



HAL
open science

L'interaction entre le suppresseur de l'ARN interférence du BNYVV et sa cible DRB4 est modulée par un ARN viral non codant

Lucie Bellott

► To cite this version:

Lucie Bellott. L'interaction entre le suppresseur de l'ARN interférence du BNYVV et sa cible DRB4 est modulée par un ARN viral non codant. Médecine humaine et pathologie. Université de Strasbourg, 2021. Français. NNT : 2021STRAJ113 . tel-03934772

HAL Id: tel-03934772

<https://theses.hal.science/tel-03934772>

Submitted on 11 Jan 2023

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

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

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé
CNRS UPR2357

THÈSE présentée par

Lucie BELLOTT

Soutenue le : 16 juillet 2021

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**
Discipline/ Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**L'interaction entre le suppresseur de l'ARN
interférence du BNYVV et sa cible DRB4 est
modulée par un ARN viral non codant**

THÈSE dirigée par :
Pr. David GILMER

Professeur, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS :
Pr. Maria Carla SALEH
Pr. Peter MOFFETT

Professeure, Institut Pasteur, Paris
Professeur, Université de Sherbrooke

EXAMINATEUR :
Dr. Sébastien PFEFFER

Directeur de recherches, Institut de biologie moléculaire et
cellulaire, Strasbourg

Remerciements

Je tiens à adresser mes plus sincères remerciements aux membres du jury, Maria Carla Saleh, Sébastien Pfeffer et Peter Moffett, d'avoir accepté d'évaluer ce manuscrit.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse David Gilmer pour m'avoir accueilli dans son laboratoire. Merci de m'avoir proposé ce stage de master 2 alors que je me trouvais dans une situation délicate. Merci de m'avoir tant préparé pour le concours de l'école doctorale et tous les oraux qui ont suivi. Merci pour ton investissement et ta disponibilité lors de la correction de ce manuscrit et des divers rapports, compte-rendu, dossiers que je devais fournir.

Merci à mon co-encadrant, Fabrice Michel, pour ces (presque) 10 années. L'aventure commença au 420-423, et je suis ravie qu'elle se soit poursuivie jusqu'ici. Pour toutes ces supervisions de stages, de master et surtout durant ces quatre années de thèse, je te remercie pour ta présence, ta confiance et ton soutien constants.

Je remercie mes collègues du labo 409, particulièrement Danièle Scheidecker pour ta gentillesse et toute l'aide que tu nous fournies au quotidien. Salah Bouzoubaa, merci pour tous ces clones que je t'ai « emprunté », ta disponibilité et ta bonne humeur permanente. Je remercie Janine Kehrli pour l'aide qu'elle m'a apporté lors de son stage. Merci à toutes les personnes de l'institut qui ont rendu ma vie plus douce pendant ces années. Merci pour les moments que nous avons partagé ensemble : petit-déjeuner, apéro, repas à la Kfet, barbecue etc...

Je remercie l'équipe pédagogique de virologie pour m'avoir permis de réaliser cette année d'ATER avec vous. Maria Dimitrova et Corinne Schmitt-Keichinger, merci à vous deux particulièrement de m'avoir si bien formée, laissé pratiquer ces enseignements en grande autonomie. Sachez que j'ai pris beaucoup de plaisir à enseigner à vos côtés. Salah Bouzoubaa, merci de m'avoir transmis tous tes petits secrets pour la réussite de cette expérience.

Ma benchmate, Réré. Merci pour tout, tout simplement. Cette expérience aura eu une toute autre saveur grâce à toi.

Je tiens à remercier Hélène Scheer pour son aide dans la génération des lignées transgéniques de *N. benthamiana*. Merci à toi pour cette organisation, ce travail d'équipe pour générer ces plantes. Merci aussi à Louis-Valentin Méteignier pour ta relecture de la revue, tes précieux conseils et protocoles.

Ma reconnaissance et mes remerciements infinis sont dédiés à mes grands-parents. Je vous remercie de nous avoir accueilli, moi et Léon, pendant près de 5 ans. Merci d'avoir partagé votre vie avec nous. Depuis notre emménagement à Strasbourg, je ne compte plus les kilomètres que vous avez fait pour venir le récupérer à l'école, l'emmener à ses activités périscolaires etc... Merci à vous, merci pour lui, de l'avoir gardé tous les mercredis, toutes ces vacances scolaires. Notre vie à tous les deux serait tout autre sans vous, et vous avez, pour cela, toute ma gratitude.

Je tiens à remercier mes proches et ami(e)s pour leur soutien. Maman, force de la nature et réel modèle, je te remercie pour tout. J'espère un jour réussir à approcher la maman que tu es. Merci pour toutes ces valeurs.

Mon petit (grand ?) Léon. Peut-être qu'un jour tu aimeras la lecture et tu tomberas sur ces quelques lignes. Du haut de tes sept ans, je ne peux que te remercier d'être l'enfant que tu es. Tu as rempli ma vie d'une douceur incroyable et fais de moi une maman comblée. Je t'aime ma crapule.

Au futur papa, merci à toi. Je n'aurai jamais assez de vocabulaire et de place ici pour t'exprimer tous mes remerciements. Merci pour tes précieux conseils, ta patience, ton soutien, ton amour. Merci pour ta contribution à ce travail, ta disponibilité pour toujours m'aider. Merci d'avoir pris le relais avec Léon pendant ces longues semaines de rédaction.

Merci (et bravo) de me supporter.

Au ventre qui pousse ...



Déclaration sur l'honneur *Declaration of Honour*

J'affirme être informé que le plagiat est une faute grave susceptible de mener à des sanctions administratives et disciplinaires pouvant aller jusqu'au renvoi de l'Université de Strasbourg et passible de poursuites devant les tribunaux de la République Française.

Je suis conscient(e) que l'absence de citation claire et transparente d'une source empruntée à un tiers (texte, idée, raisonnement ou autre création) est constitutive de plagiat.

Au vu de ce qui précède, **j'atteste sur l'honneur que le travail décrit dans mon manuscrit de thèse est un travail original et que je n'ai pas eu recours au plagiat ou à toute autre forme de fraude.**

I affirm that I am aware that plagiarism is a serious misconduct that may lead to administrative and disciplinary sanctions up to dismissal from the University of Strasbourg and liable to prosecution in the courts of the French Republic.

I am aware that the absence of a clear and transparent citation of a source borrowed from a third party (text, idea, reasoning or other creation) is constitutive of plagiarism.

*In view of the foregoing, **I hereby certify that the work described in my thesis manuscript is original work and that I have not resorted to plagiarism or any other form of fraud.***

Nom : Bellott Prénom : Lucie

Ecole doctorale : ED414

Laboratoire : CNRS-IBMP-Laboratoire Gilmer-Ziegler-Graff

Date : 16/08/2021

Table des matières

Liste des abréviations	1
Liste des virus cités	3
1. Introduction générale	4
1.1. Bellott, L., Gilmer, D. and Michel, F. (2019). Hit two birds with one stone: the multiple properties of (viral) RNA silencing suppressors. <i>Virologie</i> 23, 38-60.	6
1.2. Les protéines DRB, cofacteurs essentiels des <i>Dicer-like proteins</i>	30
1.3. Notre modèle viral, le beet necrotic yellow vein virus	40
1.4. Objectifs de la thèse	47
2. Matériels et méthodes.....	49
2.1. Matériels	50
2.1.1. Matériel végétal.....	50
2.1.1.1. <i>Chenopodium quinoa</i>	50
2.1.1.2. <i>Nicotiana benthamiana</i>	50
2.1.2. Souches bactériennes	50
2.1.2.1. <i>Escherichia coli</i>	50
2.1.2.2. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	51
2.1.3. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	51
2.1.4. Vecteurs de clonage et d'expression	52
2.1.5. Milieux de culture	54
2.2. Méthodes.....	55
2.2.1. Techniques de transformation et d'expression de protéine et d'ARN.....	55
2.2.1.1. Transformation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> et agroinfiltration	55
2.2.1.2. Transformation d' <i>Escherichia coli</i>	55
2.2.1.2.1. Transformation par choc thermique.....	55
2.2.1.2.2. Transformation par électroporation.....	56
2.2.1.3. Transformation des levures.....	56
2.2.1.4. Transformation et sélection d' <i>Arabidopsis thaliana</i> transformées par <i>floral dip</i>	56
2.2.1.5. Transformation et sélection de <i>Nicotiana benthamiana</i> transgéniques ...	57
2.2.2. Synthèse, extraction et analyse des ARN	58
2.2.2.1. Synthèse des ARN infectieux par transcription <i>in vitro</i>	58
2.2.2.2. Inoculation des ARN viraux.....	58

2.2.2.3.	Synthèse des sondes radioactives	59
2.2.2.3.1.	Sondes ADN marquées à l' [α - ³² P]dCTP	59
2.2.2.3.2.	Sondes ARN marquées à l' [α - ³² P]UTP	59
2.2.2.4.	Extraction et analyse des ARN de haut poids moléculaires par northern blot	60
2.2.2.5.	Extraction et analyse des ARN de petits poids moléculaires par northern blot	61
2.2.3.	Extraction et analyse des protéines.....	61
2.2.3.1.	Extraction de protéines de matériel végétal	61
2.2.3.2.	Extraction de protéines de levures.....	62
2.2.3.3.	Analyse des protéines par western blot.....	62
2.2.3.3.1.	Séparation des protéines par gel SDS-PAGE	62
2.2.3.3.2.	Transfert et immunodétection des protéines	62
2.2.4.	Clonage	63
2.2.4.1.	Techniques de clonage conventionnel	63
2.2.4.1.1.	Amplification d'un fragment d'ADN à partir d'une matrice d'ADN	63
2.2.4.1.2.	Amplification d'un gène par RT-PCR	63
2.2.4.1.3.	Digestion par enzymes de restriction	64
2.2.4.1.4.	Déphosphorylation du vecteur	64
2.2.4.1.5.	Purification d'acides nucléiques au phénol/chloroforme/alcool isoamylique.....	64
2.2.4.1.6.	Précipitation des acides nucléiques.....	65
2.2.4.1.7.	Analyse des fragments par électrophorèse	65
2.2.4.1.8.	Ligation.....	65
2.2.4.1.9.	Sélection des plasmides recombinants.....	65
2.2.4.1.10.	Amplification et purification de plasmides recombinants.....	66
2.2.4.1.11.	Analyse des plasmides recombinants par séquençage	66
2.2.4.2.	Clonage Golden Gate	66
2.2.4.2.1.	Principe	66
2.2.4.2.2.	Clonage et ligation	67
2.2.5.	Localisation cellulaire et tests d'interaction <i>in vivo</i>	67
2.2.5.1.	Test d'interaction protéine-ARN par triple hybride de levures.....	67
2.2.5.2.	Test d'interaction protéine-protéine par double hybride de levures	68
2.2.5.3.	(Co-)Localisation <i>in situ</i> de protéines par microscopie confocale	68
2.2.5.4.	Recherche d'interaction protéine-protéine <i>in situ</i> par FRET-FLIM	68

2.2.6. Fractionnement subcellulaire - Isolement de noyaux de <i>Nicotiana benthamiana</i>	69
3. Résultats.....	71
3.1. Chapitre 1 : Caractérisation des partenaires de la protéine p14 en contexte infectieux.....	72
3.2. Lucie Bellott ¹ , Kamal Hleibieh ¹ , Philippe Hammann ² , Johana Chicher ² , Fabrice Michel ^{1,*} and David Gilmer ^{1,*} . Viral RNA silencing suppressor and DCL4-associated DRB4 protein interaction is modulated by a viral long non coding-RNA	86
4. Conclusions et discussion	113
4.1. Conclusions	114
4.2. Discussion.....	116
4.3. Modèles envisagés dans l'hôte <i>Beta</i>	123
5. Bibliographie	125
6. Annexes.....	133
6.1. Bellott, L., Gilmer, D. and Michel, F. (2019). D'une pierre deux coups : Les multiples caractéristiques des suppresseurs d'ARN interférence (viraux). <i>Virologie</i> . 23, 38-60.	134
6.2. Bellott, L., Chaib, A., Petitjean, O., Rigo, P. and Gilmer, D. (2017). Apports et enseignements de la virologie en biologie contemporaine. <i>Virologie</i> . 21, 199-210.....	159

Liste des abréviations

°C : degré Celsius	endoIR-siRNA : endogenous inverted repeat siRNA
AD : activation domain	GAM : goat anti-mouse
ADN : acide désoxyribonucléique	GAR : goat anti-rabbit
ADNc/cDNA : ADN complémentaire	GFP : green fluorescent protein
AGO : Argonaute	h : heure
ARN : acide ribonucléique	HA : hémagglutinine
BD : binding domain	HEL : helicase
BET : bromure d'éthidium	HEPES : acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique
BiFC : bimolecular fluorescence complementation	HYL1 : hyponastic leaves 1
BSA : bovine serum albumin	kDa : kilodalton
CP : coat protein	LB (milieu de culture) : Luria-Bertani/Lysogeny broth
CPL1 : C-terminal domain phosphatase-like1	LB : left border
CRP : cysteine rich protein	miARN : microARN
db : double brin	min : minute
D-bodies : dicing bodies	MS : murashige et Skoog
DCL : dicer-like	MTR : méthyl-transférase
Dcr : dicer	nc : non-codant
DO : densité optique	NES : nuclear export signal
DRB : double-stranded RNA binding protein	NLS : nuclear localisation sequence
dsRBD : double-stranded RNA binding domain	nm : nanomètre
EDTA : acide éthylène diamine tétra-acétique	NoLS : nucleolar localization signal
eGFP : enhanced green fluorescent protein	NOS : nopaline synthase
	nt : nucleotide
	ORF : open reading frame

p/v : poids pour volume
 p4-siRNA : polymeraseIV-siRNA
 PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis
 UV : ultraviolet
 PAMP : pathogen-associated molecular pattern
 pBin : plasmide binaire
 PCR : polymerase chain reaction
 pH : potential hydrogène
 phasiRNA : phased-siRNA
 POL : polymérase
 Pre-miARN : precursor-miRNA
 Pri-miARN : primary-miRNA
 PRO : protéase
 PTGS : post transcriptional gene silencing
 PTI : PAMP triggered immunity
 PVDF : polyvinylidene fluoride
 RB : right border
 RdDM: RNA-directed DNA methylation
 RDRP : RNA-dependent RNA polymerase
 Rep : réplicon
 RT : read-through
 sb : simple brin
 SD : synthetic defined
 SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
 SE : Serrate
 sec : seconde
 siARN : small interfering ARN
 SSC : saline sodium citrate
 sub : subgenomic
 ta-siRNA : trans-acting siRNA
 T-DNA : ADN de transfert
 TGB : triple gene block
 TGS : transcriptional gene silencing
 Ti : tumor inducing
 TIR-NBS-LRR : Toll/interleukin receptor-nucleotide-binding site - Leucine-rich repeat
 tRFP : tag red fluorescent protein
 TSS : transcription start site
 U : unité
 UTR : untranslated region
 VIGS : virus induced gene silencing
 VRC : viral replication complexes
 vsiARN : siRNA viraux
 VSR : Viral Suppressor of RNA silencing
 WT : wild-type
 XRN : exoribonuclease
 ZnF : zinc-finger

Liste des virus cités

BCTV : beet curly top virus

BdMV : burdock mottle virus

BNYVV : beet necrotic yellow vein virus

BSBMV : beet soil-borne mosaic virus

BSMV : barley stripe mosaic virus

CaMV : cauliflower mosaic virus

CMV : cucumber mosaic virus

CPMV : cowpea mosaic virus

GFLV : grapevine fan leaf virus

PVX : potato virus X

RSNV : rice stripe necrosis virus

TAV : tomato aspermy virus

TBSV : tomato bushy stunt virus

TCV : turnip crinkle virus

TMV : tobacco mosaic virus

TRV : tobacco rattle virus

TSWV : tomato spotted wilt virus

TuMV : turnip mosaic virus

TuYV : turnip yellows virus

TYMV : turnip yellow mosaic virus

1. Introduction générale

Introduction générale

Dans un contexte de course à l'armement constant vu au travers de l'évolution humaine, l'ensemble des organismes est soumis à des atteintes menaçant leur intégrité. D'un point de vue cellulaire et moléculaire, les organismes se défendent contre les attaques d'autres entités (micro-organismes, virus) en déployant des mesures visant à confiner l'agresseur, le neutraliser ou sacrifier une partie de l'organisme pour en préserver le reste. Les agresseurs quant à eux, déploient des stratégies visant à contourner ces moyens coercitifs. Chez les plantes, les premiers mécanismes de défense décrits concernent la résistance gène-pour-gène (Flor, 1971) suivie de la découverte de l'interférence par l'ARN (Baulcombe, 2004; Ratcliff et al., 1997) puis des résistances multigéniques et récessives (Lellis et al., 2002; Ruffel et al., 2002). Si ces découvertes datent du siècle dernier, leur mise en place remonte à des spéciations évolutives ancestrales.

Cette introduction générale abordera les aspects globaux de contre-défense virales mis en place à l'encontre du mécanisme de résistance appelé "interférence par l'ARN" au travers de la revue publiée dans *Virologie* et intitulée "*Hit two birds with one stone: the multiple properties of (viral) RNA silencing suppressors*" dont la version française intitulée "D'une pierre deux coups : les multiples caractéristiques des suppresseurs (viraux) de l'interférence par l'ARN" se trouve en annexe de ce manuscrit. Cette revue est suivie d'une introduction sur les protéines DRB exerçant une action régulatrice des mécanismes de l'ARN interférence puis une présentation du modèle viral étudié au laboratoire, le virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave. Les objectifs de la thèse sont exposés à la fin de cette partie introductive.

1.1. Bellott, L., Gilmer, D. and Michel, F. (2019). Hit two birds with one stone: the multiple properties of (viral) RNA silencing suppressors. *Virologie* 23, 38-60.

Hit two birds with one stone: the multiple properties of (viral) RNA silencing suppressors

D'une pierre deux coups : les multiples caractéristiques des suppresseurs (viraux) de l'interférence par l'ARN

Lucie Bellott
David Gilmer
Fabrice Michel

Université de Strasbourg,
Institut de biologie moléculaire
des plantes, CNRS,
12, rue du Général-Zimmer,
67084 Strasbourg, France

Abstract. In any organism, gene expression regulation is provided by multiple factors to maintain a harmonious development of individuals. Discovered in the late 1990s, RNA interference (RNAi) completely remodelled the way in which gene expression regulations were initially apprehended. RNAi provides fine regulation at the cellular level and allows organisms to control their development, maintain their genomic integrity and fight against different stresses like viral infection. Exogenous or endogenous double-stranded RNAs initiate RNAi and are recognized and cleaved by Dicer protein in about twenty nucleotide duplexes small RNAs (sRNAs). One strand of the duplex is loaded into a ribonucleoprotein complex, named RISC (RNA induced silencing complex), composed of at least one ARGONAUTE protein and a sRNA. Therefore, the expression of any RNA possessing the complementary siRNA sequence will be specifically silenced either at the transcriptional or post-transcriptional level. RNAi plays a prominent role in the defence against viral infection and the last two decades of research have refined our knowledge of proteins involved in this pathway. Many viruses counteract the antiviral action of RNAi through the expression of factors (VSR, Viral suppressor of RNA silencing) that were first identified on virally infected plants. However, in mammals the antiviral role of RNAi remains controversial. Indeed, viral infections are controlled by the interferon response and the antiviral action of RNAi has not been clearly demonstrated *in vivo*. In this review, the main modes of defence suppression used by VSR and endogenous RNAi suppressors will be presented. Finally, the role of viral non-coding RNAs (ncRNAs) acting as suppressors of RNAi will be discussed.

Key words : VSR, silencing, PTGS, RNAi, ncRNA, siRNA

Résumé. La régulation de l'expression des gènes est assurée chez tous les organismes pour maintenir un développement harmonieux de l'individu. Découverte à la fin des années 1990, l'ARN interférence a complètement révolutionné la façon dont étaient conçues ces régulations. L'ARN double brin est la molécule initiatrice de cette voie et sera reconnu puis clivé par une protéine Dicer en duplex d'une vingtaine de nucléotides : les petits ARN interférents ou siARN (*small interfering ARN*). L'un des brins du duplex est alors incorporé dans un complexe ribonucléoprotéique, RISC (*RNA induced silencing complex*), avec une protéine ARGONAUTE. Dès lors, l'expression de tout ARN qui possède la séquence complémentaire au siARN sera réprimée au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel. Cette spécificité de séquence assure une régulation fine au niveau cellulaire et permet aux organismes de contrôler leur développement, maintenir leur intégrité génomique et lutter contre différents stress. En cas d'infection virale, l'ARN interférence est particulièrement sollicitée puisque de nombreuses molécules d'ARN exogènes sont néo-synthétisées. Cette action antivirale associée à l'ARN interférence fut découverte chez les plantes à l'aube du XXI^{ème} siècle. Depuis, deux décennies de recherche

Correspondence : D. Gilmer : F. Michel
<gilmer@unistra.fr>
<fabrice.michel@ibmp-cnrs.unistra.fr>

ont permis d'affiner nos connaissances sur les multiples protéines impliquées dans cette voie et aussi de découvrir des protéines capables de supprimer l'ARN interférence (VSR, *Viral suppressor of RNA silencing*). Les premiers VSR ont été identifiés sur des plantes virosées et permettent aux virus de contourner la défense antivirale de la plante. Chez les mammifères, le rôle antiviral de l'ARN interférence reste discuté par la communauté scientifique. En effet, l'infection virale y est contrôlée par la réponse interféron et le rôle de l'ARN interférence n'a pas été formellement démontré *in vivo*. Les principaux modes de suppression usités par les VSR, qu'ils soient exprimés par des virus animaux ou végétaux, seront présentés dans cette revue et accompagnés par la description de suppresseurs endogènes. Enfin, ces différents modèles de suppression seront complétés et complexifiés par les ARN viraux non codants (ARNnc). La suppression du *silencing* n'est pas restreinte aux VSR de nature protéique et plusieurs exemples d'ARNnc viraux assurant cette même fonction seront présentés.

Mots clés: VSR, *Silencing*, PTGS, ARNi, ncARN, siARN

Introduction

RNAi or RNA silencing was initially observed on petunias in 1990 [1, 2], and was further characterized in 1998 by A. Fire and C. Mello in *Caenorhabditis elegans* [3]. This mechanism controls stress responses [4], development [5] and protects genome integrity from mobile elements such as transposons [6]. Found from unicellular [7] to human species [8], it is mediated by 21 to 30 nucleotides (nt) sequence specific long RNAs that inhibit gene expression at the transcriptional level (TGS: transcriptional gene silencing) [9, 10] and at the post-transcriptional level (PTGS: post-transcriptional gene silencing) [11]. Double-stranded RNA (dsRNA), the initiating molecule of RNAi [3], is produced by viral infections, or by RNA-dependent RNA polymerases (RDR), or transcription of inverted repeat or convergent regions [12, 13]. These dsRNAs are recognized and then cleaved by a type III endoribonuclease, Dicer [14], which generates duplexes of small RNAs (sRNAs). They are divided into two major classes: small interfering RNA (siRNA) and microRNA (miRNA). Although they diverge in their origins (endogenous and/or exogenous), biogenesis pathways and targets, their mode of action remains similar. These sRNAs are loaded into one ARGONAUTE (AGO) protein and unwinded to generate single-stranded RNAs (ssRNAs) [15]. One strand is displaced from AGO, the other one (guide strand) is retained to make the functional RISC complex. The guide strand recognizes by base complementary a targeted nucleotide sequence [16]. The effector RISC initiates either PTGS through translational inhibition or messenger RNAs (mRNAs) cleavage through the endonucleotidic activity (slicer) of AGOs proteins [17] or TGS by regulating DNA or histones methylation through proteins able to alter chromatin states [10]. Whether RNAi induces post-transcriptional or transcriptional silencing

depends on the organism, the AGO protein and the nature of the small RNA loaded into AGO. In addition to preserving and regulating genome expression, RNA interference has an essential antiviral function in invertebrates [18] and in plants but remains controversial in mammals [19]. In 1999, one year after the publication of the Fire and Mello work, an antiviral action has been associated with RNA silencing in plants [20], but widely demonstrated at the beginning of the 21st century.

In plants, "Dicer" enzymes are named Dicer-like or DCL [21]. DCL1 generates miRNAs (*figure 1*) while DCL3 is responsible for the synthesis of endogenous 24 nt siRNAs involved in TGS [22, 23]. DCL4 is the main antiviral DCL and generates 21 nt siRNAs. In the absence of DCL4 activity, DCL2 protein has a redundant antiviral action and generates 22 nt siRNAs [24]. During RNA virus infection, double-stranded replication intermediates generated by the viral RDR and/or viral intramolecular fold-back RNA structures are DCL4 substrates, thus generating 21 nt viral siRNAs (vsiRNAs). They possess a phosphate group at the 5' end and 2 nt overhang at the 3' hydroxyl end [25, 26] where they are protected from uridylation and degradation by a methyl group added by the methyl-transferase HEN1 [27, 28].

In the model plant *Arabidopsis thaliana*, ten AGO proteins have been identified. The guide strand loaded into AGO is positioned at its 3' end in the PAZ domain [29, 30] while the 5' phosphate end is located in a pocket at the interface of MID/A and PIWI/B domains [31]. This folding is forming the PIWI domain which exhibits an RNase H-like structure and is responsible for target RNA cleavage [32]. Such slicing activity has been demonstrated only for AGO1, AGO2, AGO4 and AGO7 [33-36]. AGO1 and AGO2 are the major anti-viral AGO proteins against RNA viruses while AGO5, AGO7 and AGO10 have a minor role in antiviral defence

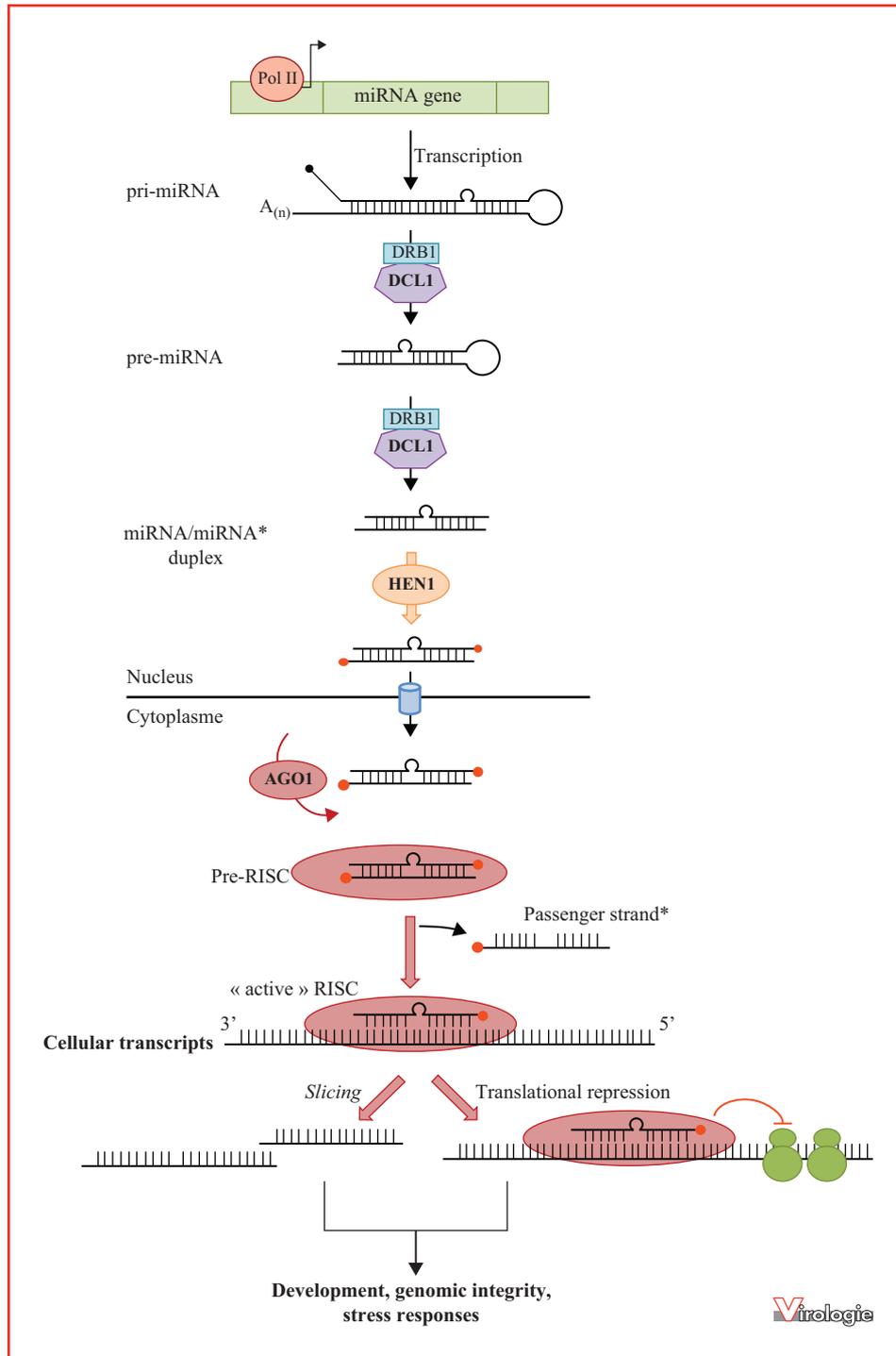


Figure 1. Simplified representation of plant miRNA biogenesis and modes of action. Pri-miRNAs are transcribed by RNA polymerase II, capped (black sphere) and polyadenylated (A_(n)). DCL1 and its cofactors, including DRB1 (double-stranded RNA binding 1, also referred to HYL1), ensure their processing into pre-miRNA. MiRNA duplexes are obtained following a second dicing step and methylated at their 3' end by HEN1 (orange sphere). The duplex is exported into the cytoplasm and loaded into AGO1 to form the pre-RISC complex. The passenger strand is removed and the “active” RISC complex ensures cell transcripts silencing by their cleavage or by inhibiting their translation through their base-pairing complementarity to the guide strand.

[34, 37–39]. Immunity against DNA viruses is mainly provided by AGO4 involved in TGS, where it regulates methylation levels of viral and cellular DNAs [40–42].

The formation of RISC has been a matter of debate for a long time, and two models were proposed: on the one hand, the RNA duplex is separated prior to guide strand loading into AGO, whereas on the other hand, the duplex in its double-stranded form is loaded into AGO and the selection of the guide strand, as well as the dissociation of both strands take place within the RISC. This latter model seems to be favoured following the discovery of small dsRNA loaded into human and *Drosophila* AGO proteins [43, 44]. Guide strand selection is not random but relies on duplexes thermodynamic stability: the strand having a lower stability at its 5' end is selected as a guide and the other, called “passenger”, is eliminated [45, 46]. In *A. thaliana*, a base-dependent selective bias at the 5' end of the small RNA seems to favour the recruitment of AGO proteins: AGO1 tends to select strands with uracil whereas AGO2 and AGO4 select those with adenine and AGO5 has a preference for cytosine [47, 48]. This specificity has also been explained according to the structural resolution of the human AGO2 MID (middle) domain. Several studies have shown that selection of the guide strand in AGO was subjected to a strong bias according to the base present at the 5' end of miRNAs [49, 50]. A rigid loop of the MID domain ensures the specific recognition of adenosine monophosphate and uridine monophosphate, while its affinity for cytidine monophosphate and guanosine monophosphate is thirty times lower. In addition, when mutations are introduced in the loop domain, this specificity is no longer ensured and confirms the major role of the MID domain in this selective process [51]. When a perfect RNA duplex (case for siRNA) is loaded into AGO, the passenger strand can be cleaved and degraded [52–54]. In cleavage-deficient AGOs, the elimination process of the passenger strand remains poorly documented. Nevertheless, a mirror model has been proposed when the pre-RISC complex is loaded with an imperfect hybrid duplex miRNA-miRNA* [55].

In plants, viral RNAs are targeted by the guide strand through base complementarity and will be mostly cleaved by AGO1 or AGO2 to restrict viral infection. The cleavage products are used as a template by cellular RNA dependent RNA polymerases (RDRP or RDR) [56]. RDR6 is the major RNA polymerase involved in silencing amplification [57, 58] and, in association with its major cofactor SGS3 (suppressor of gene silencing 3) [59, 60], ensures *de novo* synthesis of dsRNAs processed by DCLs, which generate the so-called “secondary” vsRNAs (figure 2, left and figure 3). This population of siRNAs can traffic through plasmodesmata to reach the plant vascular system and confers extensive antiviral immunity [61, 62].

Phytoviruses have evolved to express suppressors of RNA interference (VSR: viral suppressors of RNA silencing) to counteract this antiviral defence. These are principally proteins, although nucleic acid VSRs have been recently described. Virtually, all viruses express such counter-defence elements, but no sequence neither structure similarities have been established [63], suggesting that evolutionary convergence of such a viral function is likely. This convergence is enhanced by the various VSRs mechanisms already characterized, targeting multiple steps of the RNA interference pathway. This review will focus on presenting the different silencing suppression strategies employed by VSRs, without pretending to make their exhaustive list.

Discovery of VSRs

The tobacco etch virus (TEV) HC-Pro protein (helper component proteinase) was the first described VSR and confirmed the antiviral function of RNA silencing. Symptoms exacerbation of co-infected plants with potato virus Y (PVY) and potato virus X (PVX) was initially attributed to the potyviral HC-Pro expression, described as a broad-spectrum pathogenicity enhancer that increases heterologous virus replication. Transgenic expression of HC-Pro is sufficient to increase symptoms severity and accumulation of tobacco mosaic virus (TMV), cucumber mosaic virus (CMV) and PVX genomic RNAs [64]. In addition, HC-Pro is essential for viral long-distance movement [65]. Among the hypotheses about HC-Pro functions, it was suggested that the protein can inhibit a cellular defence mechanism [65]. Following RNA silencing discovery, this hypothesis was validated and HC-Pro became the first identified VSR [66]. After multiple studies, HC-Pro appeared as a multifunctional VSR able to target several steps of the RNA silencing pathway. HC-Pro limits RNA interference establishment by sequestering vsRNAs and therefore limits RISC assembly [67, 68]. HC-Pro also decreases small RNAs methylation levels, by interacting on the one hand with HEN1 [69] and on the other hand with two key enzymes regulating the methionine biosynthesis cycle [70]. In addition, HC-Pro interacts with AGO1 at the ribosomal level and counteracts its translational inhibition function. Moreover, HC-Pro causes a decrease of AGO1 mRNA expression level by inducing the expression of miR168, a microRNA targeting AGO mRNA [71]. HC-Pro is not the only RNA silencing suppressor described in potyviruses. The VPg protein is also able to interact with SGS3, the cofactor of RDR6, to initiate its degradation by the proteasome and by autophagy. RDR6 subsequent degradation is observed

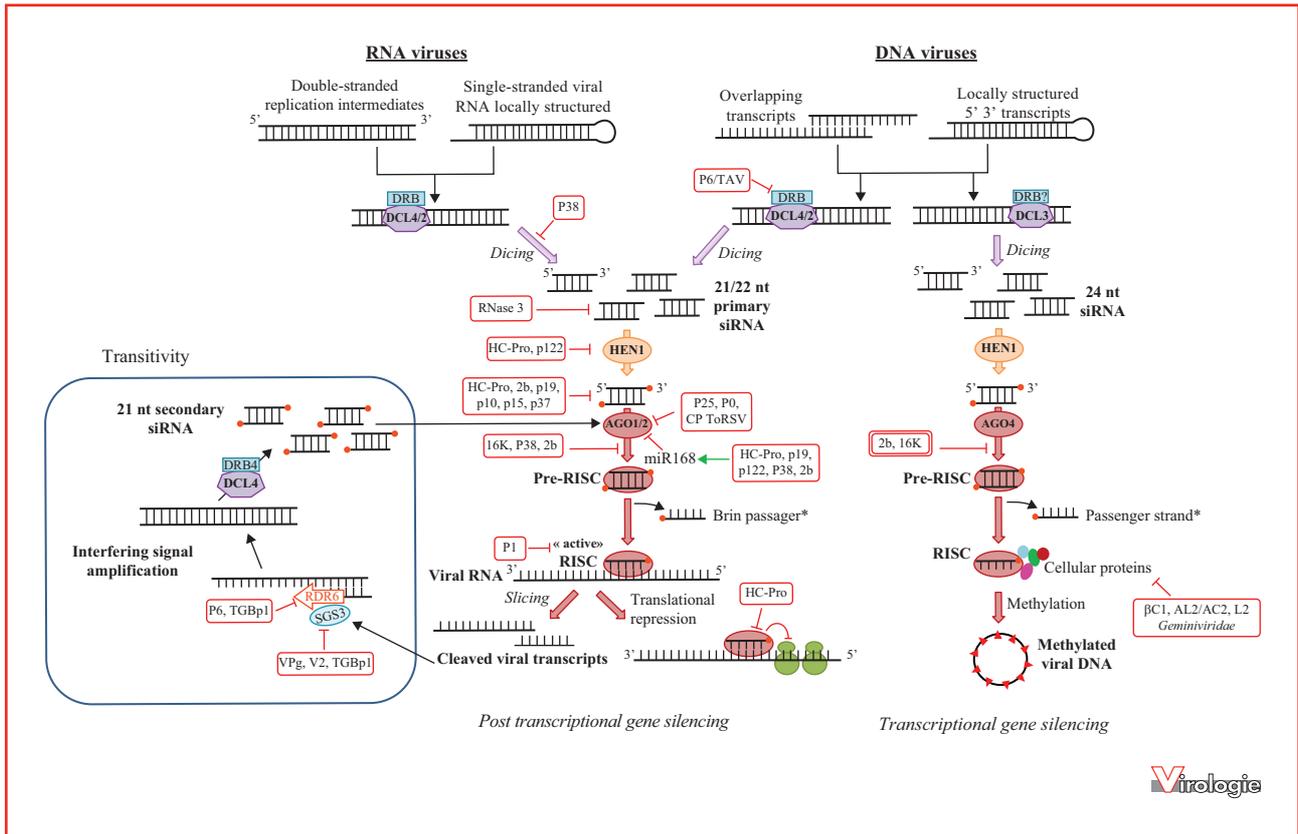


Figure 2. Graphical representation of antiviral defense provided by RNA interference and counter-defenses mediated by VSR. Replication intermediates (double-stranded RNA) and/or double-stranded structures of RNA viruses as well as overlapping and/or locally structured transcripts of DNA viruses are recognized and cleaved (dicing) by Dicer-like enzymes (DCL). DCLs are associated with their DRB (double-stranded RNA binding) cofactors to generate primary small interfering RNAs duplexes (siRNAs). A methyl group (orange sphere) is added to each 3' hydroxyl end of the duplex by HEN1 (Hua enhancer 1). SiRNAs are loaded into an ARGONAUTE protein (AGO) to form the pre-RISC complex (RNA induced silencing complex). One of the duplex strand, then named passenger strand, is eliminated to form the active RISC complex. When infected with RNA viruses, viral transcripts are targeted by base complementarity with the guide strand loaded in AGO and will be mainly cleaved by AGO slicing activity. Cellular RNA dependent RNA polymerases (RDRs) make use of cleavage products to amplify the interfering signal. Secondary siRNAs are generated by DCL4 and associate with AGO to form RISC complexes. Regarding DNA viruses, cellular proteins involved in DNA methylation associate with RISC to initiate the methylation of the viral genome (red triangles). VSRs are represented in red boxes. VSRs expressed by RNA viruses for which an action has been demonstrated in TGS are framed by a double line. *Geminiviridae* express VSRs that inhibit the activity of cellular proteins involved in methylation [192, 193].

and seems to be correlated to that of SGS3 [72]. This VPg-SGS3 interaction is described for four potyviruses that diverge in nucleotide sequence and host spectrum [72, 73].

The 2b protein of some cucumoviruses was among the first VSRs described in 1998 [74]. Co-localization and immunoprecipitation experiments revealed a nuclear and cytoplasmic interaction of 2b with AGO1 that correlated with a decrease in AGO1 slicing activity [75]. Similarly, the nuclear interaction between 2b and AGO4 restricts its endonucleolytic activity [40]. However, binding to these cellular factors is not the only suppression mechanism used

by 2b protein. Its binding to small RNAs also appears critical for effective viral counter-defence [76]. A recent study modelling the 2b protein structure proposes a tetrameric complex in which each dimer interacts with a siRNA duplex [77].

If viral dsRNAs induce silencing, few viral counter-defence mechanisms are described to inhibit this initiation step. The double-stranded forms are mostly diced by cellular DCLs to form the vsiRNAs; and these are largely targeted by various VSRs in order to limit plant antiviral response. Nevertheless, the p6 (or TAV – Transactivator/viroplasm) protein expressed by the cauliflower mosaic virus (CaMV) is a mul-

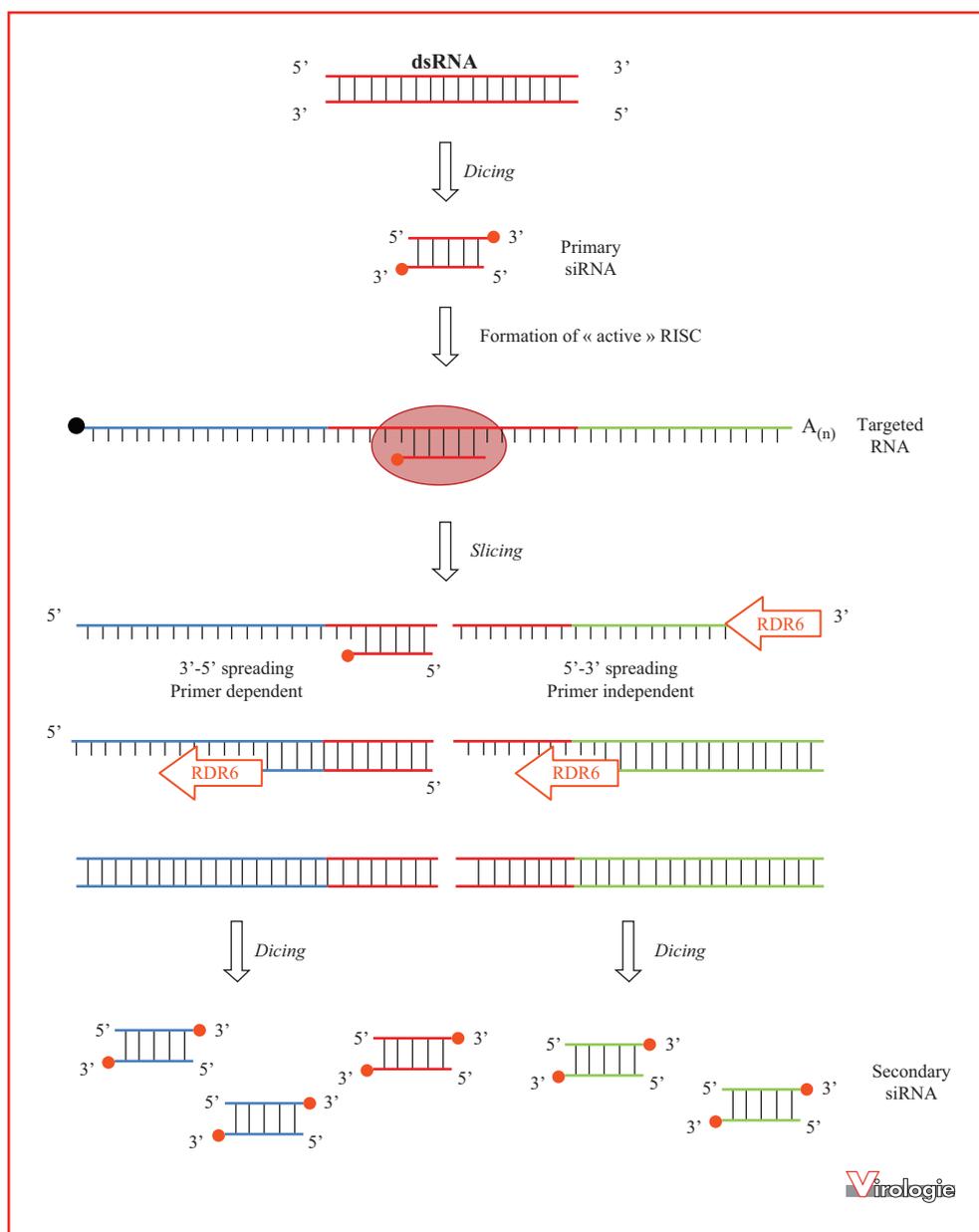


Figure 3. Transitivity mechanism representation. Following targeted RNA cleavage, primary siRNAs are used as primers by RNA-dependent RNA polymerase 6 (RDR6) to generate new dsRNA molecules (case for dependent primer spreading, left). RDR6 recruitment remains to be clarified in the independent primer spreading (right). Neo-synthesized dsRNA molecules are diced by DCLs to produce secondary siRNAs. This siRNA population is specific to the sequence targeted by primary siRNAs but also from its upstream and downstream regions, amplified by RDR6.

The black sphere represents the cap, the orange sphere the 3' methyl group and A(n) the polyadenylated tail.

titask protein that also ensure a VSR activity [78]. TAV has a cytoplasmic and nuclear localization where it interacts with DRB4 (double-stranded RNA-binding protein 4), a cofactor of DCL4. This interaction limits but does not abolish DCL4 action since 21 nt vsRNAs are still detected [79].

VSR: ubiquitous and polymorphic proteins of phytoviruses

Phytoviruses all appear to express VSR in order to counteract the antiviral defence provided by RNA interference. This first part will describe the vari-

ous strategies used by VSR that are presented in *figure 2*.

Proceed upstream of the silencing pathway: target viral siRNA

The vsiRNAs generated after Dicer cleavage can be targeted by VSRs that use various strategies (sequestration, modification and degradation) to limit their loading into RISC. Sweet potato chlorotic stunt virus (SPCSV) expresses RNase type III (RNase 3) which cleaves vsiRNA into 14 nt fragments that cannot be loaded into RISC, limiting the antiviral defence [80]. To date, this direct degradation of vsiRNA by a viral enzyme is the only example described for a phytovirus VSR.

A strategy commonly used by VSRs consists in sequestering vsiRNAs to limit and/or prevent their loading into RISC. The p19 protein of tombusvirus is one of the best characterized VSR: p19 specifically binds siRNA duplexes and does not bind single-stranded siRNAs or small dsRNAs with blunt ends nor long dsRNAs [81]. The sequestration specificity mediated by p19 has been explained thanks to crystallographic data. P19 homodimer acts as a caliper preferably recognizing 21 nt siRNAs and its affinity slightly decreases 5-fold and 6-fold when one base pair was removed or added respectively [82, 83]. Grapevine virus A (GVA) p10 protein is a VSR also limiting the systemic spread of the silencing signal by siRNA sequestration regardless of their sequence [84]. However, p10 VSR remains less characterized than p19.

The octameric and annular structural characterization of beet yellows virus (BYV) p21 protein has also clarified its function in silencing suppression. The octamer inner surface exposed is conserved and the positively charged amino acids can bind RNAs. However, unlike p19, binding is not specific to small dsRNAs since p21 is also able to bind ssRNAs. The affinity of p21 for ssRNA increases with the size of the nucleic acid. In addition, p21 also binds DNA but with a lower affinity [85]. Therefore, p21 seems to bind nucleic acids without a real specificity. Nevertheless, the co-immunoprecipitation of p21 transiently expressed in *Nicotiana benthamiana* revealed the presence of siRNAs. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA) also confirmed p21 binding to miRNAs and siRNAs duplexes and not to their single-stranded form [67]. In addition, the formation of such complexes is not reproduced when using oligodesoxyribonucleotides, despite their strict sequence similarity to tested siRNAs [86]. These results are consistent with the higher affinity of p21 for RNAs, as previously described [85]. This ability to bind long RNAs rather than siRNAs could provide an additional layer of counter defence such as viral RNAs (replication intermediates and/or locally structures) are protected from DCL cleavage.

Other VSRs are also capable to bind siRNA duplexes. This is the case for the peanut clump virus (PCV) P15 protein which presents a unique feature in silencing suppression. The P15 protein has sufficient affinity to bind 22 nt siRNAs and inhibit their loading into the RISC. Its lower affinity for 21 nt siRNAs is counteracted by their targeting and sequestration within peroxisomes in a P15-siRNA complex [87]. This addressing relies on the PTS1 (peroxisome targeting signal 1) peptidic signal expressed at the C-terminus of the protein [88, 89]. If the PTS1 sequence is lost, 21 nt siRNAs are no longer optimally sequestered, traffic through plasmodesmata and “immunize” adjacent cells, thus limiting or blocking long-distance viral infection [87].

Limit the silencing signal amplification

Another suppression mechanism consists in inhibiting the silencing signal amplification ensured by RDR6 and its cofactors. This mechanism designated as transitivity (*figure 3*) exists in plants [56] and *C. elegans* [90] and is not found in other metazoans such as *Drosophila*. Rice yellow stunt virus (RYSV) P6 protein limits the silencing signal spreading and decreases secondary siRNAs accumulation. However, P6 has no effect on a local silencing established in transient plant expression system (by agroinfiltration) or in rice protoplasts. Its co-immunoprecipitation with RDR6, supported by their co-localization, suggests that P6 limits the action of RDR6 in the silencing signal amplification [91]. SGS3, the major cofactor of RDR6, is also targeted by several VSRs to limit transitivity. Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) V2 protein shares RNA binding properties identical to those of SGS3, including binding to dsRNAs having 5' overhangs. Indeed, a competition model has been proposed where V2 displaces SGS3 from its initial substrate [92]. The SGS3-RNA complex would then be compromised by V2, disrupting the cofactor function of SGS3 and RDR6 access to RNAs. Although the interaction between V2 and SGS3 has been demonstrated by yeast two hybrid and microscopy [93], it has not been detected in a co-purification assay using V2-GST-tagged variants [92]. A third mechanism limiting transitivity is described for TGBp1 protein of plantago asiatica mosaic virus (PIAMV). The TGBp1-mediated silencing suppression depends on its ability to form homo-oligomers that co-aggregate with RDR6 and its SGS3 cofactor [94].

Targeting AGO, the major effector protein of the RISC complex

Several VSRs target RISC whose AGO effector protein is responsible for translational inhibition or cleavage of targeted RNAs. Inducing AGO degradation is one of the strategies used to destabilize RISC.

Described in 2002 as a silencing suppressor [95], the poliovirus P0 protein contains an F-box domain necessary to bypass antiviral silencing and therefore to maintain viral pathogenicity. This F-box domain also ensures the interaction with the SKP1 (S-phase kinase related protein 1) ortholog protein in *A. thaliana* [96]. SKP1 belongs to the SCF complex (Skp, Cullin, F-box) which triggers proteins ubiquitination for proteasomal degradation. However, AGO1 degradation is maintained in presence of proteasomal inhibitor [97] and is in fact degraded through the autophagy pathway [98]. Nevertheless, the P0 protein does not seem to interact directly with AGO1 [99]. P0 does not provide viral counter-defence when AGO1 is pre-loaded with siRNA or miRNA and does not bind siRNAs *in vitro* [100]. The current model then proposes an interaction between P0 and a protein partner (to be identified) of RISC, preventing its assembly and leading to the subsequent degradation of AGO1.

Like P0, the tobacco rattle virus (TRV) 16K protein cannot inhibit pre-loaded RISC activity and does not bind small RNAs. 16K disrupts *de novo* formation of RISC and therefore limits targeted mRNA cleavage. These results are consistent with a decreased accumulation of siRNAs induced by 16K and could be explained by the interaction between 16K and AGO proteins. Indeed, protein-protein interactions between 16K and AGO1 or AGO4 have been demonstrated by BiFC (Bimolecular Fluorescence complementation) but only the interaction with AGO4 has been confirmed by co-immunoprecipitation. These data specify 16K actions on RISC but the relevance of AGO4 and/or AGO1 interactions remains to be elucidated [101].

The PVX P25 protein interacts with AGO1, AGO2, AGO3 and AGO4 but not with AGO5 and AGO9. These interactions have been detected in co-immunoprecipitation experiments following their transient co-expression in *N. benthamiana*. In this study, only AGO1 expression level decreases when co-infiltrated with P25 but is stabilized by MG132, a specific proteasome inhibitor. P25 thus seems to induce AGO1 destabilization through proteasomal degradation, although no ubiquitinated form of AGO1 could be detected [102]. However, direct interactions between P25 and AGO proteins mentioned above have not been demonstrated. An indirect interaction between P25 and AGO1 cannot be ruled out and may be explained by the absence of GW/WG motifs in P25, described as major interaction sites with AGO proteins [103].

These GW/WG motifs were first described in a human protein isolated from a serum, named GW182 because of its molecular weight and richness in glycine and tryptophan amino acids. Three paralogs of GW182 protein are expressed in vertebrates (TNRC6A/GW182, TNRC6B and TNRC6C) and one insect ortholog (GW182). Proteins

belonging to the GW182 family are well characterized [104], in particular for their direct interaction with AGO proteins mediated by their GW/WG motifs. In *A. thaliana*, *C. elegans* and *Schizosaccharomyces pombe*, some GW/WG proteins are described. They also interact with AGOs and remain necessary to ensure a functional RNA interference pathway. However, due to a lack of some other domains conservation (*i.e.* other than GW/WG), these proteins do not belong to the GW182 family although their mode of action is similar.

Viruses have taken advantage of the relevance of such interactions by expressing VSRs that contain one or more GW/WG motif(s). These motifs provide an interaction with AGO proteins and allow VSRs to destabilize the formation and/or function of RISC. The P1 protein expressed by the sweet potato mild mottle virus (SPMMV) encodes three GW/WG motifs in its N-terminal domain. Immunoprecipitation and site-directed mutagenesis experiments have shown that they are necessary to maintain VSR function and AGO1 interaction. P1 inhibits AGO1 slicing activity only when it is loaded with miRNAs or vsiRNAs [105]. This ability to inhibit AGO1 function while belonging to an “active” RISC suggests that P1 could limit AGO1 interaction with its targeted RNA. Recent studies confirmed that P1 prevents the association of AGO1-sRNA complex to the target RNA [106]. This P1-mediated inhibition, however, remains to be characterized since various models are possible. Among them, two are favoured: (1) a non-competitive inhibition where the interaction of P1 with AGO1 can modify AGO1 structure thereby altering its binding to the targeted RNA; (2) a competitive inhibition where P1 interacts with AGO1 at the targeted RNA binding site. Interestingly, studies on human AGO2 and *Drosophila* AGO1 have shown that their interaction sites for GW182 proteins and for miRNAs are partially overlapping [31, 107]. If we transpose this to plants, the competitive model (2) seems most likely. Such a mechanism was subsequently discovered for other VSRs, as the turnip crinkle virus (TCV) P38 capsid protein. P38 possesses two GW/WG motifs at its N- and C-terminal ends. Both motifs are necessary to mediate AGO1 binding and silencing suppression and GW to GA mutations prevent TCV infection. Structure prediction of P38 as a dimer allowed to locate the C-terminal GW/WG motif at the protein surface that matches with a favourable AGO1 interaction site. However, such data could not be obtained for the N-terminal GW/WG domain. In a transgenic plant constitutively expressing an inverted repeated sequence (IR) (SUC:SUL plants), the coexpression of P38 (SUC:SUL x P38) resulted in a drastic reduction in siRNA-loaded AGO1 levels (siRNAs derived from the IR), while no major effect was observed on siRNA levels when P38 was brought in *trans* by viral infection (SUC:SUL + TCV). The P38 protein therefore seems to limit small RNA loading into AGO1,

but is not very effective in suppressing silencing of active RISC [108]. Although this interaction between P38 and AGO1 is necessary to ensure viral cycle progression, other mechanisms have also been described. *In vitro*, P38 is able to bind long dsRNAs regardless of their size as well as 21 nt siRNA duplexes [109-111]. In GFP and P38 transient co-expression experiments, GFP siRNAs are not detected and long GFP dsRNA are stabilised instead [109, 110]. According to these results, P38 could prevent DCLs access to dsRNAs, limiting their cleavage and subsequent biogenesis of vsiRNAs [110, 111]. A link was recently established between the P38-AGO1 interaction and dsRNA binding: mutation in the GW motif prevents AGO1 and RNAs binding [111]. P38 interaction with AGO1 could promote *in vivo* vsiRNA binding and sequestration. Thus, P38 could target two distinct steps in the silencing pathway, where its functional orientation could be finely regulated and coordinated during viral infection.

AGO1 stability is not affected by its interaction with P1 (SPMMV) or P38 (TCV) proteins. Conversely, the capsid protein CP and VSR of tomato ringspot virus (ToRSV) appears to induce a severe degradation of AGO1 by autophagy. This degradation relies on the interaction between CP and AGO1 *via* a GW/WG motif [112]. However, the study of pelargonium line pattern virus (PLPV) p37 protein has slightly complicated the relationship between a GW/WG motif, AGO1 interaction and silencing suppression. Although p37 possesses a GW/WG motif involved in its silencing suppression function, its VSR action is most likely explained by its binding to small RNAs. Indeed, a functional link between RNA binding and silencing suppression rather than an interaction with AGO1 has been established by studying p37 variants mutated in residues encompassing the GW motif [111].

Altogether, it appears that a broad spectrum of VSR proteins interact with AGO1, but that it is not always sufficient to confer a *bona fide* silencing suppressor function. Indeed, VSRs could at the same time affect other AGO proteins as described for the SPMMV P1 protein for which AGO2 binding is also reported. The biological significance of this interaction is not explained because no AGO2 inhibition has been observed in this context [106].

While no sequence homology is identified between VSRs, there is nevertheless a common counter-defence strategy developed by unrelated viruses. AGO1 homeostasis is partly regulated by miR168. In response to viral infection, AGO1 mRNA levels increase and miR168 expression is specifically induced by diverse VSRs such as crucifer-infecting Tobamovirus (crTMV) p122, cymbidium ringspot virus (CymRSV) p19, TCV p38, HC-Pro TEV or CMV 2b. This increase in miR168 accumulation causes a drastic reduction in AGO1 protein accumulation [71]. In addition to this conserved mechanism within distinct viral fami-

lies, each VSRs studied also displays an additional way to suppress silencing (vsiRNA sequestration, interaction with AGO, *etc.*). Thus, the coupling between induction of miR168 and specific action of each VSR seems favourable to these viruses, targeting several steps or distinct effectors in the silencing pathway.

Taking advantage of endogenous suppressors

PTGS was initially associated with a plant defence mechanism that can be bypassed by VSRs-encoding viruses. In addition to these so-called VSRs, PTGS is also ensured by endogenous suppressors. Such gene products are necessary to downregulate RNAi. This is particularly essential in organisms where signal amplification and long distance movement of RNAi take place. Indeed, without regulating factors involved in these two mechanisms (transitivity and spreading), the whole organism could be affected by the presence of numerous RNAs used as templates for dsRNA production leading to deleterious silencing of endogenous genes. The function of these endogenous suppressors can be hijacked from their initial cellular task by viruses to enhance their suppression of RNA silencing. Such a situation is reminiscent of the discovery of *iap* (inhibitor of apoptosis) genes, whose prototype was discovered in baculoviruses and orthologs then identified from yeast to humans [113]. Nt-Rgs-CaM protein (regulator of gene silencing-calmodulin-like) of *Nicotiana tabacum* was the first endogenous suppressor characterized. It was identified in a yeast two hybrid screen using the HC-Pro VSR as a bait. Overexpression of Rgs-CaM induces tumors in transgenic tobacco lines, similarly as does HC-Pro. Its action in the suppression of PTGS was validated in transgenic *N. benthamiana* GFP lines where the efficiency of Rgs-CaM is comparable to that of HC-Pro for GFP messenger silencing. Moreover, the expression of HC-Pro *via* a transgene or a TEV viral infection induces the expression of Rgs-CaM. Thus, HC-Pro seems to activate the expression of Rgs-CaM to overcome the RNA silencing established during viral infection [114]. A recent study reported similar conclusions about the geminiviruses AL2 silencing suppressor. This VSR also induces the expression of *A. thaliana* rgs-CaM and their nuclear interaction was confirmed by BiFC. Rgs-CaM overexpression increases both the sensitivity to the tomato golden mosaic virus (TGMV-Geminivirus) and the accumulation of viral DNAs whereas knock-out lines for rgs-CaM are less susceptible to infection [115]. In the same year, β C1 VSR expressed by a DNA satellite (TYLCCNB-tomato yellow leaf curl China betasatellite) associated with a geminivirus (TYLCCNV-tomato yellow leaf curl China virus) was also shown to induce Nb-Rgs-CaM expression in *N. benthamiana*. β C1 and Nb-Rgs-CaM overexpression lead to a decrease in

RDR6 mRNA and secondary siRNA accumulation levels [116]. While the function of calmodulin-like proteins in silencing suppression was established, a mode of action has been recently proposed. An interaction between the calmodulin-like protein of *N. benthamiana* (NbCaM) and SGS3 has been detected in a yeast two hybrid assay and *in planta*. This interaction seems a prerequisite to induce SGS3 degradation by autophagy. Also, decreased expression of several factors involved in autophagy pathway inhibits NbCaM-mediated degradation of SGS3, and also TYLCCNV and its betasatellite (TYLCCNB) accumulation [117]. Thus, NbCaM suppresses silencing by inducing SGS3 degradation and several viruses take advantage of this mechanism by promoting the induction of this endogenous suppressor. However, a controversy persists on Nt-rgs-CaM endogenous silencing suppressor function. Indeed, interaction between several VSRs containing dsRNA binding domains and Nt-rgs-CaM has been demonstrated. By a similar mechanism described above, those VSRs appear to be degraded by autophagy like SGS3, effectively promoting antiviral defence of infected plants [118].

Further studies are needed to explain this dichotomy observed for calmodulin-like proteins functions in RNA interference pathway, where the nature of VSRs and viruses seem to play a significant role in the functional orientation of calmodulin-like proteins. A hypothesis is advanced by Nakahara *et al.* where Nt-rgs-CaM appears to interact with some VSRs *via* their negatively and positively charged residues respectively, thus destabilizing a pre-established interaction between VSR and vsiRNA [118].

The AtRLI2 (RNase L inhibitor 2) protein from *A. thaliana* is ortholog to a mammalian protein involved in the regulation of the interferon response [119] whose expression is induced by synthetic dsRNAs and viral infection in HeLa cells [120, 121]. By analogy, AtRLI2 is induced in plants where silencing has been established [119] and was identified as an endogenous silencing suppressor. Indeed, AtRLI2 overexpression causes a drastic reduction of siRNA accumulation [122]. This protein is widely conserved in eukaryotes and archaea. It regulates translation and/or ribosomes biogenesis and recycling in *Drosophila*, yeast and mammals but not in plants. Nevertheless, ABCE1 (ATP-binding cassette sub-family E member 1), the human ortholog of AtRLI2, retained its silencing suppressor function when expressed in *N. benthamiana*, *C. elegans* or mammalian cells. ABCE1 was the first human protein described as an endogenous silencing suppressor [123].

In plants, the degradation of RNAs associated with PTGS is mainly provided by AGO1. Its endonucleolytic activity cleaves the targeted RNA, complementary to the guide strand loaded in RISC. Following cleavage, two RNAs are released: one upstream of the cleavage site that contains

the 5' end (5' fragment); the other downstream which contains the 3' end (3' fragment). The 3' fragment is degraded from 5' to 3' by the cytoplasmic exoribonuclease XRN4. The degradation of the 5' fragment involves two distinct pathways. If the targeted RNA is capped, DCP (decapping) proteins ensure the removal of the cap and allow XRN4 to perform the 5'-3' degradation. This 5' fragment has an unprotected 3' end following cleavage and allows access to terminal uridylyltransferases (TUTase). HESO1 (HEN1 suppressor1) is the main TUTase involved in uridylation and degradation of siRNAs and miRNAs if they are not protected by the methyl group added by HEN1. It is possible that HESO1 could be recruited by RISC since AGO1 is co-immunoprecipitated by HESO1. Similarly, the exoribonucleases RICE1 and RICE2 (RISC-interacting clearing 3'-5' exoribonucleases) seem to be recruited at the 3' end by interacting with AGO1 and AGO10 and initiate the RNA 3'-5' degradation. The exosome associated with the SKI complex ensures the complete degradation of RNA [124]. For other targets, the 3' fragment degradation following cleavage by miRISC was reported to be decreased in an *A. thaliana xrn4* mutant. [125]. Moreover, a cellular RDRP-mediated silencing stimulation was observed in *xrn4* mutant background as well as an accumulation of cleavage products [126]. Furthermore, the identification of new endogenous silencing suppressors could be limited by the high efficiency of effectors belonging to the silencing pathway. Thus, in 2007, analysis of two AGO1 hypomorphic lines allowed the identification of XRN2, XRN3 and FRY1 as endogenous suppressors of RNA silencing [127]. Although silencing establishment is deficient in *ago1* lines, it is completely restored in *ago1/fry1* and *ago1/xrn4* double mutants, while it is only partial in *ago1/xrn2* and *ago1/xrn3*. Thus, AGO1's function is restored when FRY1, XRN2, XRN3 and XRN4 are lower expressed, demonstrating their roles as RNAi endogenous suppressors. The double mutant *xrn2/xrn3* exhibits over-accumulation of miRNA precursor loops generated during nuclear DCL processing, prior to nuclear export of miRNA/miRNA* duplexes. This phenotype is consistent with the nuclear localization of XRN2 and XRN3 [128]. The *fry1* mutant phenotype is similar to that of *xrn2/xrn3* and *xrn4* in terms of miRNA precursor accumulation in the nucleus and AGO1-generated 3' cleavage products accumulation in the cytosol respectively. To confirm the role of these endogenous suppressors, *xrn2*, *xrn3*, *xrn4* and *fry1* lines were infected with CMV, a cytoplasmic replicative virus. *Xrn2* and *xrn3* lines behaved as a wild-type line with a viral infection reaching 66% to 75%. In contrast, *xrn4* and *fry1* plants showed a decreased accumulation of viral RNA and vsiRNA. This hyperresistance in mutant background confirmed the silencing suppression mediated by these two proteins [127].

In 2001, RRF-1, RRF-2 and RRF-3, three homologs to the RDRP EGO-1 [129] were studied in *C. elegans* in order to refine their role in the transitivity pathway [90]. Only *rrf-3* individuals were hypersensitive to RNA interference [130]. This sensitivity confirms the existence of a negative regulation which is mediated by RRF-3. Such a hypersensitivity phenotype was also described in *eri-1* nematode [131]. *In vitro*, ERI-1 (Enhanced RNA interference 1) specifically degrades siRNAs at the 3' overhang but not single-stranded and fully hybridized species. An exonuclease and a nucleic acid binding domains were identified in ERI-1 *in silico*. Thus, ERI-1 seems to limit RNA interference by binding and initiating the degradation of siRNA duplexes at their 3' end. Interestingly, the neuronal and gonadal-specific expression of ERI-1 may explain the lower efficiency of RNA interference in these tissues.

In *A. thaliana*, type III RNases are divided into two families: Dicer-like (DCL1 to DCL4) proteins that are widely studied for their functions in RNA interference; and RNase three-like (RTL1 to RTL5) proteins which are much less characterized. Although they all possess one RNase III domain (except RTL3 with two RNase III domains), only RTL1, RTL2 and RTL3 contain respectively 1, 2 and 3 dsRNA-binding domains (DRBs). RTL1 and RTL3 are poorly expressed in plants, while RTL2, RTL4 and RTL5 appear to be expressed in almost all plant tissues. Surprisingly, RTL1 mRNA accumulation level is twenty times higher during viral infection compared to mock control, while those of RTL2 and RTL3 remain unchanged. RTL1 expression is induced by four single-stranded RNA viruses that belong to distinct families (TCV; CMV; turnip vein clearing virus, TVCV and turnip yellow mosaic virus, TYMV). Therefore, RTL1 appears to be generally induced by a viral stress. When overexpressed, RTL1 induces a dramatic decrease in accumulation levels of three major classes of endogenous siRNAs (endogenous inverted repeat-derived-siRNA (endoIR-siRNA); polymerase IV-dependent siRNA (p4-siRNA) and transacting-siRNA (ta-siRNA)) produced by DCL2, DCL3 and DCL4 respectively, whereas the miRNAs biogenesis ensured by DCL1 is unaffected. In addition, GUS silencing induced by a 35S:GU-UG stem-loop construct was suppressed by RTL1 through inhibition of siRNAs accumulation. RTL-1 was then confirmed as an endogenous silencing suppressor [132]. Since RTL1 and DCL proteins display both RNase III and DRB domains, RTL1 could use identical substrates to those cleaved by DCLs, thus potentially limiting siRNA biogenesis by DCLs. *In vitro* and *in planta* cleavage experiments revealed RTL1 specificity for long dsRNA closed to a stem-loop structure. Its affinity for perfectly paired dsRNA had already been observed since RTL1 affected the level of DCL2, DCL3 and DCL4-matured precursors, but had no effect

on rich-mismatches precursors (*i.e.* pri- and pre-miRNAs). The endoribonucleolytic activity of RTL1 generates cohesive ends on both cleaved strands and cleavage specificity depends on a consensus sequence of a perfectly paired duplex at the base of the stem loop structure [133]. Cleavage products generated by RTL1 appear to be completely degraded by cellular exoribonucleases. Thus, RTL1 seems to exert its antiviral function by initiating the degradation of viral replication intermediates and/or locally structured viral RNAs upstream of antiviral DCLs. This additional antiviral barrier is, however, suppressed by P38 (TCV), 2b (CMV) and HC-Pro VSRs which restore the accumulation of siRNAs [132]. VSRs, in addition to suppressing PTGS mediated by antiviral DCL, may also suppress RTL1 activity.

Animal viruses express VSR

In 2002, a silencing suppression function was associated to the B2 protein expressed by the Flock house virus (FHV) naturally infecting insects [134]. When transiently expressed in GFP silenced plants, B2 restores GFP fluorescence and reduces GFP siRNA accumulation levels. Transfection of FHV and FHV- Δ B2 in wild-type or AGO2 silenced *Drosophila* cell lines confirmed B2 as a suppressor of RNA silencing. In 2005, two B2 structures were obtained by distinct teams, one by nuclear magnetic resonance (NMR) [135], the other by co-crystallization with a 18 nt dsRNA [136]. B2 is a homodimer where each monomer is composed of three α -helix (α 1, α 2 and α 3). The two structures are almost identical except for the orientation of one helix that was explained by a B2 conformational adaptation following its binding to the RNA in the crystallographic study. Positively charged residues are exposed at the dimer surface, effectively interacting with RNA backbone phosphate groups independently of its nucleotide sequence [136]. In contrast to p19, B2 does not provide specific recognition of 5' and 3' ends, also suggesting a size-independent RNA binding function. These structural data are in agreement with results published the same year that demonstrate B2 binding to siRNA duplexes and also to longer dsRNAs [137, 138]. B2 also seems to inhibit Dicer cleavage of long dsRNAs *in vivo* and *in vitro*, therefore limiting siRNA biogenesis [136, 137]. It thus appears that B2-mediated silencing suppression can take place at two levels: by masking long dsRNAs Dicer substrates and/or by sequestering siRNAs. In 2009, the interaction between the B2 C-terminal domain and the Dicer PAZ domain was demonstrated by yeast two hybrid and pull-down experiments [139]. Since the PAZ domain anchors one end of a dsRNA, B2 could then prevent dsRNA access to this Dicer pocket by a competitive

mechanism. In this scenario, B2 could in fact substitute for Dicer in dsRNA binding and would be consistent with its higher affinity for long dsRNAs compared to 21 nt duplexes [138].

Although mammals can rely on their innate and adaptive immune responses to restrict a viral infection, human viruses encode VSRs. The silencing suppressor function of influenza A virus NS1 protein was discovered and studied in the transient plant expression system [140, 141]. NS1 restores GFP expression in a reporter system and drastically reduces siRNAs accumulation levels targeting GFP mRNA, as for FHV B2 protein. The NS1-mediated silencing suppression is confirmed *in planta* by using the PVX viral vector, where NS1 exacerbates infection symptoms and increases viral pathogenicity. The function of NS1 has been partly elucidated *in vitro* where NS1 binds 21 nt siRNAs [140]. The co-crystallization of NS1 double-stranded RNA binding domain associated with a siRNA duplex confirmed previous results. Studying a protein in a different kingdom is not limited to NS1. A “trans-kingdom” analysis of rice hoja blanca virus (RHBV) NS3 protein was conducted on mammalian cells to carry out HIV-1 Tat viral protein functional complementation assays. NS3 is indeed capable of ensuring this functional complementation through its dsRNA binding domain and could then operate by sequestering small RNAs duplexes. This study confirmed the suppression of Tat-mediated silencing and proposed a Tat function similar to that described for NS3 [142]. A combination of these two “trans-kingdom” systems has been used to clarify Tat function’s by comparing it to the p19 suppressor of Tombusviruses [143]. Their effects were both studied *in planta* by their transient expression in *N. benthamiana* protoplasts and also by their transfection into mammalian cell cultures. The authors shown that Tat performs silencing suppression downstream of dsRNA duplexes biogenesis, as p19 does. Tat and p19 promote HIV mRNAs translation and ensure an increase in virion production. Thus, cellular miRNAs mediated inhibition of viral RNA translation appears to be bypassed by HIV Tat VSR. This silencing suppression activity requires the functionality of Tat dsRNA binding domain. Similar work based in part on Tat functional complementation confirmed NS1 VSR function, and was also attributed to the VP35 of Ebola virus and the E3L protein (vaccinia virus) [144, 145].

The difficulty of studying RNA silencing in mammalian somatic cells resides in the existence of the antiviral interferon response. These two cellular pathways appear exclusive: if RNA silencing proteins are expressed and functional, the antiviral response is nevertheless ensured by the interferon pathway [146]. The relationship between antiviral immunity and RNA interference was demonstrated using mouse embryonic stem cells (ESCs) deficient in the

interferon response. Infection of these non-differentiated cells with the encephalomyocarditis virus (EMCV) provoked the accumulation of vsiRNA. The nature of these small RNAs (size, 3’ 2 nt overhang...) and *dicer* knockout lines confirmed their biogenesis *via* the RNA interference machinery. The antiviral effect of these vsiRNAs was not tested on EMCV replication but their association in AGO2 tends to validate their functionality to join an active RISC complex. The accumulation of vsiRNA decreased drastically when the cells were differentiated, which is in agreement with the functional prevalence of the interferon response in somatic cells. To evaluate the antiviral potential of vsiRNA, the Nodamura virus (NoV) was used. NoV expresses the B2 protein that inhibits Dicer activity like FHV B2 protein. NoV Δ B2 maintained the accumulation of vsiRNAs in ESCs and in somatic cells and their Dicer-dependent biogenesis was abolished during a wild-type NoV infection [147]. In addition, the accumulation of NoV Δ B2 virus was enhanced (i) in AGO2 mutated ESCs [147] (ii) and in new-born hamster kidney somatic cells that express the NoV B2 protein or the Ebola virus VSR VP35 [148]. Infection of suckling mice with NoV wild-type virus was lethal five days after inoculation, and all mice infected with NoV Δ B2 virus survived. Viral clearance in NoV Δ B2-infected mice was correlated with the accumulation of vsiRNA and with the loss of silencing suppression provided by the B2 protein [148]. These results are in agreement with an antiviral response mediated by RNA interference in mammals and studies conducted on the human enterovirus 71 (HEV71) confirmed the importance of this antiviral pathway [149]. VSR function was attributed to the non-structural protein 3A which limits vsiRNA biogenesis through long-double-stranded RNAs sequestration. Like NoV, a wild-type HEV71 virus induced an aberrant production of small RNAs characteristic of viral degradation products, whereas point mutations introduced into the 3A protein decreased its binding to double-stranded RNAs and caused the accumulation of vsiRNA. These vsiRNAs were generated by Dicer from viral replication intermediates, they co-immunoprecipitated with AGO and ensured the degradation of RNA expressing viral sequences. The accumulation of these vsiRNAs was correlated with viral clearance and a drastic decrease in pathogenicity. These experiments, conducted both in mammalian somatic cells and in mice, also showed that these data were independent of the interferon pathway, demonstrating the true role of RNA interference in antiviral defence in mammals. While several studies established the role of RNA silencing as antiviral defence in mammals, this recent attribution is not yet unanimous and offers multiple perspectives. Table 1 shows some examples of animal viral suppressors.

When viral non-coding RNAs get involved

The field of “non-coding” continue to fascinate since the discovery of miRNAs at the end of the twentieth century [150]. Nowadays, more than 38,500 miRNAs are referenced, all species combined (<http://www.mirbase.org/index.shtml>, accessed 2nd august, 2019). The family of small non-coding RNAs associated with gene silencing is now extended to siRNA (small interfering) as well as to piRNA (piwi interacting). These latter are however restricted to animal’s gonadal tissues, Dicer-independent and specific to transposable elements sequences [151]. Long non-coding RNAs (lncRNA – size greater than 200 nucleotides and up to tens of kilobases) also have major regulatory functions. lncRNAs are involved in majority of cellular processes and consequently in multiple pathologies since many lncRNAs affect epigenetic regulation, cell cycle control or immune responses [152].

Some viruses, in addition to their VSR protein, also express non-coding RNA acting as an additional VSR. Viral miRNA regulation was demonstrated for the first time in 2004 by studying Epstein-Barr virus (EBV) [153]. EBV fine-tunes its viral cycle through the expression of 44 virally-encoded miRNAs whose cellular targets are multiple. These viral miRNAs control for instance immune system escape, viral latency maintenance and apoptosis inhibition. They also regulate the expression of viral proteins such as DNA polymerase (BALF5), latent membrane proteins (LMP1 and LMP2) involved in lymphocytes transformation and immortalization and BFLF2 that is required for nucleocapsids cytoplasmic translocation. By targeting their mRNA, viral miRNAs seem to restrict the lytic cycle in favour of maintaining viral latency and to promote immune system bypass [154]. The expression of such viral miRNAs has been identified in several other *Herpesviridae* viruses [155] and also in baculoviruses [156]. In addition, two non-coding transcripts are also expressed by EBV: EBER1 and EBER2 (EBV-encoded small RNA) of 167 and 172 nt respectively. Their interactions with PKR (protein kinase R), TLR3 (toll-like receptor 3) and RIG-1 proteins (retinoic acid-inducible gene I) modulate the immune system to promote viral pathogenicity and host cells transformation [157]. The expression of non-coding RNA targeting PKR is reminiscent of the adenovirus situation.

Human adenoviruses (AdVs) are dsDNA viruses of about 36 kilobases. They all express a 160 nt-long non-coding transcript, VA RNAI (virus-associated RNA). A second non-coding RNA, VA RNAII, is expressed by 80% of AdVs and they are both transcribed by RNA polymerase III from intragenic regions. These RNAs are highly structured and VA RNAI has three distinct domains: an

apical stem, a central domain and a terminal stem. These VA RNAs are exported from the nucleus by the exportin 5 (Exp5) which provides cytoplasmic translocation of dsRNA binding domain (dsRBD) proteins, small RNAs such as transfer RNAs and miRNA precursors, and Dicer mRNA [158]. Exp5 ensures the export of RNAs having a short 3’ overhang, a 5’ paired end as well as a minimum 15 nt stem. Interestingly, this structure is present at the VA RNAI terminal stem end and directly interacts with Exp5. Synthesized up to 10⁸ copies per cell, VA RNAI seem to saturate Exp5 thus entering into direct competition for pre-miRNAs and Dicer mRNAs exports. The interaction between Dicer mRNAs and Exp5 is therefore drastically reduced, resulting in a lower accumulation of cytoplasmic Dicer proteins. VA RNAI limit pre-miRNAs export as well as their cytoplasmic maturation by decreasing the amount of Dicer proteins available. In the cytoplasm, VA RNAs limit RNA interference by saturating the remaining Dicer. Like miRNAs, VA RNAI and VA RNAII have many mismatches rendering them perfect mimicry substrates. Although less abundant than VA RNAI, VA RNAII are preferentially cleaved by Dicer and are loaded into RISC, referred to “mivaRNAs” (VA RNA-derived miRNAs). Several targeted RNAs, complementary to mivaRNAs, have been identified without establishing a direct link between their silencing and a benefit for the virus, except for the cullin 4A. The post-transcriptional suppression of cullin 4A by mivaRNAII stimulates the signaling pathway of JNK (Jun N-terminal kinase) in favour of viral replication [159]. Nevertheless, the nucleotide sequence of VA RNA is poorly conserved within adenoviruses, and the cleavage efficiency and cleavage number achieved by Dicer as well as guide strand selection in AGO2 seem to be specific to each viral serotype. All of these elements diminish the possibility to obtain mivaRNAs that could be considered as “consensus” by ensuring common genes knockdown. VA RNAs may be considered as simple competitors that saturate Dicer and cause a global deregulation in miRNA population. Further work is needed to elucidate the function of these mivaRNAs whose Dicer biogenesis is well conserved in all adenoviruses and confirm the importance for AdVs to produce such pro-viral substrates [158]. In mammals, however, the interferon response remains the major antiviral pathway [160] where protein kinase R (PKR) is activated by dsRNA. VA RNAI is also capable of binding PKR to prevent its dimerization, thereby limiting activation of this antiviral pathway by competing with viral dsRNAs [161, 162].

The identification of VSRs in flaviviruses was not very successful [163] until the discovery of the NS4B non-structural protein of dengue virus [164]. This silencing suppression function was *a contrario* assigned to the structural CP protein of the yellow fever virus [165]. Although known examples of flaviviral VSRs proteins are scarce,

Table 1 Summary of viral animal suppressors.

Family	Genus/Species	VSR	Cell types/ organisms where VSR function has been demonstrated	References	
<i>Orthomyxoviridae</i>	Influenza A virus (IAV) ⁱ	NS1 ^a	- Insects cells - Plants: <i>N. benthamiana</i> - Mammals cells	[140, 145, 194, 195]	
<i>Poxviridae</i>	Vaccinia virus ⁱ	E3L ^a	- Insects cells - Mammals cells	[144, 145]	
<i>Filoviridae</i>	Ebola virus ⁱ	VP35 ^a	- Mammals cells - Plants: <i>N. benthamiana</i>	[144, 196]	
<i>Retroviridae</i>		Tat ^a	- Mammals cells - Plant cells (protoplasts)	[143, 197, 198]	
	Human immunodeficiency virus I (HIV-1) ⁱ	TAR ^b	- Mammals cells	[199]	
		RRE ^b	- Mammals cells	[200]	
<i>Coronaviridae</i>	Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) ⁱ	Nucleocapsid N ^a	- Mammals cells	[201]	
<i>Adenoviridae</i>	Adenovirus ⁱ	VA RNA ^b	- Mammals cells	[159, 202]	
<i>Picornaviridae</i>	Human enterovirus 71 ⁱ	3A ^a	- Mammals cells - Mice	[149]	
<i>Flaviviridae</i>	Hepatitis C virus (HCV) ⁱ	Core ^a	- Mammals cells	[203-205]	
	Yellow fever virus ⁱ	Capsid C ^a	- Mosquito vector	[206]	
	Flavivirus ⁱ	sfRNA ^b	- Mosquito vector - Insects cells - Mammals cells	[163, 168]	
<i>Nodaviridae</i>	Nodamura Virus ⁱ	Nodamura Virus ⁱⁱ	B2 ^a	- Insects cells - Mammals cells - Mice	[137, 145, 147, 148, 207]
	Flock house virus (FHV) ⁱⁱ		- Plants: <i>N. benthamiana</i> - Insects cells - Insects: <i>Drosophila</i>	[134, 136, 139]	
<i>Dicistroviridae</i>	<i>Drosophila</i> C virus (DCV) ⁱⁱ	1A ^a	- Insects cells - Insects: <i>Drosophila</i>	[208]	
	Cricket paralysis virus (CrPV) ⁱⁱ			[209]	
<i>Bimaviridae</i>	<i>Culex</i> Y virus (CYV) ⁱⁱ	VP3 ^a	- Insects cells - Insects: <i>Drosophila</i>	[210]	
	<i>Drosophila</i> X virus (DXV) ⁱⁱ				

The distinction between mammalianⁱ and insectⁱⁱ viruses is indicated in the "Genus/Species" column. The nature (Proteic^a and nucleic^b) of the VSR is indicated.

flaviviruses all ensure the expression of a non-coding RNA (subgenomic flavivirus RNA, sfRNA), collinear with the 3' UTR, essential for viral pathogenicity [166]. It was initially named subgenomic flaviviral RNA and its biogenesis was then associated with an incomplete degradation of genomic viral RNA by XRN1, a cellular exoribonuclease involved in the regulation of RNA catabolism [166]. Several studies have identified RNA structures that stall XRN1 and induce the subsequent accumulation of sfRNA (figure 4A) [167]. The function of sfRNAs was associated with silencing suppression by studying the West Nile virus (WNV), whereas none non-structural viral proteins tested possess a VSR activity [163]. SfrRNA-mediated silencing suppression is effective in siRNA and miRNA pathways, in insects and mammalian cells and these results have been successfully transposed to the dengue virus. These data were supplemented by studying the Kunjin virus (KUNV) which confirms the involvement of sfRNA in silencing suppression in infectious context in the mosquito vector *Culex quinquefasciatus* [168]. These studies also reveal a specific co-immunoprecipitation of sfRNA 3' UTR region with Dicer and AGO2 in KUNV infected cells. In that way, WNV sfRNA are able to inhibit *in vitro* Dicer-mediated cleavage of long dsRNA by a competitive mechanism since sfRNA-specific cleavage products are accumulated [163]. In fact, like VA RNAs, sfRNAs could mimic viral genomes by saturating Dicer and AGO2 to limit anti-viral cellular defence. A similar mechanism is described for BNYVV (beet necrotic yellow vein virus). The genome of this multipartite plant virus is composed of four to five positive stranded RNA segments. Each of them is capped, polyadenylated and encapsidated in individual helical particles. RNA1 and RNA2 are sufficient to ensure viral replication on model plants such as *N. benthamiana*. However, on natural hosts (*i.e.* of the *Beta* genus), RNA4 and RNA3 are required for viral transmission and systemic movement respectively. The viral long-distance movement is not dependent on RNA3 *per se*, but rather depends on the accumulation of a non-coding viral RNA derived from RNA3 [169, 170], initially designated as RNA3sub [171]. The “core” sequence (about 250 nt) is encoded in the vicinity of RNA3sub promoter sequence and is involved in viral long-distance movement [172]. The study of the “core” sequence allowed the identification of the 20 nt “coremin” motif conserved in all Benyviruses [173] and known as “Box1” within Cucumoviruses. CMV subgenomic RNA5 accumulation is dependent on this “Box1” sequence fold-backed as a stem-loop [174]. For BNYVV, the “coremin” sequence also remains essential for RNA3sub accumulation and ensures viral long-distance movement on *Beta* species [169]. Furthermore, the RNA3sub production and accumulation out of the viral context and *in vitro* defines its RNA3sub as a non-coding RNA (ncRNA3), derived from an incom-

plete degradation of RNA3 [169]. The production of this ncRNA3 is attributed to the cellular protein XRN4 of *A. thaliana* that degrades RNA3 from 5' to 3' to reach the “coremin” sequence where XRN4 appears to be blocked by a structural feature (figure 4B) [175]. BNYVV viral RNA1 and RNA2 are sufficient to ensure long-distance infection and viral movement on *N. benthamiana* model plant, where RNA1 expresses proteins necessary for viral replication, whereas structural, movement and silencing proteins are expressed from RNA2. The p14 protein suppresses silencing by limiting the production of secondary siRNAs through the transitivity mechanism and is essential to ensure viral systemic spreading [176]. However, the hypomorphic BA2 version of p14 VSR is unable to provide viral long-distance movement but is partially complemented by ncRNA3. Indeed, nearly 40% of plants infected with RNA1 and RNA2-BA2 present a systemic infection when RNA3 is supplemented in the inoculum. This complementation is only observed with the wild-type RNA3 and not at all with a RNA3 unable to ensure ncRNA3 accumulation. Thus, ncRNA3 provides a functional complementation to a p14 mutant deficient in its VSR function [170].

Conclusions and outlooks

RNA interference ensures essential functions in genes expression regulation in many organisms by maintaining their harmonious development and fighting against different biotic stresses. Although this review focuses on viral infections, RNA interference is also essential for regulating gene expression upon bacterial infections [177] and during abiotic stresses [178].

One of the main features of RNA interference is to reduce expression levels in a sequence-specific manner. Following this mechanism, it is then possible to target any RNA (partially) complementary to the guide strand loaded in RISC. This pathway ensures limitless potential and a total diversification of RNA populations to be silenced. Phytoviruses have to fight this machinery and, to overcome this selection pressure, they express a protein and/or an RNA able to bypass this antiviral silencing. Although VSRs appear to target a limited set of RNAi factors (AGO, DCL, RDR, sRNAs), each VSR uses a unique mechanism to counteract RNAi. Diversity of these mechanisms seems to exceed the number of targets available. The functional versatility of VSRs complicates their study and their characterization is challenging. Indeed, multiple VSRs were described but the mode of action for only a few of them was determined thanks to structural studies (*e.g.* p19 and p21). Endogenous silencing suppressors should also be considered. They are essential for RNA interference regulation and VSRs have taken advantage of their suppressor functions. Their expres-

sion is often induced by viral infection and they enhance VSRs counter-defence at the expense of infected plants.

Although VSRs studies were restricted to proteins, interest for viral RNA acting as VSR has recently increased. It is not surprising to encounter nucleic acids dedicated to suppressing RNA interference, this mechanism itself being initiated and governed by RNA. One regulatory mechanism limits endogenous silencing and consists in diverting miRNAs from their initial targets by “miRNA sponges”. RNA having multiple desired miRNA binding sites are overexpressed to promote the formation of miRISC complexes on these miRNA sponges. The miRNAs are thus sequestered on these “sponges” and their initial function is diverted. This regulatory mechanism is particularly relevant for human health but the design of “sponges” remains complicated and the off-target risk must be controlled [179, 180]. The first endogenous miRNA “sponge” was found in plants [181] and later in prokaryotes [182]. Not surprisingly, viruses have managed to take advantage of this new regulatory mechanism, like the herpesvirus saimiri and murine cytomegalovirus [183, 184]. Expression of viral non-coding RNA has been demonstrated for several plant and animal viruses. In contrast to VSRs proteins, functional conservation appears for some non-coding RNAs, where they can serve as a decoy in the silencing machinery. Their common feature consists in saturating the main antiviral proteins of the RNA interference pathway (Dicer-DCL, AGO *etc.*). A competition mechanism is currently preferred, where DCL and AGO are saturated with a viral non-coding RNA decoy, preventing them from being effective at their antiviral function. Few examples are known where these non-coding viral RNAs are integrating an active RISC complex to inhibit the expression of a specific gene. This saturation process, however, is not generalized to all viral ncRNAs since some viruses, such as EBV, express a panoply of miRNA disrupting the cell cycle in favour of viral infection without presenting such a competitive mechanism.

Finally, RNA interference seems closely related to several RNA degradation mechanisms named RQC (RNA quality control). Three major RNA monitoring pathways are Nonsense-mediated decay (NMD), Non-stop decay (NSD) and No-go decay (NGD). They respectively ensure the degradation of RNAs containing premature termination codons (PTC), missing stop codon or with stalled ribosomes. RNA viruses display several strategies to encode and express their proteins within a genome that has to be as short as possible: overlapping genes, subgenomic RNAs and readthrough. Such a compaction in the viral genetic information allows the formation of ideal substrates for the RQC machinery such as micro-ORFs, non-capped and non-polyadenylated RNAs, long 3' UTR sequences and stop codons recognized as PTC by NMD factors [185]. In plants [186] and animals [187], these viral RNAs are recognized

as aberrant by the NMD machinery and subject to degradation. Nevertheless, various strategies are used by viruses to circumvent the deleterious effects of NMD on viral amplification. For example, the resistance of Rous sarcoma virus (RSV) to NMD is conferred by a RNA structure downstream of a stop codon. This structure rich in pyrimidines ensures the recruitment of PTBP1 protein (polypyrimidine tract binding protein 1) instead of NMD proteins [188]. Another strategy deployed by human T-cell lymphotropic virus type 1 (HTLV-1) consists in binding the main proteins involved in NMD, thus preventing them from performing their function [189]. Whatever the strategy employed, viral RNAs are stabilized by NMD inhibition.

Initially, a dichotomy was admitted between RQC and RNA interference where aberrant endogenous RNAs were targeted by the RQC pathway while regulation of endogenous and exogenous genes was provided by RNA interference. Nevertheless, multiple proteins involved in RQC pathways prevent RNA interference formation. RQC-associated proteins mutations stimulate RNA interference and induce RNA degradation *via* the silencing pathway. In this review, an example was given for exoribonucleases XRN2, XRN3 and XRN4 but this principle is now extended to other RQC factors: proteins associated with the exosome and its cofactors, proteins involved in deadenylation and decapping processes *etc.* [190]. Although these endogenous silencing suppressors have been identified, one question remained unsolved in RNA interference downregulation: how can we explain that transitivity regulates antiviral response and transgene expression while endogenous RNAs (mostly regulated by miRNA) are not subjected to this amplification process. Again, interlinking between RQC and RNA interference is undeniable. In fact, SKI2 protein is associated with the exosome to ensure RNAs 3'-5' degradation in RQC and also ensures the degradation of 5' cleavage products released after RISC complex slicing in the miRNAs pathway. SKI2 prevents miRNA-triggered transitivity activation by inhibiting the biogenesis of secondary siRNAs whereas they accumulate in *ski2* plants following RDR6 amplification [191]. The regulation of endogenous genes expression is thus preferentially subject to RQC, while their management by the silencing machinery would be deleterious.

RNA interference represents an outstanding regulation platform for genes expression control, finely tuned by multiple proteins and nucleic acid factors. Its relationships with various cellular pathways (RNA quality control, RNA editing *etc.*) provides hierarchical but also coordinated regulation processes.

Although it remains a very complex system, RNA interference is easily circumvented during viral infection. Viruses appear as impressive disrupters able to avoid this antiviral mechanism and have even evolved to take advantage from it. However, there are still many perspectives to elucidate

mechanisms used by viruses and mediated by their VSR and associated non-coding RNAs to bypass immune defence.

Acknowledgments. Lucie Bellott wrote the manuscript and realized the figures. Fabrice Michel and David Gilmer corrected and edited the review. The authors thank both reviewers for their comments and suggestions, as well as Louis-Valentin Méteignier for critically reading the manuscript and helpful remarks. Lucie Bellott is funded by a doctoral grant from the Ministry of Education and Research.

Conflict of interest : None.

References

- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 1990; 2: 279-89.
- Van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 1990; 2: 291-9.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806-11.
- Sunkar R, Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Sci* 2007; 12: 301-9.
- Chen X. Small RNAs and their roles in plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2009; 25: 21-44.
- Ito H. Small RNAs and transposon silencing in plants. *Dev Growth Differ* 2012; 54: 100-7.
- Molnar A, Bassett A, Thuenemann E, et al. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 2009; 58: 165-74.
- He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 522-31.
- Morris KV, Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* 2004; 305: 1289-92.
- Moazed D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature* 2009; 457: 413-20.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008; 9: 102-14.
- Vazquez F, Legrand S, Windels D. The biosynthetic pathways and biological scopes of plant small RNAs. *Trends Plant Sci* 2010; 15: 337-45.
- Borsani O, Zhu J, Verslues PE, Sunkar R, Zhu J-K. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell* 2005; 123: 1279-91.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001; 409: 363-6.
- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 2002; 110: 563-74.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000; 404: 293-6.
- Hutvagner G, Simard MJ. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 22-32.
- Wang XH, Aliyari R, Li WX, et al. RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science* 2006; 312: 452-4.
- Petitjean O, Montavon T, Pfeffer S. En avoir ou pas, l'interférence par l'ARN comme défense antivirale chez les mammifères. *Virologie* 2018; 22: 251-60.
- Hamilton AJ, Baulcombe DC. Species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 1999; 286: 950-2.
- Gascioli V, Mallory AC, Bartel DP, Vaucheret H. Partially redundant functions of *Arabidopsis* DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. *Curr Biol* 2005; 15: 1494-500.
- Kurihara Y, Watanabe Y. *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 12753-8.
- Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM, et al. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* 2004; 2: e104.
- Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, Kasschau KD, Carrington JC, Voinnet O. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 2006; 313: 68-71.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001; 15: 188-200.
- Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 2001; 20: 6877-88.
- Li J, Yang Z, Yu B, Liu J, Chen X. Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 2005; 15: 1501-7.
- Yang Z, Ebricht YW, Yu B, Chen X. HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res* 2006; 34: 667-75.
- Song JJ, Liu J, Tolia NH, et al. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol* 2003; 10: 1026-32.
- Yan KS, Yan S, Farooq A, Han A, Zeng L, Zhou MM. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* 2003; 426: 468-74.
- Ma JB, Yuan YR, Meister G, Pei Y, Tuschl T, Patel DJ. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* 2005; 434: 666-70.
- Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 2004; 305: 1434-7.
- Baumberger N, Baulcombe DC. *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 11928-33.
- Carbonell A, Fahlgren N, Garcia-Ruiz H, et al. Functional analysis of three *Arabidopsis* ARGONAUTES using slicer-defective mutants. *Plant Cell* 2012; 24: 3613-29.
- Montgomery TA, Howell MD, Cuperus JT, et al. Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell* 2008; 133: 128-41.
- Qi YJ, He XY, Wang XJ, Kohany O, Jurka J, Hannon GJ. Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature* 2006; 443: 1008-12.

37. Garcia-Ruiz H, Carbonell A, Hoyer JS, *et al.* Roles and programming of *Arabidopsis* ARGONAUTE proteins during turnip mosaic virus infection. *PLoS Pathog* 2015; 11 : e1004755.
38. Harvey JJW, Lewsey MG, Patel K, *et al.* An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS One* 2011; 6 : e14639.
39. Jaubert M, Bhattacharjee S, Mello AF, Perry KL, Moffett P. ARGONAUTE2 mediates RNA-silencing antiviral defenses against potato virus X in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2011; 156 : 1556-64.
40. Hamera S, Song X, Su L, Chen X, Fang R. Cucumber mosaic virus suppressor 2b binds to AGO4-related small RNAs and impairs AGO4 activities. *Plant J* 2012; 69 : 104-15.
41. Raja P, Jackel JN, Li S, Heard IM, Bisaro DM. *Arabidopsis* double-stranded RNA binding protein DRB3 participates in methylation-mediated defense against geminiviruses. *J Virol* 2014; 88 : 2611-22.
42. Raja P, Sanville BC, Buchmann RC, Bisaro DM. Viral genome methylation as an epigenetic defense against geminiviruses. *J Virol* 2008; 82 : 8997-9007.
43. Miyoshi K, Tsukumo H, Nagami T, Siomi H, Siomi MC. Slicer function of *Drosophila* Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes Dev* 2005; 19 : 2837-48.
44. Yoda M, Kawamata T, Paroo Z, *et al.* ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17 : 17-23.
45. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003; 115 : 209-16.
46. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003; 115 : 199-208.
47. Mi S, Cai T, Hu Y, *et al.* Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* 2008; 133 : 116-27.
48. Takeda A, Iwasaki S, Watanabe T, Utsumi M, Watanabe Y. The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. *Plant Cell Physiol* 2008; 49 : 493-500.
49. Hu HY, Yan Z, Xu Y, *et al.* Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics* 2009; 10 : 413.
50. Ghildiyal M, Xu J, Seitz H, Weng Z, Zamore PD. Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs partitions microRNA* strands into the RNA interference pathway. *RNA* 2010; 16 : 43-56.
51. Frank F, Sonenberg N, Nagar B. Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature* 2010; 465 : 818-22.
52. Leuschner PJ, Ameres SL, Kueng S, Martinez J. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep* 2006; 7 : 314-20.
53. Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 2005; 123 : 607-20.
54. Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 2005; 123 : 621-9.
55. Kawamata T, Seitz H, Tomari Y. Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16 : 953-60.
56. Vaistij FE, Jones L, Baulcombe DC. Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell* 2002; 14 : 857-67.
57. Curaba J, Chen X. Biochemical activities of *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase 6. *J Biol Chem* 2008; 283 : 3059-66.
58. Wang X-B, Wu Q, Ito T, *et al.* RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010; 107 : 484-9.
59. Kumakura N, Takeda A, Fujioka Y, Motose H, Takano R, Watanabe Y. SGS3 and RDR6 interact and colocalize in cytoplasmic SGS3/RDR6-bodies. *FEBS Lett* 2009; 583 : 1261-6.
60. Yoshikawa M, Peragine A, Park MY, Poethig RS. A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 2005; 19 : 2164-75.
61. Dunoyer P, Himber C, Voinnet O. 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* 2005; 37 : 1356-60.
62. Himber C, Moissiard G, Ritzenthaler C, Voinnet O, Dunoyer P. Transitivity dependent and independent cell to cell movement of RNA silencing. *EMBO J* 2003; 22 : 4523-33.
63. Burgyan J, Havelda Z. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci* 2011; 16 : 265-72.
64. Pruss G, Ge X, Shi XM, Carrington JC, Bowman Vance V. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 1997; 9 : 859-68.
65. Kasschau KD, Cronin S, Carrington JC. Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology* 1997; 228 : 251-62.
66. Anandalakshmi R, Pruss GJ, Ge X, *et al.* A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95 : 13079-84.
67. Lakatos L, Csorba T, Pantaleo V, *et al.* Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J* 2006; 25 : 2768-80.
68. Del Toro FJ, Donaire L, Aguilar E, Chung B-N, Tenllado F, Canto T. Potato virus Y HCPro suppression of antiviral silencing in *Nicotiana benthamiana* plants correlates with its ability to bind *in vivo* to 21- and 22-nucleotide small RNAs of viral sequence. *J Virol* 2017; 91 : e00367-417.
69. Jamous RM, Boonrod K, Fuellgrabe MW, Ali-Shtayeh MS, Krczal G, Wassenegger M. The helper component-proteinase of the zucchini yellow mosaic virus inhibits the Hua enhancer 1 methyltransferase activity *in vitro*. *J Gen Virol* 2011; 92 : 2222-6.
70. Ivanov KI, Eskelin K, Bašić M, *et al.* Molecular insights into the function of the viral RNA silencing suppressor HCPro. *Plant J* 2016; 85 : 30-45.
71. Varallyay E, Havelda Z. Unrelated viral suppressors of RNA silencing mediate the control of ARGONAUTE1 level. *Mol Plant Pathol* 2013; 14 : 567-75.
72. Cheng X, Wang A, Simon AE. The potyvirus silencing suppressor protein VPg mediates degradation of SGS3 via ubiquitination and autophagy pathways. *J Virol* 2017; 91 : e01478-1516.
73. Rajamäki M-L, Strenig J, Valkonen JP. Silencing suppressor protein VPg of a potyvirus interacts with the plant silencing-related protein SGS3. *Mol Plant Microbe Interact* 2014; 27 : 1199-210.
74. Brigneti G, Voinnet O, Li W-X, Ji L-H, Ding S-W, Baulcombe DC. Retracted: viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J* 1998; 17 : 6739-46.

75. Zhang X, Yuan Y-R, Pei Y, *et al.* Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev* 2006 ; 20 : 3255-68.
76. González I, Rakitina D, Semashko M, *et al.* RNA binding is more critical to the suppression of silencing function of cucumber mosaic virus 2b protein than nuclear localization. *RNA* 2012 ; 18 : 771-82.
77. Nemes K, Gellért Á, Almási A, *et al.* Phosphorylation regulates the subcellular localization of cucumber mosaic virus 2b protein. *Sci Rep* 2017 ; 7 : 13444.
78. Love AJ, Laird J, Holt J, Hamilton AJ, Sadanandom A, Milner JJ. Cauliflower mosaic virus protein P6 is a suppressor of RNA silencing. *J Gen Virol* 2007 ; 88 : 3439-44.
79. Haas G, Azevedo J, Moissiard G, *et al.* Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *EMBO J* 2008 ; 27 : 2102-12.
80. Cuellar WJ, Kreuze JF, Rajamaki ML, Cruzado KR, Untiveros M, Valkonen JP. Elimination of antiviral defense by viral RNase III. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 ; 106 : 10354-8.
81. Silhavy D, Molnar A, Luciola A, *et al.* A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J* 2002 ; 21 : 3070-80.
82. Ye K, Malinina L, Patel DJ. Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* 2003 ; 426 : 874-8.
83. Vargason JM, Szittyá G, Burgyan J, Hall TM. Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 2003 ; 115 : 799-811.
84. Zhou ZS, Dell'Orco M, Saldarelli P, Turturo C, Minafra A, Martelli GP. Identification of an RNA-silencing suppressor in the genome of grapevine virus A. *J Gen Virol* 2006 ; 87 : 2387-95.
85. Ye K, Patel DJ. RNA silencing suppressor p21 of beet yellows virus forms an RNA binding octameric ring structure. *Structure* 2005 ; 13 : 1375-84.
86. Chapman EJ, Prokhnovsky AI, Gopinath K, Dolja VV, Carrington JC. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev* 2004 ; 18 : 1179-86.
87. Incarbone M, Zimmermann A, Hammann P, Erhardt M, Michel F, Dunoyer P. Neutralization of mobile antiviral small RNA through peroxisomal import. *Nat Plants* 2017 ; 3 : 17094.
88. Dunoyer P, Pfeffer S, Fritsch C, Hemmer O, Voinnet O, Richards KE. Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clump virus. *Plant J* 2002 ; 29 : 555-67.
89. Hu J, Baker A, Bartel B, *et al.* Plant peroxisomes: biogenesis and function. *Plant Cell* 2012 ; 24 : 2279-303.
90. Sijen T, Fleenor J, Simmer F, *et al.* On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 2001 ; 107 : 465-76.
91. Guo H, Song X, Xie C, *et al.* Rice yellow stunt rhabdovirus protein 6 suppresses systemic RNA silencing by blocking RDR6-mediated secondary siRNA synthesis. *Mol Plant Microbe Interact* 2013 ; 26 : 927-36.
92. Fukunaga R, Doudna JA. dsRNA with 5' overhangs contributes to endogenous and antiviral RNA silencing pathways in plants. *EMBO J* 2009 ; 28 : 545-55.
93. Glick E, Zrachya A, Levy Y, *et al.* Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 ; 105 : 157-61.
94. Okano Y, Senshu H, Hashimoto M, *et al.* In planta recognition of a double-stranded RNA synthesis protein complex by a potyviral RNA silencing suppressor. *Plant Cell* 2014 ; 26 : 2168-83.
95. Pfeffer S, Dunoyer P, Heim F, Richards KE, Jonard G, Ziegler-Graff V. P0 of beet western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J Virol* 2002 ; 76 : 6815-24.
96. Pazhouhandeh M, Dieterle M, Marrocco K, *et al.* F-box-like domain in the *Polevirus* protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 ; 103 : 1994-9.
97. Baumberger N, Tsai CH, Lie M, Havecker E, Baulcombe DC. The *polevirus* silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr Biol* 2007 ; 17 : 1609-14.
98. Derrien B, Schepetilnikov M, Viotti C, *et al.* Degradation of the antiviral component ARGONAUTES1 by the autophagy pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012 ; 109 : 15942-6.
99. Bortolamiol D, Pazhouhandeh M, Marrocco K, Genschik P, Ziegler-Graff V. The *Polevirus* F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Curr Biol* 2007 ; 17 : 1615-21.
100. Csorba T, Lozsa R, Hutvagner G, Burgyan J. *Polevirus* protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1. *Plant J* 2010 ; 62 : 463-72.
101. Fernández-Calvino L, Martínez-Priego L, Szabo EZ, *et al.* Tobacco rattle virus 16K silencing suppressor binds ARGONAUTE 4 and inhibits formation of RNA silencing complexes. *J Gen Virol* 2016 ; 97 : 246-57.
102. Chiu MH, Chen IH, Baulcombe DC, Tsai CH. The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Mol Plant Pathol* 2010 ; 11 : 641-9.
103. El-Shami M, Pontier D, Lahmy S, *et al.* Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev* 2007 ; 21 : 2539-44.
104. Eulalio A, Tritschler F, Izaurralde E. The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *RNA* 2009 ; 15 : 1433-42.
105. Giner A, Lakatos L, Garcia-Chapa M, Lopez-Moya JJ, Burgyan J. Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs. *PLoS Pathol* 2010 ; 6 : e1000996.
106. Kenesi E, Carbonell A, Lózsá R, Vértessy B, Lakatos L. A viral suppressor of RNA silencing inhibits ARGONAUTE 1 function by precluding target RNA binding to pre-assembled RISC. *Nucleic Acids Res* 2017 ; 45 : 7736-50.
107. Till S, Lejeune E, Thermann R, *et al.* A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain. *Nat Struct Mol Biol* 2007 ; 14 : 897-903.
108. Azevedo J, Garcia D, Pontier D, *et al.* Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev* 2010 ; 24 : 904-15.
109. Qu F, Ren T, Morris TJ. The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *J Virol* 2003 ; 77 : 511-22.
110. Merai Z, Kerenyi Z, Kertesz S, Magna M, Lakatos L, Silhavy D. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol* 2006 ; 80 : 5747-56.
111. Perez-Canamas M, Hernandez C. Key importance of small RNA binding for the activity of a glycine-tryptophan (GW) motif-containing viral suppressor of RNA silencing. *J Biol Chem* 2015 ; 290 : 3106-20.
112. Karran RA, Sanfacon H. Tomato ringspot virus coat protein binds to ARGONAUTE 1 and suppresses the translation repression of a reporter gene. *Mol Plant Microbe Interact* 2014 ; 27 : 933-43.

- 113.** O’Riordan MX, Bauler LD, Scott FL, Duckett CS. Inhibitor of apoptosis proteins in eukaryotic evolution and development: a model of thematic conservation. *Dev Cell* 2008 ; 15 : 497-508.
- 114.** Anandalakshmi R, Marathe R, Ge X, *et al.* A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 2000 ; 290 : 142-4.
- 115.** Chung HY, Lacatus G, Sunter G. Geminivirus AL2 protein induces expression of, and interacts with, a calmodulin-like gene, an endogenous regulator of gene silencing. *Virology* 2014 ; 460-461 : 108-18.
- 116.** Li F, Huang C, Li Z, Zhou X. Suppression of RNA silencing by a plant DNA virus satellite requires a host calmodulin-like protein to repress RDR6 expression. *PLoS Pathog* 2014 ; 10 : e1003921.
- 117.** Li F, Zhao N, Li Z, *et al.* A calmodulin-like protein suppresses RNA silencing and promotes geminivirus infection by degrading SGS3 via the autophagy pathway in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS Pathog* 2017 ; 13 : e1006213. doi: 10.1371/journal.ppat.1006213.
- 118.** Nakahara KS, Masuta C, Yamada S, *et al.* Tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNA silencing suppressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012 ; 109 : 10113-8.
- 119.** Braz AS, Finnegan J, Waterhouse P, Margis R. A plant orthologue of RNase L inhibitor (RLI) is induced in plants showing RNA interference. *J Mol Evol* 2004 ; 59 : 20-30.
- 120.** Martinand C, Salehzada T, Silhol M, Lebleu B, Bisbal C. The RNase L inhibitor (RLI) is induced by double-stranded RNA. *J Interferon Cytokine Res* 1998 ; 18 : 1031-8.
- 121.** Martinand C, Montavon C, Salehzada T, Silhol M, Lebleu B, Bisbal C. RNase L inhibitor is induced during human immunodeficiency virus type 1 infection and down regulates the 2-5A/RNase L pathway in human T cells. *J Virol* 1999 ; 73 : 290-6.
- 122.** Sarmiento C, Nigul L, Kazantseva J, Buschmann M, Truve E. AtRLI2 is an endogenous suppressor of RNA silencing. *Plant Mol Biol* 2006 ; 61 : 153-63.
- 123.** Kärblane K, Gerassimenko J, Nigul L, *et al.* ABCE1 is a highly conserved RNA silencing suppressor. *PLoS One* 2015 ; 10 : e0116702.
- 124.** De Almeida C, Scheer H, Gobert A, *et al.* RNA uridylation and decay in plants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2018 ; 373 : 20180163.
- 125.** Souret FF, Kastenmayer JP, Green PJ. AtXRN4 degrades mRNA in *Arabidopsis* and its substrates include selected miRNA targets. *Mol Cell* 2004 ; 15 : 173-83.
- 126.** Gazzani S, Lawrenson T, Woodward C, Headon D, Sablowski R. A link between mRNA turnover and RNA interference in *Arabidopsis*. *Science* 2004 ; 306 : 1046-8.
- 127.** Gy I, Gasciolli V, Lauressegues D, *et al.* *Arabidopsis* FIERY1, XRN2, and XRN3 are endogenous RNA silencing suppressors. *Plant Cell* 2007 ; 19 : 3451-61.
- 128.** Kastenmayer JP, Green PJ. Novel features of the XRN-family in *Arabidopsis*: evidence that AtXRN4, one of several orthologs of nuclear Xrn2p/Rat1p, functions in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 ; 97 : 13985-90.
- 129.** Smardon A, Spoerke JM, Stacey SC, Klein ME, Mackin N, Maine EM. EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr Biol* 2000 ; 10 : 169-78.
- 130.** Simmer F, Tijsterman M, Parrish S, *et al.* Loss of the putative RNA-directed RNA polymerase RRF-3 makes *C. elegans* hypersensitive to RNAi. *Curr Biol* 2002 ; 12 : 1317-9.
- 131.** Kennedy S, Wang D, Ruvkun G. A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in *C. elegans*. *Nature* 2004 ; 427 : 645-9.
- 132.** Shamandi N, Zytnicki M, Charbonnel C, *et al.* Plants encode a general siRNA suppressor that is induced and suppressed by viruses. *PLoS Biol* 2015 ; 13 : 1-28.
- 133.** Charbonnel C, Niazi AK, Elvira-Matelo E, *et al.* The siRNA suppressor RTL1 is redox-regulated through glutathionylation of a conserved cysteine in the double-stranded-RNA-binding domain. *Nucleic Acids Res* 2017 ; 45 : 11891-907.
- 134.** Li H, Li WX, Ding SW. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* 2002 ; 296 : 1319-21.
- 135.** Lingel A, Simon B, Izaurralde E, Sattler M. The structure of the flock house virus B2 protein, a viral suppressor of RNA interference, shows a novel mode of double-stranded RNA recognition. *EMBO Rep* 2005 ; 6 : 1149-55.
- 136.** Chao JA, Lee JH, Chapados BR, Debler EW, Schneemann A, Williamson JR. Dual modes of RNA-silencing suppression by flock house virus protein B2. *Nat Struct Mol Biol* 2005 ; 12 : 952-7.
- 137.** Sullivan CS, Ganem D. A virus-encoded inhibitor that blocks RNA interference in mammalian cells. *J Virol* 2005 ; 79 : 7371-9.
- 138.** Lu R, Maduro M, Li F, *et al.* Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2005 ; 436 : 1040-3.
- 139.** Singh G, Popli S, Hari Y, Malhotra P, Mukherjee S, Bhatnagar RK. Suppression of RNA silencing by flock house virus B2 protein is mediated through its interaction with the PAZ domain of Dicer. *FASEB J* 2009 ; 23 : 1845-57.
- 140.** Bucher E, Hemmes H, De Haan P, Goldbach R, Prins M. The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. *J Gen Virol* 2004 ; 85 : 983-91.
- 141.** Delgadillo MO, Sáenz P, Salvador B, García JA, Simón-Mateo C. Human influenza virus NS1 protein enhances virus pathogenicity and acts as an RNA silencing suppressor in plants. *J Gen Virol* 2004 ; 85 : 993-9.
- 142.** Schnettler E, De Vries W, Hemmes H, *et al.* The NS3 protein of rice hoja blanca virus complements the RNAi suppressor function of HIV-1 Tat. *EMBO Rep* 2009 ; 10 : 258-63.
- 143.** Qian S, Zhong X, Yu L, Ding B, De Haan P, Boris-Lawrie K. HIV-1 Tat RNA silencing suppressor activity is conserved across kingdoms and counteracts translational repression of HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009 ; 106 : 605-10.
- 144.** Haasnoot J, De Vries W, Geutjes EJ, Prins M, De Haan P, Berkhout B. The Ebola virus VP35 protein is a suppressor of RNA silencing. *PLoS Pathog* 2007 ; 3 : e86.
- 145.** Li W-X, Li H, Lu R, *et al.* Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 ; 101 : 1350-5.
- 146.** Maillard PV, Van der Veen AG, Deddouche-Grass S, Rogers NC, Merits A, Reis e Sousa C. Inactivation of the type I interferon pathway reveals long double-stranded RNA-mediated RNA interference in mammalian cells. *EMBO J* 2016 ; 35 : 2505-18.
- 147.** Maillard PV, Ciaudo C, Marchais A, *et al.* Antiviral RNA interference in mammalian cells. *Science* 2013 ; 342 : 235-8.
- 148.** Li Y, Lu J, Han Y, Fan X, Ding SW. RNA interference functions as an antiviral immunity mechanism in mammals. *Science* 2013 ; 342 : 231-4.
- 149.** Qiu Y, Xu Y, Zhang Y, *et al.* Human virus-derived small RNAs can confer antiviral immunity in mammals. *Immunity* 2017 ; 46 : 992-1004.

150. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843-54.
151. Czech B, Munafò M, Ciabrelli F, et al. piRNA-guided genome defense: from biogenesis to silencing. *Annu Rev Genet* 2018; 52: 131-57.
152. Beermann J, Piccoli M-T, Viereck J, Thum T. Non-coding RNAs in development and disease: background, mechanisms, and therapeutic approaches. *Physiol Rev* 2016; 96: 1297-325.
153. Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, et al. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 2004; 304: 734-6.
154. Barth S, Meister G, Grässer FA. EBV-encoded miRNAs. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1809: 631-40.
155. Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, et al. Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods* 2005; 2: 269-76.
156. Singh J, Singh CP, Bhavani A, Nagaraju J. Discovering microRNAs from *Bombyx mori* nucleopolyhedrosis virus. *Virology* 2010; 407: 120-8.
157. Iwakiri D. Multifunctional non-coding Epstein-Barr virus encoded RNAs (EBERs) contribute to viral pathogenesis. *Virus Res* 2016; 212: 30-8.
158. Vachon VK, Conn GL. Adenovirus VA RNA: an essential pro-viral non-coding RNA. *Virus Res* 2016; 212: 39-52.
159. Wakabayashi K, Machitani M, Tachibana M, Sakurai F, Mizuguchi H. A MicroRNA derived from adenovirus virus-associated RNAII promotes virus infection via posttranscriptional gene silencing. *J Virol* 2019; 93: e01265-1318.
160. Randall RE, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* 2008; 89: 1-47.
161. Kitajewski J, Schneider RJ, Safer B, et al. Adenovirus VAI RNA antagonizes the antiviral action of interferon by preventing activation of the interferon-induced eIF-2 α kinase. *Cell* 1986; 45: 195-200.
162. Clarke PA, Mathews MB. Interactions between the double-stranded RNA binding motif and RNA: definition of the binding site for the interferon-induced protein kinase DAI (PKR) on adenovirus VA RNA. *RNA* 1995; 1: 7-20.
163. Schnettler E, Sterken MG, Leung JY, et al. Noncoding *Flavivirus* RNA displays RNA interference suppressor activity in insect and mammalian cells. *J Virol* 2012; 86: 13486-500.
164. Kakumani PK, Ponia SS, Rajgokul KS, et al. Role of RNA interference (RNAi) in dengue virus replication and identification of NS4B as an RNAi suppressor. *J Virol* 2013; 87: 8870-83.
165. Samuel GH, Wiley MR, Badawi A, Adelman ZN, Myles KM. Yellow fever virus capsid protein is a potent suppressor of RNA silencing that binds double-stranded RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113: 13863-8.
166. Pijlman GP, Funk A, Kondratieva N, et al. A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity. *Cell Host Microbe* 2008; 4: 579-91.
167. Slonchak A, Khromykh AA. Subgenomic flaviviral RNAs: what do we know after the first decade of research. *Antiviral Res* 2018; 159: 13-25.
168. Moon SL, Dodd BJT, Brackney DE, Wilusz CJ, Ebel GD, Wilusz J. *Flavivirus* sfRNA suppresses antiviral RNA interference in cultured cells and mosquitoes and directly interacts with the RNAi machinery. *Virology* 2015; 485: 322-9.
169. Peltier C, Klein E, Hleibieh K, et al. Beet necrotic yellow vein virus subgenomic RNA3 is a cleavage product leading to stable non-coding RNA required for long-distance movement. *J Gen Virol* 2012; 93: 1093-102.
170. Flobinus A, Hleibieh K, Klein E, Ratti C, Bouzoubaa S, Gilmer D. A viral noncoding RNA complements a weakened viral RNA silencing suppressor and promotes efficient systemic host infection. *Viruses* 2016; 8: 272.
171. Balmori E, Gilmer D, Richards K, Guilley H, Jonard G. Mapping the promoter for subgenomic RNA synthesis on beet necrotic yellow vein virus RNA 3. *Biochimie* 1993; 75: 517-21.
172. Lauber E, Guilley H, Tamada T, Richards KE, Jonard G. Vascular movement of beet necrotic yellow vein virus in *Beta macrocarpa* is probably dependent on an RNA 3 sequence domain rather than a gene product. *J Gen Virol* 1998; 79: 385-93.
173. Ratti C, Hleibieh K, Bianchi L, Schirmer A, Autonell CR, Gilmer D. Beet soil-borne mosaic virus RNA-3 is replicated and encapsidated in the presence of BNYVV RNA-1 and -2 and allows long distance movement in *Beta macrocarpa*. *Virology* 2009; 385: 392-9.
174. Thompson JR, Buratti E, De Wispelaere M, Tepfer M. Structural and functional characterization of the 5' region of subgenomic RNA5 of cucumber mosaic virus. *J Gen Virol* 2008; 89: 1729-38.
175. Flobinus A, Chevigny N, Charley PA, et al. Beet necrotic yellow vein virus noncoding RNA production depends on a 5' \rightarrow 3' Xrn exoribonuclease activity. *Viruses* 2018; 10: 137.
176. Chiba S, Hleibieh K, Delbianco A, et al. The benyvirus RNA silencing suppressor is essential for long-distance movement, requires both zinc-finger and NoLS basic residues but not a nucleolar localization for its silencing-suppression activity. *Mol Plant Microbe Interact* 2013; 26: 168-81.
177. Staedel C, Darfeuille F. MicroRNAs and bacterial infection. *Cell Microbiol* 2013; 15: 1496-507.
178. Guleria P, Mahajan M, Bhardwaj J, Yadav SK. Plant small RNAs: biogenesis, mode of action and their roles in abiotic stresses. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2011; 9: 183-99.
179. Tay FC, Lim JK, Zhu H, Hin LC, Wang S. Using artificial microRNA sponges to achieve microRNA loss-of-function in cancer cells. *Adv Drug Deliv Rev* 2015; 81: 117-27.
180. Barta T, Peskova L, Hampl A. miRNAsong: a web-based tool for generation and testing of miRNA sponge constructs *in silico*. *Sci Rep* 2016; 6: 36625.
181. Franco-Zorrilla JM, Valli A, Todesco M, et al. Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat Genet* 2007; 39: 1033-7.
182. Figueroa-Bossi N, Valentini M, Malleret L, Bossi L. Caught at its own game: regulatory small RNA inactivated by an inducible transcript mimicking its target. *Genes Dev* 2009; 23: 2004-15.
183. Cazalla D, Yario T, Steitz JA. Down-regulation of a host MicroRNA by a *Herpesvirus saimiri* noncoding RNA. *Science* 2010; 328: 1563-6.
184. Marcinowski L, Tanguy M, Krmpotic A, et al. Degradation of cellular miR-27 by a novel, highly abundant viral transcript is important for efficient virus replication *in vivo*. *PLoS Pathog* 2012; 8: e1002510.
185. Balistreri G, Bognanni C, Mühlemann O. Virus escape and manipulation of cellular nonsense-mediated mRNA decay. *Viruses* 2017; 9: 24.
186. Garcia D, Garcia S, Voinnet O. Nonsense-mediated decay serves as a general viral restriction mechanism in plants. *Cell Host Microbe* 2014; 16: 391-402.
187. Balistreri G, Horvath P, Schweingruber C, et al. The host nonsense-mediated mRNA decay pathway restricts mammalian RNA virus replication. *Cell Host Microbe* 2014; 16: 403-11.
188. Ge Z, Quek BL, Beemon KL, Hogg JR. Polypyrimidine tract binding protein 1 protects mRNAs from recognition by the nonsense-mediated mRNA decay pathway. *eLife* 2016; 5: e11155.

- 189.** Mocquet V, Neusiedler J, Rende F, *et al.* The human T-lymphotropic virus type 1 tax protein inhibits nonsense-mediated mRNA decay by interacting with INT6/EIF3E and UPF1. *J Virol* 2012; 86: 7530-43.
- 190.** Liu L, Chen X. RNA quality control as a key to suppressing RNA silencing of endogenous genes in plants. *Mol Plant* 2016; 9: 826-36.
- 191.** Branscheid A, Marchais A, Schott G, *et al.* SKI2 mediates degradation of RISC 5'-cleavage fragments and prevents secondary siRNA production from miRNA targets in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* 2015; 43: 10975-88.
- 192.** Yang X, Xie Y, Raja P, *et al.* Suppression of methylation-mediated transcriptional gene silencing by β C1-SAHH protein interaction during geminivirus-beta satellite infection. *PLoS Pathog* 2011; 7: e1002329.
- 193.** Buchmann RC, Asad S, Wolf JN, Mohannath G, Bisaro DM. Geminivirus AL2 and L2 proteins suppress transcriptional gene silencing and cause genome-wide reductions in cytosine methylation. *J Virol* 2009; 83: 5005-13.
- 194.** De Vries W, Haasnoot J, Fouchier R, De Haan P, Berkhout B. Differential RNA silencing suppression activity of NS1 proteins from different influenza A virus strains. *J Gen Virol* 2009; 90: 1916-22.
- 195.** Li Y, Basavappa M, Lu J, *et al.* Induction and suppression of antiviral RNA interference by influenza A virus in mammalian cells. *Nat Microbiol* 2016; 2: 16250.
- 196.** Zhu Y, Cherukuri NC, Jackel JN, *et al.* Characterization of the RNA silencing suppression activity of the Ebola virus VP35 protein in plants and mammalian cells. *J Virol* 2012; 86: 3038-49.
- 197.** Bennasser Y, Le S-Y, Benkirane M, Jeang K-T. Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity* 2005; 22: 607-19.
- 198.** Bennasser Y, Jeang K-T. HIV-1 Tat interaction with Dicer: requirement for RNA. *Retrovirology* 2006; 3: 95.
- 199.** Bennasser Y, Yeung ML, Jeang K-T. HIV-1 TAR RNA subverts RNA interference in transfected cells through sequestration of TAR RNA-binding protein, TRBP. *J Biol Chem* 2006; 281: 27674-8.
- 200.** Daniels SM, Sinck L, Ward NJ, *et al.* HIV-1 RRE RNA acts as an RNA silencing suppressor by competing with TRBP-bound siRNAs. *RNA Biol* 2015; 12: 123-35.
- 201.** Cui L, Wang H, Ji Y, *et al.* The nucleocapsid protein of coronaviruses acts as a viral suppressor of RNA silencing in mammalian cells. *J Virol* 2015; 89: 9029-43.
- 202.** Andersson MG, Haasnoot PCJ, Xu N, Berenjian S, Berkhout B, Akusjärvi G. Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA. *J Virol* 2005; 79: 9556-65.
- 203.** Wang Y, Kato N, Jazag A, *et al.* Hepatitis C virus core protein is a potent inhibitor of RNA silencing-based antiviral response. *Gastroenterology* 2006; 130: 883-92.
- 204.** Ji J, Glaser A, Wernli M, Berke JM, Moradpour D, Erb P. Suppression of short interfering RNA-mediated gene silencing by the structural proteins of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2008; 89: 2761-6.
- 205.** Chen W, Zhang Z, Chen J, *et al.* HCV core protein interacts with Dicer to antagonize RNA silencing. *Virus Res* 2008; 133: 250-8.
- 206.** Samuel GH, Wiley MR, Badawi A, Adelman ZN, Myles KM. Yellow fever virus capsid protein is a potent suppressor of RNA silencing that binds double-stranded RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113: 13863-8.
- 207.** Johnson KL, Price BD, Eckerle LD, Ball LA. Nodamura virus nonstructural protein B2 can enhance viral RNA accumulation in both mammalian and insect cells. *J Virol* 2004; 78: 6698-704.
- 208.** Van Rij RP, Saleh M-C, Berry B, *et al.* The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* 2006; 20: 2985-95.
- 209.** Nayak A, Berry B, Tassetto M, *et al.* Cricket paralysis virus antagonizes Argonaute 2 to modulate antiviral defense in *Drosophila*. *Nat Struct Mol Biol* 2010; 17: 547.
- 210.** Van Cleef KWR, Van Mierlo JT, Miesen P, *et al.* Mosquito and *Drosophila* entomobirnaviruses suppress dsRNA- and siRNA-induced RNAi. *Nucleic Acids Res* 2014; 42: 8732-44.
- 211.** Slonchak A, Khromykh AA. Subgenomic flaviviral RNAs: what do we know after the first decade of research. *Antiviral Res* 2018; 159: 13-25.
- 212.** Roby JA, Pijlman GP, Wilusz J, Khromykh AA. Noncoding subgenomic *Flavivirus* RNA: multiple functions in West Nile virus pathogenesis and modulation of host responses. *Viruses* 2014; 6: 404-27.

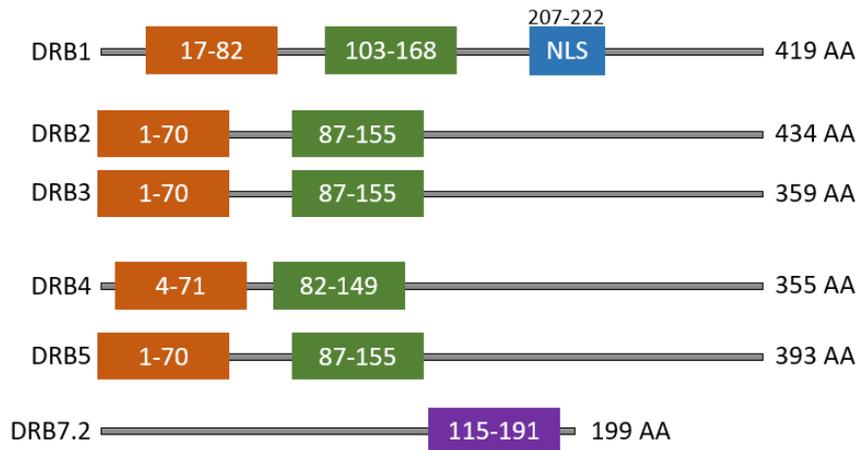


Figure 1 : Les protéines DRB chez *Arabidopsis thaliana*

Les protéines DRB1 à DRB5 et DRB7.2 sont schématisées. Les positions des dsRBD1 et dsRBD2 sont précisées dans les rectangles orange et vert respectivement. La position du signal de localisation nucléaire (NLS) de DRB1 est indiquée par un cadre bleu. La position du domaine dsRBD de DRB7.2 (violet) a été prédite à l'aide des logiciels Jpred 4 et PROSITE. AA, acides aminés. Les schémas ont été réalisés à partir des données des articles de (Aute et al., 2017; Clavel et al., 2016; Yang et al., 2014).

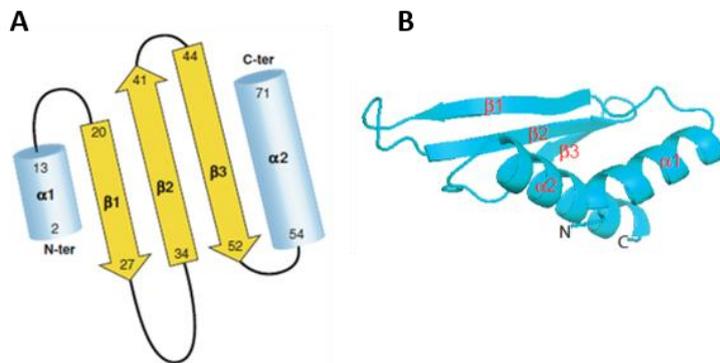


Figure 2 : Représentation d'un dsRBD canonique

Représentation schématique d'un dsRBD (A) et de la structure du dsRBD1 de DRB1/HYL1 d'*A. thaliana* (B, pdb accession number 3ADG), formé de N-ter (N) en C-ter (C), d'une hélice α (α 1), suivie de trois brins β (β 1, β 2 et β 3) puis d'une seconde hélice α (α 2). En A, Les numéros indiquent la position consensus des résidus impliqués dans la formation des structures secondaires (Masliah et al., 2013; Yang et al., 2010).

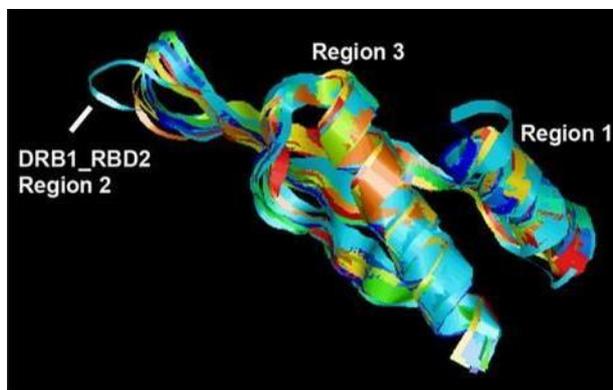


Figure 3 : Superposition des dsRBD d'*A. thaliana*

La structure du dsRBD1 de DRB1 a été utilisée comme référence pour superposer les modèles des dsRBD1 et dsRBD2 des DRB1 à DRB5 de *A. thaliana* (Reis et al., 2016). La région 1 correspond à l'hélice α 1, la région 2 au coude entre les brins β 1 et β 2 et la région 3 à l'extrémité N-terminale de l'hélice α 2. Ces trois régions sont impliquées dans l'interaction avec l'ARN double brin.

1.2. Les protéines DRB, cofacteurs essentiels des *Dicer-like* protéines

Depuis la découverte du *RNA silencing*, les mécanismes de régulation de l'expression des gènes par les petits ARN ne cessent de se complexifier. De nouvelles classes de petits ARN sont décrites, de nouvelles protéines et leurs réseaux d'interaction identifiés laissant envisager de multiples voies de régulation supplémentaires. Centrales dans les voies du *RNA silencing*, les protéines DCL (*Dicer-like*) sont au cœur de la biogenèse de ces petits ARN régulateurs. Bien qu'agissant de concert dans des voies de régulation identiques, seulement quatre DCL contre dix protéines argonautes (AGO) sont décrites chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Les protéines DCL sont assistées par des cofacteurs pour assurer leur spécificité de reconnaissance et/ou leur fonction catalytique. En plus, leur orientation fonctionnelle pourrait aussi dépendre de la nature du cofacteur lui étant associé. Les *double-stranded RNA binding* (DRB) protéines sont les partenaires des DCL les mieux décrits et jouent un rôle majeur dans les mécanismes dépendants de l'activité *dicing* des DCL (*e.g.* biogénèse des miARN, défense antivirale).

Chez *A. thaliana*, sept protéines DRB sont décrites. Les DRB1 à DRB5 ont une masse molaire de 35 à 40 kDa et renferment deux domaines de liaison aux ARN double brin (*double-stranded RNA binding domain*, dsRBD) à leur extrémité N-terminale (**Fig.1**). Une nouvelle famille ne possédant qu'un seul dsRBD a été décrite et comporte deux membres chez *A. thaliana* : DRB7.1 et DRB7.2 (**Fig.1**). Les domaines dsRBD d'environ 65 à 70 acides aminés adoptent une structure tertiaire, formée d'une hélice α , de trois brins β puis d'une seconde hélice α ($\alpha\beta\beta\beta\alpha$) (**Fig.2**). Cette structure assure la reconnaissance et la liaison aux ARN, et médie aussi des interactions protéines-protéines (Chang and Ramos, 2005). Des constructions chimériques de DRB1 et de DRB2 et des expériences de complémentation ont montré que leurs dsRBD1 partagent une fonction similaire de liaison à l'ARN tandis que leurs dsRBD2 assurent chacun une fonction distincte (Reis et al., 2016). La structure du dsRBD1 de DRB1 est canonique et semble assurer l'interaction avec les ARN (Yang et al., 2010). Aucune donnée structurale n'est disponible pour DRB2, mais son dsRBD1 complète celui de DRB1 et son interaction avec les ARN a été démontrée (Tschopp et al., 2017). Ces analyses ont été poursuivies pour les DRB2 à DRB5 d'*A. thaliana*. Les structures de leurs domaines de liaison à l'ARN double brin

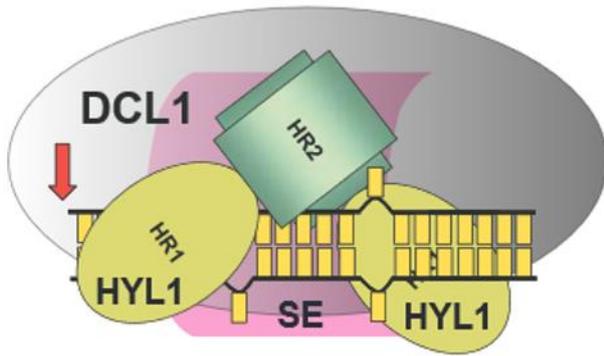


Figure 4 : Modèle d'association du complexe effecteur de biogenèse des miARN chez *A. thaliana*

Les protéines DRB1/HYL1 dimérisent par l'association de leurs dsRBD2 (HR2) et interagissent avec l'ARN par leur dsRBD1 (HR1). La protéine SERRATE (SE) interagit avec DCL1 et elles s'associent à HYL1 pour former ce complexe ternaire. HYL1 et SE pourraient agir comme « règle moléculaire » pour guider le site clivage de DCL1 (indiqué par la flèche rouge). (Yang et al., 2010).

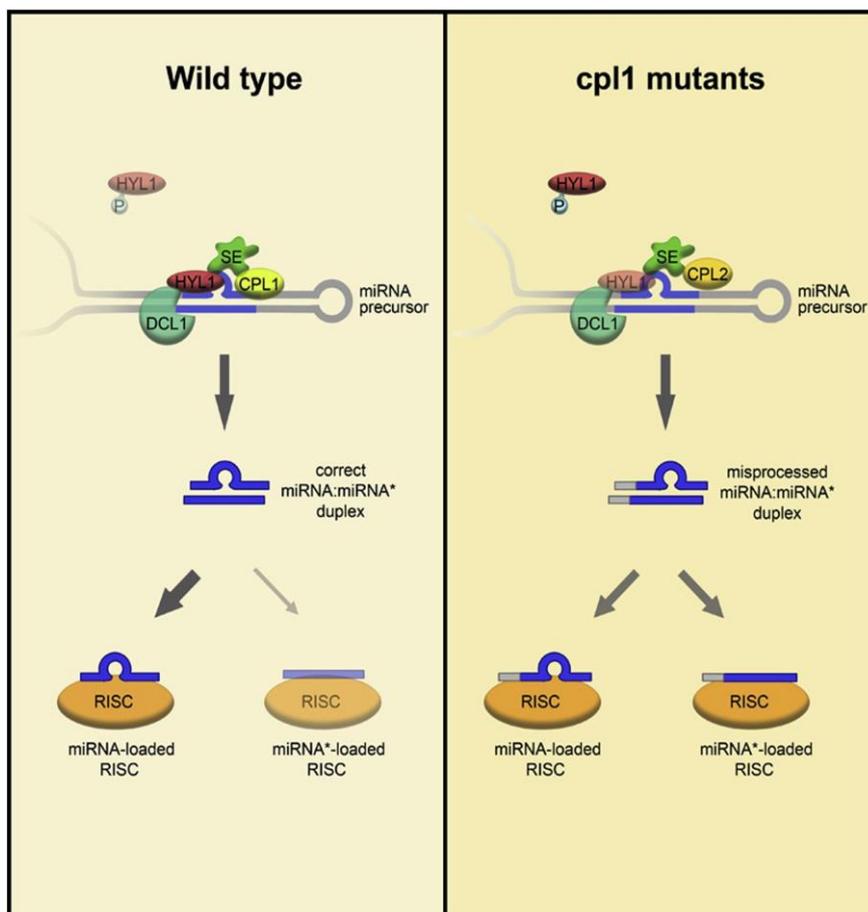


Figure 5 : La protéine CPL1 régule l'association du complexe effecteur de maturation des miARN chez *A. thaliana*

L'interaction entre CPL1 et HYL1 est médiée par la protéine SERRATE (SE). L'activité optimale de HYL1 est observée dans son état hypophosphorylée. Sa déphosphorylation est assurée par la protéine CPL1. Les plantes d'*A. thaliana* *cpl1* présentent des défauts dans la précision de maturation des miARN plutôt que dans leur niveaux d'accumulation. (Manavella et al., 2012)

ont été prédites et superposées sur les structures des dsRBD de DRB1 (**Fig.3**, (Reis et al., 2016)). L'ensemble des dsRBD1 et dsRBD2 des protéines DRB2 à DRB5 se superposent et semblent adopter la structure canonique du dsRBD1 de DRB1. Un écart à cette structure est uniquement observé pour le dsRBD2 de DRB1 (DRB1_RBD2 Region 2 sur la **Fig.3**) dont la structure non canonique avait déjà été décrite (Yang et al., 2010).

La protéine DRB1, également connue sous le nom de HYL1, est certainement le partenaire de DCL1 le mieux décrit. L'interaction directe entre DRB1 et DCL1 est primordiale pour maintenir l'efficacité de *dicing* de DCL1 (Hiraguri et al., 2005; Kurihara et al., 2006). La protéine SERRATE (SE) interagit avec DCL1 (Iwata et al., 2013) pour former avec DRB1, le complexe effecteur de production des miARN (**Fig.4**) (Dong et al., 2008; Kurihara et al., 2006; Yang et al., 2006a). Les mutants *hyl1* et *se-1* présentent des niveaux d'accumulation de miARN très faibles bien que les pri-miARN soient produits (Yang et al., 2006b). De plus, DRB1/HYL1 et SE assurent la spécificité de clivage de DCL1 ainsi que sa processivité *in vitro* et *in vivo* (Dong et al., 2008; Kurihara et al., 2006). Le second domaine de liaison à l'ARN double brin de DRB1/HYL1 assure sa dimérisation et promeut la fixation à l'ARNdb (Yang et al., 2010). Un modèle de « règle moléculaire » est ainsi proposé dans lequel le dimère de DRB1/HYL1 contrôle l'activité de DCL1 (**Fig.4**). Ces résultats sont en accord avec les données de Hiraguri *et al.* qui démontrent que le dsRBD1 de DRB1/HYL1 assure la spécificité d'interaction avec l'ARNdb, et que le dsRBD2 est impliqué dans des interactions protéines-protéines (Hiraguri et al., 2005). Des précisions sur le mode d'action de DRB1/HYL1 démontrent son importance sur la sélection du site de clivage à la base de la tige du pri-miARN (Yang et al., 2014). Au sein de ce complexe de maturation des miARN, la protéine SERRATE pourrait exercer une fonction chaperon indispensable. Plusieurs travaux présentent cette protéine comme une plateforme pour favoriser et/ou maintenir des interactions entre les différents partenaires de ce complexe. En effet, le positionnement de SE médie l'interaction entre HYL1 et la phosphatase CPL1 (*C-terminal domain phosphatase-like 1*) (Manavella et al., 2012). CPL1 déphosphoryle HYL1 pour assurer son activité optimale dans l'état hypophosphorylée. Son interaction avec DCL1 et le pri- ou le pré-miARN est alors favorisée pour former un complexe de *cropping* et de *dicing* "actif" (Machida et al., 2011) (**Fig.5**). Si l'importance des pri-/pré-miARN dans l'assemblage de ce complexe a été démontrée, la mécanistique et la chronologie ne sont toujours pas élucidées. Le modèle actuel privilégie une première interaction entre DCL1 et l'ARN qui induit

un changement conformationnel de DCL1. Des sites d'interaction se libèrent et favorisent son interaction avec SE (Iwata et al., 2013). SERRATE pourrait reconnaître la jonction ARNsb-ARNdb présente à la base des pri- et pré-miARN et ainsi optimiser leur position dans le site catalytique de DCL1 (Machida et al., 2011).

Les trois protéines DCL1, DRB1/HYL1 et SE interagissent au sein de petits foci nucléaires (*Dicing-bodies* ou *D-bodies*) où des pri-miARN ont également été détectés (Fang and Spector, 2007). La formation de ces *D-bodies* repose sur une séparation de phase liquide-liquide assurée par les domaines intrinsèquement désordonnés de la protéine SERRATE (Xie et al., 2021). Des *D-bodies* reconstitués *in vitro* et l'utilisation de lignées mutantes *se-1* ont permis de confirmer que ces *D-bodies* sont des structures essentielles impliquées dans la maturation des miARN. *In vitro*, l'interaction entre DRB1/HYL1 et SE et l'incorporation de DRB1/HYL1 dans les gouttelettes de *D-bodies* sont grandement favorisées par la présence de pré-miARN (Xie et al., 2021).

Enfin, DRB1/HYL1 semble faciliter l'export des duplex de miARN des *D-bodies*. Ces duplex présentent une asymétrie thermodynamique au niveau de leurs extrémités. Le brin guide, qui reste associé à AGO, est généralement le brin qui présente une thermostabilité plus faible en 5' (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003). Dans les *A. thaliana drb1*, cette sélection est perdue et les deux brins s'accumulent à des niveaux similaires (Eamens et al., 2009). DRB1/HYL1 pourrait ainsi contrôler la polarité du duplex de miARN dans AGO1 pour diriger la prédominance fonctionnelle du brin guide. Ce modèle a été démontré chez la drosophile où R2D2 (l'homologue de DRB1) fixe l'extrémité la plus stable du duplex tandis que Dcr2 fixe l'autre extrémité (Tomari et al., 2004). Ensemble, ces protéines permettent l'orientation du duplex dans AGO et maintiennent le biais de sélection du brin guide.

Comme pour le complexe DCL1-DRB1/HYL1, l'interaction entre DCL4 et DRB4 est également bien décrite. La localisation des deux protéines a d'abord été démontrée dans les noyaux de *Tradescantia reflexa* (Hiraguri et al., 2005) avant d'observer une distribution cytoplasmique de DCL4 (Montavon et al., 2018; Pumplin et al., 2016). Cette disparité est provoquée par l'expression de deux isoformes de DCL4 chez *A. thaliana*. Le site d'initiation de la transcription (TSS) est dicté par le niveau de méthylation du promoteur de DCL4. Ce niveau de régulation détermine la localisation nucléaire de l'isoforme complète de DCL4 avec un NLS à l'extrémité N-terminale (DCL4^{NLS}), ou cytoplasmique de l'isoforme plus court appelée DCL4Δ

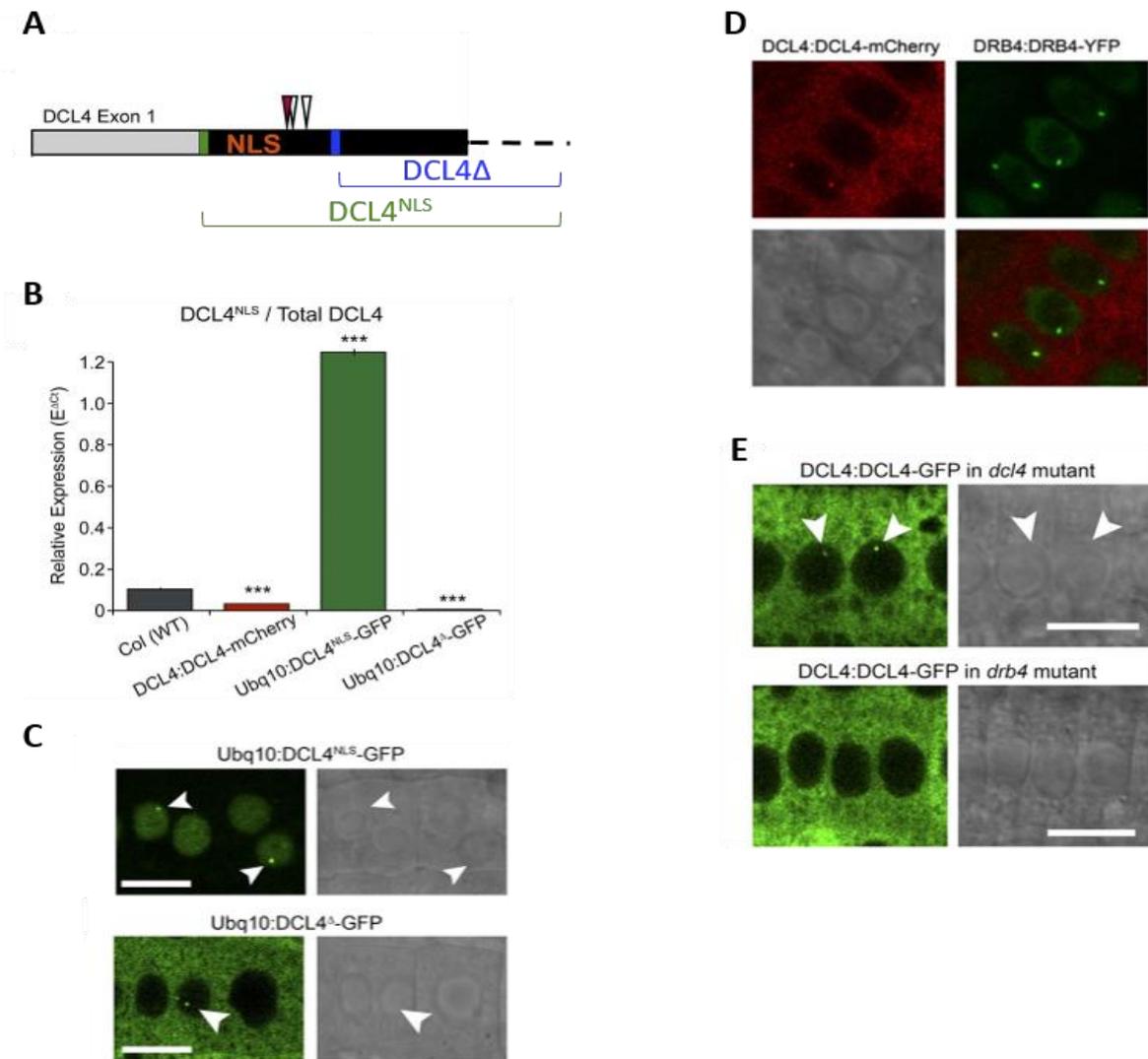


Figure 6 : Expression et localisation subcellulaire des protéines DCL4 d'*A. thaliana*

A) Représentation schématique du locus de DCL4. Les deux ATG initiateurs sont représentés en vert et bleu et assurent l'expression des protéines DCL4^{NLS} et DCL4 Δ respectivement. Les rectangles gris et noir représentent la région 5' non-traduite et le premier exon de DCL4 respectivement. Le site d'initiation de la transcription (TSS) identifié dans les plantes d'*Arabidopsis thaliana* Col0 est indiqué par des flèches blanches (duplicat). La flèche rouge indique le TSS déterminé dans les lignées surexprimant la protéine de fusion DCL4-mCherry sous le contrôle du promoteur endogène de DCL4 (ProDCL4:DCL4-mCherry). B) Expression relative de DCL4^{NLS} dans les lignées Col (WT) et transgéniques d'*A. thaliana* par rapport aux DCL4 totales. Les moyennes de trois réplicats biologiques indépendants où chacun comporte trois réplicats techniques sont représentées. *** p-value < 0.001, réalisée avec le test t de Student par rapport à l'échantillon Col (WT). C) Localisation subcellulaire des protéines DCL4^{NLS} et DCL4 Δ fusionnées à la GFP, exprimées dans les cellules racinaires d'*A. thaliana* sous le contrôle du promoteur constitutif de l'ubiquitine (Ubq10). D) Colocalisation des protéines de fusion DCL4-mCherry et DRB4-YFP exprimées sous le contrôle de leur promoteur endogène dans les racines d'*A. thaliana*. E) Localisation subcellulaire de la protéine DCL4^{NLS} exprimée sous le contrôle de son propre promoteur et fusionnée à la GFP dans les racines de lignées *dcl4* ou *drb4* d'*A. thaliana*. Les images de microscopie ont été réalisées à l'aide d'un microscope confocal, les flèches blanches indiquent les foci nucléaires ou *dicing bodies*. La barre d'échelle représente 10 μ m. (modifiée de (Pumplin et al., 2016))

délétée des 60 premiers acides aminés (Pumplin et al., 2016) (**Fig.6A**). L'analyse de l'expression relative de ces deux isoformes a permis de conclure que DCL4 Δ est la version majoritairement exprimée (**Fig.6B**) et contraste avec les premières observations strictement nucléaires de DCL4, dictées par l'annotation d'un TSS unique. Bien que DCL4 Δ soit majoritairement exclue du noyau, de petits foci nucléaires sont observés (**Fig.6C**) où DCL4 Δ et DRB4 co-localisent (**Fig.6D**) mais ne sont pas observés dans des plantes *drb4* (**Fig.6E**) (Montavon et al., 2018; Pumplin et al., 2016). DRB4 pourrait ainsi lier et assurer l'import nucléaire d'une fraction de DCL4 Δ .

Lors d'immunoprécipitation dirigée contre DRB4, la protéine DCL4 et des petits ARN de 21 nt sont retrouvés associés à DRB4. Ces ARN sont perdus en fond mutant *drb4* et retrouvés lors de l'expression d'une protéine DRB4 recombinante. Cette restauration n'est pas observée lors de l'expression des protéines recombinantes DRB1, DRB2 et DRB3, démontrant qu'une spécificité fonctionnelle est maintenue par DRB4 (Fukudome et al., 2011). La fonction de DRB4 dans la défense antivirale a été démontrée dans des plantes infectées par le TCV (turnip crinkle virus) (Qu et al., 2008) où les plantes *drb4* présentent une accumulation accrue des ARN viraux comparé aux plantes WT. Les travaux de Jakubiec *et al.* démontrent que DRB4 est essentielle pour maintenir la biogenèse des siARN viraux (vsiARN) de 21 nt associés à DCL4 lors d'une infection par le TYMV (turnip yellow mosaic virus) (Jakubiec et al., 2012). Les niveaux d'accumulation des ARNm et de la protéine DRB4 augmentent dans les plantes infectées. En plus, la protéine DRB4 est localisée dans les noyaux des plantes saines et est relocalisée dans le cytoplasme des plantes infectées (Jakubiec et al., 2012). La relocalisation nucléo-cytoplasmique de DRB4 au niveau des complexes de réplication a aussi été observée lors d'infection par le TRV (tobacco rattle virus) et le TBSV (tomato bushy stunt virus) dans *A. thaliana* (Incarbone et al., 2020a, 2020b). DRB4 s'associe aux ARN *in vitro* et aux ARN viraux *in vivo* (Jakubiec et al., 2012). A l'instar de DRB1, l'interaction avec les ARNdb semble principalement médiée par le dsRBD1 de DRB4 (Aute et al., 2017). La séquence qui sépare les deux dsRBD de DRB4 de *A. thaliana* (seulement neuf acides aminés) semble contraindre la structure de DRB4 et empêcher son dsRBD2 d'interagir avec la même molécule d'ARN que son dsRBD1, le laissant ainsi disponible pour assurer d'autres interactions (Aute et al., 2017). Lors d'expériences d'immunoprécipitation, une fraction de DRB4 est retrouvée "libre", *i.e.* non associée à DCL4 (Nakazawa et al., 2007). La biogenèse de certains miARN est dépendante de DCL4 et non pas de DCL1 (Rajagopalan et al., 2006) mais des travaux ultérieurs ont montré

l'association de DRB4 dans cette voie alternative (Pegler et al., 2019; Pélissier et al., 2011). En revanche, l'interaction démontrée entre DRB4 et la protéine DRB7.2, récemment décrite, pourrait expliquer les deux fractions distinctes de DRB4. Cette nouvelle famille de DRB (nommée DRB7) a été identifiée par analyse phylogénétique (Clavel et al., 2016). Elle est conservée chez l'ensemble des plantes vasculaires et deux protéines, DRB7.1 et DRB7.2, sont codées chez *A. thaliana*. Contrairement aux autres DRB exprimées chez *A. thaliana*, les DRB7 ne possèdent qu'un unique domaine dsRBD (**Fig.1**). L'interaction entre DRB7.2 et DRB4 a été démontrée par complémentation bimoléculaire de fluorescence (BiFC) dans les noyaux (Montavon et al., 2017). Ce complexe DRB4/DRB7.2 est impliqué dans la production des siARN dérivés des séquences endogènes inversement répétées (endoIR-siRNA). Aucune interaction entre DRB7.2 et DCL4 n'a été détectée et elle n'est pas favorisée par la présence de DRB4 dans le cas où une interaction indirecte serait privilégiée au sein d'un complexe multiprotéique. Lors d'expériences d'immunoprécipitation de DRB7.2, les niveaux d'accumulation de DRB4 associés à DRB7.2 sont très nettement inférieurs lorsque DRB7.2 est surexprimée en présence de DCL4. Ces résultats suggèrent fortement qu'il existe une compétition pour interagir avec DRB4 et que DCL4 est préférentiellement liée par DRB4. Les niveaux d'accumulation des endoIR-siRNA de 24 nt, *i.e.* générés par DCL3, sont supérieurs dans les lignées *drb7.2* et *drb4* mais aucun effet additif n'est observé dans les lignées *drb4/drb7.2*, confirmant là encore une action coordonnée des deux protéines au sein d'un même complexe. Toutefois, le complexe DRB4/DRB7.2 ne semble pas inhiber l'action de DCL3 par une interaction directe car DRB4 n'interagit pas avec DCL3 et aucun peptide de DCL3 n'a été identifié dans des immunoprécipitations de DRB7.2. L'effet inhibiteur de DRB4 et DRB7.2 sur la biogenèse de ces siARN s'exerce par la séquestration des précurseurs des endoIR-siRNA ce qui limite leur maturation par DCL3 (Montavon et al., 2017).

En dehors de son rôle dans la défense antivirale, DRB4 assure aussi l'homéostasie cellulaire en contrôlant la biogenèse des *trans-acting* siARN (ta-siARN, (Adenot et al., 2006; Nakazawa et al., 2007). Ces petits ARN font partie de la famille des phasiARN (*phased-siRNA*), eux-mêmes étant inclus dans une famille encore plus large, celle des siARN secondaires (ou siARN RDR6-dépendants). Les ta-siARN sont ainsi générés par deux étapes de *dicing* successives : 1) un transcrit primaire (codant ou non-codant) synthétisé par la polymérase II est ciblé par un miARN qui induit son clivage et 2) ces produits de clivage sont pris en charge par RDR6

pour synthétiser de nouveaux ARN double brin, substrat de DCL4/DRB4 qui génèrent les ta-siARN.

Au début de leur découverte, les deux complexes DCL1/DRB1 et DCL4/DRB4 ont parfois été considérés comme des modèles de « un pour un », où chacune des DCL interagit exclusivement avec sa DRB. Toutefois, un nouveau mode de régulation a été proposé en observant une interchangeabilité dans les complexes DCL/DRB. L'interaction entre DCL1 et DRB2 avait déjà été observée sans qu'une réelle fonction ne puisse être attribuée à ce complexe (Hiraguri et al., 2005). La surexpression de DRB2 dans des lignées *drb1* restaure des niveaux d'accumulation de miARN à des niveaux similaires à ceux observés dans les lignées *drb1/DRB1* et Col0. Les protéines DRB3 et DRB5 ne permettent pas une telle complémentarité probablement en raison de leur localisation subcellulaire différentes de la localisation nucléaire des protéines DCL1, DRB1 et DRB2 (Eamens et al., 2012a). Toutefois, en fonction des miARN étudiés dans le méristème apical, la perte d'activité de DRB2 entraîne une augmentation ou une réduction de leurs niveaux d'accumulation. DRB2 se positionne ainsi comme un régulateur de la voie des miARN qui présente une fonction synergique mais aussi antagoniste à celle de DRB1 (Eamens et al., 2012a). Des plantes sauvages et les mutants *drb1* et *drb2* ont été étudiés par une analyse protéomique. Parmi les protéines présentant des niveaux d'accumulation dérégulés, dix d'entre elles ont été sélectionnées. Cinq sont codées par un messenger dont on sait qu'il est ciblé par un miARN ; pour les cinq autres, il ne s'agit que d'une prédiction. Les niveaux d'accumulation élevés des protéines corrèlent avec ceux de leur ARNm respectifs qui augmentent dans les plantes *drb1* alors que les niveaux d'accumulation des transcrits dans les plantes *drb2* sont inchangés (Reis et al., 2015). Ces données orientent l'action de DRB2 dans l'inhibition de la traduction médiée par les miARN. Comme DRB1 et DRB2 s'associent à DCL1, l'orientation dans telle ou telle voie pourrait être gouvernée par le dsRBD2 de chacune des DRB qui pourrait ainsi assurer la spécificité fonctionnelle de chacune de DRB par des interactions protéines-protéines distinctes (Chang and Ramos, 2005).

Une fonction antivirale a récemment été associée à DRB2. A l'instar de DRB4, DRB2 est relocalisée aux complexes de réplication de plusieurs virus (Barton et al., 2017; Incarbone et al., 2020b). La surexpression de DRB2 dans des feuilles infectées par le TRV, TBSV, PVX

(potato virus X) ou GFLV (grapevine fan leaf virus) réduit drastiquement l'accumulation des ARN viraux (Incarbone et al., 2020b). Dans les plantes *knockout drb2*, l'accumulation des ARN viraux du TRV est favorisée par rapport aux plantes Col-0 (Incarbone et al., 2020b) mais reste modérée pour le TBSV (Incarbone et al., 2020a). DRB2 se présente ainsi comme une protéine antivirale à large spectre avec une fonction supplémentaire dans la voie des miARN.

Si l'action des protéines DRB2 et DRB4 a souvent été considérée comme redondante (surtout dans la défense antivirale), une fonction antagoniste est aussi décrite dans la régulation des p4-siARN (Pélissier et al., 2011). Ces petits ARN sont générés suite à la transcription par la polymérase IV (p4) d'un ARN converti en double-brin par RDR2 et son clivage par DCL3 en siARN de 24 nt (p4-siARN). Ces p4-siARN s'associent majoritairement à AGO4 pour initier le TGS (*transcriptional gene silencing*) par la méthylation de l'ADN et la modification des histones (voie RdDM, *RNA-directed DNA methylation*, pour revue voir (Erdmann and Picard, 2020)). Les niveaux d'accumulation des p4-siARN sont augmentés dans les *A. thaliana drb2* et réduits dans les plantes *drb4* (Pélissier et al., 2011). De plus, les plantes qui surexpriment DRB2 miment les plantes *drb4* : elles présentent le phénotype *zippy*, aussi décrit chez les mutants *dcl4* (Adenot et al., 2006), avec une diminution de l'accumulation des p4-siARN et des ta-siARN (Pélissier et al., 2011). A l'exception des miARN DCL4-dépendants dont l'accumulation diminue dans les mutants *drb2*, les niveaux d'accumulation des autres petits ARN (miARN, ta-siARN, endoIR-siARN) générés indépendamment de l'activité de polIV restent inchangés dans les plantes *drb2* (Pélissier et al., 2011). Ces données illustrent à nouveau la redondance fonctionnelle que peuvent présenter les protéines DRB2 et DRB4 (dans la voie des miARN DCL4 dépendants) et aussi leur effet antagoniste limité à la voie des p4-siARN.

A l'heure actuelle, les protéines DRB3 et DRB5 restent peu caractérisées. Elles ne semblent pas être impliquées dans la voie canonique de biogenèse des miARN mais pourraient s'associer à DRB2 dans la voie alternative par l'inhibition de la traduction (Eamens et al., 2012b).

Une fonction antivirale a récemment été attribuée à DRB3 en étudiant la réponse à l'infection par un geminivirus (beet curly top virus, BCTV) dans *A. thaliana*. La défense antivirale est assurée par la méthylation du génome viral par la voie RdDM (Raja et al., 2008). Parmi les lignées *drb2*, *drb3*, *drb4* et *drb5*, seules les plantes *drb3* sont hyper-susceptibles à l'infection par un geminivirus. Des expériences de BiFC et de co-immunoprécipitation révèlent une

interaction nucléaire de DRB3 avec DCL3 et AGO4 (Raja et al., 2014), toutes deux impliquées dans le TGS. Les niveaux d'accumulation des siARN dérivés du geminivirus ne sont pas altérés dans les mutants *drb3* et *ago4* (Raja et al., 2014) mais le génome viral y est trouvé hypométhylé. DRB3 semble ainsi agir en aval de la biogenèse des siARN assurée par DCL3 et participe à la défense antivirale ciblant les geminivirus par la voie RdDM. Si la fonction des DRB2, DRB3 et DRB5 n'a été que rarement associée à la défense antivirale, leur relocalisation au niveau des complexes de réplication cytoplasmique de plusieurs virus (TuMV (turnip mosaic virus), TSWV (tomato spotted wilt virus), TMV (tobacco mosaic virus), PVX) semble conforter leur rôle dans la défense antivirale (Barton et al., 2017). En revanche, DRB1 et DRB4 restent localisées dans les noyaux. Ces résultats sont cohérents avec la fonction de DRB1 dans la voie des miARN mais contradictoires avec la relocalisation cytoplasmique décrite pour DRB4 en cas d'infection virale par le TYMV, TRV et TBSV (Incarbone et al., 2020a, 2020b; Jakubiec et al., 2012).

L'ensemble de ces données tend à confirmer que les interactions DCL/DRB initialement décrites ne sont pas exclusives. Si des généralités existent, il semble aujourd'hui que ces associations binaires soient bien plus flexibles que le modèle de « une DRB pour une DCL ». De multiples voies de biogenèse de petits ARN sont désormais décrites et sont en partie gouvernées par l'association, ou non, des DRB aux DCL.

Les données présentées ci-dessus concernent les protéines DRB d'*A. thaliana* (sauf exception mentionnée). *Nicotiana benthamiana* est une autre plante modèle largement utilisée dans les laboratoires (pour revue, voir (Bally et al., 2018)). Si de nombreux travaux relatifs à l'ARN interférence sont effectués dans *N. benthamiana* (VIGS, détermination et études fonctionnelles de VSR etc.), peu de données sont disponibles sur ses protéines impliquées dans les voies du RNAi. Depuis 2012, deux génomes de *N. benthamiana* sont disponibles en ligne (<http://benthgenome.com> et <https://solgenomics.net>), toutefois la difficulté d'étudier la fonction de ces protéines peut s'expliquer par le génome tétraploïde de *N. benthamiana*. Cette plante résulte en effet d'un croisement entre *Nicotiana sylvestris* et *Nicotiana noctiflora* dont les deux génomes parentaux ont été maintenus (Schiavinato et al., 2020). En théorie, *N. benthamiana* possède donc deux isoformes de chaque gène et cette organisation génétique a compliqué l'annotation de son génome. Une étude préliminaire

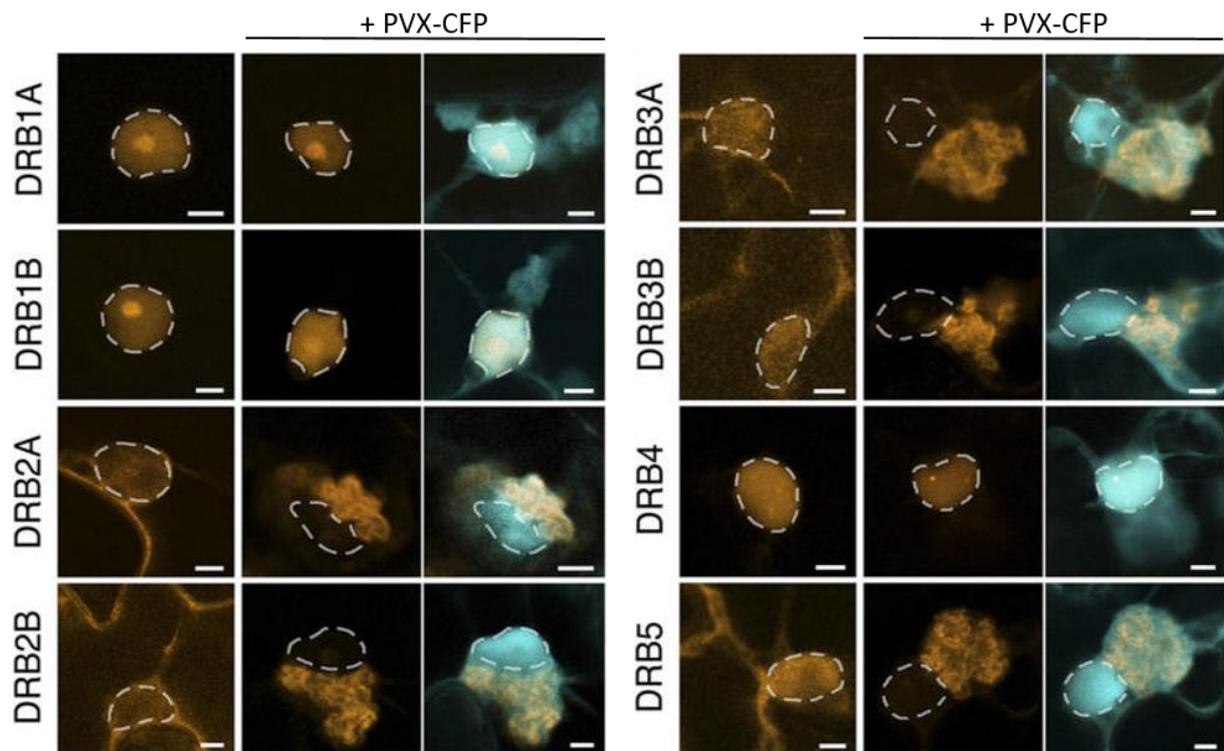


Figure 7 : Localisation et relocalisation subcellulaire des protéines DRB de *N. benthamiana* en cas d'infection virale

Les protéines DRB de *N. benthamiana* ont été fusionnées à l'OFP (*orange fluorescent protein*) pour assurer leur expression transitoire dans *N. benthamiana* par agroinfiltration, en absence ou en co-infiltration avec le virus PVX exprimant la CFP (*cyan fluorescent protein*) fusionnée à la protéine de capsid CP. Les noyaux sont entourés par le cercle pointillé blanc. La barre d'échelle représente 5 μm . (Barton et al., 2017)

menée sur les gènes de *N. benthamiana* impliqués dans le *RNA silencing* a montré que : la moitié d'entre eux sont exprimés par paire avec leur homologue fonctionnel, un quart d'entre eux exprime une version génique fonctionnelle et l'homologue s'exprime mais n'est pas fonctionnel, et dans le dernier quart, le deuxième homologue n'est pas exprimé (Bally et al., 2018).

Parmi les protéines impliquées dans le *RNAi* chez *N. benthamiana*, les DRB ont fait l'objet de quelques études. La localisation subcellulaire des DRB et leur éventuelle relocalisation en cas d'infection virale ont récemment été décrites (Barton et al., 2017). Leurs études sont basées sur les séquences des protéines DRB répertoriées dans la banque de benthgenome. Deux gènes homéologues (A et B) sont décrits pour DRB1, DRB2 et DRB3 tandis qu'un gène unique semble avoir été identifié pour DRB4 et DRB5. Les protéines DRB1 et DRB4 s'accumulent préférentiellement dans les noyaux et une localisation plutôt diffuse dans le nucléoplasme et le cytoplasme est observée pour les protéines DRB2, DRB3 et DRB5 (**Fig.7**). La relocalisation des protéines a été étudiée suite à l'infection par le virus PVX qui induit la formation de complexes de réplication viraux (VRC, *viral replication complexes*) aisément visibles et identifiables en microscopie (Tilsner et al., 2012). Lors de l'infection, les protéines DRB1 et DRB4 demeurent nucléaires, tandis que DRB2, DRB3 et DRB5 sont majoritairement relocalisées au sein des VRC cytoplasmiques du PVX (**Fig.7**). Cette relocalisation a été observée lors d'infections par trois autres virus, le TuMV, le TSWV et le TMV. Ceci permet de généraliser la relocalisation de DRB2, DRB3 et DRB5 en cas d'infections virales.

Dans les travaux de Fátýol *et al.* (Fátýol et al., 2020), les fonctions des protéines DRB2B, DRB3A, DRB4 et DRB5 ont été étudiées dans la mise en place de la réponse antivirale médiée par le *RNA silencing* et/ou le PTI (*PAMP triggered immunity*). Surexprimée de manière transitoire, DRB2 est la seule DRB testée à favoriser l'accumulation du virus PVX dans *N. benthamiana*. Cette activité provirale est liée à l'inhibition de l'activité des DCL qui se traduit par une diminution d'accumulation des vsARN. En parallèle, le *knockdown* de DRB2 réduit drastiquement les symptômes d'infection virale ainsi que la mise en place de nécroses induites par DRB2 lors d'une réponse PTI. Cette réponse de type PTI serait induite lors d'une infection mixte où l'excès d'ARN viraux pourrait activer cette voie antivirale alternative.

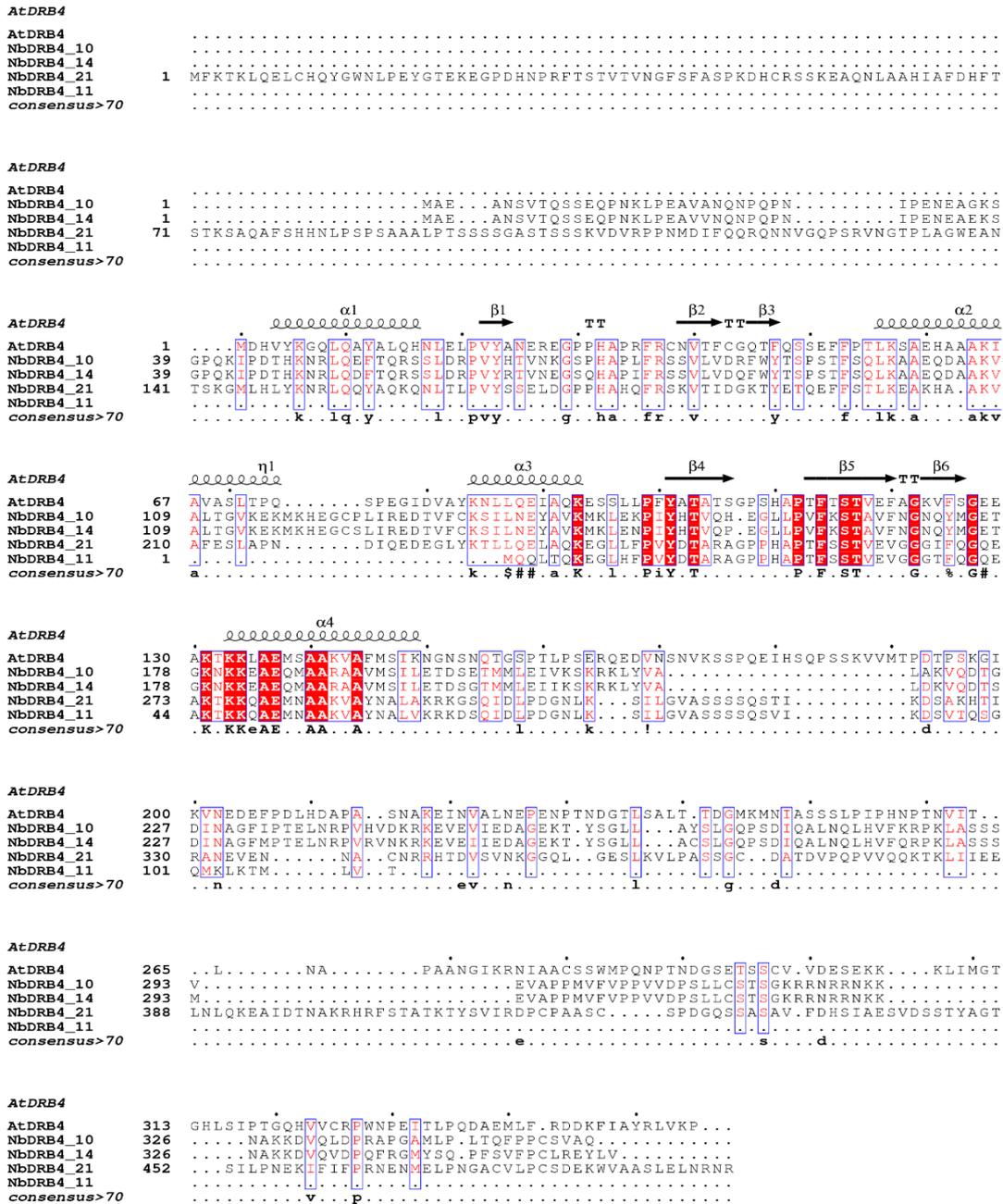


Figure 8 : Alignement des séquences des protéines DRB4 de *N. benthamiana* et de *A. thaliana*

Les séquences des quatre protéines DRB4 de *N. benthamiana* (NbDRB4) annotées ont été alignées à celle d'*A. thaliana* (AtDRB4). Les séquences des NbDRB4_10, NbDRB4_14, NbDRB4_21 et NbDRB4_11 correspondent aux numéros d'accès Niben101Scf06376g01010, Niben101Scf09861g01014, Niben101Scf05841g01021 et Niben101Scf05841g01011 respectivement. La séquence consensus est indiquée. Les acides aminés conservés à 100 % sont surlignés en rouge et apparaissent en majuscules dans la séquence consensus, ceux conservés à 70 % sont écrits en rouge et apparaissent en lettres minuscules dans la séquence consensus. \$ représente la conservation des acides aminés L ou M, # celle des acides aminés N, D, Q, ou E, % celle des acides aminés F et Y, ! la conservation des acides aminés V ou I. Les hélices α et les brins β des domaines dsRBD de DRB4 d'*A. thaliana* illustrés dans la figure 2 sont indiqués au-dessus des alignements.

Les DRB apparaissent désormais comme des protéines clés dans les diverses voies du *RNA silencing*. Caractérisées comme des cofacteurs des DCL, elles assurent leur précision et maintiennent leur processivité de clivage dans la biogenèse des petits ARN. Découverts il y a plus de 20 ans, les fonctions associées aux petits ARN sont grandissantes et de nouvelles familles ne cessent d'être décrites. Si la plante modèle *Arabidopsis thaliana* est un outil majeur dans la description de ces processus, elle présente aussi ses limites, illustrée par la caractérisation des phasiARN chez le riz ou encore d'autres espèces (Jiang et al., 2020). La difficulté de transposer l'universalité des travaux menés chez *A. thaliana* est aussi illustrée par la divergence des séquences des protéines DRB4 chez *N. benthamiana* (**Fig.8**). Si certains résidus sont conservés, surtout au sein des dsRBD, la protéine DRB4 de *A. thaliana* ne semble pas homologue à l'une des DRB4 décrite chez *N. benthamiana*. Les travaux concernant le *RNAi* ont été majoritairement menés sur *A. thaliana* et la transposition de ces résultats à *N. benthamiana* peut parfois paraître délicate au regard de la divergence des séquences des protéines impliquées dans le *RNAi*. Malheureusement, bien que *N. benthamiana* soit largement reconnue comme une plante modèle et que de nombreux suppresseurs du *RNAi* y aient été identifiés et étudiés, la caractérisation fonctionnelle de ses protéines reste discrète.

Afin d'enrichir les données existantes sur le *RNAi* antiviral dans *N. benthamiana*, la caractérisation du VSR du beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) infectant *N. benthamiana* a été initiée au laboratoire.

1.3. Notre modèle viral, le beet necrotic yellow vein virus

Le beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) appartient à la famille des *Benyviridae*, au genre des *Benyvirus* qui regroupe également le beet soil-borne mosaic virus (BSBMV), le burdock mottle virus (BdMV) et le rice stripe necrosis virus (RSNV) (Gilmer et al., 2017). Les virus de cette famille sont multipartites et leur génome est composé de deux à cinq ARN simple brin de polarité positive, coiffés et polyadénylés.

Le BNYVV infecte les plantes de la famille des *Chenopodiaceae* et ses hôtes appartiennent au genre *Beta* : la betterave sucrière (*Beta vulgaris*) et la betterave sauvage (*Beta macrocarpa*). Souvent, l'infection virale se traduit uniquement par les symptômes racinaires appelés rhizomanie. Toutefois, les infections systémiques sont aussi possibles et provoquent des symptômes foliaires tels que le jaunissement des nervures et la formation de nécroses.

On distingue aujourd'hui quatre isolats du BNYVV : les isolats A et B sont constitués de quatre ARN génomiques, et les isolats P et J possèdent un cinquième ARN génomique (Schirmer et al., 2005). La longueur des particules virales varie de 390 nm à 80 nm en fonction de l'ARN encapsidé et présentent un diamètre de 20 nm. Elles sont majoritairement constituées de la protéine de capsid CP. La protéine mineure de capsid CP-RT est située à l'une des extrémités des particules et participe à la morphogenèse et à la transmission du virus par le protozoaire vecteur (Schmitt et al., 1992; Tamada and Kusume, 1991).

La caractérisation moléculaire du BNYVV a été initiée dès l'obtention des clones cDNA infectieux des cinq ARN génomiques (Bouzoubaa et al., 1986; Ouillet et al., 1989; Ziegler-Graff et al., 1988). La polyprotéine nécessaire à la réplication et les protéines structurales, de mouvement et de suppression du *RNAi* sont exprimées à partir des ARN1 et ARN2 respectivement (**Fig.9**). Ces deux ARN suffisent à exprimer les gènes de ménage pour initier l'infection sur des plantes modèles. L'infection virale est initiée au laboratoire par l'inoculation mécanique de transcrits viraux produits *in vitro* ou de sap. L'infection virale est systémique sur *Nicotiana benthamiana* et *Spinacia oleracea* (épinard) et locale sur *Chenopodium quinoa*. Chez cette plante, l'infection se traduit par la formation de lésions locales. A noter que la plante *Arabidopsis thaliana* n'est pas hôte pour ce virus.

Les protéines responsables de l'accentuation des symptômes, de la pathogénicité et impliquées dans la transmission sont exprimées par les ARN3 à ARN5. Ces ARN3 à ARN5 étant accessoires pour l'infection de certaines plantes utilisées au laboratoire, ils ont été dérivés en vecteurs d'expression appelés réplicons (rep3 et rep5, **Fig.9**). Ces réplicons conservent les séquences promotrices et les signaux d'encapsidation présents aux extrémités 5' et 3' non codantes des ARN génomiques dont ils sont issus et les régions codantes sont remplacées par une séquence d'intérêt à exprimer (Schmidlin et al., 2005). Contrairement au rep5, la délétion de la séquence interne de l'ARN3 abolit le transport à longue distance de ce réplicon rep3 bien qu'il soit toujours encapsidé.

L'ARN1 (6746 nt) code une polyprotéine de 237 kDa dont le domaine protéase réalise un autoclivage et libère deux protéines : (1) l'une de 150 kDa qui renferme les domaines méthyltransférase (MTR), hélicase (HEL) et protéase (PRO) et (2) l'autre de 60 kDa portant le domaine polymérase (POL) (**Fig.9**). Ces deux protéines interagissent pour former le complexe de réplication qui paraît associé au réticulum endoplasmique (Pakdel et al., 2015).

L'ARN2 (4612 nt) assure l'expression de la protéine majeure de capsid CP de 21 kDa. Un mécanisme de translecture du codon stop de la CP permet de synthétiser la protéine de fusion CP-RT de 75 kDa. Cette protéine mineure de capsid est essentielle à la transmission par le vecteur *Polymyxa betae* (Tamada et al., 1996a). Les autres gènes 3' proximaux sont exprimés à partir de trois ARN subgénomiques (Gilmer et al., 1992) (**Fig.9**). Les protéines de mouvement du BNYVV sont organisées sous la forme d'un *triple-gene-block* (TGB) et sont exprimées par les deux plus grands ARN subgénomiques. Cette organisation en TGB est conservée chez de nombreux phytovirus associés au genre des Potexvirus, Pomovirus, Hordeivirus (pour revue voir (Verchot-Lubicz et al., 2010)). La première protéine de mouvement du TGB, dénommée TGB-p1 ou p42, est exprimée par le premier ARN subgénomique (ARN2sub-a). Les protéines TGB-p2 et TGB-p3, p13 et p15 respectivement, sont exprimées par l'ARN2sub-b. La protéine p15 est synthétisée par un mécanisme de *leaky scanning*. Le dernier ORF de l'ARN2 est exprimé par l'ARN subgénomique ARN2sub-c. Il code pour le suppresseur du *RNA silencing*, la protéine p14.

L'ARN3 (1775 nt) est monocistronique et code pour la protéine p25 (**Fig.9**) qui gouverne la symptomatologie foliaire (Jupin et al., 1992; Vetter et al., 2004) et racinaire (Peltier et al.,

2011; Tamada et al., 1999). L'expression transitoire de p25 dans des feuilles de *Beta vulgaris* suffit à induire leur jaunissement (Peltier et al., 2011) et l'expression constitutive de p25 dans des lignées transgéniques d'*A. thaliana* induit le phénotype de ramification racinaire (Peltier et al., 2011). Un signal de localisation nucléaire (NLS) et une séquence d'export nucléaire (NES) ont été identifiés sur la protéine p25 (Vetter et al., 2004). Ces deux motifs coordonnent le trafic nucléocytoplasmique de p25. Sa localisation nucléaire serait associée à l'activation de la transcription. En effet, dans le système simple hybride de levure, la transcription du gène rapporteur est activée par la protéine p25 fusionnée à un domaine de liaison à l'ADN (LexA ou Gal4BD). Des expériences de mutagenèse ont positionné le domaine d'activation de la transcription des résidus 103 à 160 (Klein et al., 2007). En parallèle, p25 induit une dérégulation du transcriptome et favorise l'expression de protéines provirales (suppresseur de mort cellulaire, Bax inhibitor 1) et diminue l'expression de protéines associées aux mécanismes de résistance (gènes de résistance R TIR-NBS-LRR) (Peltier et al., 2011). En plus, une dérégulation hormonale majeure est observée dans les plantes infectées, particulièrement marquée dans les voies de signalisation auxine-dépendantes (Peltier et al., 2011) qui contrôlent le développement latéral racinaire (Fernando Gil et al., 2018). Finalement, tout ou partie de ces mécanismes pourrait dépendre de l'état de phosphorylation de p25 (Hleibieh, 2010). Malgré l'ensemble de ces caractéristiques, la fonction de la protéine p25 reste imprécise.

L'ARN3 est aussi indispensable pour assurer le mouvement viral à longue distance sur les hôtes naturels du genre *Beta* (Lauber et al., 1998) indépendamment d'une expression protéique. En effet, des mutations abolissant l'expression de p25 ne perturbent pas l'infection systémique sur *B. macrocarpa* (Lauber et al., 1998). Des expériences de délétions ont permis d'identifier une région appelée « core » (position 1033 à 1266) indispensable au mouvement systémique du BNYVV sur *B. macrocarpa* (Lauber et al., 1998). L'ARN3 du BSBMV peut compléter l'ARN3 du BNYVV lors d'inoculation sur *B. macrocarpa* (Ratti et al., 2009). Une séquence conservée de 20 nt a été identifiée dans la région core lors d'un alignement nucléotidique des ARN3 du BNYVV et du BSBMV. Cette séquence contient les nucléotides 1236 à 1255 du BNYVV et a été nommée « Coremin » (core minimum) (Ratti et al., 2009). Un ARN viral colinéaire à l'extrémité 3' de l'ARN3 est produit et comporte la séquence Coremin à son extrémité 5', précédée de 2 nt (Peltier et al., 2012). Un mode de biogenèse par synthèse d'ARN subgénomique avait été privilégié pour produire l'ARN3-sub (Balmori et al., 1993).

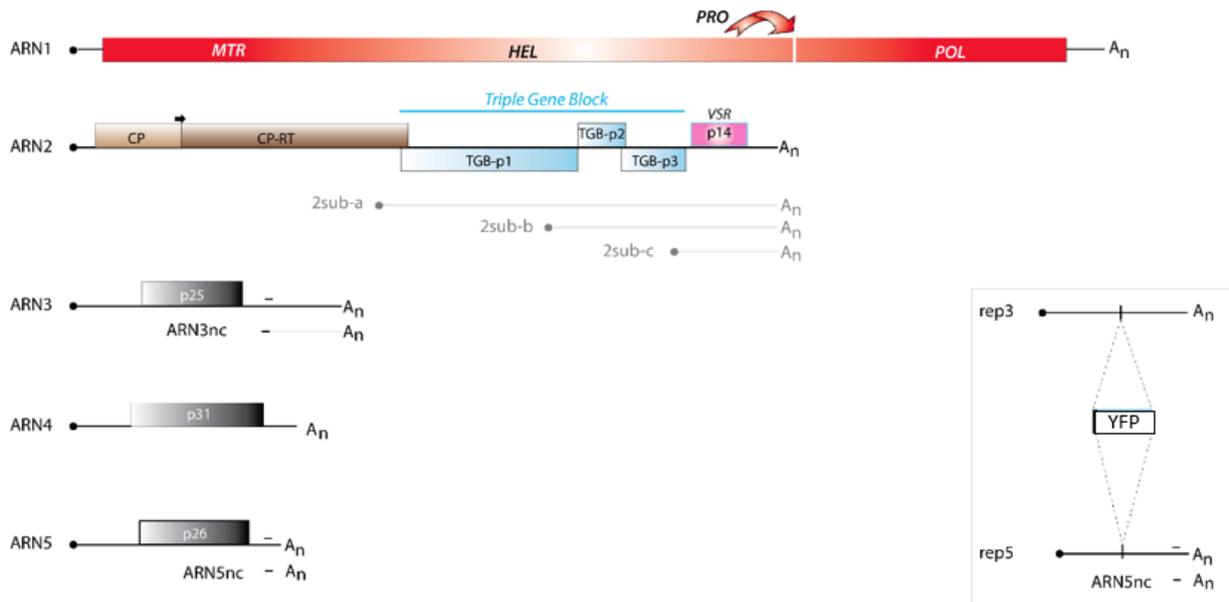


Figure 9 : Représentation de l'organisation génomique du BNYVV et des réplicons dérivés des ARN3 et ARN5

Les séquences codantes sont représentées par des rectangles, la flèche rouge représente le clivage autocatalytique de la polyprotéine codée par l'ARN1. L'expression d'ARN subgénomiques (2sub-a à -c) permet de produire les protéines TGB et le VSR p14. L'ARN3, l'ARN5 et le rep5 permettent la production d'ARN non codant possédant le motif "Coremin" à leur extrémité 5'. •, m7Gppp ; MTR, domaine méthyltransférase ; HEL, domaine hélicase ; PRO, activité protéase ; POL, domaine polymérase ; CP, protéine de capsid ; CP-RT, protéine mineure de capsid produite par translecture ; →, translecture ; TGB, *Triple Gene Block* ; VSR, suppresseur d'ARN interférence ; A_n , séquence polyadénylée ; -, motif "Coremin" ; YFP, *your favorite protein*.

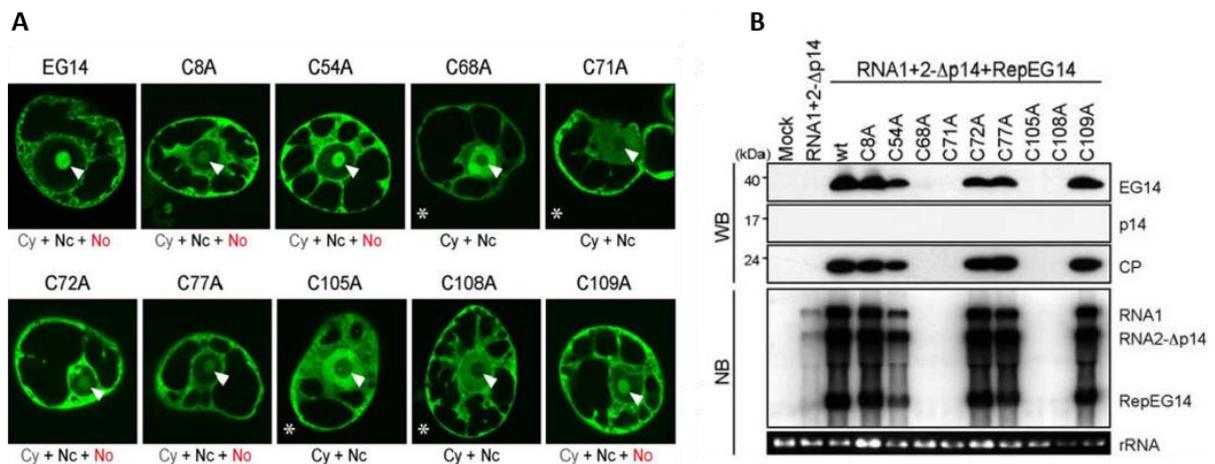


Figure 10 : Identification des cystéines essentielles au maintien de la structure-fonction de la protéine p14

Les données de Chiba, 2013 ont permis : (A) de localiser la protéine p14 dans le nucléole et le cytoplasme de protoplastes infectés (EG14, eGFPp14) mais aussi de caractériser les résidus cystéines impliqués dans le maintien d'une structure doigt à zinc exposant un signal de localisation nucléolaire (C8A à C109A). Les astérisques indiquent les constructions pour lesquelles une faible fluorescence ainsi qu'une perte de localisation nucléolaire sont observées. Cy, cytoplasme ; Nc, noyau ; No, nucléole. (B) de définir que le maintien de l'activité VSR de la protéine dépend de la structure ZnF comme l'indique l'analyse moléculaire du contenu des lésions locales de *C. quinoa*, infectés par l'ARN1 et l'ARN2 Δ p14, supplémentés par l'un des rep3 assurant l'expression des mutants de substitution de la protéine p14, fusionnés à l'eGFP. NB, northern blot ; WB, western blot. (Chiba et al., 2013)

Toutefois, l'expression ectopique de l'ARN3 dans *N. benthamiana* et *B. macrocarpa* aboutit à l'accumulation de l'ARN3-sub (Peltier et al., 2012). Ce dernier n'est pas coiffé et possède un groupement phosphate en 5'. Sa biogenèse indépendante de facteurs viraux (RdRp notamment) et sa structure en 5', différente des ARN génomiques et subgénomiques issus de l'ARN2, ont permis de considérer cette entité comme un produit de dégradation plutôt qu'un ARN subgénomique *per se*. Les travaux d'Alyssa Flobinus ont identifié l'exoribonucléase cytoplasmique XRN4 comme responsable de la dégradation de l'ARN3 jusqu'à deux nucléotides en amont de la séquence coremin où elle semble bloquée par un élément structural. Ceci assure alors l'accumulation de l'ARN3 non-codant (ARN3nc) (Flobinus et al., 2018) (**Fig.9**). Cette séquence Coremin est conservée chez les Benyvirus où elle est retrouvée sur les ARN3 et ARN4 du BSBMV. Chez les cucumovirus, cette séquence est également retrouvée sur les trois ARN du CMV (cucumber mosaic virus) et du TAV (tomato aspermy virus) et porte le nom de « box1 ». Thompson *et al.* propose l'organisation de cette séquence sous la forme d'une tige boucle (Thompson et al., 2008) qui a été également proposée pour d'autres phytovirus avec des variations de séquence (Dilweg et al., 2019).

L'ARN4 (1467 nt) permet d'exprimer la protéine p31 (**Fig.9**), essentielle à la transmission par le vecteur *P. betae*. Son mode d'action dans la relation virus-vecteur reste imprécis (Rahim et al., 2007). Sa spécificité d'action n'est pas restreinte compte tenu d'une complémentarité possible entre la protéine p32 du BSBMV et la protéine p31 du BNYVV (D'Alonzo et al., 2012). L'expression de p31 est aussi associée à l'aggravation des symptômes chez *Beta vulgaris* et *N. benthamiana*. Enfin, une activité de suppression du *RNA silencing* est décrite mais semblerait restreinte au système racinaire de *N. benthamiana* (Rahim et al., 2007).

L'ARN5 (1350 nt) est trouvé dans les isolats P et J du BNYVV et est associé à une plus forte pathogénicité virale (Tamada et al., 1996b). La protéine p26 exprimée par l'ARN5 augmente la sévérité des symptômes racinaires (Heijbroek et al., 1999; Link et al., 2005; Tamada et al., 2021). La protéine p26 est nucléocytoplasmique et, à l'instar de p25 lorsqu'elle est fusionnée à un domaine d'interaction à l'ADN (LexA ou Gal4BD), elle active la transcription de gènes rapporteurs dans la levure (Link et al., 2005). Un ARN non-codant dérivé de l'ARN5 s'accumule également ; il possède une extrémité 5' monophosphate avec deux nucléotides précédant la séquence Coremin (Peltier et al., 2012). Son mode de biogenèse n'a pas été démontré mais

p14 ⁷⁴-**KLKCKKQ**KNKNSKSHVQNGYLRKVR-⁹⁷
 p14BA1 ⁷⁴-**AL**ACKKQKNKNSKSHVQNGYLRKVR-⁹⁷
 p14BA2 ⁷⁴-KLK**CAA**QKNKNSKSHVQNGYLRKVR-⁹⁷
 p14BA3 ⁷⁴-KLKCKKQ**AN**HSAHVQNGYLRKVR-⁹⁷
 p14BA4 ⁷⁴-KLKCKKQKNKNSKSHVQNGYL**AAVA**-⁹⁷

Figure 11 : Séquences des domaines NoLS de la protéine p14 et des mutants p14BA1 à p14BA4
 Les résidus lysine (K) et arginine (R) de la protéine p14 substitués par l'alanine (A) sont indiqués en gras et en rouge dans les séquences des mutants.

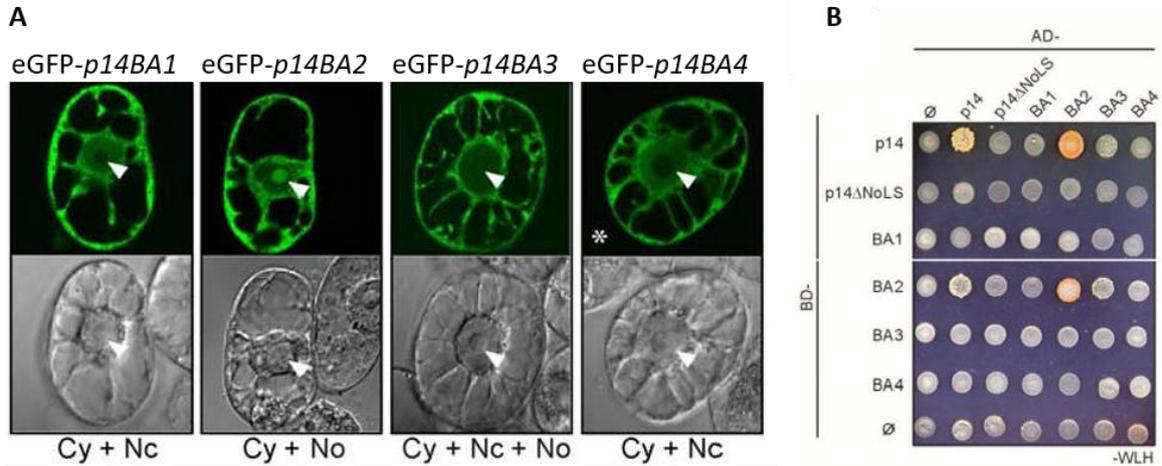


Figure 12 : Localisation subcellulaire et multimérisation des mutants p14BA1 à p14BA4

La localisation en contexte viral des protéines mutées et fusionnées à l'eGFP a permis d'identifier des résidus du domaine de localisation nucléolaire (A) et également impliqués dans la multimérisation de la protéine p14 constatée en système double hybride de levure (B). L'astérisque indique la construction pour laquelle une faible fluorescence est observée. Cy, cytoplasme ; Nc, noyau ; No, nucléole. W, tryptophane ; L, leucine ; H, histidine ; AD, *activating domain* ; BD, *binding domain*. (Chiba et al., 2013)

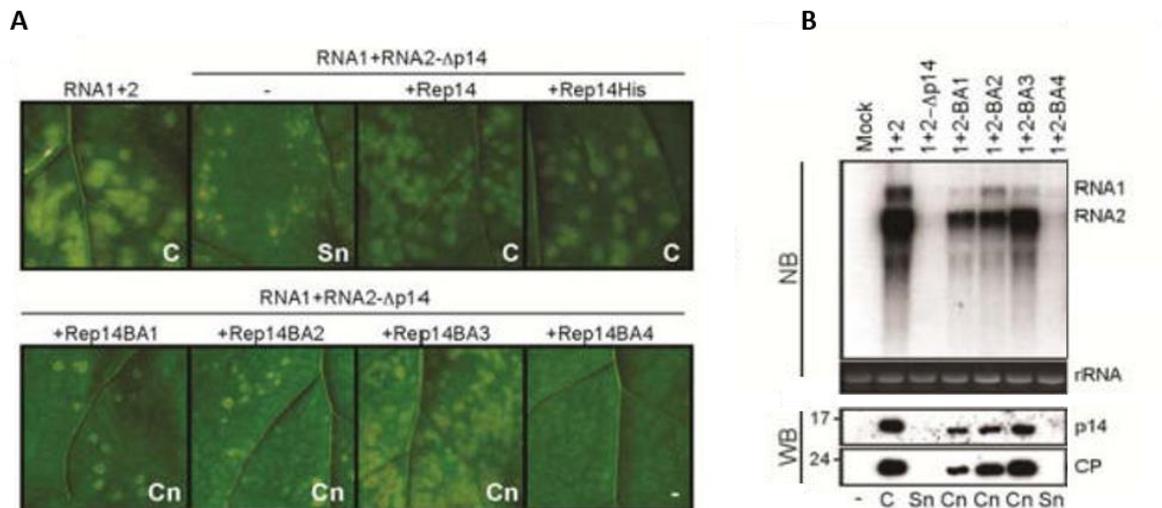


Figure 13 : Analyse de complémentation des mutants p14BA1 à p14BA4 sur C. quinoa

La complémentation d'un virus déficient dans la synthèse de son VSR peut être assurée à l'aide d'un réplicon exprimant ce VSR ou des versions hypomorphes mais pas nulles. La complémentation phénotypique est étudiée en observant et caractérisant les lésions locales de *C. quinoa*. En absence de VSR (RNA1 + RNA2Δp14) les lésions sont nécrotiques (Sn). Elles sont chlorotiques (C) en présence de la protéine p14 (RNA1 + 2) (A). La complémentation fonctionnelle est validée par des analyses moléculaires (B) du contenu protéique et nucléique des lésions locales. C, *chlorotic lesion* ; Sn, *small necrotic lesion* ; Cn, *chlorotic lesion with necrotic center* ; -, *no lesion*, NB, *northern blot* ; WB, *western blot*. (Chiba et al., 2013)

compte tenu des similitudes qu'il présente avec l'ARN3nc, on peut penser qu'il s'accumule suite à la dégradation de l'ARN5 génomique par XRN4.

Lors de l'infection d'une plante par le BNYVV, la suppression du *RNA silencing* est assurée par la protéine p14, un VSR de 127 acides aminés riche en cystéine (*cysteine-rich protein*, CRP). P14 possède un motif en doigt de zinc (ZnF) formé par les cystéines C68, C71, C105 et C108, conservées chez les Benyviridae. Ce ZnF est essentiel à la fonction du signal de localisation nucléolaire (NoLS, résidus 68 à 90) qu'il renferme, comme l'ont montré les expériences de mutagenèse dirigée, de localisation subcellulaire et de complémentations fonctionnelles effectués par Chiba *et al.* (Chiba *et al.*, 2013) et résumées dans la **figure 10**. La localisation nucléolaire de p14 n'est pas exclusive, elle est aussi localisée dans le cytoplasme.

Les résidus basiques présents au sein du NoLS de p14 ont été substitués par des alanines pour créer les quatre mutants, *p14BA1* à *p14BA4* (**Fig.11**). L'analyse des propriétés biologiques des protéines p14 modifiées a été réalisée comme décrite ci-dessus pour les mutants affectant le ZnF et une recherche de multimérisation a été effectuée en système double hybride (Chiba *et al.*, 2013), **Fig.12**). Il apparaît que seule la protéine eGFP-*p14BA2* conserve la localisation nucléolaire et cytoplasmique de p14 en restant capable d'interagir avec elle-même (**Fig.12B**). Les protéines de fusion eGFP-*p14BA1* et eGFP-*p14BA4*, si elles maintiennent leur localisation nucléo-cytoplasmique, sont exclues du nucléole et perdent leurs capacité d'auto-interaction, tout comme le mutant eGFP-*p14BA3* qui lui est localisé dans le cytoplasme, le noyau et partiellement dans le nucléole (**Fig.12A**). L'adressage au nucléole pourrait dépendre de l'état d'oligomérisation du VSR puisque la protéine p14 WT et le mutant *p14BA2* sont les seuls à former des dimères. Enfin, les tests de complémentation fonctionnelle permettent de constater que le mutant *p14BA3*, et dans une moindre mesure les mutants *p14BA2* et *p14BA1*, sont capables d'assurer des fonctions de suppresseur de *RNAi* mais pas le mutant *p14BA4* (**Fig.13**).

Le maintien de la fonction VSR de ces mutants a été testé en patch sur *N. benthamiana* et évalué par leur co-expression avec la GFP et la construction GFFG, déclencheur de *RNAi* (**Fig.14**). La protéine p14 induit une augmentation de la fluorescence dans la zone d'expression et réduit l'accumulation des siARN primaires et surtout des siARN secondaires (P) normalement produits par le mécanisme de transitivity. Le mutant

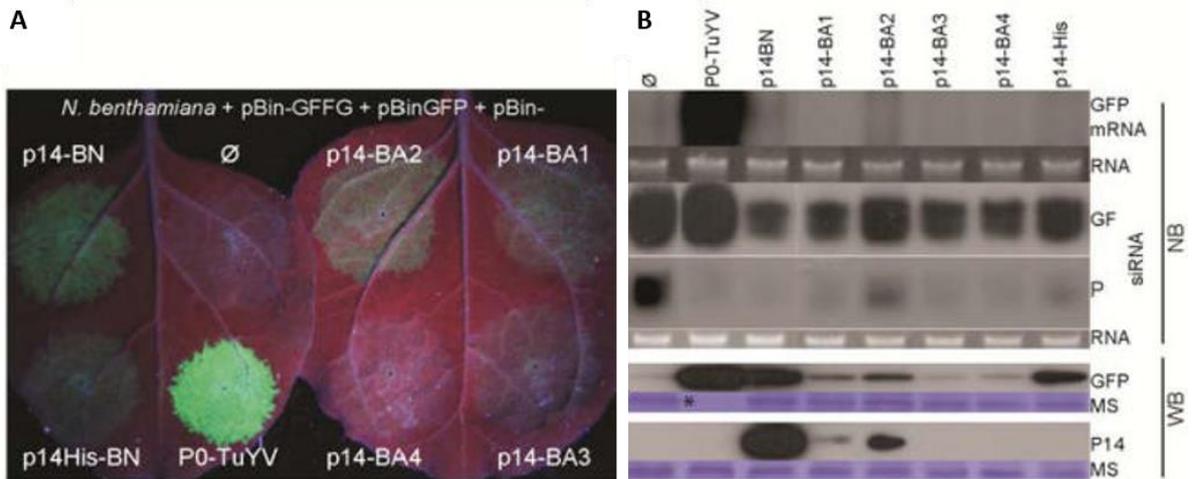


Figure 14 : La fonction VSR de la protéine p14 et de ses mutants *p14BA1* à *p14BA4* étudiée en système de *GFP reporter assay*

La protéine p14, et dans une moindre mesure les mutants *p14BA1* et *p14BA2*, possèdent une fonction de suppression du *RNAi* dans le système de *GFP reporter assay* (A). Cette activité de VSR de la protéine p14 est associée à une diminution d'accumulation des siARN secondaires (B). BN, BNYVV ; TuYV, Turnip yellows virus ; NB, northern blot ; WB, western blot ; MS, *membrane staining*. (Chiba et al., 2013)

hypomorphe *p14BA2* permet une légère augmentation de la fluorescence et n'affecte pas l'accumulation des siARN primaires qui avoisine celle du contrôle et l'accumulation des siARN secondaires n'est pas inhibée par ce mutant *p14BA2*. Replacés dans le contexte d'expression naturelle (sur l'ORF6 de l'ARN2), seuls les mutants *p14BA1* et *p14BA3* sont capables d'initier un mouvement viral à longue distance sur *N. benthamiana*, avec une efficacité moindre pour le mutant *p14BA1*. Sur cette plante, les mutants *p14BA2* et *p14BA4* sont incapables d'effectuer un mouvement à longue distance. Sur *B. macrocarpa*, en présence de l'ARN3, seules les protéines p14 WT et le mutant *p14BA3* assurent l'infection systémique (Hleibieh, 2010). Ces résultats démontrent que la protéine p14 est essentielle pour assurer le mouvement viral systémique.

L'ensemble de ces travaux démontre que l'adressage nucléolaire de la protéine p14 dépend de sa structure et du ZnF qui semble aussi gouverner sa multimérisation. En revanche, la fonction VSR n'est pas corrélée à la localisation nucléolaire de p14.

Les expériences de Flobinus *et al.* (Flobinus *et al.*, 2016) ont révélé que la mutation hypomorphe portée par *p14BA2* pouvait être complétée par la présence de l'ARN3, indépendamment de l'expression de la protéine p25 mais dépendant de la production de l'ARN3nc. En effet, la substitution de la séquence Coremin par la séquence inverse et complémentaire (« Nimeroc », ARN3E) abolie la complémentation. Ces effets sont constatés d'un point de vue phénotypique sur les lésions locales induites lors de l'infection de feuilles de *C. quinoa* (**Fig.15A**). La complémentation partielle est également constatée par l'augmentation de l'accumulation des ARN et protéines virales en présence de l'ARN3 sauvage mais pas de sa forme dépourvue de la séquence Coremin (**Fig.15B**). Enfin, le mouvement systémique du mutant hypomorphe *p14BA2* est partiellement restauré en présence d'ARN3 (**Fig.15C**). Cette complémentation est particulièrement intéressante puisqu'elle mime la situation retrouvée chez l'hôte naturel où l'ARN3 demeure obligatoire pour asseoir l'infection systémique. Le mouvement de ce virus exprimant la version *p14BA2* est également possible sur des plantes sous-exprimant la protéine RDR6 (RDR6i) que ce soit en présence ou en absence d'ARN3, ce qui valide l'action de p14 sur le mécanisme de la transitivity (**Fig.15D**).

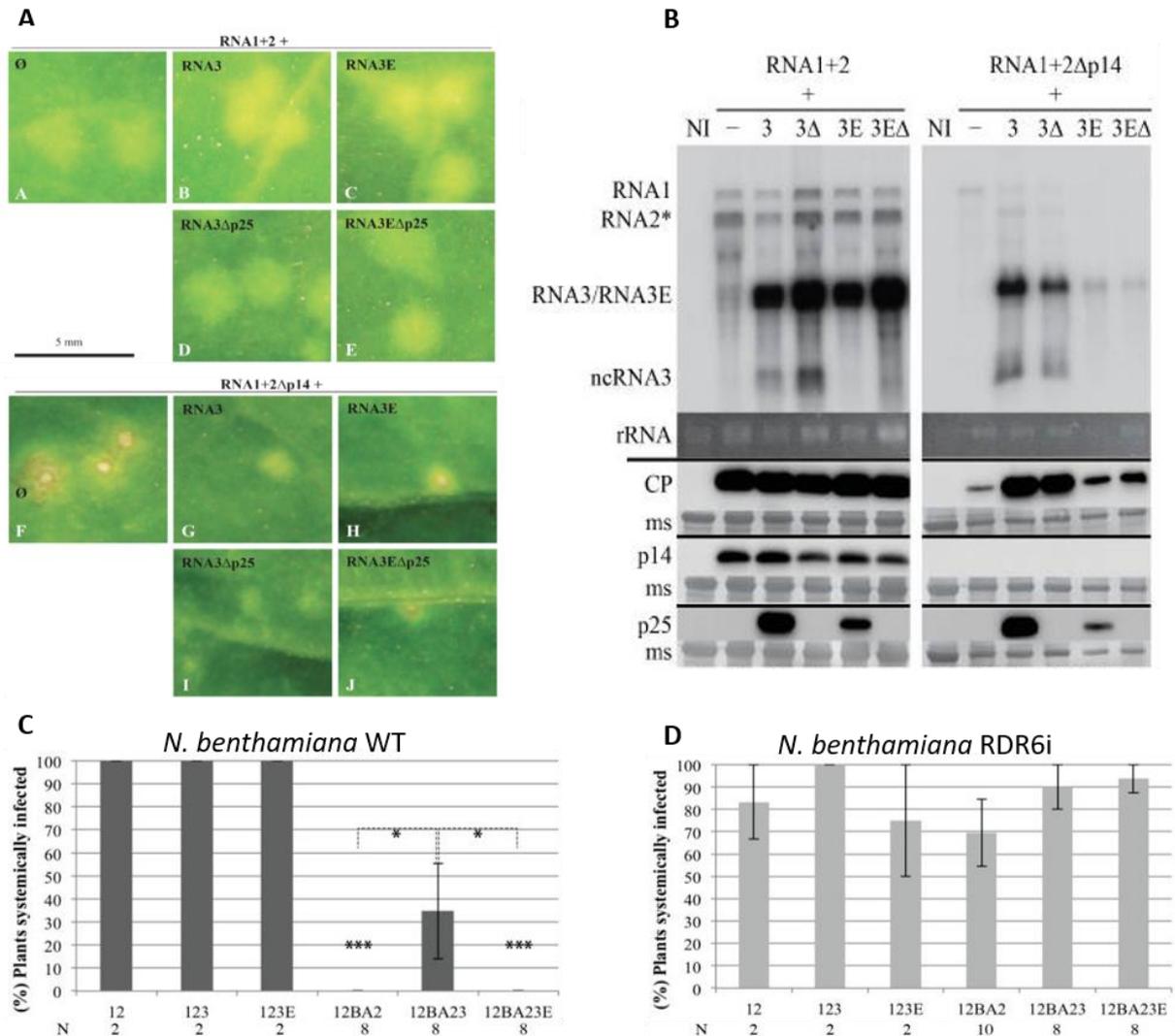


Figure 15 : Complémentation fonctionnelle assurée par l'ARN3 non-codant dans *C. quinoa* et *N. benthamiana*

L'absence d'expression de p14 est spécifiquement complétée par la présence d'ARN3 non-codant tant au niveau du phénotype (A) qu'au niveau moléculaire (B) dans des lésions locales de *C. quinoa*. L'effet de l'ARN3nc est dissocié de celui de la protéine p25 par l'utilisation d'ARN3 n'assurant plus l'expression de p25 ($\Delta p25$ en (A) ; Δ en (B)) L'incapacité du mutant *p14BA2* à effectuer un mouvement viral systémique est partiellement complétée par l'accumulation de l'ARN3nc dans des plantes de *N. benthamiana* WT (C) et l'efficacité de systémie est identique à celle de p14 WT sur des plantes silencées pour l'expression de RDR6 (D). Les résultats sont analysés par le test exact de Fisher. *, p-value<0,05 ; ***, p-value<0,001 ; N, nombre de plantes étudiées. (Flobinus et al., 2016)

Un facteur viral indispensable au mouvement du BNYVV à longue distance est donc le VSR p14 et selon l'hôte la production d'ARN non codant dérivé de l'ARN3 ou 5 semble contribuer au mécanisme régi par la protéine p14.

1.4. Objectifs de la thèse

A mon arrivée au laboratoire, des précisions sur le mode d'action de la protéine p14, le mode de biogenèse de l'ARN3nc et son importance dans la complémentation fonctionnelle du mutant hypomorphe *p14BA2* venaient d'être publiés par Alyssa Flobinus (Flobinus et al., 2016, 2018). Une grande partie de ses travaux s'est focalisée sur le mouvement à longue distance du virus. Aucun partenaire de la protéine p14 n'avait encore été validé.

Mon premier objectif a consisté à préciser le mode d'action de la protéine p14. Pour cela, j'ai entrepris de développer des outils permettant de réaliser son immunoprécipitation dans le but de co-purifier puis d'identifier par spectrométrie de masse ses partenaires potentiels. Les travaux de Chiba (Chiba et al., 2013) ont permis de déterminer que les fusions d'étiquettes en position C-terminale de p14 affectent son activité contrairement à la fusion de l'eGFP en N-terminal. J'ai donc entrepris de produire plusieurs versions de p14 étiquetées par des étiquettes HA, Flag ou myc et de tester leur fonctionnalité. Deux stratégies ont été adoptées pour réaliser l'immunoprécipitation de la protéine p14 : (1) en contexte viral pour favoriser l'identification de partenaires qui pourraient être exprimés lors du cycle infectieux et (2) en dehors du contexte viral, dans des conditions de surexpression dans des feuilles de *N. benthamiana*. Pour ces études, j'ai aussi étiqueté les mutants hypomorphes de p14 pour tenter d'établir un lien entre une modification d'interaction et la modification du phénotype du mutant.

Le second objectif de mes travaux s'est focalisé sur la compréhension du mécanisme liant l'ARN3nc à la suppression du *RNAi* par p14. Mon objectif a consisté à étudier comment est apportée une telle complémentation fonctionnelle. Sur l'hôte naturel, l'ARN3 est indispensable pour assurer l'infection systémique. Au laboratoire, l'infection systémique de plantes modèles par le mutant hypomorphe *p14BA2* en présence de d'ARN3 permet de mimer cette situation. En effet, la production d'ARN3nc lève l'incapacité du mutant à effectuer une infection systémique.

Les résultats obtenus lors de mes recherches se sont complétés et les deux sous-projets présentés ci-dessus sont devenus étroitement liés. Ils seront présentés sous la forme de deux chapitres.

Le premier chapitre concerne les approches d'immunoprécipitation de la protéine p14 exprimée en contexte viral. Pour cela, des versions étiquetées de la protéine p14 ont été produites et leur fonctionnalité testée lors de l'infection. L'agrégation de p14 dans des complexes de haut poids moléculaires a compromis son immunoprécipitation et l'identification de partenaires associés. Le deuxième chapitre présente la caractérisation des interactants de la protéine p14 exprimée hors de son contexte viral. Ces deux chapitres sont présentés sous la forme d'articles. Toutefois, le premier reste plutôt une ébauche d'un article qui ne peut pas être soumis en l'état puisque certaines données nécessitent d'être confirmées. La caractérisation des interactants viraux et cellulaires de p14 en contexte viral devra être poursuivie pour compléter mes données préliminaires et étayer cette ébauche.

2. Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

2.1. Matériels

2.1.1. Matériel végétal

Chenopodium quinoa et *Nicotiana benthamiana* sont les deux plantes modèles utilisées lors de ces travaux. Elles sont cultivées selon un cycle de 16 heures de luminosité à 22°C et 8h d'obscurité à 18°C.

2.1.1.1. *Chenopodium quinoa*

La plante modèle *Chenopodium quinoa* appartient à la famille des Chenopodiaceae. L'infection par le BNYVV s'y traduit par l'apparition de lésions locales chlorotiques vertes (en absence de la protéine p25 exprimée par l'ARN3) ou jaune (en présence de p25) ou de lésions locales nécrotiques. Cet hôte est utilisé pour valider la fonctionnalité des clones infectieux avant d'étudier leur mouvement systémique sur *N. benthamiana*. Trois à quatre feuilles sont inoculées par plante.

2.1.1.2. *Nicotiana benthamiana*

Cas d'infection virale : sur cet hôte de la famille des Solanacées, le BNYVV peut effectuer une infection systémique et rejoindre ainsi les feuilles apicales en absence de l'ARN3. Les plantes au stade quatre feuilles âgées de quatre semaines sont utilisées pour être inoculées.

Cas d'agroinfiltration : les feuilles de *N. benthamiana* âgées de cinq semaines sont agroinfiltrées par une suspension bactérienne d'*Agrobacterium tumefaciens* pour assurer l'expression transitoire d'ARN et de protéines.

2.1.2. Souches bactériennes

2.1.2.1. *Escherichia coli*

MC1022 : Cette souche est utilisée pour des clonages dits classiques, qui s'opposent au clonage Golden Gate, pour amplifier les clones recombinants. Le génotype des bactéries MC1022 est *araD139, Δ(ara leu)7697, Δ(lacZ) M15, galU, galK, rpsL*.

Top10 : La souche Top10 est utilisée pour amplifier les clones recombinants générés par les clonages Golden Gate. Le génotype des souches Top10 est *mcrA*, $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$, *Phi80lacZ(del)M15*, $\Delta lacX74$, *deoR*, *recA1*, *araD139*, $\Delta(ara-leu)7697$, *galU*, *galK*, *rpsL(SmR)*, *endA1*, *nupG*.

2.1.2.2. *Agrobacterium tumefaciens*

Cette bactérie phytopathogène est responsable de la galle du collet et se traduit par l'apparition de tumeurs sur les plantes infectées qui produisent des nutriments nécessaires à la multiplication de la bactérie. Cette maladie repose sur le transfert de matériel génétique entre la bactérie *Agrobacterium tumefaciens* et la plante hôte. La bactérie possède un plasmide Ti (*Tumor inducing*) dont un fragment limité par des bordures gauche et droite, le T-DNA (ADN de transfert), est transféré puis intégré au hasard dans le génome de la plante infectée. Le plasmide Ti exprime des gènes de virulence *vir* qui assurent le transfert du T-DNA, tandis que les gènes oncogènes sont responsables du développement tumoral.

Cette compétence des agrobactéries à transférer du matériel génétique est utilisée au laboratoire pour assurer l'expression transitoire de protéines et/ou d'ARN. La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* GV3101 porte une résistance chromosomique à la rifampicine pour assurer sa sélection. Son plasmide Ti pMP90 confère une résistance à la gentamicine et contient les gènes *vir* mais est désarmé : il ne peut pas effectuer le transfert de son propre T-DNA mais assure celui du gène d'intérêt. Ce dernier est exprimé par un plasmide binaire (pBin, §2.1.4 Vecteurs de clonage et d'expression) dans lequel le gène d'intérêt est inséré entre les bordures gauche et droite (LB, *left border* et RB, *right border*) et apporte la résistance à la kanamycine.

Ces bactéries sont transformées avec le plasmide binaire par électroporation et sont cultivées à 28°C sur un milieu LB supplémenté de gentamicine, kanamycine et rifampicine.

2.1.3. *Saccharomyces cerevisiae*

AH109 : Cette souche de levure est utilisée pour détecter des interactions entre protéines en système double hybride. Les gènes rapporteurs de cette souche sont ADE2, HIS3, lacZ et MEL1 et chacun d'eux est sous le contrôle d'un promoteur GAL4. Le génotype de la souche AH109 est *MATa*, *trp1-901*, *leu2-3,112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4 Δ* , *gal80 Δ* , *LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3*, *GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2*, *URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ*.

YBZ1 : Cette souche est utilisée dans le système de triple hybride de levure pour détecter des interactions protéine-acide ribonucléique. Un dimère de la protéine CP du phage MS2 est fusionné à la protéine LexA. La protéine d'intérêt est fusionnée au domaine d'activation de la protéine GAL4. Les gènes rapporteurs de cette souche sont HIS3 et lacZ. Son génotype est *MATa, ura3-52, leu2-3, 112, his3-200, trp1-1, ade2, LYS2 :: (LexAop)-HIS3, ura3 :: (lexA-op)-lacZ, LexA-MS2 coat (N55K)*.

2.1.4. Vecteurs de clonage et d'expression

pGAD-T7 : Pour assurer les expériences de clonage dans *E. coli*, ce vecteur possède une origine de réplication OriV et un gène de résistance à l'ampicilline. Dans la levure, le vecteur se réplique à partir de l'origine de réplication 2 μ . Le gène LEU2 est le marqueur auxotrophique qui assure la sélection des levures transformées. La protéine d'intérêt est fusionnée à l'extrémité C-terminale du domaine d'activation de la protéine GAL4 (GAL4AD : GAL4 *activation domain*), possède l'étiquette HA à son extrémité N-ter. Son message est produit à partir du promoteur constitutif ADH1 (alcool déshydrogénase).

pGBK-T7 : Ce vecteur assure l'expression de protéines fusionnées à l'extrémité C-ter du domaine de liaison à l'ADN de la protéine GAL4 (GAL4BD : GAL4 *binding domain*). La protéine d'intérêt possède l'épitope c-myc à son extrémité N-ter. Son message est transcrit à partir du promoteur ADH1. Ce vecteur se réplique dans *E. coli* et *S. cerevisiae* à partir des origines de réplication pUC ori et 2 μ respectivement. La sélection est assurée par la résistance à la kanamycine dans *E. coli* et par le marqueur auxotrophique TRP1 dans la levure.

pIII-MS2 : Ce vecteur assure l'expression d'un ARN dans la levure et permet de tester une interaction ARN-protéine dans le système de triple hybride de levure (SenGupta et al., 1996). L'ARN est transcrit par l'ARN polymérase III et renferme deux sites en tandem de fixation à la protéine CP du phage MS2. En 3', un site de restriction unique *SmaI* permet d'insérer la séquence d'intérêt pour laquelle l'interaction avec une protéine d'intérêt est recherchée. La sélection est assurée par la résistance à l'ampicilline dans *E. coli* et par le marqueur auxotrophique URA3 dans la levure.

pBin61 : Ce plasmide binaire a été utilisé lors des expériences de GFP *reporter assay* pour surexprimer la GFP et le *trigger* du *silencing*, la tige boucle GFFG, dans *N. benthamiana*. Deux origines de répllication assurent la répllication du plasmide dans *E. coli* et *A. tumefaciens*. La sélection plasmidique est assurée par une résistance à la kanamycine. L'ADN à transférer est flanquée des régions LB (*left border*) et RB (*right border*) et contient la séquence d'intérêt à exprimer sous le contrôle du promoteur et du terminateur 35S du CaMV (cauliflower mosaic virus) ainsi que le gène de résistance à la kanamycine sous le contrôle du promoteur et du terminateur NOS (nopaline synthase).

pBSM (*pBluescribe modified*) : Ce vecteur est conçu pour le clonage d'ADNc. Ce vecteur renferme un gène de résistance à l'ampicilline et une cassette de clonage bordée par les promoteurs T3 et T7. Les ADNc des ARN génomiques 1 à 4 du BNYVV y sont clonés et placés sous le contrôle du promoteur T7. Après linéarisation en aval de la séquence d'ADNc, la transcription *in vitro* permet la production d'ARN infectieux.

pUC19 : Ce vecteur renferme un gène de résistance à l'ampicilline et une cassette de clonage dans laquelle la séquence d'un promoteur T7 suivie de celle de l'ADNc de l'ARN5 ont été introduites.

Vecteurs compatibles pour le clonage Golden Gate

Cette technique de clonage est décrite dans le chapitre "Méthodes" de ce manuscrit. Les vecteurs nécessaires à la réalisation de ces clonages ont été obtenus à l'IBMP dans l'équipe de C. Ritzenthaler et sont mis à disposition pour l'ensemble de l'institut.

pGGz-D : Un plasmide pDONRTM/Zeo destiné au clonage Gateway a été modifié pour le rendre compatible au clonage Golden Gate. Les plasmides pGGz-D « donneurs » d'étiquettes ont été réalisés en éliminant le site SapI du pDONRTM/Zeo et en introduisant la cassette « SapI + étiquette d'intérêt + SapI » dans le site SmaI du gène ccdB. Ce plasmide confère la résistance à la zéocine ainsi qu'au chloramphénicol.

pGGz-R : Les plasmides de destination ou « Receveurs R » ont aussi été modifiés pour les rendre compatibles au Golden Gate. La cassette de clonage « SapI + Chloramphénicol + ccdB

+ *SapI* » a été introduite dans les vecteurs de destination souhaités à l'instar du pET et du pEAQ. Ces vecteurs sont amplifiés dans les *E. coli* One Shot™ ccdB Survival™ 2 T1R, compatibles avec la production de la toxine ccdB.

pET-GG : Le plasmide pET assure l'expression de protéines recombinantes dans *E. coli* et a été rendu compatible au clonage Golden Gate. Les séquences d'intérêt sont sous le contrôle du promoteur T7 et ce plasmide confère la résistance à l'ampicilline.

pEAQ-GG : Le plasmide binaire pBinplus utilisé pour assurer l'expression transitoire de protéine dans les plantes par agrotransformation a été modifié pour générer le plasmide pEAQ (Sainsbury et al., 2009). Ce dernier possède des séquences 5' et 3' UTR du cowpea mosaic virus (CPMV) modifiées pour favoriser l'expression des protéines. En plus, un « *backbone* » minimal a été sélectionné : la taille du plasmide a ainsi été réduite de moitié et favorise les étapes de clonage. Le plasmide pEAQ a été rendu compatible avec la stratégie de clonage Golden Gate et confère une résistance à la kanamycine. Les protéines d'intérêt à exprimer sont sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV.

2.1.5. Milieux de culture

LB (*Lysogeny broth* ou Luria Bertani) : Ce milieu de culture complet est utilisé pour la croissance non sélective des levures. Il contient du bactotryptone 1 %, de l'extrait de levure 0,5 %, du NaCl 0,5 % et son pH est de 7,4. Il est souvent additionné d'antibiotiques pour sélectionner les bactéries recombinantes suite à un clonage.

YPD (*Yeast extract peptone dextrose*) : Ce milieu complet assure la croissance non sélective des levures. Il est utilisé pour assurer une croissance effective à partir d'un stock glycérol.

SD (*Synthetic defined*) : Ce milieu est nécessaire pour réaliser les expériences de double et triple hybride de levures. Il est supplémenté par un mélange d'acides aminés en fonction de l'auxotrophie des levures. Il permet de sélectionner les levures transformées et d'évaluer des interactions protéine-protéine ou protéine-ARN.

MS (Murashige et Skoog) : Ce milieu de culture est utilisé pour générer des plantes *in vitro*. Les disques foliaires de *N. benthamiana* sont déposés sur cette gélose pour obtenir des cals et des plantules. Lors des transformations d'*A. thaliana* par *floral dip*, les graines sont semées sur ce milieu pour assurer leur sélection.

Un milieu MS appauvri en NH_4NO_3 et KNO_3 est aussi utilisé et est nommé ½ milieu MS.

2.2. Méthodes

2.2.1. Techniques de transformation et d'expression de protéine et d'ARN

2.2.1.1. Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens* et agroinfiltration

Pour assurer l'expression transitoire de protéines et/ou d'ARN, des cultures d'*A. tumefaciens* (souches GV3101) sont transformées par électroporation (2500 V, 25 μF , 400 Ω , électroporateur Bio-Rad Gene Pulser X-cell). Après le choc électrique, les bactéries sont mises en suspension dans le milieu LB et incubées 2 heures à 28°C. Les agrobactéries sont cultivées 18h à 28°C sur un milieu LB sélectif (kanamycine 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$; rifampicine 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ +/- gentamicine 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Les bactéries sont centrifugées et le culot est resuspendu dans 10 mL de solution MA (MgCl_2 10 mM ; acétosyringone 200 μM). Les bactéries sont incubées dans ce tampon 2 heures minimum à température ambiante pour accroître leur virulence. Les densités optiques des cultures bactériennes sont ensuite normalisées en ajoutant du tampon MA afin que chacune des cultures soit infiltrée à une DO de 0,5. L'infiltration des feuilles est réalisée sur la face abaxiale (inférieure) des feuilles et favorisée en réalisant une légère piqûre à l'aide d'une aiguille. Généralement, l'ensemble du limbe de trois feuilles est agroinfiltré et les feuilles sont récoltées 3 jours après l'infiltration (exception faite des cinétiques d'expression).

2.2.1.2. Transformation d'*Escherichia coli*

2.2.1.2.1. Transformation par choc thermique

Les bactéries chimiocompétentes sont mises en présence du vecteur d'intérêt (0,5 à 1 μg) ou du mélange réactionnel de clonage/ligation (cas du clonage Golden Gate) pendant 30 min

dans la glace. Le choc thermique est réalisé en les chauffant 45 sec à 42°C puis en les remettant dans la glace 2 min. Les bactéries sont ensuite reprises dans du milieu LB, mises au bain-marie à 37°C pour se régénérer puis étalées sur un milieu sélectif. Les colonies sont analysées après 16h à 37°C.

2.2.1.2.2. Transformation par électroporation

Les bactéries électrocompétentes sont décongelées sur la glace et supplémentées par 2 µL de produit de ligation préalablement purifié par un traitement phénolique. L'ensemble est déposé dans une cuve d'électroporation dont les électrodes, distantes de 2 mm, permettent de réaliser un choc électrique (2500 V, 25 µF, 200 Ω). La suspension bactérienne est reprise dans du milieu LB, incubée 30 min à 37°C puis étalée sur une boîte de pétri avec du milieu sélectif. Les colonies sont analysées après incubation de 16 h à 37°C.

2.2.1.3. Transformation des levures

Les levures sont mises en culture sur un milieu riche YPD (*yeast extract peptone dextrose*) pendant 12 h à 30°C. Les cellules sont récoltées à l'aide d'une oese, resuspendues dans 1 mL d'eau stérile et centrifugées 1 min à 2000 g. Le culot est repris dans 20 µL d'eau et 5 µL d'ADN de sperme de saumon (10 mg/mL) ainsi que 2 µg de plasmide sont ajoutés. Après une forte agitation (vortex), 500 µL de PEG/LiAc (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 ; Polyéthylèneglycol (PEG) 4000 40 % ; acétate de lithium 0,1 M ; EDTA 1 mM) sont ajoutés et la suspension est vortexée avant d'incuber 15 min à température ambiante puis 15 min à 42°C. Les levures sont centrifugées 30 sec à 2000 g, le culot est lavé avec 1 mL d'eau stérile et le culot est resuspendu dans 100 µL d'H₂O stérile. Les levures sont étalées sur un milieu sélectif et incubées 3 jours jusqu'à l'apparition des colonies. Ces cellules sont récoltées pour effectuer la deuxième transformation en suivant le protocole décrit ci-dessus. Les levures obtenues sont étalées sur un milieu sélectif assurant la sélection des deux plasmides. Après croissance, les levures co-transformées sont récoltées pour effectuer les expériences de double et triple hybride de levure.

2.2.1.4. Transformation et sélection d'*Arabidopsis thaliana* transformées par *floral dip*

Les agrobactéries renfermant le vecteur pEAQ-Δp19-NbDRB4-tRFP sont mises en culture pendant 18 heures à 28°C dans 250 mL de milieu LB supplémenté en kanamycine

(100 µg/mL), rifampicine (100 µg/mL) et gentamicine (30 µg/mL). Les bactéries sont sédimentées 10 min à 900 g à 20°C. Le culot est repris dans une solution contenant ½ milieu MS Salt M0255, 5 % de sucrose, 200 µM d'acétosyringone et 0,05 % de Silwet L-77.

Les hampes florales d'*Arabidopsis thaliana* sont plongées 1 minute dans la suspension bactérienne puis les plantes sont placées 48 heures à l'obscurité dans des mini-serres. Les graines récoltées sont aliquotées par volume de 50 µL environ. Elles sont stérilisées avec 500 µL d'éthanol 70 % pendant 2 minutes. L'éthanol est éliminé et remplacé par 500 µL d'une solution d'hypochlorite de sodium et de tween pour stérilisation 10 minutes sous agitation lente. Les graines sont lavées par 500 µL d'eau stérile à cinq reprises pendant 5 minutes puis étalées sur un milieu MS (saccharose 1 % ; agarose 0,8 % ; kanamycine 100 µg/mL ; pH 5,8) avant vernalisation des graines à 4°C pendant 24 heures. Les boîtes sont incubées dans des conditions de 16 heures de jour à 22,5°C et 8 heures de nuit à 18°C jusqu'à l'apparition des plantules. Les jeunes pousses sont repiquées en terre et cultivées une semaine dans des mini-serres pour les maintenir dans une atmosphère légèrement humide et confinée.

2.2.1.5. Transformation et sélection de *Nicotiana benthamiana* transgéniques

Pour compléter nos expériences d'expression transitoire, des plantes de *N. benthamiana* transgéniques ont été générées. Des feuilles de *N. benthamiana* sont agroinfiltrées par les constructions souhaitées. Après trois jours, les feuilles sont prélevées puis stérilisées 20 min dans un bain de javel (4 %) puis rincées dans trois bains successifs d'eau stérile pendant 10 min. Les feuilles ainsi stérilisées sont séchées sur un papier filtre stérile et des disques foliaires sont prélevés et déposés sur un milieu de sélection (milieu Murashige & Skoog Duchefa® ; saccharose 3 % ; agar 0,8 % ; 6-benzylaminopurine 2 mg/L; acide 1-naphtalène acétique 0,05 mg/L; kanamycine 150 mg/L ; carbenicilline 500 mg/L ; pH 5,8). Les disques foliaires sont placés à 25°C dans des conditions de 16 heures de jour et 8 heures de nuit. Des cals apparaissent après deux semaines et sont repiqués sur un nouveau milieu de sélection tous les 15 jours jusqu'à l'apparition de jeunes plantules. Ces plantules sont repiquées sur un milieu d'enracinement (½ MS ; saccharose 1,5 % ; agar 0,8 % ; pH 5,8) jusqu'à l'apparition d'un système racinaire assez développé et sont ensuite repiquées en terre.

Tableau 1 : Réaction de transcription *in vitro* (20 µL)

Matrice linéarisée	1 µg
Tampon 5X	1X
rATP, rCTP, rUTP 100 mM	1,5 µL
rGTP 100 mM	0,07 µL
Cap 15 mM	4 µL
DTT 0,1 M	1 µL
BSA 2 mg/mL	0,5 µL
RNase OUT	20 U
T7 polymérase	100 U
H ₂ O Nuclease free	qsp 20 µL

Tableau 2 : Composition d'un inoculum (volume final de 100 µL)

ARN1	10 µg
ARN2	5 µg
Autres ARN en fonction	5 µg
Tampon phosphate 10X	10 µL
Macaloïde	0,05 %
H ₂ O	qsp 100 µL

2.2.2. Synthèse, extraction et analyse des ARN

2.2.2.1. Synthèse des ARN infectieux par transcription *in vitro*

Les séquences des ADNc des ARN viraux sont intégrées dans des vecteurs dédiés à leur transcription *in vitro* par l'ARN polymérase T7. Avant la réaction de transcription, les vecteurs sont linéarisés par une enzyme de restriction en aval du fragment à synthétiser. Cette étape permet de concentrer la transcription de l'ARN désiré et non sur les séquences en aval. Les vecteurs linéarisés sont ensuite purifiés au phénol/chloroforme/alcool isoamylique et le culot est resuspendu dans de l'eau stérile et la concentration est ajustée à 1,5 µg/µL. La réaction de transcription est réalisée en présence d'un analogue de la coiffe pour mimer l'extrémité 5' des ARN viraux du BNYVV. Le kit RiboMAX™ (Promega) est utilisé pour réaliser le milieu réactionnel qui est incubé à 37°C pendant 30 min avec une concentration de rGTP réduite pour favoriser l'incorporation de cet analogue, puis 3 heures à 37°C, après ajout de rGTP (pour atteindre une concentration identique aux autres rNTP) (**Tableau 1**). Les ARN ainsi transcrits sont analysés sur un gel d'agarose 1 % (p/v) avant d'inoculer les plantes voulues.

2.2.2.2. Inoculation des ARN viraux

Les plantes sont infectées par des ARN viraux transcrits *in vitro*. Les clones infectieux sont produits à partir d'ADNc (Bouzoubaa et al., 1986; Link et al., 2005; Ouillet et al., 1989; Ziegler-Graff et al., 1988) dérivés de l'isolat naturel F2. Ces séquences virales clonées dans un vecteur pBluescript sont sous le contrôle d'un promoteur T7 pour leur transcription.

Un inoculum de 100 µL contient 10 µg d'ARN1 tandis que la quantité des autres ARN viraux est ajustée à 5 µg. 10 µL et 20 µL par feuille sont utilisés pour inoculer *C. quinoa* et *N. benthamiana* respectivement (**Tableau 2**). Un abrasif (célite) est saupoudré sur les feuilles avant d'y déposer l'inoculum afin de favoriser les blessures mécaniques et la pénétration des ARN dans les tissus végétaux en frottant la feuille avec une légère pression. Les lésions locales présentes sur les feuilles de *C. quinoa* sont récoltées 8 jours après inoculation pour analyser leur contenu protéique et/ou nucléique. Les feuilles inoculées et apicales de *N. benthamiana* sont respectivement prélevées 8 jours et 3 semaines après l'inoculation pour analyser les protéines et/ou les ARN viraux.

2.2.2.3. Synthèse des sondes radioactives

2.2.2.3.1. Sondes ADN marquées à l' [α - 32 P]dCTP

Un fragment spécifique de la séquence à hybrider est synthétisé par PCR, purifié au phénol/chloroforme/alcool isoamylique, précipité à l'éthanol 100 % et le culot est repris dans de l'eau stérile. Cette matrice est utilisée à raison de 25 ng pour réaliser une sonde. Elle est dénaturée à 100°C pendant 2 min avant d'être déposée dans la glace. Le kit Prime-a-gene® Labeling system (Promega) est utilisé pour réaliser la sonde à l'aide de 10 μ L de tampon 5X ; 2 μ L d'un mix de désoxyribonucléotides AGT à 500 μ M chacun ; 2 μ L de BSA (2 mg/mL) ; 1 μ L de la polymérase Klenow 5 U/ μ L ; 2,5 μ L de la source radioactive [α - 32 P]dCTP à 10 μ Ci/ μ L ; qsp H₂O 50 μ L. La sonde est synthétisée pendant 1h30 à 37°C avant d'être purifiée sur une colonne G-25 pour éliminer les nucléotides non incorporés. L'intégralité de la sonde est récupérée par centrifugation et ajoutée au tampon d'hybridation recouvrant la membrane pendant une nuit à 42°C.

2.2.2.3.2. Sondes ARN marquées à l' [α - 32 P]UTP

Des vecteurs de transcription possèdent sous le contrôle d'un promoteur T3 ou T7, une séquence complémentaire à la séquence d'intérêt que l'on cherche à détecter. Ces vecteurs sont au préalable linéarisés par une enzyme de restriction et purifiés au phénol/chloroforme/alcool isoamylique. La réaction de transcription *in vitro* est réalisée dans un volume de 20 μ L en présence de 1,5 μ g d'ADN linéarisé, 2 μ L de tampon 10X (Tris-HCl 400 mM pH 8 ; MgCl₂ 100 mM ; DTT 100 mM ; NaCl 100 mM ; spermidine 40 mM), 1 μ L d'un mélange de rATP, rGTP, rCTP (12,5 mM chacun), 1 μ L de rUTP (0,5 mM), 1 μ L de BSA (2 mg/mL), 0,5 μ L de RNase OUT (40 U/ μ L), 1 μ L d'ARN polymérase T3 ou T7 et 20 μ Ci de [α - 32 P]UTP (3000 Ci/mmol et 10 mCi/mL). Après 1h30 à 37°C, la matrice d'ADN est dégradée en ajoutant 1 unité de DNase RQ1 au milieu réactionnel pendant 30 min à 37°C. La sonde est purifiée au phénol/chloroforme/alcool isoamylique et précipitée en présence de 2 volumes d'éthanol 100 % et 2 M d'acétate d'ammonium. Après centrifugation 30 min à 16000 g, la sonde est solubilisée dans un volume d'eau RN^{ase} free selon la radioactivité incorporée.

2.2.2.4. Extraction et analyse des ARN de haut poids moléculaires par northern blot

Les ARN de haut poids moléculaires sont extraits en broyant 300 mg de feuilles, préalablement réduits en poudre dans l'azote liquide, dans le tampon polysome (Tris-HCl 200 mM pH 9 ; KCl 400 mM ; saccharose 200 mM ; MgCl₂ 35 mM ; EGTA 25 mM). Ils sont purifiés par un traitement au phénol puis au phénol/chloroforme/alcool isoamylique. Les acides nucléiques sont précipités dans deux volumes d'éthanol 100 %. Après centrifugation 30 min à 16000 g à 4°C, les culots sont repris dans 200 µL d'acétate de sodium (AcNa) 3 M à pH 5,5, centrifugés 15 min à 16000 g à 4°C, lavés à l'éthanol 70 % et repris dans de l'eau stérile RN^{ase} free. L'intégrité des ARN est vérifiée sur un gel d'agarose avant de les analyser.

Les ARN de grande taille sont analysés par northern blot de haut poids moléculaires. 5 µg d'ARN sont ajoutés à 4 volumes de tampon de charge dénaturant HFF (HEPES-KOH 20 mM pH 7,8 ; EDTA 1 mM ; formamide 50 % ; formaldéhyde 6 % ; bleu de bromophénol 0,005 %). Les échantillons sont dénaturés 5 min à 65°C, refroidis dans la glace puis déposés sur un gel d'agarose dénaturant (agarose 1 % ; HEPES-KOH 20 mM pH 7,8 ; EDTA 1 mM ; formaldéhyde 6 %). La migration est réalisée à 80 V dans du tampon HEPES (HEPES-KOH 20 mM pH 7,8 ; EDTA 1 mM) à température ambiante. Les ARN sont transférés par capillarité (ou transfert passif) sur une membrane de nylon HybondTM (Amersham) dans du SSC 20X (NaCl 3 M ; citrate trisodique 0,3 M) pendant 12 heures. Un cross link est réalisé aux UV (2 x 140 millijoule) pour fixer les ARN sur la membrane. Pour vérifier la charge équivalente des ARN et l'intégrité des ARN avant leur analyse, la membrane est colorée au bleu de méthylène.

La membrane est pré-hybridée dans le tampon riboprobe (formamide 50 % ; SSC 5X ; Denhardt 8X ; tampon phosphate 50 mM pH 6,5 ; SDS 0,1 %) pendant 30 minutes à 60°C. La sonde radioactive est ajoutée (le volume ajouté dépend de la qualité de la sonde ainsi que de son temps de demi-vie) et l'hybridation est réalisée sur la nuit à 55°C. Trois lavages à 65°C sont réalisés dans du SSC 2X, SDS 0,1 %. S'il reste beaucoup de radioactivité sur la membrane, un lavage supplémentaire dans un tampon plus stringent (SSC 0,2X ; SDS 0,2 %) est réalisé. La membrane est ensuite autoradiographiée.

2.2.2.5. Extraction et analyse des ARN de petits poids moléculaires par northern blot

Les ARN de petites poids moléculaires sont extraits en broyant 300 mg de matériel végétal, préalablement réduits en poudre dans l'azote liquide, dans 1 mL de TRIzol[®]. Les échantillons sont laissés 5 min à température ambiante et 200 µL de chloroforme sont ajoutés avant d'être vortexés, laissés 5 min à température ambiante et centrifugés 15 min à 16000 g à 4°C. La phase aqueuse est récupérée pour réaliser deux purifications au phénol/chloroforme/alcool isoamylique et les acides nucléiques sont précipités dans deux volumes d'éthanol et 1/10^{ème} d'AcNa 3 M. Les acides nucléiques sont précipités, les culots lavés à l'éthanol 70 % et resuspendus dans de l'eau RN^{ase} free. L'intégrité des ARN est vérifiée sur un gel d'agarose 1 %, 0,5X TBE avant de les analyser par northern blot.

Pour analyser les petits ARN, 1 volume de formamide 100 % est ajouté à 15 µg d'ARN. Le tampon de charge 4X (Tris-HCl 50 mM pH 7,7 ; EDTA 5 mM ; glycérol 50 % ; bleu de bromophénol 0,005 %) est ajouté et les échantillons sont chauffés 5 min à 95°C avant de refroidir 10 min dans la glace. Une pré-électrophorèse est réalisée sur un gel de polyacrylamide 17,5 %, urée 7 M, TBE 0,5X pendant 30 min à 80 V dans du TBE 0,5X avant d'y déposer les échantillons. Les ARN sont transférés sur une membrane de nylon HybondTM (Amersham) pendant 1h30 dans du TBE 0,5X à 4°C. Un cross link est réalisé aux UV (2 x 140 mJ) et la membrane est colorée au bleu de méthylène pour vérifier la charge. Des sondes d'ADN sont utilisées pour révéler les ARN de petits poids moléculaires.

La membrane est pré hybridée dans le tampon Perfect Hyb Plus Hybridization (SIGMA) 30 minutes à 42°C. L'intégralité de la sonde est ensuite ajoutée et l'hybridation est réalisée sur la nuit à 42°C. Trois lavages à 50°C sont effectués avec du tampon SSC 2X, SDS 0,1 %. La membrane est mise sous film autoradiographique après avoir vérifié la présence de radioactivité sur la membrane.

2.2.3. Extraction et analyse des protéines

2.2.3.1. Extraction de protéines de matériel végétal

Pour analyser les protéines de matériel végétal, 150 mg de feuilles agroinfiltrées et de feuilles inoculées et apicales de *N. benthamiana* sont récoltés, tandis que cinq lésions locales de *C. quinoa* sont prélevées à l'aide d'un emporte pièces. Le matériel végétal est congelé dans

l'azote liquide et broyé à l'aide de billes de verre dans l'agitateur SILAMAT. 200 µL de tampon Laemmli 2X (Tris-HCl 125 mM pH 6,8 ; SDS 5 % ; glycérol 20 % ; β-mercaptoéthanol 5 % ; bleu de bromophénol 0,005 %) sont ajoutés et les protéines sont dénaturées 2 min (dans le cas de p14) à 5 min à 90°C avant d'être mises dans la glace. Les extraits sont centrifugés 2 min à température ambiante à 16000 g avant que 10 µL de surnageant ne soit prélevé pour être analysé par western blot.

2.2.3.2. Extraction de protéines de levures

Des cultures de 2 mL dans un milieu adéquat sont lancées la veille de l'extraction. Les cultures sont centrifugées 5 min à 2000 g lorsqu'elles ont atteint leur niveau de saturation ($DO_{600} = 15$). Le culot est repris dans 500 µL d'eau stérile et 50 µL de NaOH à 1,85 M. Après 10 min dans la glace, 50 µL de TCA (acide trichloroacétique) 100 % sont ajoutés et la suspension est à nouveau laissée dans la glace 10 min. Le culot est repris dans 50 µL de tampon SBR (Tris-HCl 80 mM pH 6,8 ; glycérol 14 % ; SDS 3,6 % ; EDTA 3,6 mM ; β-mercaptoéthanol 2 % ; bleu de bromophénol 0,005 %). Les extraits sont chauffés 10 min à 37°C avant d'être analysés par western blot.

2.2.3.3. Analyse des protéines par western blot

2.2.3.3.1. Séparation des protéines par gel SDS-PAGE

Le gel SDS-PAGE (*polyacrylamide gel electrophoresis*) est une électrophorèse discontinue constitué d'un gel supérieur (*stacking*) pour concentrer les protéines et d'un gel inférieur de résolution (*resolving*). Le gel de concentration contient 4 % d'acrylamide, 0,1 % de bisacrylamide (37,5/1), 125 mM de Tris-HCl à pH 6,8 et 0,1 % de SDS. Le pourcentage du gel de résolution varie en fonction du poids moléculaire des protéines étudiées et contient 375 mM de Tris-HCl à pH 8,8 et 0,1 % de SDS. La polymérisation des gels est induite en ajoutant 0,1 % de TEMED et 1 % d'ammonium persulfate. La migration des échantillons est effectuée dans 25 mM de Tris-HCl à pH 8,3, 192 mM de glycine et 0,1 % de SDS.

2.2.3.3.2. Transfert et immunodétection des protéines

Les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF (Immobilon™) pendant 1h30 à 4°C dans 25 mM de Tris-HCl à pH 8,3, 192 mM de glycine et 20 % d'éthanol. La membrane est saturée pendant 30 min dans une solution de PTL (PBS 1X ; Tween 0,5 % ; lait 5 %) avant d'incuber avec l'anticorps primaire désiré 2 h à température ambiante ou 12 h à 4°C. Trois

Tableau 3 : Dilutions auxquelles les anticorps sont utilisés

@X désigne un anticorps dirigé contre la protéine X.

Anticorps primaires		Anticorps secondaires		Anticorps couplés	
@CP	1/80000	GAR	1/10000	@Flag-HRP	1/8000
@p14	1/20000	GAM	1/10000	@myc-HRP	1/10000
@p25	1/40000			@HA-HRP	1/25000
@tRFP	1/7500				
@GFP	1/80000				
@Rbcl	1/10000				
@H3	1/7500				

lavages successifs dans du tampon PBS 1X, Tween 0,5 % sont réalisés pendant 10 min avant d'incuber la membrane avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase dans du tampon PTL pendant 2 h à température ambiante (**Tableau 3**). À nouveau, trois lavages sont effectués et la révélation des protéines est réalisée en présence du substrat de la peroxydase fournie dans le kit de révélation Lumi-light.

2.2.4. Clonage

2.2.4.1. Techniques de clonage conventionnel

2.2.4.1.1. Amplification d'un fragment d'ADN à partir d'une matrice d'ADN

Si le fragment d'ADN à amplifier est inséré dans un vecteur, ce dernier est utilisé comme matrice pour réaliser l'amplification du fragment par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en utilisant une polymérase de haute-fidélité (Phusion™). Les sites de restriction sont insérés sur les deux amorces oligodésoxyribonucléotidiques spécifiques des extrémités 5' et 3' du fragment à amplifier. La réaction d'amplification par PCR repose sur une répétition de 30 cycles où : (1) l'ADN est dénaturé à 98°C pendant 30 secondes, (2) les amorces s'hybrident spécifiquement sur le fragment d'ADN à une température de fusion (T_m) pendant 30 secondes et (3) la polymérase allonge les amorces hybridées pour synthétiser le fragment voulu à 72°C pendant un temps variable qui dépend de la longueur de l'amplicon. La température de fusion T_m est déterminée selon le pourcentage en nucléotides GC dans l'amorce, la longueur de l'amorce et peut varier au cours des cycles en fonction du pourcentage de nucléotides hybridés à la matrice. Les produits de PCR ainsi générés sont analysés sur un gel d'agarose avant d'être purifiés par un traitement phénolique et soumis à leur digestion par les enzymes de restriction compatibles.

2.2.4.1.2. Amplification d'un gène par RT-PCR

Dans le cas où le fragment d'ADN à amplifier n'a pas été isolé auparavant, une transcription inverse est effectuée sur des ARN totaux extraits au tampon polysome (voir & 2.2.2.4.1 Extraction des ARN de haut poids moléculaires). Le milieu réactionnel initial est composé de 1 µg d'ARN totaux et de 1 µL d'oligo(dT) (50 µM). Le volume est ajusté à 5 µL avec de l'eau et les ARN sont dénaturés à 72°C pendant 5 min avant d'être mis sur glace pendant 5 min. Le milieu est complété par 1 µL de dNTP (10 mM) ; 0,5 µL de RNase OUT (40 U/µL) ; 1 µL de DTT

(100 mM) ; 4 µL de tampon RT 5X (Tris-HCl 250 mM pH 8,3 ; KCl 375 mM ; DTT 50 mM ; 1,2 µL de MgCl₂ (25 mM) et 1 µL d'enzyme RT ImProm-II™. Le volume est ajusté à 20 µL avec de l'eau. L'hybridation des oligo(dT) est favorisée pendant 5 min à température ambiante, la transcription inverse est réalisée à 42°C pendant une heure et la dénaturation de l'enzyme est effectuée à 70°C pendant 15 min. Pour diluer la réaction, 30 µL d'eau sont ajoutés. Ce milieu réactionnel est directement utilisé comme matrice à raison de 5 µL pour amplifier un fragment d'ADN par PCR.

2.2.4.1.3. Digestion par enzymes de restriction

Le choix des enzymes de restriction est dicté par les sites disponibles dans la cassette multiple de clonage (MCS) du vecteur et leur absence dans la séquence à cloner. Ces endonucléases reconnaissent leur site, généralement palindromique, et assurent leur clivage pour générer des extrémités franches ou cohésives. Des enzymes libérant des extrémités cohésives sont favorisées, ainsi que l'utilisation de deux enzymes distinctes (clivage en 5' et en 3') afin d'effectuer un clonage orienté. Selon la compatibilité de tampon des enzymes de restriction, soit une digestion est réalisée en présence des deux enzymes, soit deux digestions séquentielles sont réalisées avec une purification phénolique intermédiaire. Les réactions de digestion sont effectuées à 37°C pendant 2 h.

2.2.4.1.4. Déphosphorylation du vecteur

La déphosphorylation des vecteurs suite à leur digestion enzymatique les empêche de se refermer sur eux-mêmes sans intégrer l'insert voulu lors de l'étape de ligation. Cette étape est réalisée par la phosphatase alcaline d'intestin de veau qui assure la déphosphorylation des extrémités 5' phosphate libérées lors des digestions enzymatiques. La phosphatase est ajoutée directement dans le milieu réactionnel de digestion puisqu'elle offre une flexibilité d'utilisation dans une grande majorité des tampons de digestion utilisés. La réaction de déphosphorylation est menée à 37°C pendant 30 min avant d'extraire et purifier le vecteur par un traitement phénolique.

2.2.4.1.5. Purification d'acides nucléiques au phénol/chloroforme/alcool isoamylique

Les acides nucléiques sont extraits par un volume de phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25:24:1). Les échantillons sont vortexés, laissés 2 min à température ambiante puis

centrifugés pendant 15 min à 16000 g. La phase aqueuse (ou surnageant) est prélevée et les acides nucléiques sont précipités.

2.2.4.1.6. Précipitation des acides nucléiques

Tous les acides nucléiques, indépendamment de leur taille, sont précipités par deux volumes d'éthanol 100 % en présence de NaCl 200 mM.

2.2.4.1.7. Analyse des fragments par électrophorèse

Les fragments de PCR ainsi que les plasmides digérés sont analysés sur un gel d'agarose de 0,8 % à 2 % en fonction de leur taille attendue. Un aliquot est ajouté au tampon de charge (Tris-HCl 2 mM pH 8 ; EDTA 10 mM ; saccharose 5 % ; bleu de bromophénol 0,01 %) et déposé sur le gel pour migration dans du tampon TBE 0,5X (Tris-Borate 100 mM pH 8 ; EDTA 2 mM). Le gel est ensuite plongé dans un bain de BET (0,5 µg/mL) et l'ADN visualisé sous lumière UV.

2.2.4.1.8. Ligation

La T4 DNA ligase effectue la ligation de l'insert et du vecteur en réalisant une liaison phosphodiester entre les extrémités 3'OH et 5'P de deux molécules d'ADN. Dans cette réaction, 100 ng de vecteur sont mis en présence d'un excès d'insert : 5 fois plus en quantité molaire. La ligation est effectuée pendant 1 h minimum à 22°C. Les produits de ligation sont purifiés par une extraction phénolique et repris dans 5 µL d'eau pour transformer des bactéries électrocompétentes.

2.2.4.1.9. Sélection des plasmides recombinants

Une sélection des clones à amplifier est effectuée par PCR sur colonies. Cette étape permet de vérifier l'insertion de fragment d'ADN dans le vecteur grâce à un couple d'amorce dont l'une s'hybride sur le vecteur, l'autre sur l'insert. Le milieu réactionnel est composé de : 10 µL tampon 5X ; 3 µL MgCl₂ (25 mM) ; 1 µL mix dNTP (10 mM chacun) ; 0,5 µL d'amorce sens et anti-sens (10 mM) ; 0,25 µL GoTaq DNA polymérase (5 U/µL) et est complété à 50 µL avec de l'eau. Une colonie est piquée à l'aide d'un cure-dent et plongée dans le milieu réactionnel. La réaction est lancée dans un thermocycleur et analysée sur un gel d'agarose pour visualiser la présence/l'absence de fragments. Trois à quatre colonies positives sont choisies pour isoler et purifier leur plasmide recombinant.

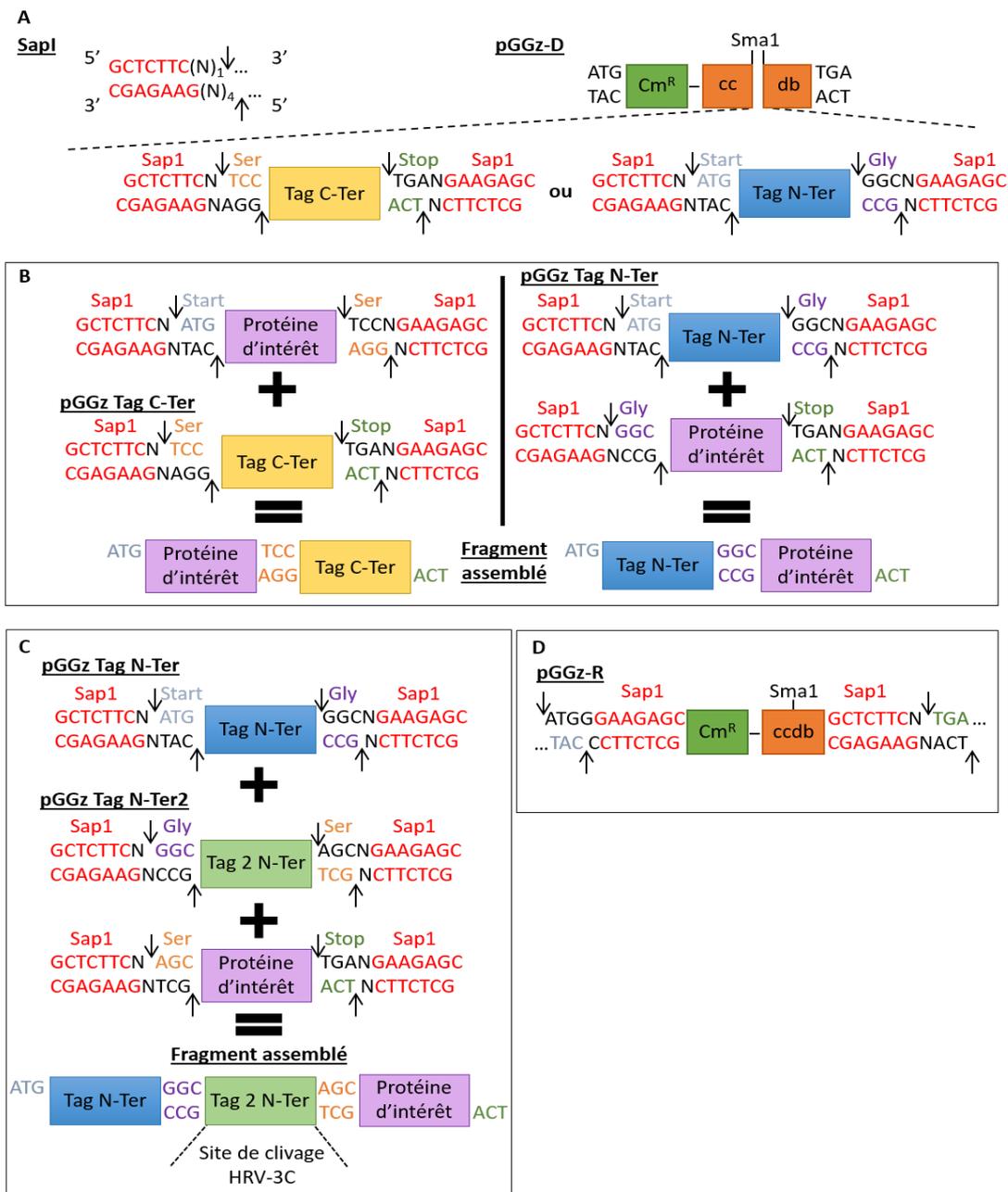


Figure 16 : Stratégie de clonage Golden Gate

A) L'enzyme de restriction *SapI* génère une extrémité 5' sortante de trois nucléotides en dehors de son site de reconnaissance : les flèches représentent les sites de clivage de l'enzyme. Les séquences des étiquettes à fusionner sont insérées dans le site *SmaI* du gène *ccdb* du plasmide pGGz-D et sont bordées des sites *SapI*. La séquence d'une étiquette à fusionner en C-ter est flanquée d'un codon sérine en 5' et d'un codon stop en 3'. La séquence d'une étiquette à fusionner en N-ter est flanquée d'un codon d'initiation ATG en 5' et d'un codon glycine en 3'. B) Un produit de PCR est généré pour contenir la séquence de la protéine d'intérêt, flanquée en 5' d'un codon d'initiation et en 3' d'un codon sérine pour la fusionner à une étiquette en C-ter ou d'un codon glycine en 5' et d'un codon stop en 3' pour la fusionner à une étiquette en N-ter. C) Dans le cas où ce clonage est utilisé pour produire des protéines recombinantes, le site de clivage de l'enzyme 3C du HRV a été ajouté entre l'étiquette et la protéine d'intérêt. Les codons cohésifs ont été adaptés dans cette condition. D) La cassette « *SapI*-Cm^R-*ccdb*-*SapI* » du plasmide de destination pGGz-R est excisée lors de la digestion enzymatique *SapI* et libère des codons cohésifs start et stop, compatibles avec ceux présents aux extrémités des fragments assemblés.

2.2.4.1.10. Amplification et purification de plasmides recombinants

Cette étape permet de purifier du plasmide recombinant qui sera envoyé à la plateforme de séquençage. Des cultures de 5 mL (LB + antibiotique de sélection) sont ensemencées avec les bactéries positives en PCR colonie. L'ADN plasmidique est extrait selon les recommandations du kit Nucleospin® Plasmid Easypure. La concentration des plasmides ainsi extraits est estimée par une lecture de densité optique au NanoDrop™.

2.2.4.1.11. Analyse des plasmides recombinants par séquençage

Le séquençage est réalisé par la plateforme de l'expression génique de l'IBMP selon la méthode de Sanger.

2.2.4.2. Clonage Golden Gate

2.2.4.2.1. Principe

Cette technique est simple puisqu'elle s'affranchit des étapes de purification phénolique retrouvées dans les clonages classiques et elle est rapide puisqu'elle est réalisée en deux étapes. La première consiste à synthétiser par PCR le fragment d'ADN puis à réaliser un mélange réactionnel unique où le clonage (par enzyme de restriction) et la ligation ont lieu. Le mélange réactionnel contient l'ADN d'intérêt à fusionner, un vecteur donneur d'étiquette, un plasmide receveur ainsi qu'une enzyme de restriction spécifique et la ligase. Le Golden Gate repose sur l'utilisation d'une enzyme de restriction de type IIS (*Shifted cleavage*) qui réalise un clivage endonucléolytique en dehors de son site de reconnaissance. L'enzyme de restriction *SapI* libère une extrémité 5' sortante de trois nucléotides (**Fig.16A**). Cette propriété est utilisée pour générer des séquences cohésives aux extrémités des fragments d'ADN à assembler. Une collection de plasmides pGGz-D (plasmide Golden Gate-zéocine-Donneur) est disponible où chacun d'eux code pour une étiquette distincte (eGFP, tRFP, 6His, GST, Streptavidine, ...). Ces étiquettes sont flanquées des sites de restriction *SapI* et de séquences compatibles dessinées en fonction du clonage à réaliser. Cette cassette de clonage est insérée dans le gène *ccdb* du plasmide pGGz-D. Le fragment d'ADN d'intérêt est synthétisé par PCR en dessinant des amorces où les sites *SapI*, les séquences cohésives apportant un codon start ou stop (en fonction de l'orientation N-ter ou C-ter) et les séquences cohésives compatibles à celles de l'étiquette à fusionner sont ajoutées. Dans le cas où l'étiquette est en position N-terminale, la séquence cohésive apporte un codon glycine, lorsque l'étiquette est en position C-terminale (**Fig.16B**), la séquence cohésive apporte un codon serine. Un module

Tableau 4 : Clonage Golden Gate, réaction de clonage et ligation

Etape 1 : x10	37°C	10 min
	18°C	10 min
Etape 2	18°C	60 min
Etape 3	50°C	10 min
Etape 4	80°C	10 min
Etape 5	10°C	5 min

complémentaire peut être inséré entre l'étiquette et la protéine d'intérêt en adaptant les séquences cohésives (**Fig.16 C**). Cette étape est réalisée pour ajouter le site de clivage de la protéine 3C du HRV pour la production des protéines recombinantes.

Plusieurs types de plasmides receveurs et compatibles au Golden Gate sont disponibles (pGGz-R) : pET pour la production de protéines, pEAQ pour l'agrotransformation et l'expression transitoire de protéines *in planta* etc. Dans les pGGz-R, le gène *ccdb* est flanqué des sites *SapI* et est excisé lors de la digestion enzymatique pour être remplacé par le fragment assemblé grâce à l'hybridation des séquences cohésives renfermant les codons *start* et *stop* (**Fig.16D**). Le cas échéant, ce gène permet de réaliser une sélection positive des bactéries puisque la protéine *ccdb* est toxique pour l'ADN gyrase et entraîne la mort des bactéries.

2.2.4.2.2. Clonage et ligation

Un milieu réactionnel unique assure l'étape de digestion et de ligation. Il est composé de 50 ng de produit PCR purifié ; 300 ng de vecteur pGGz-D donneur de l'étiquette ; 150 ng de vecteur pGGz-R receveur ; 1 µL d'enzyme *SapI* (10 U/µL) ; 2 µL de tampon Cut Smart 10X ; 1 µL de T4 DNA ligase (1 U/µL) ; 1 µL rATP (10 µM). Le volume est ajusté à 20 µL et le programme ci-dessous est effectué dans un thermocycleur (**Tableau 4**). Dans l'étape 1, les séquences cohésives peuvent s'hybrider à 37°C et leur ligation est effectuée à 18°C. Après la réaction, 10 µL de produits de ligation sont utilisés pour transformer des bactéries chimiocompétentes.

2.2.5. Localisation cellulaire et tests d'interaction *in vivo*

2.2.5.1. Test d'interaction protéine-ARN par triple hybride de levures

Les levures YBZ1 sont co-transformées par les plasmides pGAD qui exprime la protéine d'intérêt fusionnée au domaine d'activation de la protéine GAL4 et pIII-MS2 qui exprime un ARN chimérique : (1) l'ARN dont l'interaction avec la protéine d'intérêt est testée et (2) deux structures tige-boucle reconnues spécifiquement par la protéine CP du phage MS2. CP-MS2 est exprimée en dimère par la souche de levure et est fusionnée au domaine de fixation à l'ADN de la protéine LexA. Le facteur de transcription est reconstitué par l'interaction ARN-protéine et assure la croissance des levures sur un milieu sélectif dépourvu d'histidine.

2.2.5.2. Test d'interaction protéine-protéine par double hybride de levures

Les levures AH109 sont co-transformées par les plasmides pGAD-AD et pGBK-BD qui assurent respectivement la croissance des levures sur un milieu SD dépourvu de leucine (L) et tryptophane (W). Ces levures sont cultivées dans un milieu SD-WL pendant 48 h à 30°C. Le test d'interaction est réalisé en déposant 3 gouttes de ces cultures, ainsi que leur dilution au 1/10ème et au 1/100ème, sur un milieu dépourvu d'histidine (SD-WLH) et un milieu plus stringent dépourvu d'histidine et d'adénine (SD-WLHA).

2.2.5.3. (Co-)Localisation *in situ* de protéines par microscopie confocale

Un disque foliaire est prélevé sur des plantes de *N. benthamiana* agroinfiltrées trois jours auparavant. L'échantillon est déposé entre lame et lamelle, recouvert d'eau et les bulles d'air sont éliminées en réalisant le vide pendant une minute. Les protéines d'intérêt, fusionnées à l'eGFP ou la tRFP, sont observées par microscopie confocale à l'aide du microscope inversé ZEISS LSM700. L'excitation de l'eGFP et de la tRFP est réalisée à 488 nm et 555 nm respectivement. Les échantillons sont observés sous l'objectif 40x par immersion à l'huile. L'acquisition des images est gérée par le logiciel ZEN tandis que le montage des clichés est réalisé sur ImageJ.

2.2.5.4. Recherche d'interaction protéine-protéine *in situ* par FRET-FLIM

Le FLIM (*Fluorescence lifetime imaging microscopy*) est une technique qui permet de détecter des interactions protéine-protéine *in vivo*. Elle repose sur le transfert d'énergie entre deux protéines de fusion : l'une est fusionnée à un fluorophore donneur d'énergie et l'autre à un fluorophore accepteur. Une compatibilité énergétique doit exister entre les fluorophores de sorte à ce que le spectre d'émission du fluorophore donneur chevauche le spectre d'absorption du fluorophore accepteur. Ce transfert d'énergie entre deux molécules fluorescentes est défini comme le FRET (*Förster resonance energy transfer*) et dépend de la distance qui sépare ces deux protéines. Le FLIM est une technique qui permet de mesurer le FRET en déterminant le temps de vie de la protéine de fusion donneur. Le temps de vie d'un fluorophore représente la durée passée à l'état excité avant de rejoindre l'état fondamental et est de l'ordre de la nanoseconde. Son temps de vie diminue si son énergie est transférée à une molécule acceptrice. Ainsi, plus le transfert d'énergie est efficace, plus le temps de vie

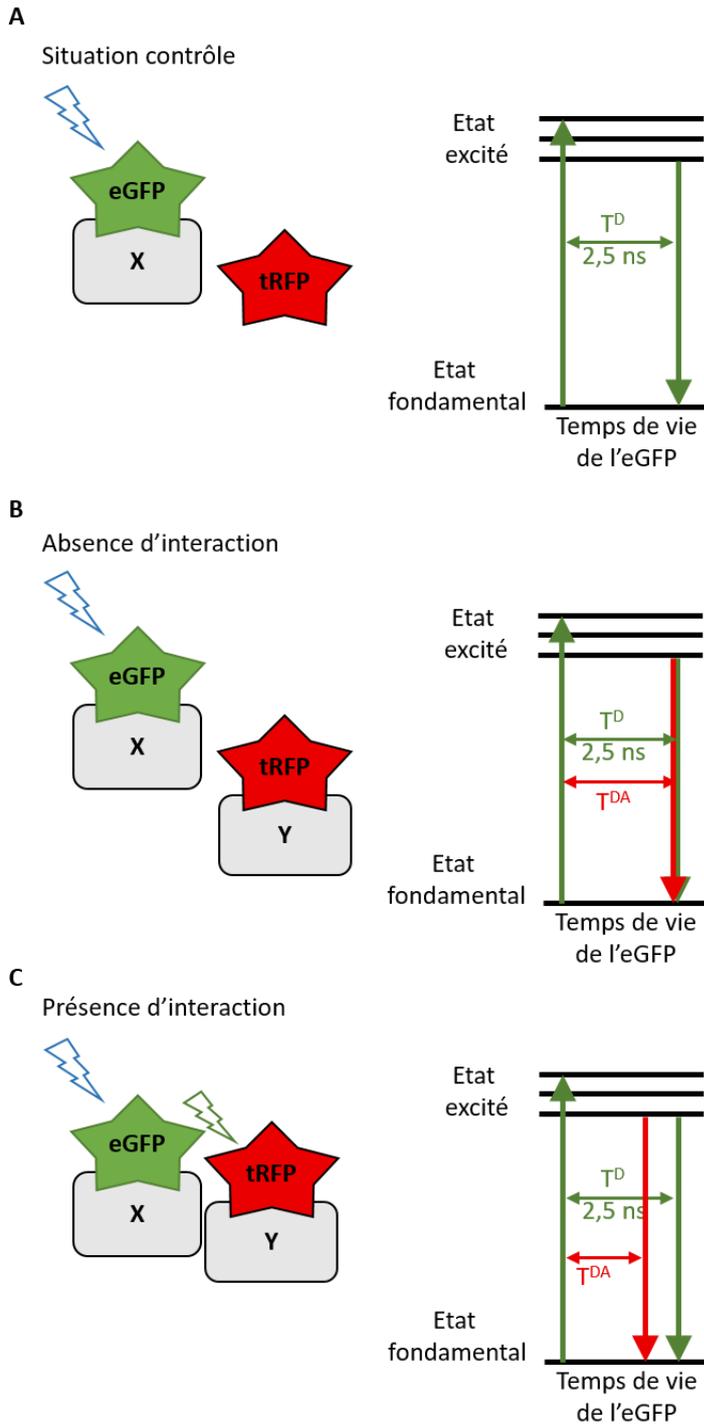


Figure 17 : Principe du FRET-FLIM

L'eGFP est excitée à 488 nm à l'aide d'un laser (éclair bleu). A) Dans la situation contrôle, la protéine d'intérêt X fusionnée à l'eGFP a été co-exprimée avec la tRFP. Le temps de vie de l'eGFP ne varie pas de sa valeur consensuelle de 2,5 ns. B) En cas d'absence d'interaction entre les protéines X et Y, le temps de vie de l'eGFP reste proche de 2,5 ns. C) Lors d'une interaction entre X et Y, les fluorophores sont assez proches pour que l'énergie émise par l'eGFP soit transférée (éclair vert) à la tRFP et le temps de vie de l'eGFP diminue. T^D et T^{DA} représentent le temps de vie de l'eGFP en présence du donneur (ici, la protéine de fusion eGFP-X) et de la tRFP et en présence de l'accepteur (tRFP-Y) respectivement.

diminue. L'efficacité de FRET est déduite des temps de vie du donneur en présence du fluorophore non fusionné (T^D ; contrôle) et de la protéine de fusion acceptrice (T^{DA}) et se détermine tel que :

$$E(\%) = (1 - (T^{DA}/T^D)) \times 100$$

Le couple eGFP/tRFP est utilisé dans les expériences de FRET-FLIM. Le temps de vie de l'eGFP varie de 2,4 à 2,6 ns (Nedbal et al., 2015; Pepperkok et al., 1999). Ces temps de vie peuvent être influencés par de nombreux facteurs physiologiques (comme par exemple le pH, la concentration de certains ions et l'autofluorescence tissulaire et aussi par certaines caractéristiques intrinsèques au fluorophore (photoblanchiment, multimérisation (Leavesley and Rich, 2016). Ce bruit de fond possible pour l'eGFP a été mesuré et induit une efficacité de FRET de 6 % (Denay et al., 2019). Nous avons donc décidé de placer une valeur seuil significative à 7 % pour conclure à une interaction.

Pour vérifier l'absence d'interaction entre une protéine de fusion X-eGFP et la tRFP, le temps de vie de l'eGFP (fusionnée à X) est estimé en présence de la tRFP seule (non fusionnée) à chaque observation : c'est le temps T^D (**Fig.17A**). L'expérience est poursuivie à condition que le temps de vie mesuré dans cette situation contrôle soit de l'ordre de 2,5 ns. En cas d'absence d'interaction entre les protéines d'intérêt testées, le temps de vie de l'eGFP (T^{DA}) est inchangé : $T^{DA} \simeq T^D$ (**Fig.17B**). A l'inverse, une interaction entre les protéines d'intérêt se traduit par une diminution du temps de vie de l'eGFP : $T^{DA} < T^D$ (**Fig.17C**).

2.2.6. Fractionnement subcellulaire - Isolement de noyaux de *Nicotiana benthamiana*

Les feuilles de *Nicotiana benthamiana* sont réduites en poudre dans l'azote liquide. 0,5 g de matériel végétal est resuspendu à l'aide de 10 mL de tampon 1 (sucrose 0,4 M ; Tris-HCl 10 mM pH 7,5 ; $MgCl_2$ 10 mM ; DTT 2,5 mM). Le broyat est filtré sur une couche de Miracloth puis centrifugé 20 min à 4°C à 3200 g. Le surnageant est récupéré pour analyser le contenu cytosolique protéique et nucléique. Le culot est resuspendu dans 1 mL de tampon 2 (sucrose 0,25 M ; Tris-HCl 10 mM pH 7,5 ; $MgCl_2$ 10 mM ; Triton 1 % ; DTT 2,5 mM). Après 10 min à température ambiante, les échantillons sont centrifugés 10 min à 4°C et 16000 g. Le surnageant contient les mitochondries et les chloroplastes éclatés par le Triton ; le culot renferme les noyaux et chloroplastes intacts. Le surnageant est éliminé et l'étape de lavage avec le tampon 2 est répétée si le culot est vert foncé. Le culot est repris dans 300 μ L de

tampon 2 et le tout est déposé sur un coussin de sucrose (sucrose 1,75 M ; Tris-HCl 10 mM pH 7,5 ; MgCl₂ 2,5 mM ; Triton 0,15 % ; DTT 2,5 mM). Les échantillons sont centrifugés à 16000 g pendant 1 h à 4°C. Le culot renfermant les noyaux intacts sont repris dans 200 µL de tampon de lyse (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 ; EDTA 10 mM pH 8 ; SDS 1 %). Tous les tampons sont supplémentés en inhibiteurs de protéases extemporanément.

Les ARN et les protéines sont extraits au TRIzol[®] à partir de 5 mL et de 100 µL de fraction cytosolique et nucléaire respectivement.

3. Résultats

Résultats

3.1. Chapitre 1 : Caractérisation des partenaires de la protéine p14 en contexte infectieux

Chapitre 1 : Caractérisation des partenaires de la protéine p14 en contexte infectieux

1 Introduction

BNYVV is a multipartite virus belonging to the *Benyviridae* family and comprise a segmented genome of four to five positive-sense single-stranded RNAs (Gilmer et al., 2017). Each RNA is individually encapsidated and forms helical viral particles. RNA1 and RNA2 encode “housekeeping genes” necessary and sufficient to trigger an infection on model plants such as *Chenopodium quinoa* and *Nicotiana benthamiana* where local lesions and systemic infection are respectively observed (Andika et al., 2005; Ouillet et al., 1989). RNA1 ensures the synthesis of a polyprotein involved in viral replication whereas CP major and CP-RT minor structural proteins, triple-gene block cell-to cell movement proteins and silencing suppressor protein p14 are expressed through RNA2 (Gilmer et al., 1992; Hehn et al., 1997; Tamada and Kusume, 1991). On natural hosts from *Beta* species, RNA3 and RNA4 are mandatory to ensure virus systemic infection and vector transmission by *Polymyxa betae* respectively (Lauber et al., 1998; Tamada et al., 1989).

RNA3 triggering viral long distance movement does not involve the p25 protein expression but rather the RNA3-derived non-coding RNA (Lauber et al., 1998; Peltier et al., 2012). Indeed, RNA3 is processed by exoribonuclease 4 (XRN4) from 5' to 3' until stalling onto the Coremin motif (Flobinus et al., 2018). This latter is 20-nucleotides long, strictly conserved among Benyviruses, which allow ncRNAs accumulations (Peltier et al., 2012). NcRNA3 also provides a silencing suppression function, recently attributed to non-coding RNA (adenoviral VA RNA, flaviviral sfRNA) and not restricted to protein anymore (Flobinus et al., 2016). Indeed, the presence of the ncRNA3 is able to complement an infection triggered by a VSR-deficient inoculum composed of RNA1 and RNA2 Δ p14 on local host *C. quinoa*. This effect is specific to ncRNA3 *per se* and not attributed to the p25 or genomic RNA3 since a mutated version of RNA3 unable to accumulate ncRNA3 through the replacement of the Coremin sequence by its reverse complementary sequence Nimeroc (namely RNA3E) is unable to provide a such functional complementation (Flobinus et al., 2016). The ncRNA3 also exerts its functional complementation at the systemic level on *N. benthamiana* as it partially complements the

long-distance movement deficiency of a virus expressing the *p14BA2* hypomorphic VSR mutant (Flobinus et al., 2016).

The silencing suppression of the p14 VSR was tested using the GFP reporter assay. The wild type p14 specifically reduced secondary P siRNA accumulation levels whereas silencing suppression function was abolished for the *p14BA2* mutant (Chiba et al., 2013). Interestingly, the systemic infection of a virus expressing *p14BA2* is prevented on WT *N. benthamiana* but is completely restored on RDR6 knock-down plants (Flobinus et al., 2016). Taken together these results suggest that the transitivity pathway is specifically targeted by the BNYVV p14 VSR.

To deeper understand the p14 silencing suppression mechanism, we decided to identify viral and cellular partners associated with p14. While we were not able to express a functional tagged-p14 protein through the RNA5 derived replicon5, we successfully expressed Flagp14 in the RNA2 context. We then used immunoprecipitation coupled to mass spectrometry to identify potential p14 partners during viral infection. Preliminary results are presented here.

2 Materials and Methods

2.1 Plasmids, cloning strategies and *in vitro* transcription

Linearized plasmids containing cDNA copies of RNA1, RNA2 (RNA2 WT, RNA2 Δ p14, RNA2:Flagp14, RNA2:TripleStop:Flagp14 or expressing the hypomorphic *p14BA2* mutant), RNA3 and replicon 5 (rep5- \emptyset , rep5-p14, rep5-Flag/cMyc/HAp14) were used for *in vitro* transcription as described previously (Bouzoubaa et al. 1987; Quillet et al. 1989).

To create RNA2:Flagp14 (or RNA2:Flag*p14BA2*) expressing plasmid, two primary PCR were performed : the first with a forward primer upstream of p14 sequence, coupled to a reverse containing two successive Flag epitopes and partially complementary to p14 (Flag²-p14R); the second with a forward primer complementary to Flag²-p14R coupled to a reverse oligo downstream of p14 sequence. Those two PCR products were used as PCR megaprimer and a nested PCR using internal primers was produced and *EcoRI/Sall* digested before replacing the WT sequence in the cDNA clone.

RNA2:TripleStop (RNA2:TS) expressing Flagp14 or Flag*p14BA2* were obtained by using Flagp14 and Flag*p14BA2* megaprimer to replace the p14 sequence in the RNA2:TS cDNA clone obtained previously (Schmitt et al., 1992).

Tagged-p14 PCR products were generated with a forward primer containing cMyc, Flag or HA sequence coupled to reverse primer complementary to p14 downstream sequence, using RNA2 cDNA clone as a template. Amplicons were *NcoI/XbaI* digested and inserted into replicon5 cDNA (Schmidlin et al., 2005).

2.2 Plant infection

100 µl of nuclease free inoculum (50 mM KH₂PO₄ (pH 7.5) containing 0.05 % Macaloïde) containing RNA1 (10 µg), RNA2, RNA3 and replicon 5 (5 µg each) *in vitro* transcripts were rub inoculated onto 6 weeks-old *C. quinoa* or 4 weeks-old *N. benthamiana* to start the infection.

2.3 Immunoprecipitation

Three weeks after inoculation, apical leaves of *N. benthamiana* were harvested and grinded with liquid nitrogen and cold mortar into fine powder. 150 mg were grinded 10 min in lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7 to pH 9); 50 mM NaCl ; (0.1 % or 1 %) Triton ; when indicated 1 mM DTT, supplemented with one tablet of cOmplete™ protease inhibitor cocktail for 50 mL of buffer) and homogenized 10 min at 12 rpm at 4°C. Cellular debris were removed by two successive centrifugations at 16000 g for 10 min at 4°C. 50 µL of supernatant is retrieved for input analysis and remaining supernatants was incubated at 4°C with magnetic beads conjugated to an anti-Flag monoclonal antibody (µMACS system, Miltenyi Biotec) for 30 min at 6 rpm. Samples were dropped on µColumn and 50 µL of the flowthrough were harvested for fraction analysis. Column was then washed with 1 mL of lysis buffer and with 100 µL of washing buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)). Elution was performed with 90 µL of 90°C pre-warmed elution buffer (50 mM Tris-HCl (pH 6.8); 50 mM DTT; 1 % SDS; 1 mM EDTA; 0.005 % bromophenol blue; 10 % glycerol). 5 µL of the eluted fraction was kept for analysis and the remaining 85 µL were analysed by liquid chromatography coupled to tandem mass-spectrometry (LC-MS/MS).

2.4 Protein and RNA extraction and analyses

Leaves were grinded in liquid nitrogen to obtain a fine powder and 100 mg and 200 mg were harvested for protein and RNA extraction respectively. Samples were mixed thoroughly with glass beads in Precellys® in a “polysome” buffer (200 mM Tris-HCl (pH 9); 400 mM KCl; 200 mM saccharose; 35 mM MgCl₂; 25 mM EGTA) to extract RNAs using a phenol/chloroform purification, followed by an ethanol precipitation. 200 µL of 3 M NaAc were added on pellet to solubilize small RNAs and DNA. Remaining RNA pellet was washed with 70 % ethanol and

then dissolved in 50 to 100 μ L of nuclease free water, depending on the pellet size. RNA quantity was estimated using spectrophotometry and quality estimated on agarose gel. High molecular weight northern blot was performed using 5 μ g of RNA, mixed with 4 volumes of HFF buffer (20 mM HEPES-KOH (pH 7.8); 1 mM EDTA; 50 % formamide; 6 % formaldehyde; 0.005 % bromophenol blue). Samples denaturation was performed 5 min at 65°C before loading on denaturing agarose gel (1 % agarose; 20 mM HEPES-KOH (pH 7.8); 1 mM EDTA; 6 % formaldehyde). After migration in HEPES-EDTA buffer, RNA were transferred on Hybond™ membrane in 20X SSC for 12 hours. RNA were UVs cross-linked and membrane stained with methylene blue. Pre-hybridization was performed in 50 % formamide; 5X SSC; 8X Denhardt; 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (pH 6.5); 0.1 % SDS solution for radiolabelled RNA probes or in PerfectHyb™ Plus Hybridization buffer for radiolabelled DNA probes.

For protein analyses, samples were directly grinded in Laemmli 2X buffer and boiled for 2 minutes at 90°C. Following 1 min at 12000 g centrifugation, supernatant was loaded on a SDS-PAGE. Proteins were transferred on Immobilon-P PVDF membrane in Tris-ethanol buffer and incubated with antisera directed against BNYVV or eGFP proteins. Following washes in 1X PBS; 0.5 % SDS, HRP conjugated goat anti-rabbit secondary antibody was used to detect protein through electrochemiluminescence. Membranes were further stained with coomassie blue to check for equal loading.

2.5 *Transmission electron microscopy*

A grid used in transmission electron microscopy (covered with formvar and carbon) was incubated with 20 μ L of BNYVV anti-CP sera, diluted to 1/8000 in phosphate buffer (pH 7.2). Grid was washed twice 5 min with phosphate buffer and incubated at 4°C during 2 h with 20 μ L of infected leaves crude extract obtained following grinding in the phosphate buffer and 16000 g centrifugation. After two washing steps, grids were negatively stained with 2 % uranyl acetate and observed with Hitachi H7500 transmission electron microscope.

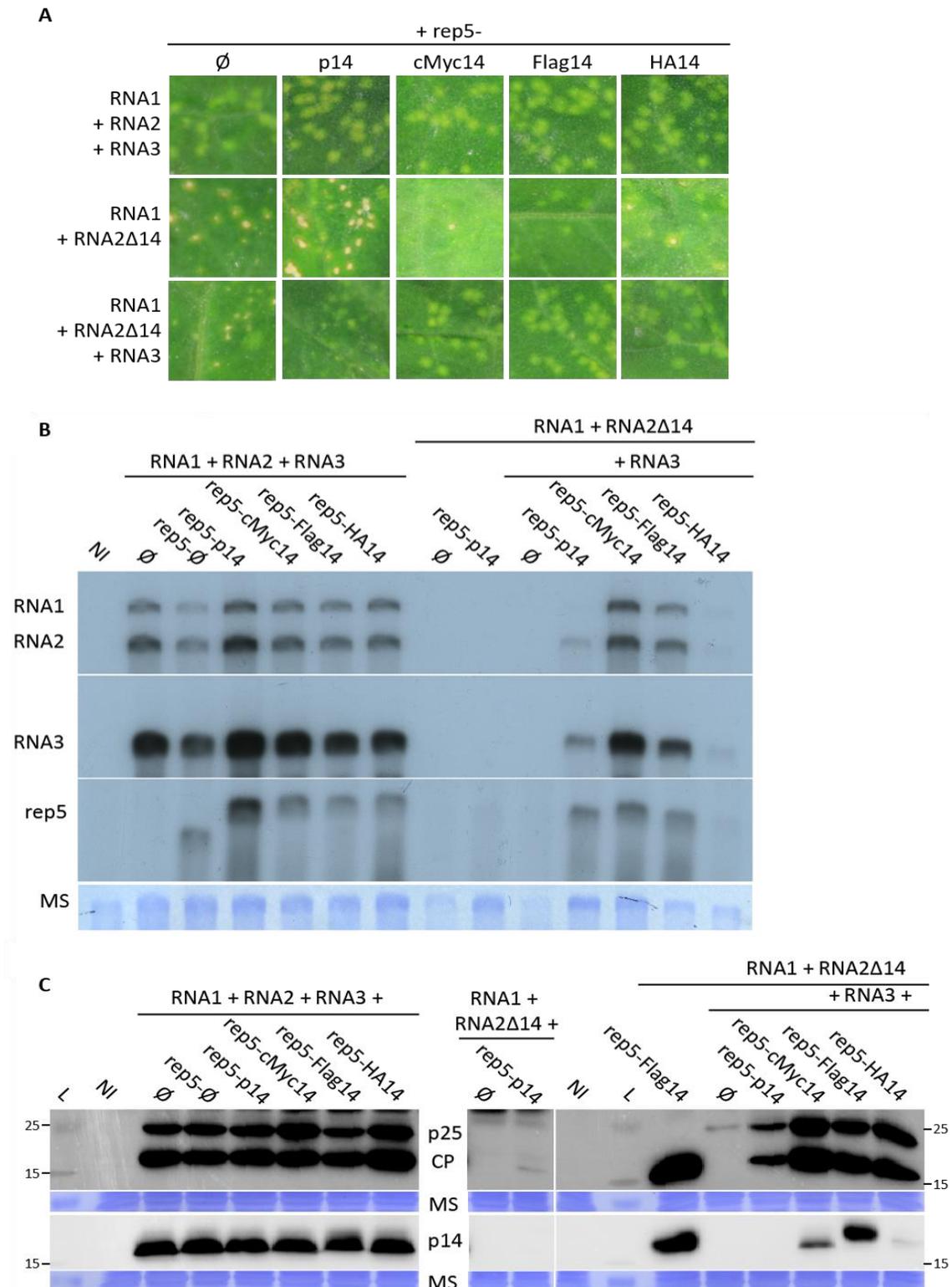


Figure 1: A functional complementation of an RNA2 p14 deletion mutant is provided by the use of an RNA5-derived vector expressing tagged-p14 proteins on *C. quinoa*

C. quinoa were infected with BNYVV RNA1, RNA2 or RNA2 with p14 sequence deletion (RNA2Δ14) with or without RNA3 and supplemented with rep5 (rep5-∅) or rep5 expressing p14 (rep5-p14, rep5-cMyc14, rep5-Flag14 or rep5-HA14). A) Local lesions induced by RNA1, RNA2 or RNA2Δ14, rep5-∅ or expressing proteins in the presence or absence of RNA3. B) Total RNAs extracted from local lesions were analysed by northern blot with BNYVV specific probes specified on the left. C) Proteins were analysed by western blot using antibodies specific to p25, CP and p14 proteins. Some ladder molecular weights (kDa) are indicated. MS, membrane staining; NI, non-infected; L, ladder.

3 Results and discussion

3.1 Expression of tagged-p14 proteins through replicon 5 on *C. quinoa*

To identify p14 partners during viral infection, tagged versions of the p14 protein were produced. We maintained the RNA3 integrity to allow the viral long distance movement in *N. benthamiana* when necessary (*i.e* with *p14BA2* hypomorphic mutant) and used the RNA5-derived vector (rep5) to express mycp14, Flagp14 and HAp14 for complementation assays of VSR defective inoculum (RNA1 + RNA2 Δ p14). Functional tests were performed on *C. quinoa* leaves. All combinations were first tested in the presence of WT RNA1, 2 and 3. Under these conditions, *i.e* with p14 WT expressed from RNA2, all local lesions were phenotypically identical with similar size and chlorotic appearance (**Fig.1A**, upper panel). This corroborates with similar RNA (**Fig.1B**, left) and protein (**Fig.1C**, left) accumulation levels. Then, plants were inoculated with RNA1 and RNA2 Δ p14, supplemented with rep5 transcripts expressing tagged-p14 protein. For all conditions, except rep5 expressing Flagp14, necrotic lesions appeared (including rep5-p14) suggesting that p14 expression through replicon 5 was not able to complement RNA2 Δ p14 (**Fig.1A**, middle panel). Molecular analysis confirmed the abortive infection with an absence of any viral RNA detection (**Fig.1B**, middle panel) and proteins (**Fig.1C**, middle panel) in leaves. We then repeated the experiment by adding the RNA3 in the inoculum to provide the complementation described previously by Flobinus *et al.* (Flobinus *et al.*, 2016). Local lesions on *C. quinoa* appeared chlorotic in the presence of RNA3 (**Fig.1A**, lower panel). Some necrotic lesions were still observed with RNA1 + RNA2 Δ p14 + RNA3 + rep5- \emptyset which are in line with Flobinus results showing that Δ p14 is only partially complemented with ncRNA3 (Flobinus *et al.*, 2016). Indeed, RNA3 enhanced viral RNA and protein accumulation (compare RNA1 + RNA2 Δ p14 + rep5-p14 - to + RNA3 **Fig.1B** and **Fig.1C**), excepted for HAp14 condition (**Fig.1B,1C** right). However, similar CP and p25 protein accumulation levels were observed for the three tagged-p14 proteins in the presence of RNA3 showing that complementation was functional (**Fig.1C**, right). More importantly, the complementation provided by Flagp14 was functional in the absence of RNA3 (**Fig.1C**, see RNA1 + RNA2 Δ p14 + rep5-Flag14).

3.2 Replicon 5 do not trigger functional complementation on *N. benthamiana*

The ability of tagged-p14 proteins to trigger a systemic infection was evaluated on *N. benthamiana* (**Fig.2**). As previously observed, RNA3 promoted viral RNAs accumulation

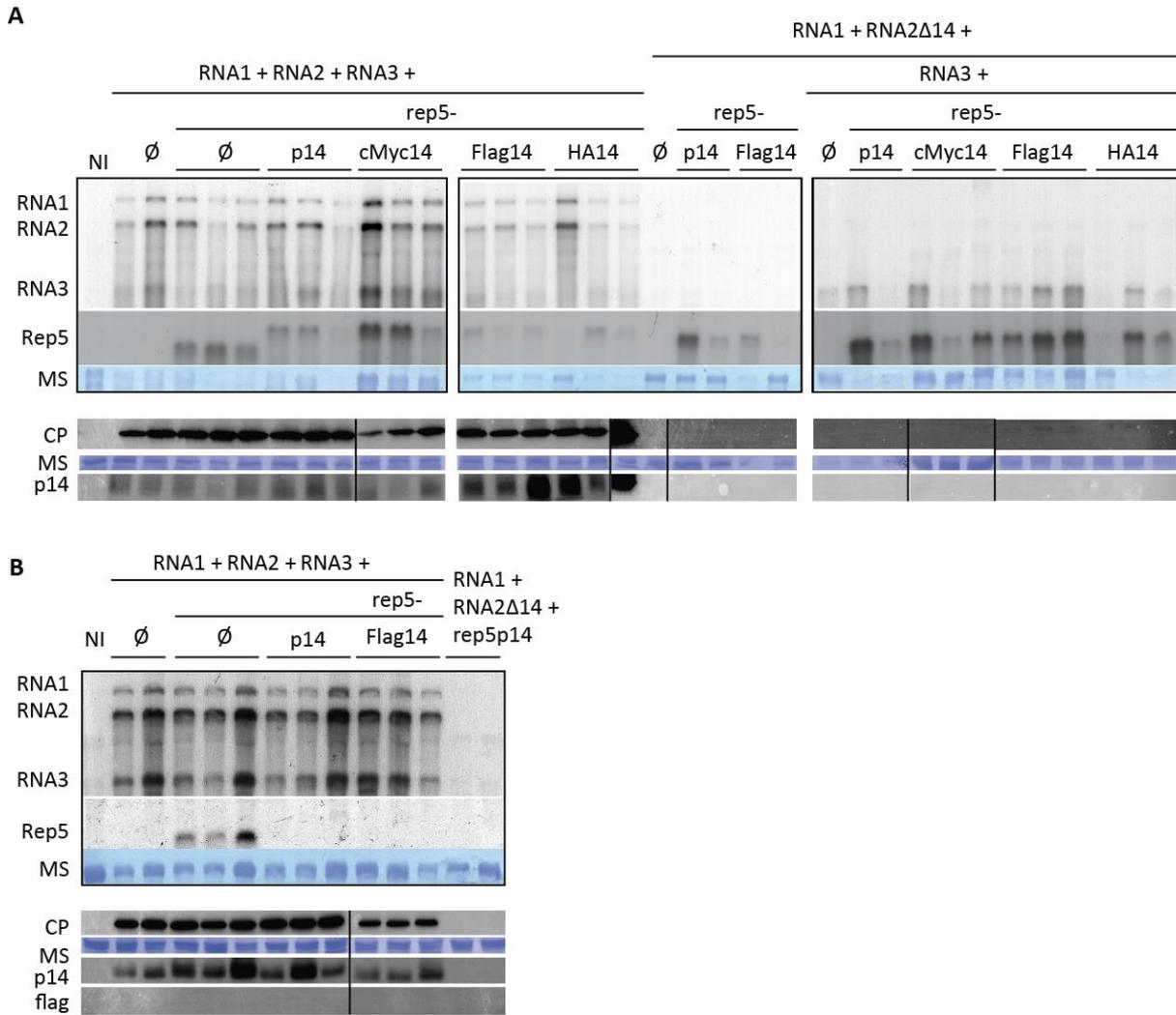


Figure 2: RNA5 vector expressing tagged-14 proteins do not allow functional complementation of an RNA2 p14 deletion mutant on *N. benthamiana*

N. benthamiana were infected with BNYVV RNA1, RNA2 or RNA2 with p14 sequence deletion (RNA2Δ14) with or without RNA3 and supplemented with empty rep5 (rep5-∅) or expressing p14 (rep5-p14) or p14 fused to cMyc tag (rep5-cMyc14), Flag tag (rep5-Flag14) or HA tag (rep5-HA14). A) Inoculated leaves and B) non-inoculated apical leaves were harvested to analyse BNYVV RNAs and proteins accumulation levels with specific probes and antibodies indicated on the left. MS, membrane staining; NI, non-infected. Vertical lines depicted on western blot correspond to a split of two distinct membranes.

(compare RNA1, RNA2 Δ p14, rep5-p14 or rep5-Flagp14 +/- RNA3) but did not allow to detect any viral proteins in inoculated leaves (**Fig.2A**). Meanwhile, we tested the transitive overexpression of mycp14, Flagp14 and HAp14 in *N. benthamiana* and only Flagp14 was detected with a tag-specific antibody. In addition to previously protein detection profiles in *C. quinoa*, we decided to focus on the Flag epitope. We therefore analysed RNA and protein accumulation in *N. benthamiana* apical leaves infected with controls empty rep5 and rep5-p14 and rep5-Flagp14 (**Fig.2B**). Even in the presence of RNA2 WT and RNA3, rep5- \emptyset was the only replicon detected in apical leaves whereas as soon as p14 sequence is encoded by the replicon, it did not move long distance. The complementation assay triggered with RNA1, RNA2 Δ p14 and rep5-p14 failed to detect any viral RNA and proteins in apical leaves (**Fig.2B**). From those experiments, we conclude that rep5 expressing p14 protein partially provided a functional complementation in *C. quinoa* but was unable to ensure viral systemic movement in *N. benthamiana*.

3.3 Expression of Flag-p14 protein though RNA2 is functional

We then decided to replace the p14 sequence by the Flagp14 sequence in RNA2 and four RNA2:Flagp14 clones were obtained (#2, #5, #7 and #9). Following transcription, those transcripts were co-inoculated on *C. quinoa* with RNA1 and RNA3 to evaluate the functionality of those constructions (**Fig.3**). The quantity and the chlorotic phenotype of the local lesions observed on *C. quinoa* were identical to those observed with RNA2 WT suggesting that Flagp14 expressed in its nucleotidic context was functional (**Fig.3A**). In those local lesions, viral RNAs and proteins accumulated at similar levels in the presence of RNA2 WT or RNA2:Flagp14, despite we can observe that p14 seems preferentially accumulating with RNA2 WT (**Fig.3B**). In *N. benthamiana*, all plants infected with RNA1, RNA2:Flagp14 and RNA3 were symptomatic (data not shown) and molecular analysis of the apical leaves confirmed that Flagp14 ensure the systemic viral infection (**Fig.3C**). While the CP protein accumulated at similar levels with RNA2 WT or RNA2:Flagp14, Flagp14 was specifically detected with anti-Flag antibody but remained less expressed than p14 when detected with anti-p14 antibody. However, Flagp14 expression was sufficient to maintain its VSR activity and fulfil systemic infection. RT-PCR were performed on total RNA extracted from *N. benthamiana* apical leaves to make sure that the Flag sequence had been kept by the virus progeny (**Fig.3C**). Moreover, infections were carried out without RNA3 on *C. quinoa* and *N. benthamiana*. Under those conditions, Flagp14

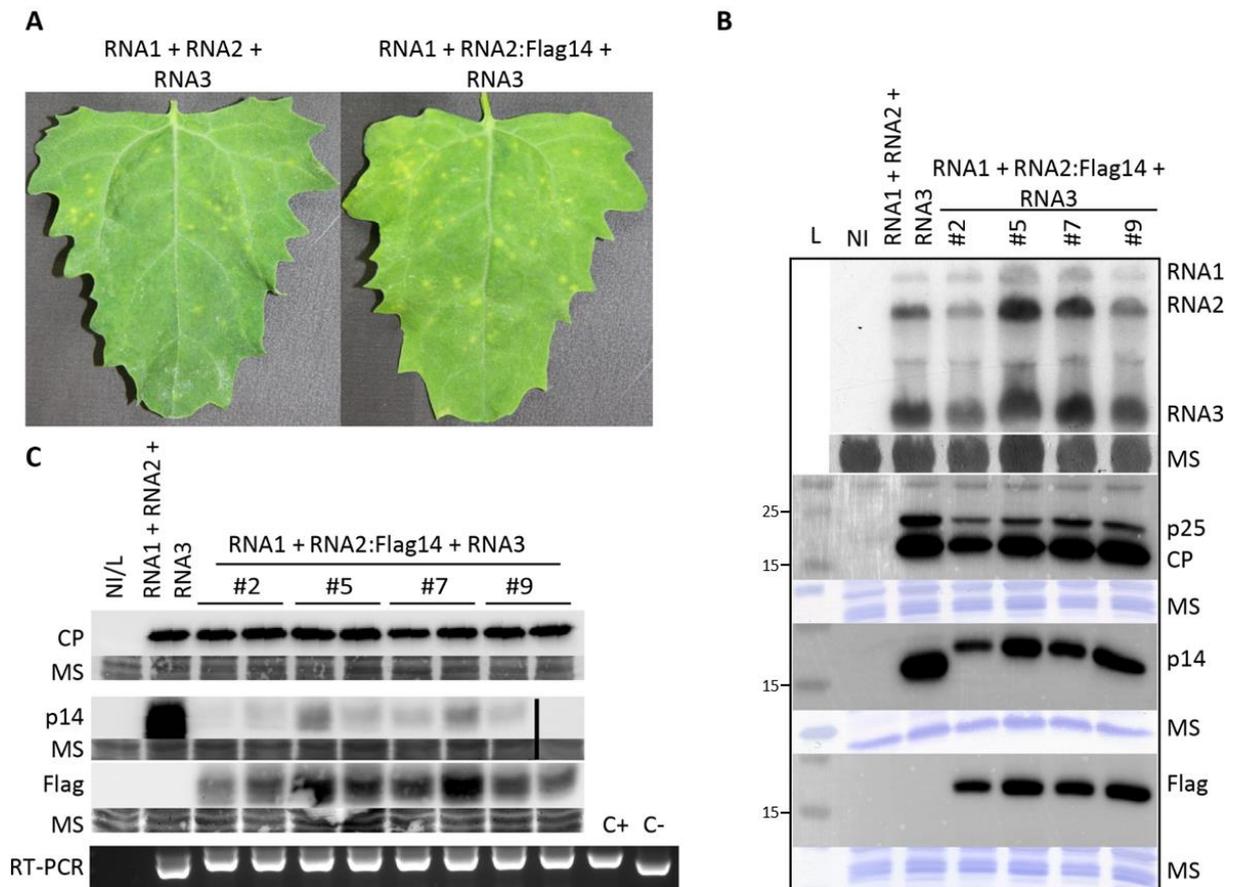


Figure 3: Substitution of p14 by Flagp14 sequence in the RNA2 allow the production of functional infectious clones triggering long distance movement on *N. benthamiana*

Local lesions phenotype (A) and molecular analysis (B) of *C. quinoa* infected with RNA1, RNA2 or RNA2 expressing Flagp14 (RNA2:Flag14) and RNA3. Total RNAs and proteins extracted from local lesions were analysed by northern blot and western blot respectively. BNYVV specific probes and antibodies used for immunodetection are indicated on the right. Some ladder molecular weights (kDa) are indicated in B). C) *N. benthamiana* apical leaves were harvested three-weeks after inoculation with BNYVV RNA1, RNA2 or RNA2 expressing Flagp14 (RNA2:Flag14) and RNA3. Proteins were analysed by western blot using antibodies specific to CP and p14 proteins and Flag epitope. RT-PCR was performed on total RNA extracted from *N. benthamiana* apical leaves using oligos encompassing (Flag)p14 sequences. RNA2:Flagp14 and RNA2 cDNA were used as positive (C+) and negative (C-) controls respectively. MS, membrane staining; NI, non-infected; L, ladder. Vertical line depicted on western blot corresponds to a split of two distinct membranes.

expressed by RNA2 still ensured viral long distance movement, confirming the entire functionality of this construction even in the absence of RNA3 (data not shown). Combined with sequencing results, we decided to work with the RNA2:Flagp14 clone #7. Altogether, those results clearly established that RNA2:Flagp14 was a functional construction able to express Flagp14 protein that could be used for immunoprecipitation.

3.4 *Flagp14 immunoprecipitation during BNYVV infection on N. benthamiana*

As RNA3 is critical for natural host infection and hypomorphic p14 complementation in *N. benthamiana* (Flobinus et al., 2016), we decided to perform immunoprecipitations (IP) against the Flag epitope on *N. benthamiana* apical leaves, infected with RNA1 and RNA3, supplemented with RNA2 WT (123 as a control) or RNA2:Flagp14 (12:Fp143). For a first trial, a standard lysis buffer was employed (50 mM Tris-HCl (pH 8); 50 mM NaCl; antiprotease) where two Triton™ concentrations (0.1 % vs. 1 %) were tested. Input, flowthrough and eluted fractions were analysed by western blot to validate IP method (**Fig.4A**). For RNA1, RNA2 and RNA3 controls, p14 signals were observed in the input fractions and for 0.1 % Triton, the majority was lost in the flowthrough. In the presence of 1 % Triton, only weak signals were detected in the flowthrough and elution fractions and we cannot explain where p14 could have been lost before IP column loading (**Fig.4A**). For RNA2 expressing Flagp14 (12:Fp143), samples were analysed on commercial precast gradient polyacrylamide gel with @Flag antibody. As observed in **Fig.4B**, Flag immunoprecipitation gave similar results in the presence of 0.1 % or 1 % Triton. A small amount of Flagp14 was lost in the flowthrough and elution fractions were enriched in Flagp14 protein compared to levels detected in the input. Flagp14 was detected as monomers between 15 and 25 kDa, dimers and in higher molecular weight complexes. We decided to analyse Flagp14 potential associated partners by mass spectrometry (**Fig.4C**). A similar number of total proteins were immunoprecipitated in the RNA2 control and RNA2 expressing Flagp14 conditions (**Fig.4C**, upper panel). Despite those total proteins being quite abundant (1100 to 1800), only a tiny fraction of them were specifically associated with Flagp14 (**Fig.4C**, middle panel). As an example, the first top hit protein associated with Flagp14 (50S ribosomal protein L21) was found with only 6 and 5 peptides in 0.1 % and 1 % Triton respectively. Moreover, the abundance of capsid peptides found in all samples (from 134 to 285) was striking, whereas the number of p14 peptides was rather low (from 9 to 27) (**Fig.4C**, lower panel). We then speculated that viral particles could

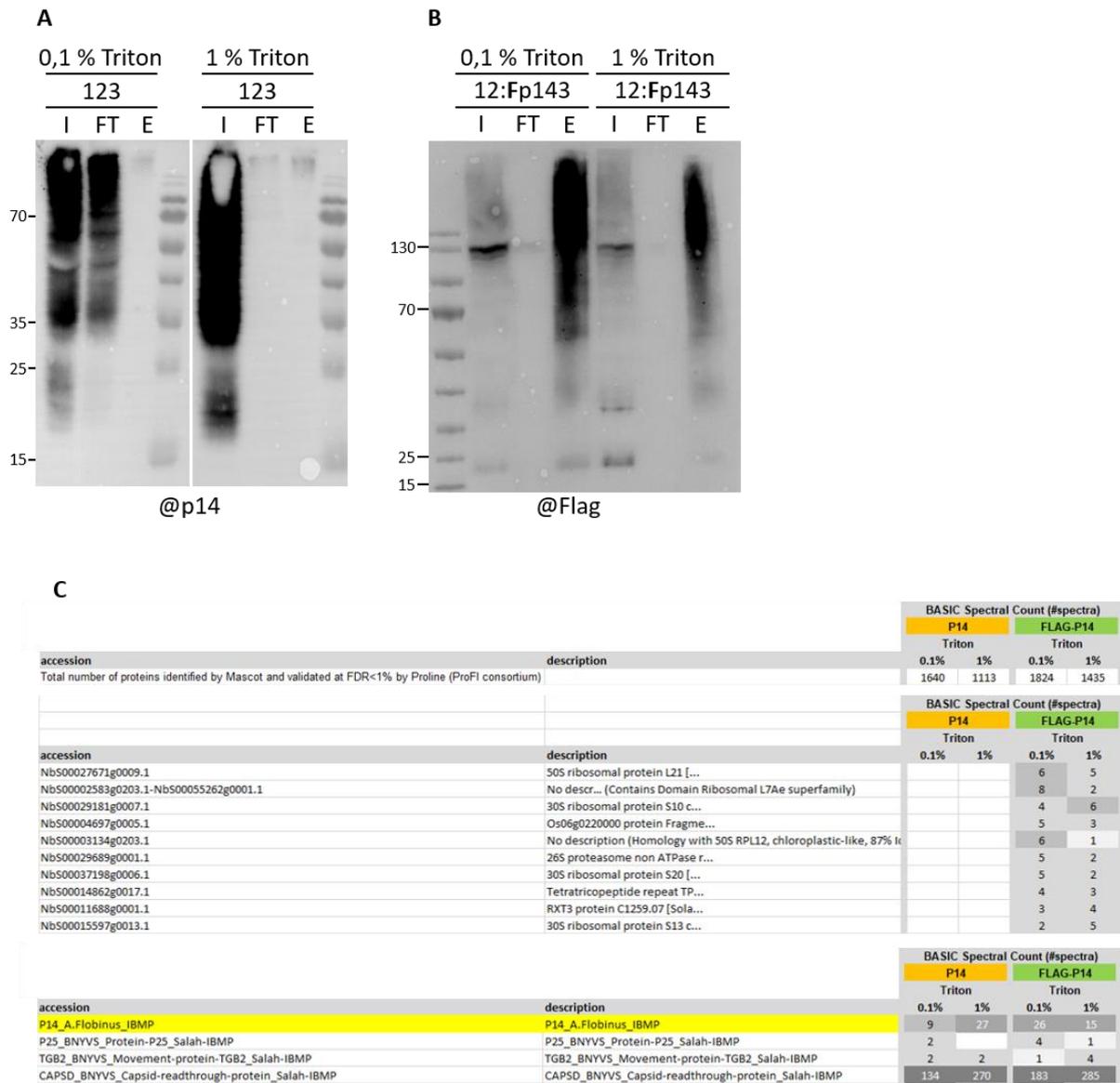


Figure 4: Flag immunoprecipitation performed on infected *Nicotiana benthamiana* according to detergent concentration and analysis by mass spectrometry

Nicotiana benthamiana were infected with BNYVV RNA1, RNA2 WT or RNA2:Flagp14 and RNA3. Apical leaves were harvested and grinded in lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8); 50 mM NaCl; antiprotease) with 0.1 % or 1 % Triton™. Input (I), flowthrough (FT) and elution (E) fractions were analysed on 12.5 % resolving (A) or on precast gradient (B) SDS-PAGE and immunodetection performed with anti-p14 and anti-Flag antibodies respectively. Some ladder molecular weights (kDa) are indicated. C) Total number of proteins (upper panel), potential associated p14 proteins (middle panel) and BNYVV proteins (lower panel) identified by mass spectrometry following Flag-immunoprecipitation performed on infected *N. benthamiana*. Infections were triggered by RNA1 and RNA2 expressing WT p14 (orange columns, p14) or by RNA1 and RNA2 expressing Flagp14 (green columns, Flag-P14).

saturate the column during the loading sample and that elution with a pre-warmed Laemmli buffer was sufficient to disrupt a part of viral particles and proteins associated with them. This would explain (i) the high amount of CP proteins found in the four IP, (ii) the small amount of proteins specifically associated with Flagp14 and (iii) the similar number of p14 peptides detected under control conditions (9 and 27 peptides with RNA2 WT) and RNA2 expressing Flagp14 (26 and 15 peptides with RNA2:Flagp14).

3.5 Optimization of immunoprecipitations performed under viral context

Following those results, we decided to improve the IP conditions. Evidences are accumulating in favour of a BNYVV long distance movement triggered by ribonucleoprotein complex (RNP) instead of viral particles. We then thought that p14 could be associated with RNA in those high molecular weight complexes observed in western blot. *N benthamiana* previously infected with RNA1, RNA2 and RNA3 were harvested and plant samples grinded in a lysis buffer. This crude extract was submitted to different treatments to eliminate potential RNAs (RNase and alkaline hydrolysis) and then analysed by p14 immunodetection. As shown in **Fig.5A**, p14 antibody recognized RNase A enzyme and high molecular weight complexes were detected in all conditions, demonstrating that those complexes may not be scaffold by RNA. We then tried to optimize the buffer composition. P14 is a cysteine-rich protein (CRP), which seems functional as a dimer. We then tested buffer pH ranging from 7 to 9, with the addition of DTT to a final concentration of 1 mM (**Fig.5B**). Plants infected with RNA1, RNA2:Flagp14 and RNA3 were grinded in those different buffers, treated as IP input samples, and then a fraction was analysed by western blot. At pH 7 in the presence of DTT, p14 was highly accumulating as a monomer and lower amounts of p14 were detected in high molecular weight complexes. At pH 8, which corresponds to p14 isoelectric point (pI), p14 was detected as a monomer but also highly accumulated at higher molecular weight, with and without DTT. At pH 9, p14 detection was similar to that observed at pH 7 but the benefit provided by the DTT treatment was less obvious.

We then decided to test an IP with a lysis buffer at pH 7 and containing 1 mM DTT. To anticipate a differential analysis in the absence and in the presence of BNYVV RNA3, we performed IP on *N. benthamiana* apical leaves infected with RNA1, RNA2 WT or RNA2:Flagp14 and supplemented or not with RNA3 (**Fig.5C**). p14 was detected with anti-p14 antibody in the input and the flowthrough fractions of control samples (12 and 123), whereas no signal was

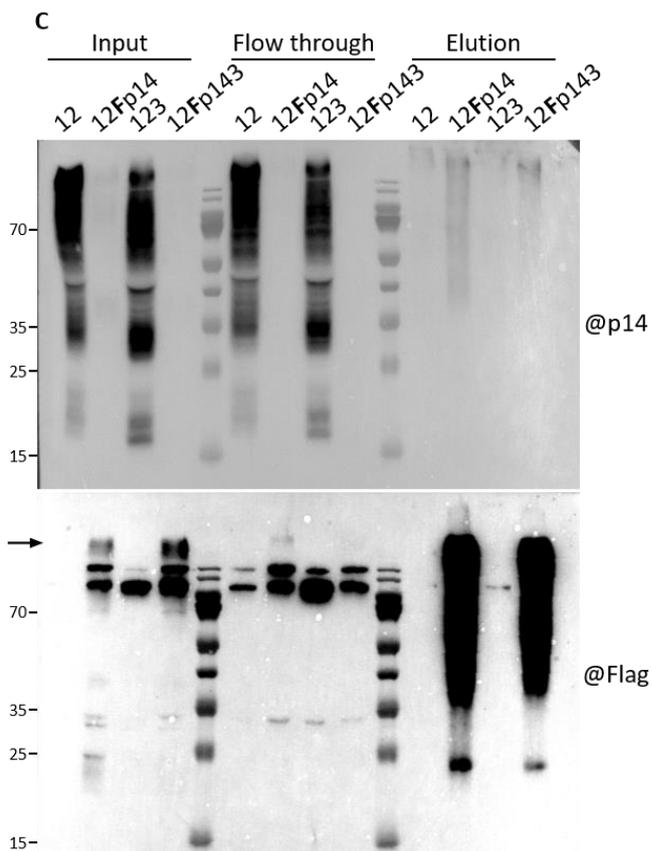
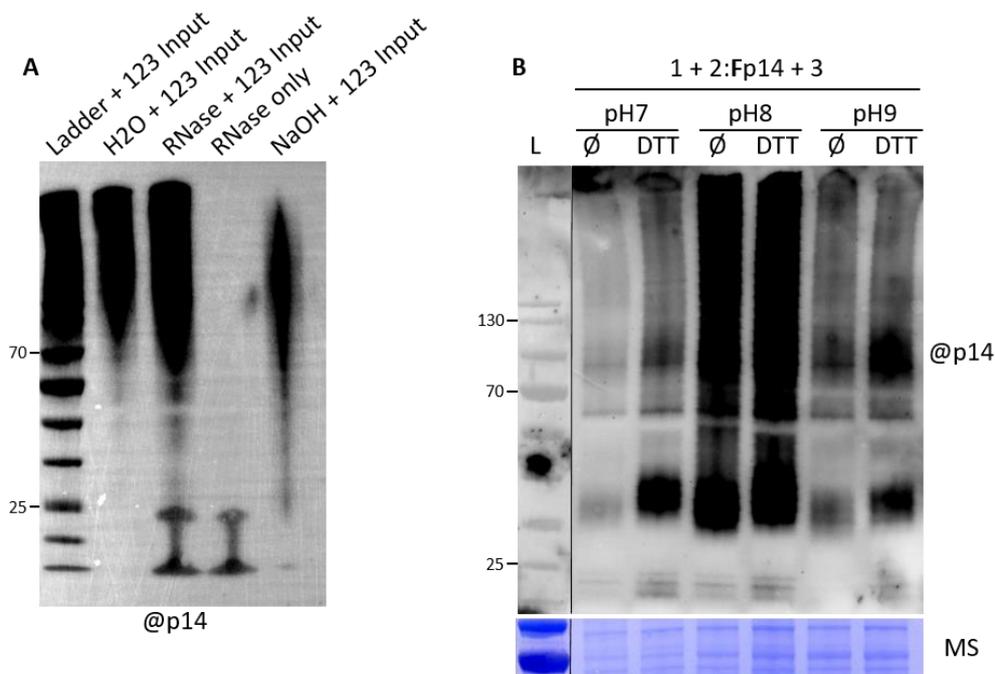


Figure 5: Optimization of Flagp14 immunoprecipitation performed on infected *Nicotiana benthamiana*

A) A crude extract of *Nicotiana benthamiana* plant sample previously infected with RNA1, RNA2 and RNA3 was submitted to RNase A (5 µg) and alkaline hydrolysis (NaOH 1 M final) treatments to eliminate potential associated RNAs. Samples were analysed on precast gradient gel followed by western blot using anti-p14 antibody. B) *Nicotiana benthamiana* were infected with BNYVV RNA1, RNA2:Flagp14 and RNA3 and apical leaves were harvested and grinded in different lysis buffers. The benefit of a reducing agent was evaluated with the addition of 1 mM dithiothreitol (DTT) and pH ranging from 7 to 9 were tested. Those samples were treated as input fractions and analysed by p14 immunodetection by western blot. C) *Nicotiana benthamiana* were infected with BNYVV RNA1, RNA2 WT or

RNA2:Flagp14 alone or in the presence of RNA3. Apical leaves were harvested and grinded in lysis buffer at pH 7 and containing 1 mM DTT. Anti-Flag immunoprecipitations were performed and input, flowthrough and elution fractions analysed by western blot with specific anti-p14 and anti-Flag antibodies. MS, membrane staining. Some molecular weight (kDa) of the ladder (L) are indicated. Arrow shows high molecular weight complexes containing Flagp14 proteins.

obtained on eluted fractions. With Flag antibody, two non-specific strips appeared in the input and flowthrough fractions whereas specific signals were obtained in Flagp14-expressing input samples (**Fig.5C**, see arrow on @Flag western blot). In elution fractions, Flagp14 was strongly detected, indicating that eluted samples were indeed enriched with Flagp14 protein. This is reminiscent of what we previously observed in *N. benthamiana* in **Fig.3C** where Flagp14 was easily and hardly detected with anti-Flag and anti-p14 antibodies respectively. Monomeric p14 and high molecular weight complexes were both observed in eluted Flagp14 samples showing that buffer optimization is not enough to improve Flagp14 IP.

3.6 *BNYVV viral particles removal*

It has been previously shown that the readthrough protein CP-RT is essential for viral particles formation (Schmitt et al., 1992). Two supplemental stop codons were added after the amber suppressive stop codon at the CP/RT junction. This RNA2-triple stop (RNA2:TS) clone was supposed to prevent the minor capsid protein CP-RT and viral particles synthesis. Flagp14 and Flagp14BA2, expressing a hypomorphic version of the p14, sequences were replaced in the RNA2:TS backbone to create RNA2:TS:Flagp14 and RNA2:TS:Flagp14BA2. To test their infectivity, *C. quinoa* were infected with RNA1, RNA2:TS:Flagp14 or RNA2:TS:Flagp14BA2 supplemented with RNA3 or not and local lesions were harvested for CP(-RT) protein detection. As observed in **Fig.6A**, triple stop (TS) mutations indeed prevented readthrough CP-RT protein translation without affecting CP major capsid protein accumulation levels. We then verified by electronic microscopy that viral particles formation was indeed impaired in those triple stop mutants (**Fig.6B**). Surprisingly, viral particles were observed with RNA2 and RNA2 triple stop expressing Flagp14 or Flagp14BA2. Viral particles were however more difficult to detect with RNA2:TS:Flagp14BA2 and corroborates with western blot results where viral infection was weakly detected with anti-CP antibody (**Fig.6A**). As our RNA2:triple stop constructs did not prevent viral particles formation, we tried to remove them from infected tissues before the IP. For this purpose, *N. benthamiana* infected with RNA1, RNA2 WT or RNA2:Flagp14 and RNA3 were grinded in lysis buffer as usual. Samples were split into two fractions where one was filtered in 100 kDa cut-off column before the first centrifugation step and the other represented the non-filtered control condition. Immunoprecipitations were performed as previously on non-filtered and filtered fractions and were analysed by western blot (**Fig.6C**). With RNA2 WT and no filtration process (\emptyset), p14 signal was detected both in the

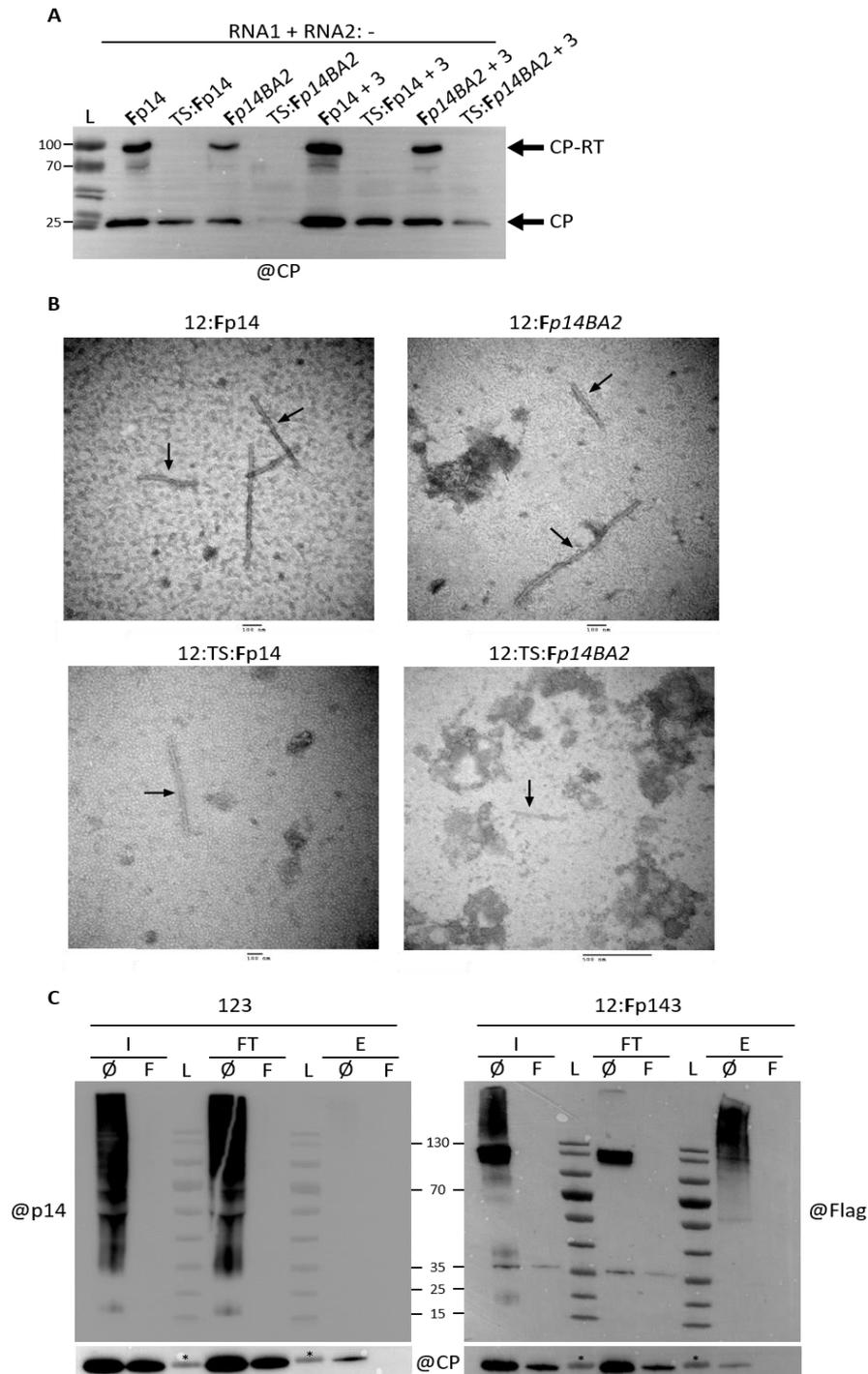


Figure 6: Preventing BNYVV viral particles from accumulating is not a suitable strategy for Flagp14 immunoprecipitations

A) *Chenopodium quinoa* were infected with RNA1, RNA2:Flagp14 (Fp14) or RNA2:TS:Flagp14 (TS:Fp14) or expressing the hypomorphic *p14BA2* version (Fp14BA2 and TS:Fp14BA2), and supplemented or not with RNA3. Local lesions were analysed by western blot with anti-CP antibody. B) *C. quinoa* local lesions were grinded in phosphate buffer and extract observed on an electronic microscope to verify the presence of viral particles, depicted by black arrows. C) *Nicotiana benthamiana* were infected with BNYVV RNA1, RNA2 WT or RNA2:Flagp14 in the presence of RNA3. Apical leaves crude extracts were submitted to 100 kDa cut-off filtration with an exclusion column (filtered fraction, (F) or not (non-filtered fraction, ∅). Anti-Flag immunoprecipitations were performed and input (I), flowthrough (FT) and elution (E) fractions analysed by western blot with specific anti-p14, anti-Flag and anti-CP antibodies. Some ladder molecular weights (kDa) are indicated. Asterisks on CP western blot correspond to the ladder 25 kDa protein. L, ladder.

input and the flowthrough fractions whereas signal detection was abolished in the filtered sample (F). For the IP performed with RNA2:Flagp14, Flagp14 was immunoprecipitated in high molecular weight complexes and as with RNA2 WT, filtration prevented Flagp14 detection in any fraction. Besides, we observed that filtration did not prevent the coat protein (CP) of 21 kDa from accumulating even if a slight decrease was observed in filtered fractions, especially with RNA2:Flagp14 (**Fig.6C**). We observed an identical CP detection profile with RNA1, RNA2 and RNA3 and RNA1, RNA2:Flagp14 and RNA3, suggesting that CP does not specifically interact with p14. The stringency of the filtration prevented p14 and Flag14 from accumulating and does not represent a judicious strategy in our optimization process.

Meanwhile, the protein DRB4 from *N. benthamiana* (NbDRB4) has been identified as a p14 potential partner by immunoprecipitation followed by mass spectroscopy performed on *N. benthamiana* agroinfiltrated leaves transiently expressing Flagp14. More precisely, we showed that p14 is excluded from the nucleolus when NbDRB4 is expressed and that both proteins transiently and/or weakly interact. We then focused on the *p14BA2* hypomorphic mutant that is unable to fulfil a systemic infection on *N. benthamiana* with RNA1 and RNA2 only, but is partially complemented by the ncRNA3. We showed that this mutant colocalizes and interacts with NbDRB4 in the nucleolus and that this interaction is specifically disrupted by the accumulation of the ncRNA3 in the nucleus.

3.7 *Is N. benthamiana DRB4 protein involved in the BNYVV viral cycle?*

The effect of NbDRB4 protein on a BNYVV infection has been investigated through a VIGS approach. The PDS as a control and NbDRB4 expression were knocked down and plants infected with several BNYVV RNA combinations, *i.e.* RNA1 and RNA2 encoding p14 WT or *p14BA2* mutant. Surprisingly, PDS-silenced plants infected with RNA1 and RNA2 were asymptomatic and protein detection by western blot confirmed the absence of viral infection. As PDS silencing gave rise to plant dwarfism and probably metabolic variations, they may not be as susceptible to BNYVV infection as non photobleached plants. However, such BNYVV infection has already been detected in PDS silenced plants (Flobinus et al., 2018) and we cannot explain why we didn't succeed with BNYVV infection. We therefore used another VIGS control consisting of the silencing of the GFP in 16C transgenic *N. benthamiana* plants. To complete our previous inoculation conditions and in order to investigate the effect of the ncRNA3 under NbDRB4 silencing, RNA3 WT (accumulating ncRNA3) and RNA3E (ncRNA3

Table 1 : BNYVV symptoms observation on GFP and NbDRB4 silenced *N. benthamiana* plants
 + and - respectively means presence and absence of BNYVV symptoms

	16C VIGS GFP	WT VIGS NbDRB4
1+2	+	+
1+2+3	+	+
1+2+3E	+	+
1+2BA2	-	-
1+2BA2+3	-	-
1+2BA2+3E	-	-

unable to accumulate) were added to the inocula. Three-weeks post-infection, all plants infected with WT BNYVV displayed typical BNYVV symptoms (curling and stunting leaves), whereas all plants infected with BNYVV *p14BA2* harboured a healthy phenotype, both independently of GFP and NbDRB4 silencing (**Table 1**). It therefore seems that NbDRB4 silencing does not promote or restrict BNYVV infection. Apical leaves were harvested for RNA and protein extractions in order to ensure the sustainability of GFP and NbDRB4 silencing and to compare viral infection levels. Those molecular experiments are still ongoing.

3.8 Complementation assay with *N. benthamiana* DRB4 protein

As DRB4 from *A. thaliana* is involved in both antiviral defense and endogenous trans-acting siRNA (tasiRNA) biogenesis (Adenot et al., 2006; Jakubiec et al., 2012; Nakazawa et al., 2007; Qu et al., 2008), we wanted to test if NbDRB4 could complement AtDRB4. For this purpose, Col0, *drb4*, and also supplemental lines as *dcl3*, *drb4/drb7* and *dcl4* were transformed to express NbDRB4-tRFP. Surprisingly, some lines exhibited unexpected phenotypes: all *dcl4* and Col0 plants expressing NbDRB4-tRFP died and displayed a growth delay respectively. The other lines did not seem to be affected by the expression of NbDRB4-tRFP. Plants from the F2 generation are now under experiments. In the transgenic lines expressing NbDRB4-tRFP as verified by western blot, trans-acting siRNA accumulation will be analysed to determine their ability to complement Arabidopsis *drb4* mutant.

4 Conclusions and perspectives

Those experiments were performed in order to identify p14 associated factor's during BNYVV infection. First, we took advantage of the BNYVV replicon 5 to express tagged versions of the p14 protein. While they were functional in *C. quinoa*, those rep5 constructs did not move at long distance in *N. benthamiana*. Surprisingly, rep5- \emptyset or rep5-eGFP (Schmidlin et al., 2005) are detected in apical leaves under the same experimental conditions. It therefore seems that the p14 sequence encoded by the replicon prevents its systemic movement. This supplementary sequence encoded by the replicon may disturb RNA-RNA interactions and impair the formation of viral RNP that are supposed to be involved in the virus long distance movement. As an alternative strategy, we inserted in the RNA2 a tag sequence at the p14 5' extremity as C-ter extensions raised non-functional proteins. Expressed under viral context, Flag-p14 fusion protein was functional in *C. quinoa* and *N. benthamiana*. Immunoprecipitations of Flag-p14 have been undertaken. Unfortunately, under the

conditions tested, results obtained following mass spectrometry were unemployable. Despite several trials being performed to optimize buffer conditions and avoid viral particles, identification of p14 partners under viral infection remains unsuccessful.

Outlooks are exposed in the last part of this manuscript where the importance to study and transpose to the viral context is discussed. Some elements such as VIGS and *A. thaliana* complementation lines are already presented here. Those experiments are closer to viral context conditions than to ectopic expression and their analyses are not yet finished and so, cannot be embedded in the draft paper already.

5 References

Adenot, X., Elmayan, T., Laressergues, 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.

Andika, I.B., Kondo, H., and Tamada, T. (2005). Evidence That RNA Silencing-Mediated Resistance to Beet necrotic yellow vein virus Is Less Effective in Roots Than in Leaves. *Mol. Plant-Microbe Interact.* *18*, 194–204.

Chiba, S., Hleibieh, K., Delbianco, A., Klein, E., Ratti, C., Ziegler-Graff, V., Bouzoubaa, S., and Gilmer, D. (2013). The benyvirus RNA silencing suppressor is essential for long-distance movement, requires both zinc-finger and NoLS basic residues but not a nucleolar localization for its silencing-suppression activity. *Mol Plant Microbe Interact* *26*, 168–181.

Flobinus, A., Hleibieh, K., Klein, E., Ratti, C., Bouzoubaa, S., and Gilmer, D. (2016). A Viral Noncoding RNA Complements a Weakened Viral RNA Silencing Suppressor and Promotes Efficient Systemic Host Infection. *Viruses* *8*.

Flobinus, A., Chevigny, N., Charley, P.A., Seissler, T., Klein, E., Bleykasten-Grosshans, C., Ratti, C., Bouzoubaa, S., Wilusz, J., and Gilmer, D. (2018). Beet Necrotic Yellow Vein Virus Noncoding RNA Production Depends on a 5'→3' Xrn Exoribonuclease Activity. *Viruses* *10*.

Gilmer, D., Bouzoubaa, S., Hehn, A., Guilley, H., Richards, K., and Jonard, G. (1992). Efficient cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus requires 3' proximal genes located on RNA 2. *Virology* *189*, 40–47.

Gilmer, D., Ratti, C., and Consortium, I.R. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Benyviridae. *J. Gen. Virol.* *98*, 1571–1572.

Hehn, A., Fritsch, C., Richards, K.E., Guilley, H., and Jonard, G. (1997). Evidence for in vitro and in vivo autocatalytic processing of the primary translation product of beet necrotic yellow vein virus RNA 1 by a papain-like proteinase. *Arch. Virol.* *142*, 1051–1058.

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.

Lauber, E., Guilley, H., Tamada, T., Richards, K.E., and Jonard, G. (1998). Vascular movement of beet necrotic yellow vein virus in *Beta macrocarpa* is probably dependent on an RNA 3 sequence domain rather than a gene product. *J. Gen. Virol.* *79*, 385–393.

- 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.
- Ouillet, L., Guilley, H., Jonard, G., and Richards, K. (1989). In vitro synthesis of biologically active beet necrotic yellow vein virus RNA. *Virology* *172*, 293–301.
- Peltier, C., Klein, E., Hleibieh, K., D'Alonzo, M., Hammann, P., Bouzoubaa, S., Ratti, C., and Gilmer, D. (2012). Beet necrotic yellow vein virus subgenomic RNA3 is a cleavage product leading to stable non-coding RNA required for long-distance movement. *J Gen Virol* *93*, 1093–1102.
- Qu, F., Ye, X., and Morris, T.J. (2008). Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 14732–14737.
- Schmidlin, L., Link, D., Mutterer, J., Guilley, H., and Gilmer, D. (2005). Use of a Beet necrotic yellow vein virus RNA-5-derived replicon as a new tool for gene expression. *J Gen Virol* *86*, 463–467.
- Schmitt, C., Balmori, E., Jonard, G., Richards, K.E., and Guilley, H. (1992). In vitro mutagenesis of biologically active transcripts of beet necrotic yellow vein virus RNA 2: evidence that a domain of the 75-kDa readthrough protein is important for efficient virus assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *89*, 5715–5719.
- Tamada, T., and Kusume, T. (1991). Evidence that the 75K readthrough protein of beet necrotic yellow vein virus RNA-2 is essential for transmission by the fungus *Polymyxa betae*. *J. Gen. Virol.* *72*, 1497–1504.
- Tamada, T., Shirako, Y., Abe, H., Saito, M., Kiguchi, T., and Harada, T. (1989). Production and Pathogenicity of Isolates of Beet Necrotic Yellow Vein Virus with Different Numbers of RNA Components. *J. Gen. Virol.* *70*, 3399–3409.

3.2. Lucie Bellott¹, Kamal Hleibieh¹, Philippe Hammann², Johana Chicher², Fabrice Michel^{1, *} and David Gilmer^{1, *}. Viral RNA silencing suppressor and DCL4-associated DRB4 protein interaction is modulated by a viral long non coding-RNA

Viral RNA silencing suppressor and DCL4-associated DRB4 protein interaction is modulated by a viral long non coding-RNA

Lucie Bellott¹, Kamal Hleibieh¹, Philippe Hammann², Johana Chicher², Fabrice Michel^{1,*} and David Gilmer^{1,*}

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

² Institut de biologie moléculaire et cellulaire, CNRS, Université de Strasbourg, Strasbourg, France

* Correspondance : david.gilmer@ibmp-cnrs.unistra.fr - fabrice.michel@ibmp-cnrs.unistra.fr

Abstract

BNYVV is a multipartite virus, composed of four to five single-stranded RNAs. RNA1 and RNA2 are necessary and sufficient to trigger an infection while on natural host *Beta* species, RNA3 remains mandatory to trigger the viral long distance movement thanks to the Coremin motif responsible for the non-coding RNA3 accumulation (ncRNA3). Systemic movement also requires the p14 protein, the viral silencing suppressor (VSR) encoded by RNA2. Interestingly, a hypomorphic p14 mutant (*p14BA2*), unable to trigger long-distance infection, is complemented by ncRNA3 accumulation. Here, we show that this mutant specifically interacts with DRB4 from *N. benthamiana* (NbDRB4) in nucleoli. This protein is the DCL4 cofactor described in *A. thaliana* silencing pathways. The *p14BA2* and NbDRB4 interaction is disrupted by ncRNA3 accumulation, that specifically accumulated in the nucleus whereas genomic RNA3 remains cytoplasmic. Both proteins display RNA binding properties and ncRNA3 may induce the dissociation of proteins interaction. Our results indicate that a specific viral RNA is targeted to nucleus and may participate to silencing suppression function through destabilisation of p14-DRB4 complex in *Beta*.

1. Introduction

RNA interference (RNAi) plays a pivotal function for most eukaryotic organisms. It controls development, stress responses and genomic integrity. It is also responsible for antiviral defense, particularly in plants. Among the many gene products involved in RNAi, the proteins of the Dicer family are responsible for small RNAs biogenesis such as microRNAs (miRNAs) and small interfering RNAs (siRNAs). *Arabidopsis thaliana* expresses four Dicer-like proteins (DCL) to regulate transcriptional and post-transcriptional gene expression. DCL1 is mainly involved in miRNA synthesis (Kurihara and Watanabe, 2004) and DCL3 controls endogenous small RNA biogenesis (Singh et al., 2019) while transacting-siRNA (tasiRNA) are generated by DCL4 (Nakazawa et al., 2007). Within a classical antiviral defense ensured by DCL4 and DCL2 (Bouché et al., 2006), viral siRNAs (vsiRNAs) are incorporated into an Argonaute (AGO) protein where one strand of the duplex is selected to target a complementary sequence. In most cases, viral RNAs are cleaved by AGO slicing activity. In plants, those cleavage products serve as template by RNA polymerase RNA dependant, mainly RDR6, to ensure *de novo* double-stranded RNA (dsRNA) synthesis. These dsRNAs are further cleaved by DCL2/4 to produce secondary vsiRNAs and to amplify the RNA silencing signal within a process named transitivity.

The dicing of dsRNA needs the complex formation between a DCL protein and its cognate dsRNA binding protein (DRB). Seven DRB are expressed in *A. thaliana*, ranging from DRB1 to DRB5 and DRB7 (DRB7.1 and DRB7.2). Among them, DRB1-DCL1 is certainly the best

characterized complex where DRB1 is mandatory for an accurate processing (Dong et al., 2008) and participates in RNA-induced silencing complex (RISC) formation (Eamens et al., 2009). DRB2, DRB3 and DRB5 seem to act in a non-canonical miRNA biogenesis pathway (Eamens et al., 2012) but their precise mechanisms are still elusive. Moreover, DRB3 has been associated with anti geminivirus activity (Raja et al., 2008) and an expanded antiviral function is attributed to DRB2 (Barton et al., 2017; Incarbone et al., 2020). Recently, a new class of endogenous inverted-repeat sRNA involving DRB7 protein has been discovered (Montavon et al., 2017). Last, DRB4 is essential for DCL4 dicing activity *in vitro* and *in vivo* (Fukudome et al., 2011; Nakazawa et al., 2007) and is crucial for plant antiviral defense pathway (Haas et al., 2008; Jakubiec et al., 2012; Qu et al., 2008). In response to RNA silencing activation, phytoviruses counterattack by producing viral suppressors (VSRs) that inhibit various stages of this defense mechanism.

The *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) belongs to the *Benyviridae* family. This multipartite virus possesses up to five positive-sense single-stranded RNAs. RNA1 encodes a polyprotein involved in the replication, while RNA2 ensures the expression of structural, cell-to-cell movement and the viral suppressor of RNA silencing, namely p14. While *Arabidopsis thaliana* is not a host for BNYVV, RNA1 and RNA2 are necessary and sufficient to trigger a viral infection on some model plants such as *Nicotiana benthamiana*. In natural conditions, RNA4 is necessary for viral transmission (Rahim et al., 2007). On *Beta* species hosts, RNA3 is mandatory to fulfil a systemic infection (Lauber et al., 1998) thanks to its processing that stalls the exoribonuclease XRN4 on the Coremin sequence to ensure subsequent non-coding RNA3 (ncRNA3) accumulation (Flobinus et al., 2018). The p14 VSR, Coremin motif and ncRNA3 are absolutely required for *Beta* species systemic infection, (Peltier et al., 2012). While *p14BA2* hypomorphic viral mutant is unable to allow long distance movement of the virus, its systemic movement is however possible in the presence of an effective production of ncRNA3. This is of particular interest because this mimics the infection of BNYVV natural hosts that requires RNA3 to ensure viral long-distance movement. Furthermore, the *p14BA2* systemic movement is also possible when the infection is performed on RDR6i *N. benthamiana*, indicating that transitivity restricts viral infection in accordance with the strong reduction of secondary siRNA accumulation by p14 VSR.

Therefore, to further study the function of this BNYVV VSR, we used an immunoprecipitation coupled to mass spectrometry approach to identify p14 potential partners. Among one of them, we identified the cellular protein DRB4 involved with DCL4 in plant antiviral defense. While we were not able to reproduce a p14-DRB4 initial coIP, we showed that DRB4 expression affected the p14 protein subcellular localization while a stable DRB4-*p14BA2* interaction was found and sensitive to ncRNA3 accumulation.

2. Materials and Methods

2.1 Isolated Genes

DRB4 (accession number: Niben101Scf06376g01010) and fibrillarlin (accession number: AM269909) genes were isolated by RT-PCR with oligo(dT) from healthy *N. benthamiana* using PCR primers ForDRB4: 5'AAAGAATTCGCAATGGCAGAAGCAAATTCT3' and RevDRB4: 5'AAAGTCGACATCTCACTGCGCCACCGAGCA3' and ForFib: 5'AAAGAATTCGCAATGGTTGCACCAACTAGAGGT3' and RevFib: 5'AAAGTCGACATCCTAGGCAGCAGCCTTCTGCTTCTT3'.

2.2 Plasmids, cloning strategies and in vitro transcription

Linearized plasmids containing cDNA copies of RNA1, RNA2 (wild-type (WT) or expressing hypomorphic mutant *p14BA2*), RNA3 and RNA3E were used for *in vitro* transcription as described previously (Bouzoubaa et al., 1987; Ouillet et al., 1989). Agroinfectious clones of BNYVV RNA3 and RNA3E were obtained previously in pJL89 backbone (Delbianco et al., 2013). Transiently expressed proteins through agroinfiltration were performed using pEAQ-Δp19 backbone vector developed for golden gate assembly. For yeast two-hybrid, p14 and hypomorphic mutants were from Chiba *et al.* 2013 (Chiba et al., 2013) and NbDRB4 was fused to HA tag in pGBK-T7 plasmid using *EcoRI* and *Sall* restriction sites. For yeast three hybrid experiments, Coremin and Nimeroc sequences were expressed through chimera RNAs by pIIIMS2.1 plasmid (SenGupta et al., 1996) and proteins fused to myc tag in pGAD-T7 plasmids using *EcoRI* and *XmaI* restriction sites. Selective markers for pGBK, pGAD and pIIIMS2 are tryptophan, leucine and uracil respectively.

2.3 Agroinfiltration

Cultures of *Agrobacterium tumefaciens* (strain GV3101) were prepared in LB media supplemented with kanamycin (100 µg/mL), rifampicin (100 µg/mL) and gentamicin (30 µg/mL) and incubated at 28°C for 18 hours. Cells were centrifuged, resuspended and incubated for at least two hours in acetosyringone (200 µM) and MgCl₂ (10 mM). Leaves of 5 weeks-old wild-type or RDR6i *N. benthamiana* were (co-)infiltrated with bacteria suspension using individual optical density 600 nm set to 0.5. RDR6i seeds were kindly provided by Sir Pr. D. Baulcombe (University of Cambridge, England).

2.4 Immunoprecipitation

Agroinfiltrated *N. benthamiana* leaves expressing p14 or Flag-p14 were harvested at 3 days post-infiltration. 100 mg of leaf sample were ground in liquid nitrogen and homogenized 10 min in 1 mL of lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7), 50 mM NaCl, 0.1 % Triton, 1 mM DTT, supplemented with one tablet of cOMplete™ protease inhibitor cocktail for 50 mL of buffer) at 12 rpm at 4°C. Cellular debris were removed by two successive centrifugations at 16000 g for 10 min at 4°C. Supernatants were incubated at 4°C with magnetic beads conjugated to an anti-Flag monoclonal antibody (µMACS system, Miltenyi Biotec) for 30 min at 6 rpm. Samples were dropped on µColumn, then washed with 1 mL of lysis buffer and with 100 µL of washing buffer (20 mM Tris-HCl (pH 7.5)). Elution was performed with 90°C pre-warmed elution buffer

(50 mM Tris-HCl (pH 6.8), 50 mM DTT, 1 % SDS, 1 mM EDTA, 0.005 % bromophenol blue, 10 % glycerol) and samples were analysed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS).

Statistical analysis based on spectral counts was performed through the IPinquiry4 R package (retrieved from <https://github.com/hzuber67/IPinquiry4.git>). This package calculates fold change and p values using the quasi-likelihood negative binomial, generalized log-linear model implemented in the edgeR package. Common and tagwise dispersions were calculated with the implemented edgeR function by filtering out less abundant proteins that could adversely affect the dispersion estimation. The size factor used to scale samples were calculated according to the DESeq2 normalization method (*i.e.*, median of ratios method). P value was adjusted using the Benjamini–Hochberg method from stats R package.

2.5 *Plant infection*

BNYVV infections were triggered by mechanical inoculation of RNA1, RNA2 and RNA3 or RNA3E *in vitro* transcripts. 10 µg of RNA1 and 5 µg of RNA2 and RNA3 (or RNA3E) were necessary to infect one 4 weeks-old *N. benthamiana*. Nuclease free inoculum were prepared in 100 µl of 50 mM KH₂PO₄ (pH 7.5) containing 0.05 % macaloid.

2.6 *Yeast two and triple hybrid experiments*

All yeast procedures were performed on *Saccharomyces cerevisiae* as described previously for yeast two-hybrid (Pakdel et al., 2015) and yeast three-hybrid (Jaeger et al., 2004).

2.7 *Protein and RNA extraction and analyses*

Leaves were ground in liquid nitrogen to obtain a fine powder and, except for subcellular fractionation and small RNA analysis, 100 mg and 200 mg were harvested for protein and RNA extraction respectively. Samples were mixed vigorously with glass beads in Precellys® in a “polysome” buffer (200 mM Tris-HCl (pH 9), 400 mM KCl, 200 mM saccharose, 35 mM MgCl₂, 25 mM EGTA) to extract RNAs using a phenol/chloroform purification. Nucleic acids were precipitated with ethanol. 200 µL of 3 M NaAc were added on pellet to solubilize small RNAs and DNA. Remaining RNA pellet was washed with 70 % ethanol and then dissolved in 50 to 100 µL of nuclease free water, depending on the pellet size. RNA quantity was estimated using spectrophotometry and quality estimated on agarose gel. High molecular weight northern blot was performed using 5 µg of RNA, mixed with 4 volumes of HFF buffer (20 mM HEPES-KOH (pH 7.8), 1 mM EDTA, 50 % formamide, 6 % formaldehyde, 0.005 % bromophenol blue). Samples denaturation was performed 5 min at 65°C before loading on denaturing agarose gel (1 % agarose, 20 mM HEPES-KOH (pH 7.8), 1 mM EDTA, 6 % formaldehyde). After migration in HEPES-EDTA buffer, RNA were transferred on Hybond™ membrane in 20X SSC for 12 hours. RNA were UVs cross-linked and membrane stained with methylene blue. Pre-hybridization was performed in 50 % formamide, 5X SSC, 8X Denhardt, 50 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ (pH 6.5), 0.1 % SDS solution for radiolabelled RNA probes or in PerfectHyb™ Plus Hybridization buffer for radiolabelled DNA probes.

For protein analyses, samples were directly ground in 2X Laemmli buffer and boiled for 2 minutes at 90°C. Following 1 min at 12000 g centrifugation, supernatant was loaded on a

polyacrylamide gel in Tris-glycine buffer. Proteins were transferred on Immobilon-P PVDF membrane in Tris-ethanol buffer and incubated with antisera directed against BNYVV or eGFP proteins. Following washes in 1X PBS, 0.5 % SDS, HRP conjugated goat anti-rabbit secondary antibody was used to detect protein. Membranes were further stained with Coomassie blue to check for equal loading.

2.8 Microscopy

2.8.1 Localization of fluorescent labelled proteins using confocal microscopy

Agroinfiltrated leaf disks were analysed three days post-agroinfiltration. Confocal laser scanning microscopy (CLSM) was performed with a Zeiss LSM700 microscope. EGFP and tRFP were excited at 488 nm and 555 nm respectively. Samples were observed using a 40x magnification under oil immersion. Images acquisition were performed with ZEN software and further edited with ImageJ.

2.8.2 FRET-FLIM

Lifetime of eGFP fusion proteins was measured in the presence of tRFP alone as a control and of NbDRB4-tRFP. Acquisitions were performed on Nikon TE2000 microscope on leaf disks three days post-agroinfiltration.

2.9 Plant subcellular fractionation

0.5 g of *N. benthamiana* infected leaves were ground in liquid nitrogen and 10 mL of resuspension buffer n°1 (0.4 M sucrose, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 2.5 mM DTT) added before two filtrations on Miracloth. Following centrifugation for 20 min at 3200 g, supernatants were harvested for cytosolic protein and RNA analyses. Pellets were resuspended in 1 mL of resuspension buffer n°2 (0.25 M sucrose, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl₂, 1 % Triton, 2.5 mM DTT) and centrifuged for 10 min at 16000 g. Supernatants were gently discarded and pellets resuspended in 300 µL of resuspension buffer n°2 and carefully settled on 300 µL on sucrose cushion (1.75 M sucrose, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2.5 mM MgCl₂, 0.15 % Triton, 2.5 mM DTT). Samples were centrifuged for one hour at 16000 g. Nuclei present in the pellets were resuspended in 200 µL of lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM EDTA, 1 % SDS). For analyses, 5 mL and 100 µL of cytosolic and nuclear fractions were used respectively to perform TRIzol™ extraction following manufacturer protocol. A DNase treatment was performed on extracted RNAs from nuclei.

3. Results

3.1 Identification of p14 potential partners

To further characterize the p14 silencing suppression function, we chose an immunoprecipitation (IP) strategy coupled to mass spectrometry for the identification of potential p14 partners. For this purpose, we performed IP on protein extracts from *N. benthamiana* leaves overexpressing a tagged version Flag-p14. Functionality of the Flag-p14 was verified within a GFP reporter assay. GFP silencing suppression efficiency was compared to the p14 WT protein. Both p14 and Flag-p14 proteins were similarly expressed

(Fig.1A, panel p14), and efficient in silencing suppression, restoring GFP protein accumulation (Fig.1B, right panel). As described previously, p14 triggered a reduction of secondary P siRNAs (Chiba et al., 2013). Our experiments recalled similar results with Flag-p14 that shared similar activity on secondary siRNAs accumulation (Fig.1A, panel P siRNA). Thus, Flag-p14 is a functional version of the p14 protein that can be used for immunoprecipitation.

Several immunoprecipitations were performed using Flag-p14 and analysed by mass spectrometry. Ribosomal proteins were mainly retrieved in IP experiments. The relevance of those translational-associated proteins has already been described during viral infection (for review, see (Walsh and Mohr, 2011)). However, ribosomal proteins remain difficult to study, particularly in *N. benthamiana* where mutant lines and genetics tools are not easily available, nor engineered. For the analyses, we then focused on immunoprecipitated candidates related to RNA silencing pathway, and identified DRB4 in one experiment, without retrieval in other experiments. Although its homolog in *A. thaliana* (AtDRB4) is already described in silencing pathways in this plant model, we decided to study this candidate (NbDRB4) to unravel its function in *N. benthamiana* that could be related to BNYVV infection.

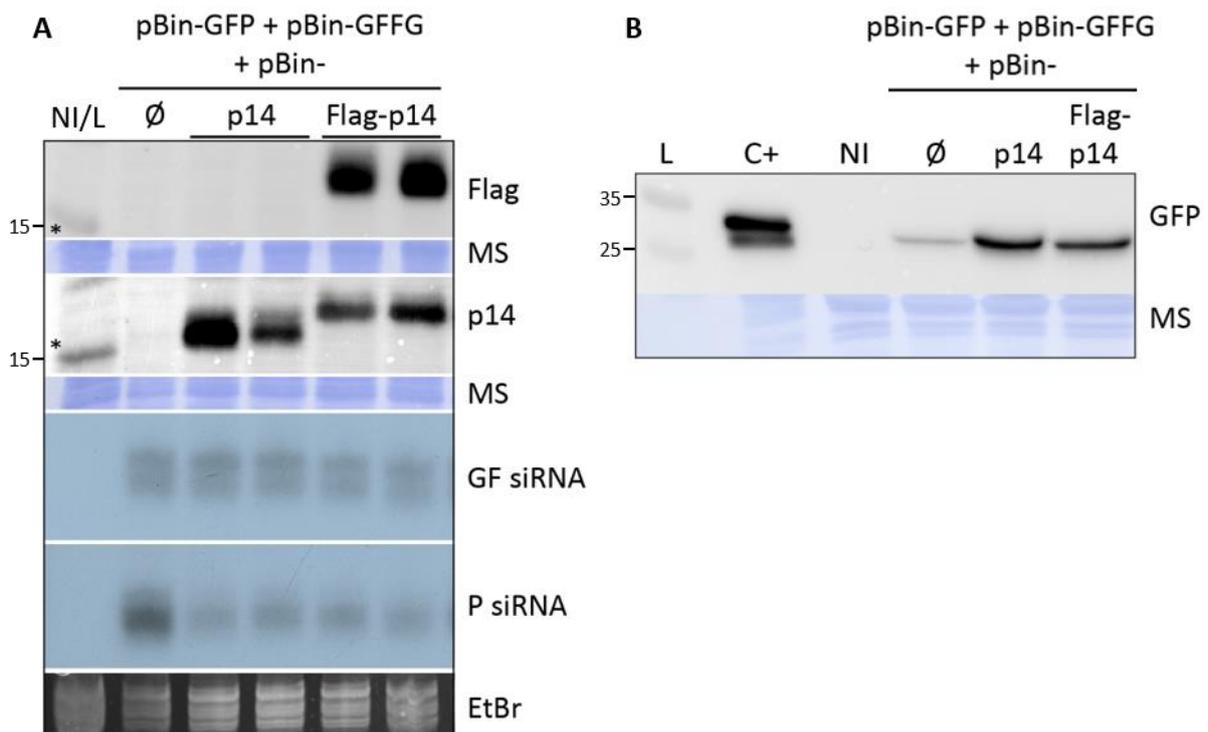


Figure 1. Flag-p14 is a functional version of p14 in a GFP reporter assay

N. benthamiana leaves were co-infiltrated with agrobacterium carrying pBin-GFP, the silencing trigger pBin-GFFG and empty, pBin- \emptyset or VSR expressing vector pBin-(Flag)p14. Small RNAs and proteins were extracted with TRIZOL™ from agroinfiltrated leaves. Small RNAs were subjected to low molecular weight northern analysis. GF and P siRNAs were detected using probes specific to the 5' and 3' parts of the GFP mRNA respectively. Western blot analysis of (Flag)p14 (A) and GFP (B) were performed. NI, non-infiltrated; L, ladder; MS, membrane staining; EtBr, ethidium bromide; C+, GFP positive control. In A), a non-infiltrated leaf extract was mixed with the ladder (NI/L) and asterisks represent the 15 kDa protein of the ladder.

3.2 Only one NbDRB4 gene was isolated and its product is localized in the nucleolus

Four distinct DRB4 sequences are annotated in *N. benthamiana* genome (**Supplementary Fig.1**). While DRB4 from *N. benthamiana* was studied by Barton *et al.* and Fátýol *et al.* (Barton *et al.*, 2017; Fátýol *et al.*, 2020), sequence alignment revealed that their described DRB4 sequence does not correspond to Niben101Scf06376g01010 nor Niben101Scf06376g01014 encoded NbDRB4 (**Supplementary Fig.1**). In fact, *N. benthamiana* possesses a tetraploid genome resulting from a hybridization event between *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana noctiflora* (Schiavinato *et al.*, 2020). Despite multiple genome rearrangements, it seems that *N. benthamiana* has two homologs for DRB4: the one previously studied and annotated as Niben101Scf05841g01021 and the other one identified in this study as Niben101Scf06376g01010. To study endogenous *N. benthamiana* DRB4 protein, total RNA have been extracted from mock and infected leaf samples and subjected to RT-PCR. Following mass spectrometry results, which identified Niben101Scf06376g01010 and Niben101Scf06376g01014 peptides spectra (**Supplementary Fig.2**), we only succeed in isolating the Niben101Scf06376g01010 version.

We first determined the subcellular localization of NbDRB4 by fusing its sequence to eGFP or tRFP within an overexpression vector. Both NbDRB4-eGFP and NbDRB4-tRFP have been localized in nuclei, and most likely in nucleolus (**Fig.2A**). To confirm its nucleolar localization, we cloned and coexpressed, with tagged NbDRB4, the *N. benthamiana* fibrillarin fused to eGFP or tRFP. Whatever the combination tested, both NbDRB4 and fibrillarin proteins clearly colocalized, confirming that NbDRB4 is mostly expressed in nucleolus and also partially diffused in the nucleoplasm (**Fig.2B**).

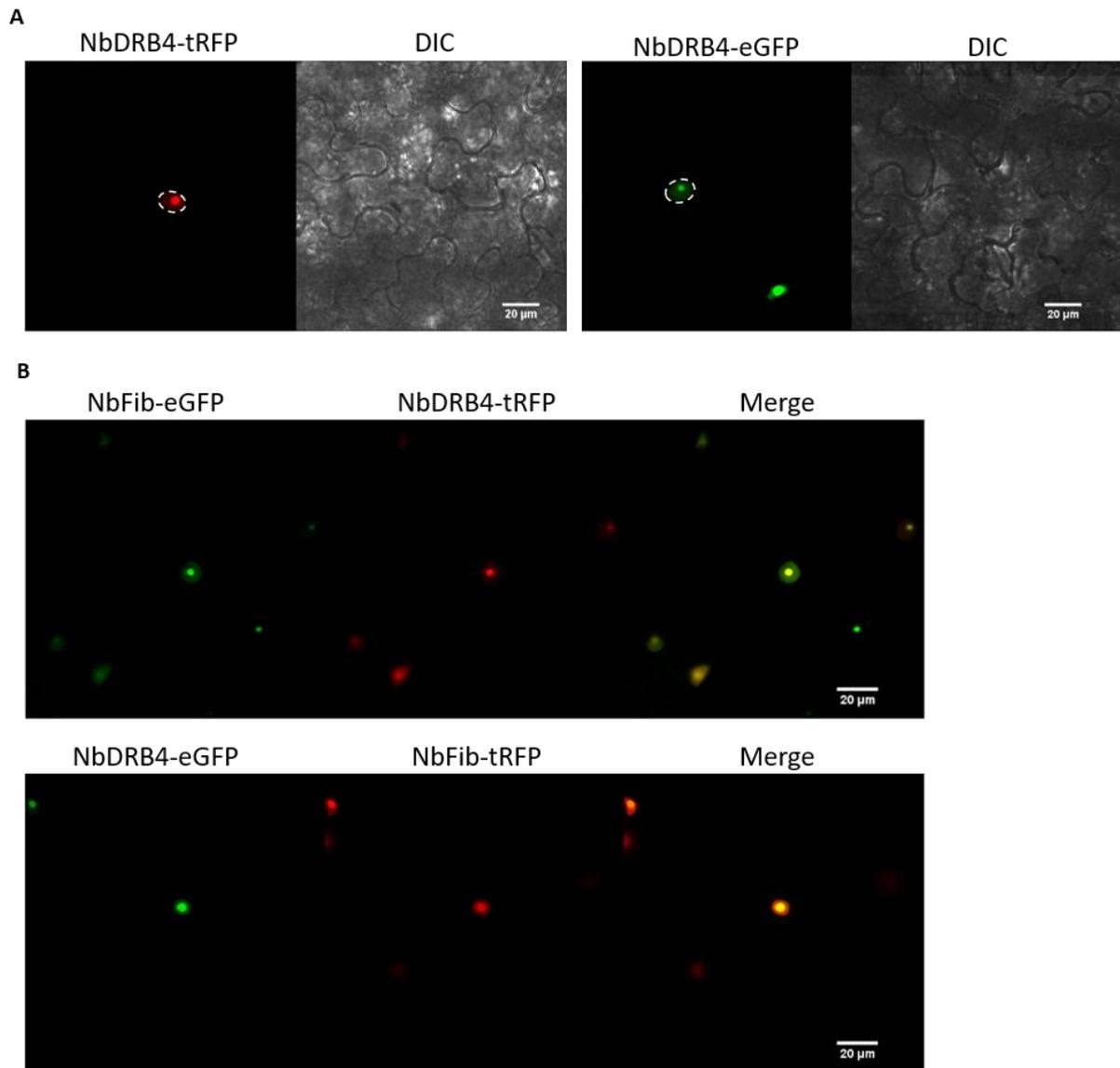


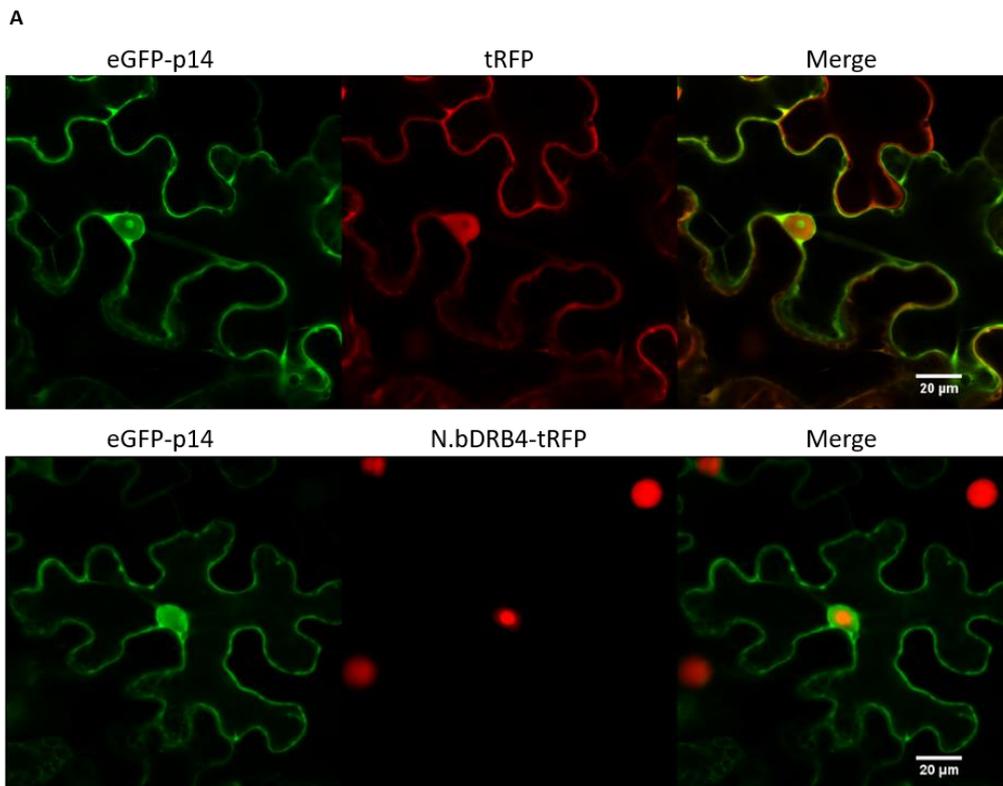
Figure 2. NbDRB4 localizes in the nucleolus in *N. benthamiana*

Transiently expressed NbDRB4 fused to tRFP (left panel) or eGFP (right panel) A) or colocalized with fibrillarin fused to eGFP (upper panel) or tRFP (lower panel) B). Nuclei are surrounded by dashed lines and visualized in differential interference contrast (DIC) in A). Observations are performed three days post-infiltration on a confocal microscope. Scale bars are indicated.

To confirm our observations under viral infection, transgenic *Nicotiana benthamiana* plants were created to express NbDRB4-tRFP. Taking advantage of the BNYVV replicon strategies (Schmidlin et al., 2005), those plants would have been infected with RNA1, RNA2Δp14 and Rep3-eGFPp14 or Rep3-eGFP-*p14BA2* to perform confocal observations and FRET-FLIM experiments. Unfortunately, these plants showed a dwarfism phenotype (**Supplementary Fig.3A**) and were sterile despite ovules and pollen having identical phenotype as the tRFP control plant (**Supplementary Fig.3B**).

3.3 *Overexpression of NbDRB4 relocalizes p14 without detectable interaction and is independent of RDR6 activity*

Following mass spectrometry results, the interaction between p14 and NbDRB4 needed to be confirmed. Taking advantage of fluorescent proteins, a FRET-FLIM approach has been employed. The tRFP was used as a control. eGFP lifetime measurements were performed after confocal laser microscopy observations to ensure that most cells expressed both proteins. Protein accumulation levels analysed by western blot confirm that eGFP-p14, NbDRB4-tRFP and tRFP are correctly expressed (**Supplementary Fig.4A**, left panel). The eGFP-p14 was localized as previously described (Chiba et al., 2013), in the nucleolus and diffused in both the nucleoplasm and the cytoplasm (**Fig.3A**). eGFP-p14 localization was not altered in the presence of tRFP expression. Interestingly, when co-expressed with NbDRB4, eGFP-p14 was excluded from the nucleolus. The interaction between p14 and NbDRB4 seems therefore unlikely but has been nevertheless searched in whole nuclei. Over three experiments, the interaction between p14 and NbDRB4 has been tested in 75 nuclei and FRET efficiency was always below a 7 % threshold fixed to consider an effective interaction (**Fig.3B**). In parallel, localization and interaction between eGFP-p14 and AtDRB4-tRFP were studied. AtDRB4-tRFP was mainly nuclear but excluded from nucleoli and did not colocalize neither interact with eGFP-p14 (**Supplementary Fig.5**).



B

	FRET efficiency (%)		
	Rep 1	Rep 2	Rep 3
eGFP-p14 + NbDRB4-tRFP	2,8 %	-1,0 %	4,0 %

Figure 3. Colocalization and interaction assay of eGFP-p14 and NbDRB4-tRFP

A) Transiently expressed eGFP-p14 and tRFP (upper panel) or NbDRB4-tRFP (lower panel). Observations are performed three days post-infiltration on a confocal microscope. Scale bars are indicated. B) FRET efficiency (%) was determined for three independent experiments (Replicate, Rep). No interaction is shown by a yellow background.

We previously demonstrated the specific impact of RDR6 knockdown on BNYVV infection (Flobinus et al., 2016). Therefore, we tested if RDR6 KD affected the eGFP-p14 localization in RDR6i *N. benthamiana*. Expressed alone or in combination with tRFP in RDR6i *N. benthamiana*, eGFPp14 localized similarly as in WT plants, in the nucleolus and diffused in the cytoplasm and nucleoplasm (not shown). In the presence of NbDRB4, p14 was excluded from the nucleolus (**Fig.4A**) and did not interact with NbDRB4 as FRET efficiency in RDR6i *N. benthamiana* was -0.2 %. Since the hypomorphic *p14BA2* version functions as WT p14 in RDR6i background (Flobinus et al., 2016), we tested the behaviour of *p14BA2* mutant in the presence of NbDRB4-tRFP. The eGFP-*p14BA2* mutant was localized as eGFP-p14 in WT plants ((Chiba et al., 2013) and this study). However, two localization profiles were observed in RDR6i plants in the presence of NbDRB4-tRFP. One was similar to p14 with a decrease in nucleolar localisation, the other remained nucleolar and colocalized with NbDRB4-tRFP (**Fig.4A**). The

analysis of protein accumulation levels revealed that fusion proteins were homogeneously expressed in RDR6i *N. benthamiana* plants (**Supplementary Fig.6**). Two distinct eGFP lifetimes pools have been observed: one higher than 2.4 ns, indicating an absence of interaction, the other lower than 2.3 ns, revealing a direct interaction between *p14BA2* and NbDRB4 (**Fig.4B**). Following these results, we decided to analyse *p14BA2* and NbDRB4 interaction in WT *N. benthamiana* plants.

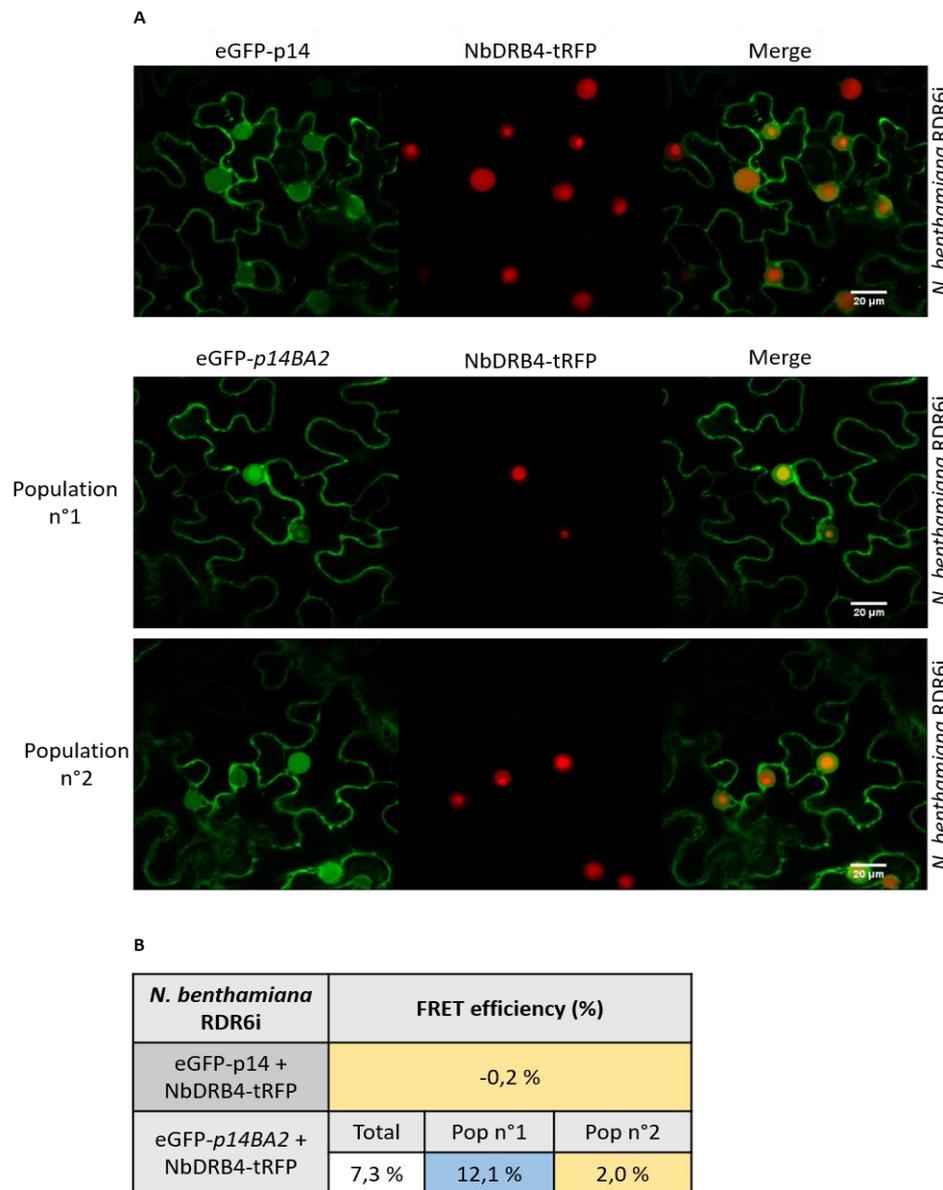


Figure 4. Effect of RDR6 knockdown on eGFP-p14 and eGFP-*p14BA2* localizations and their interaction with NbDRB4-tRFP in *Nicotiana benthamiana*

A) Transiently expressed eGFP-p14 and NbDRB4-tRFP (upper panel) or eGFP-*p14BA2* and NbDRB4-tRFP (lower panels) in RDR6i *N. benthamiana*. Observations are performed three days post-infiltration. Scale bars are indicated. B) FRET efficiencies (%) are depicted with colour codes. The yellow and blue backgrounds depict an absence and the presence of interaction, respectively. For eGFP-*p14BA2*, mean eGFP lifetime is indicated in the “Total” column and split values in columns Pop n°1 (n=9) and n°2 (n=10).

3.4 *p14BA2* hypomorphic mutant colocalizes and interacts with *NbDRB4*

In *N. benthamiana*, *p14BA2* remains in the nucleolus when coexpressed with *NbDRB4* and both proteins colocalize (**Fig.5A**). Western blot confirms that proteins were similarly expressed (**Supplementary Fig.4A**, right panel). EGFP lifetimes measurements performed on 68 nuclei within three independent experiments revealed an interaction between *p14BA2* and *NbDRB4* (**Fig.5B**) with FRET efficiency of about 14 %. Yeast two hybrid experiments were performed to confirm such interaction. Our results indicated a strong interaction of *p14BA2* with *NbDRB4* as shown with a growth on SD-WLHA media (**Fig.5C**). Yeast growth was still observed for *p14* WT at 10^{-1} and 10^{-2} dilutions on SD-WLH but abolished on stringent SD-WLHA media suggesting a possible but weak interaction between *p14* and *NbDRB4*.

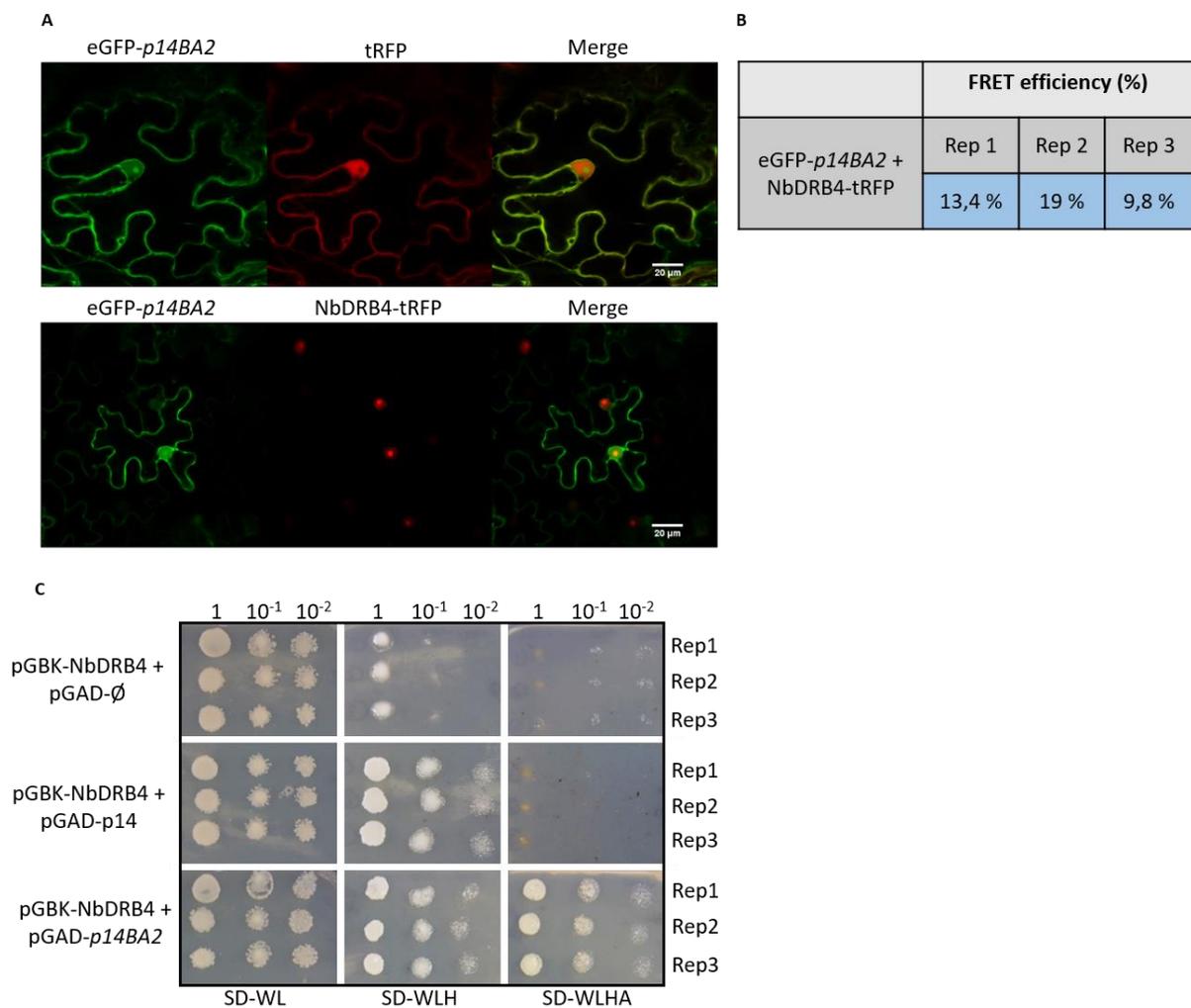


Figure 5. Colocalization and interaction assay of eGFP-*p14BA2* and *NbDRB4*-tRFP

A) Transiently expressed eGFP-*p14BA2* and tRFP (upper panel) or *NbDRB4*-tRFP (lower panel) were observed three days post-infiltration in *N. benthamiana* on a confocal microscope. Scale bars are indicated. B) FRET efficiencies (%) were determined for three independent experiments. Interaction is shown by a blue background. C) Interaction between *p14* and *p14BA2* and *NbDRB4* is studied by yeast-two hybrid on selective SD-WLH and selective and stringent SD-WLHA media. Rep, replicate; SD, synthetic defined; W, tryptophan; L, leucine; H, histidine; A, adenine.

3.5 *p14BA2* and *NbDRB4* interaction is specifically disturbed by *ncRNA3* accumulation

As previously described, the *p14BA2* mutant is unable to fulfil a systemic infection on its own (Flobinus et al., 2016). However, in the presence of an efficient *ncRNA3* accumulation, its systemic spread is restored. We decided to study the effect of *ncRNA3* accumulation upon *p14BA2* subcellular localization and its interaction with *NbDRB4* using confocal microscopy and FRET-FLIM approaches. Wild-type *RNA3*, and therefore *ncRNA3* accumulation, was from a 35S-driven cDNA clone. As a negative control, the cDNA version producing *RNA3E* unable to accumulate *ncRNA3* was used. The presence of *RNA3*, *ncRNA3* or *RNA3E* did not modify the eGFPp14 behaviour described above in the presence of *NbDRB4*-tRFP: eGFPp14 remained excluded from the nucleolus in the presence of *NbDRB4* (**Fig.6A**) and no interaction was detected between the two proteins in the presence of *ncRNA3* under these experimental conditions. The eGFP-*p14BA2* fusion protein remained localized in the nucleolus whatever the presence of *RNA3* species producing or not *ncRNA3* (**Fig.6A**). Interestingly, FRET-FLIM analysis revealed that while *NbDRB4*-tRFP was still able to interact with eGFP-*p14BA2* in the absence of *ncRNA3* (FRET efficiencies of 18,2 % and 17,4 %; **Fig.6B**), such interaction was suppressed when *ncRNA3* was present (FRET efficiencies of 1,5 % and 6,6 %; **Fig.6B**). Proteins and *RNA* accumulation levels were analysed by western blot (**Supplementary Fig.4A**) and northern blot (**Supplementary Fig.4B**) respectively. The *ncRNA3* indeed accumulated in the presence of eGFP-p14 or eGFP-*p14BA2* with both tRFP and *NbDRB4*-tRFP. Interestingly, we noticed a lower level of *ncRNA3* in the presence of *NbDRB4*-tRFP that is correlated with a higher accumulation of its precursor (*RNA3*) (**Supplementary Fig.4B**, see arrows). The sole difference between *RNA3* and *RNA3E* resides in the 20 nt long Coremin sequence that has been revert-complemented (namely Nimeroc) in the *RNA3E* version. Therefore, we recalled K. Hleibieh thesis unpublished data demonstrating a specific interaction between p14 and the Coremin sequence (**Fig.6C**) and further searched for a possible and specific interaction between the Coremin sequence and *NbDRB4*. Our analyses from yeast three hybrid experiments demonstrated a non-specific *RNA* binding property for the *NbDRB4* fusion protein as all substrates were able to coordinate the ternary complex required for the reporter gene activation (**Fig.6D**). If the Coremin effect is not linked to *DRB4*, it should affect the *VSR per se*. Using the same experimental approach, we showed that disruption of the NoLS domain aborts p14 *RNA* binding properties, whereas alanine substitutions present in *p14BA2* only affect *RNA* binding properties of the p14 mutant protein (**Fig.6C**). Indeed, the hypomorphic mutant is still able, but to a lower extent (up to 3 mM 3AT), to interact specifically with the Coremin sequence compared to the WT p14 protein (up to 5 mM 3AT).

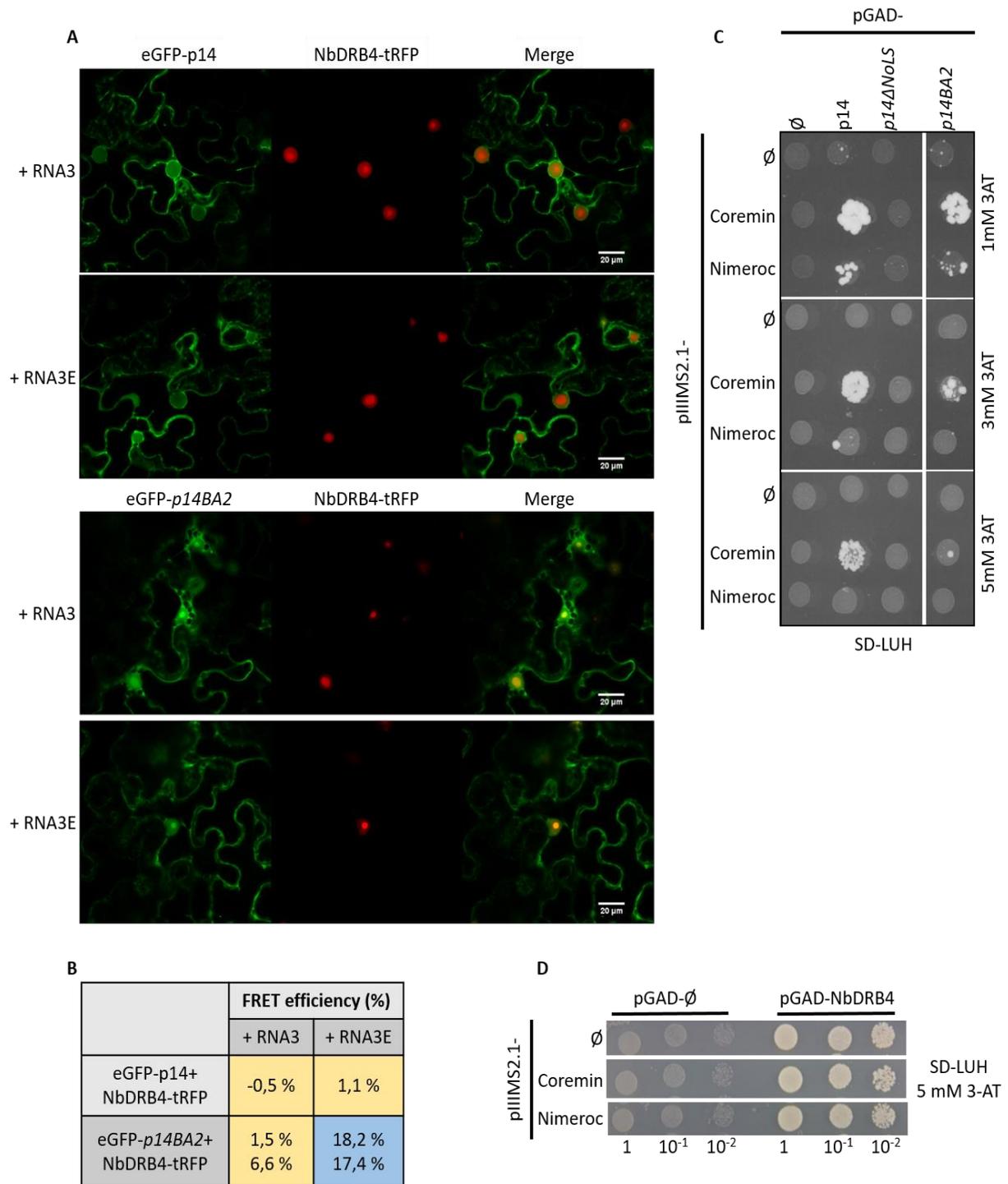


Figure 6. Effect of RNA3 and RNA3E on p14 and p14BA2 subcellular localization and their interaction with NbDRB4

A) Transiently expressed eGFP-p14 (upper panel) or eGFP-p14BA2 (lower panel) and NbDRB4-tRFP in the presence of RNA3 or RNA3E. Observations are performed three days post-infiltration on a confocal microscope. Scale bars are indicated. B) FRET efficiencies (%) are depicted with colour code; the yellow and blue backgrounds depict the absence and the presence of interaction respectively. C-D) Interaction between p14 and p14BA2 (C) or NbDRB4 (D) and Coremin or Nimeroc sequence studied by yeast three hybrid. Interaction is tested on selective SD-LUH media, supplemented with different concentrations (mM) of 3-AT. SD, synthetic defined; L, leucine; U, uracil; H, histidine; 3-AT, 3-Amino-1,2,4-triazole.

3.6 RNA3 and ncRNA3 are differentially localized in infected tissues

BNYVV replicates in the cytoplasm of infected cells where its genomic and subgenomic messenger RNAs accumulate for their expression, replication and encapsidation. If BNYVV proteins such as p25 have been detected in the nuclear compartment according to its transcription activation properties, BNYVV RNAs are far to be located in the nucleus. If the NbDRB4•*p14BA2* interaction appears disrupted in the nucleolus where they reside, we search for the presence of RNA species containing the Coremin sequence (RNA3 and ncRNA3) in the nuclear compartment of infected *N. benthamiana*.

Apical leaves were submitted to cellular fractionation 20 days post infection, to separate nuclei from the cytosol. Fractionation quality was evaluated by immunodetection of the cytoplasmic resident large rubisco subunit (RbcL) and nuclear Histone H3 (**Fig.7A**). CP immunodetection confirmed plant infections and showed that CP protein accumulated in the cytoplasm (**Fig.7A**). The CP signal observed in the nuclear 1+2+3E sample corroborated with the higher cytoplasmic contamination observed on the @RbcL western blot (**Fig.7A**). Western blot performed to detect p14 highlighted an infection of the plant infected with RNA2 expressing *p14BA2* and supplemented with RNA3, which is in line with results observed previously (Flobinus et al., 2016). Interestingly, p14 was detected in both the cytoplasm and nuclei, with a clear enrichment in the nuclear fraction (**Fig.7A**). Nucleic acids were extracted and were further probed with riboprobes complementary to 3' RNA3 (**Fig.7B**). Plants infected with the mutant producing the RNA2 expressing hypomorphic *p14BA2* protein were asymptomatic. Viral RNA3 was below the detection limit. However, systemic movement occurred in the presence of RNA3 as shown with the detection of p14 in the cytoplasmic extract. However, in the infected control plant, (**Fig.7A**, 1+2+3 Ctrl), two RNA species corresponding to genomic RNA3 and ncRNA3 were detected. In cytosolic fractions, only genomic RNA3 was slightly observed in infected plant. Surprisingly, ncRNA3 was highly accumulating in the nucleus (**Fig.7B**, 1+2+3 Nucleus). Such ncRNA3 accumulation in the nucleus cannot be attributed to the cytoplasmic contamination as ncRNA3 is only detected in the nuclei. Therefore, this represents a genuine nuclear ncRNA3 accumulation. As previously described (Flobinus et al., 2018), RNA3E did not allow the production of ncRNA3 (**Fig.7B**, 1+2+3E Nucleus) but for unknown reasons RNA3E was not detected in the cytosolic fraction (**Fig.7B**, 1+2+3E Cytoplasm). Perhaps this was due to experimental and technical limits, as only 1 µg of RNA were loaded for northern blot analyses. This limitation may certainly explain the difficulty to evidence an RNA3 accumulation.

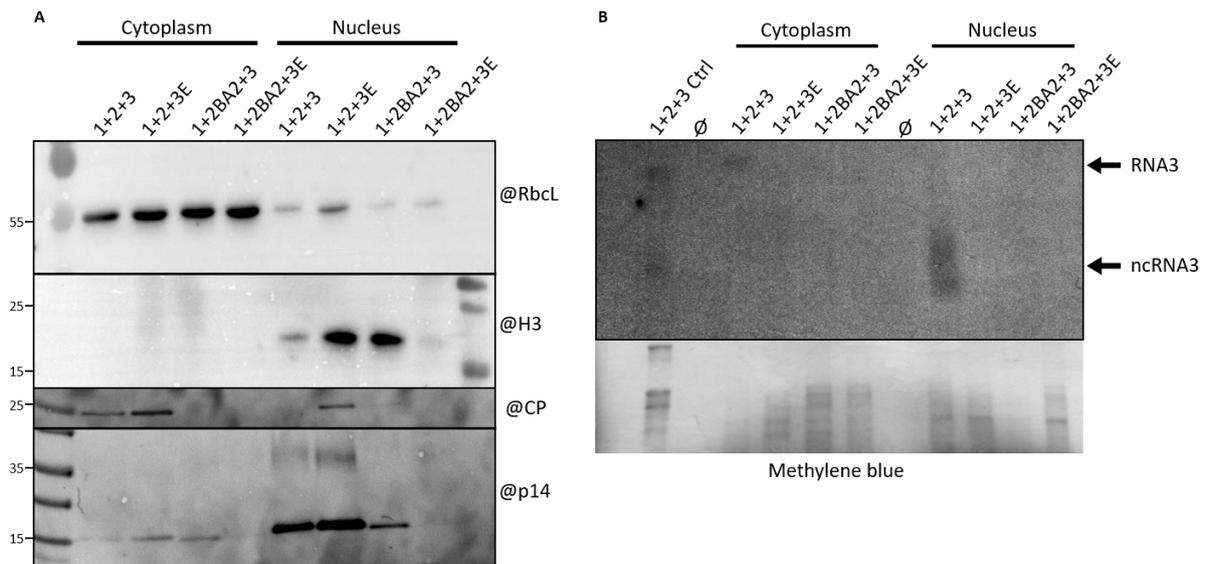


Figure 7. Genomic and non-coding RNA3 display different cellular localization

N. benthamiana were infected with RNA1, RNA2 or RNA2 expressing *p14BA2* (2BA2) and RNA3 or RNA3E. Apical leaves were subjected to cellular fractionation. A) Cytosolic and nuclear fractions qualities were verified through anti-RbcL and anti-H3 western blots. Viral infections and p14 accumulation levels were analysed with @CP and @p14 antibodies. Molecular weights (kDa) are indicated on the left. B) RNA3 and ncRNA3 were detected by northern blot using riboprobe targeting (nc)RNA3 3' extremity. Non-fractionated plant sample infected with RNA1, RNA2 and RNA3 (1+2+3 Ctrl) was used as a control.

4. Discussion

In this study, we examined the interaction between the BNYVV VSR p14 protein, its hypomorphic *p14BA2* mutant and NbDRB4. We demonstrated that *p14BA2*, and not p14, stably interacts with NbDRB4 while immunoprecipitation, and subsequent NbDRB4 potential partner identification, was performed with p14. We suspect on the one hand an extremely rapid transient interaction that could not be confirmed with classical approaches but using the hypomorphic p14 variant and on the other hand, a crosslinking between the cysteine-rich p14 and DRB4 that freeze the complex and allowed us to retrieve this protein. Hence, a specific interaction is also validated with the subcellular relocalization of p14 induced by NbDRB4 overexpression. This protein relocalization visualized by p14 nucleolar exclusion does not appear as a passive mechanism and may require a specific and transient recognition between both partners. Although weaker than *p14BA2*-NbDRB4, p14-NbDRB4 interaction was also observed in yeast two hybrid experiments. We investigated the effect of the ncRNA3 expression on the VSR interactions with NbDRB4. We have demonstrated that ncRNA3 was mainly present in the nucleus while its precursor was retained in the cytosol. Knowing the specific interaction of the p14 protein and *p14BA2* with the Coremin motif present at the 5' end of ncRNA, we could suspect that the p14 nucleolar targeting may be responsible for this ncRNA localisation.

The *p14BA2* and NbDRB4 complex seems regulated by ncRNA3 expression. While both proteins interact with the Coremin motif, only p14 (and *p14BA2*) display a binding specificity.

We propose that the specific interaction between *p14BA2* and Coremin is able to displace the previously *p14BA2-NbDRB4* complex, although we cannot exclude such a function for NbDRB4. Since RNA3 is not able to disrupt *p14BA2-NbDRB4* interaction in yeast (data not shown) we propose that yet unidentified host factors may be mandatory to trigger this mechanism. We showed that ncRNA3 is specifically targeted in the nucleus under viral infection. However, we cannot clearly assume that ncRNA3 reaches the nucleolus with our experimental procedure. The *p14BA2* mutant is deficient in long distance movement but is complemented, although partially, by the ncRNA3 accumulation. Taken together, our results suggest that partial exclusion from the nucleolus and/or loss of NbDRB4 interaction may provide a functional version of the *p14BA2* hypomorphic VSR. Our model proposes that the hypomorphic version *p14BA2* could remain sequestered in the nucleolus thanks to NbDRB4 interaction, and ncRNA3 exerts its silencing suppression function through destabilization of such association. Since *p14BA2* behaves as p14 in the presence of ncRNA3, we suspect a role of the ncRNA in a refolding of the *p14BA2* protein: ncRNA3 makes the hypomorphic version functional in *N. benthamiana* and perturbs NbDRB4 function before leaving the complex. In the wild type context, p14 could act on its own as a flash modifier of NbDRB4 that has been catch in the first CoIP. The situation in the natural host *Beta* appears more complex since the *p14BA2* viral mutant is not able to systemic spread even in the presence of the ncRNA3 (Chiba et al., 2013), suggesting another strength of p14•DRB4 interaction or the existence of another partner. While systemic movement on *Beta* involves the expression of the VSR and the production of ncRNA3, the interactions highlighted in this study in *N. benthamiana* may represent a transient step of a mechanism that appears extremely rapid. Few examples describing an RNA retrograde transfer from the cytoplasm to the nucleus are available. One can cite the case of yeast tRNAs nuclear import required to ensure a quality control pathway (Kramer and Hopper, 2013). Similarly, few data exist on positive sense RNA viral genome elements entering into the nucleus. As an example, the genome of the hibiscus chlorotic ringspot virus (HCRSV) enters the nucleus of infected cells through the formation of viral p23 protein-importin α and viral RNA complex (Gao et al., 2012). Conversely, nucleolar localization for viral proteins represents a widespread viral strategy. Nucleoli are involved in various RNA biogenesis, processing and maturation mechanisms involving three major proteins: nucleolin, B23 and fibrillarin (Taliensky et al., 2010). Those proteins govern the nucleolus dynamic and RNP (ribonucleoprotein) complex formation and therefore represent a place to reach for viruses. For example, the GRV ORF3 and RSV p2 interact with fibrillarin to ensure viral systemic spread as silencing of fibrillarin impairs the viral systemic movement. (Kim et al., 2007b, 2007a; Zheng et al., 2015). As BNYVV is proposed to move long-distance through the formation of vRNP (Gilmer et al., 2018), nucleolar addressing could be relevant. However, p14 does not interact with NbFibrillarin (NbFib) (**Supplementary Fig.7**) and could require another linker partner. The p14 silencing suppression function is unrelated to its nucleolar localization (Chiba et al., 2013). In our model, the significance of this p14 nucleolar localization remains unclear. It may depends on p14 zinc-finger structure, protein dimerization (Chiba et al., 2013) and is probably mediated by a structural change of the p14 protein dimer.

We also showed that *p14BA2*-NbDRB4 interaction was partially disturbed in *N. benthamiana* RDR6 knockdown plants. Indeed, eGFP-*p14BA2* was partially excluded from nucleoli, as was eGFP-p14 in WT and RDR6i plants. The systemic movement of the hypomorphic *p14BA2* mutant is fully restored in RDR6i *N. benthamiana*, independently of ncRNA3 accumulation (Flobinus et al., 2016). We then propose that RDR6 knockdown induced a subcellular *p14BA2* relocalization, mimicking a p14 WT phenotype and thereby ensuring the viral long distance movement. Moreover, p14 specifically reduces secondary siRNA production ((Chiba et al., 2013) and this study) and limits their movement (Flobinus et al., 2016). Collectively, the above results further substantiate that p14 silencing suppression acts on the RDR6-dependent transitivity pathway. However, it is still unclear how RDR6 knockdown induced such a phenotype for the *p14BA2* mutant. If DRB4 involvement in the transitivity pathway is conserved in *N. benthamiana*, it could explain the results observed in RDR6i plants.

While our confocal and FRET-FLIM experiments have been performed out of the viral context, challenging experiments now consist in confirming and studying this interaction network on infected plants. The importance of transposing our results in the viral context has been partially shown with the addition of BNYVV RNA3. Although still expressed through agroinfiltration, this viral RNA accumulates and produces the ncRNA3 retrieved under viral conditions (Peltier et al., 2012) which was functionally able to disrupt the previously identified *p14BA2*-NbDRB4 interaction. Moreover, the function of endogenous DRB4 in *N. benthamiana* is poorly described. Its association with NbDCL4 and function in small RNA pathway(s) have not been tested so far. It is therefore speculative to assume a similar function to AtDRB4, especially with their divergent sequence. *Nicotiana benthamiana* transgenic line expressing NbDRB4-tRFP may have been useful to perform functional assay to precise the role of NbDRB4 in BNYVV viral infection and we cannot explain their dwarfism and sterile phenotype. This is particularly striking because a NbDRB4 silencing induced by a VIGS approach did not lead to any phenotype on silenced plants (data not shown). As described in *A. thaliana*, DRB function in *N. benthamiana* may be redundant and could overcome NbDRB4 knockdown in our VIGS experiments. The potential silencing suppressor function displayed by overexpressed NbDRB4 (**Supplementary Fig.8**) may lead to enhanced activity, developmental defects and participate in the sterile phenotype obtained in *N. benthamiana* transgenic lines or represent only a side effect of its global dsRNA binding properties. Similar GFP protein and siRNA accumulation levels are observed for AtDRB4 (**Supplementary Fig.8**) whereas this protein is not described as an endogenous silencing suppressor but is rather involved in antiviral defense. NbDRB4 binding to viral RNA may stabilize RNA3, thereby preventing XRN4 access and processing. The effect of NbDRB4 on (nc)RNA3 remains to be elucidated.

Acknowledgments: The authors thank Johana Chicher for mass spectrometry data analyses. Authors are grateful to Danièle Scheidecker, H el ene Scheer and Cl ementine Coroenne for technical support.

5. Additional files:

Supplementary Figure 1: *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis thaliana* DRB4 protein sequences alignment

Supplementary Figure 2: Mass spectrometry data from ectopic IP performed on agroinfiltrated Flag-p14 *Nicotiana benthamiana*

Supplementary Figure 3: Phenotypes of transgenic *Nicotiana benthamiana* overexpressing AtDRB4-tRFP and NbDRB4-tRFP fusion proteins

Supplementary Figure 4: Molecular analyses of proteins and RNA accumulation in *Nicotiana benthamiana* leaves expressing eGFP-p14 or eGFP-*p14BA2* and NbDRB4-tRFP, in the presence of RNA3 or RNA3E

Supplementary Figure 5: Colocalization and interaction assay of eGFP-p14 and AtDRB4-tRFP

Supplementary Figure 6: Protein accumulation in RDR6i *Nicotiana benthamiana* leaves expressing eGFP-p14 or eGFP-*p14BA2* and NbDRB4-tRFP

Supplementary Figure 7: Interaction assay between fibrillarlin and p14, *p14BA2* and NbDRB4 transiently expressed in *Nicotiana benthamiana*

Supplementary Figure 8: NbDRB4 suppresses GFP silencing in *N. benthamiana* GFP reporter assay

6. References

Barton, D.A., Roovers, E.F., Gouil, Q., da Fonseca, G.C., Reis, R.S., Jackson, C., Overall, R.L., Fusaro, A.F., and Waterhouse, P.M. (2017). Live Cell Imaging Reveals the Relocation of dsRNA Binding Proteins Upon Viral Infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* *30*, 435–443.

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.

Bouzoubaa, S., Quillet, L., Guilley, H., Jonard, G., and Richards, K. (1987). Nucleotide Sequence of Beet Necrotic Yellow Vein Virus RNA-1. *J. Gen. Virol.* *68*, 615–626.

Chiba, S., Hleibieh, K., Delbianco, A., Klein, E., Ratti, C., Ziegler-Graff, V., Bouzoubaa, S., and Gilmer, D. (2013). The benyvirus RNA silencing suppressor is essential for long-distance movement, requires both zinc-finger and NoLS basic residues but not a nucleolar localization for its silencing-suppression activity. *Mol Plant Microbe Interact* *26*, 168–181.

Delbianco, A., Lanzoni, C., Klein, E., Rubies Autonell, C., Gilmer, D., and Ratti, C. (2013). Agroinoculation of Beet necrotic yellow vein virus cDNA clones results in plant systemic infection and efficient *Polymyxa betae* transmission. *Mol Plant Pathol* *14*, 422–428.

Dong, Z., Han, M.-H., and Fedoroff, N. (2008). The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 9970–9975.

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.

Eamens, A.L., Wook Kim, K., and Waterhouse, P.M. (2012). DRB2, DRB3 and DRB5 function in a non-canonical microRNA pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal. Behav.* *7*, 1224–1229.

Fátyol, K., Fekete, K.A., and Ludman, M. (2020). Double-Stranded-RNA-Binding Protein 2 Participates in Antiviral Defense. *J. Virol.* *94*, e00017-20.

Flobinus, A., Hleibieh, K., Klein, E., Ratti, C., Bouzoubaa, S., and Gilmer, D. (2016). A Viral Noncoding RNA Complements a Weakened Viral RNA Silencing Suppressor and Promotes Efficient Systemic Host Infection. *Viruses* 8.

Flobinus, A., Chevigny, N., Charley, P.A., Seissler, T., Klein, E., Bleykasten-Grosshans, C., Ratti, C., Bouzoubaa, S., Wilusz, J., and Gilmer, D. (2018). Beet Necrotic Yellow Vein Virus Noncoding RNA Production Depends on a 5'→3' Xrn Exoribonuclease Activity. *Viruses* 10.

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.

Gao, R., Liu, P., and Wong, S.-M. (2012). Identification of a Plant Viral RNA Genome in the Nucleus. *PLoS One* 7, e48736.

Gilmer, D., Ratti, C., and Michel, F. (2018). Long-distance movement of helical multipartite phytoviruses: keep connected or die? *Curr. Opin. Virol.* 33, 120–128.

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.

Incarbone, M., Clavel, M., Monsion, B., Kuhn, L., Scheer, H., Poignavent, V., Dunoyer, P., Genschik, P., and Ritzenthaler, C. (2020). Immunocapture of dsRNA-bound proteins provides insight into tobacco rattle virus replication complexes and reveals Arabidopsis DRB2 to be a wide-spectrum antiviral effector. *BioRxiv*.

Jaeger, S., Eriani, G., and Martin, F. (2004). Results and prospects of the yeast three-hybrid system. *FEBS Lett.* 556, 7–12.

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.

Kim, S.H., MacFarlane, S., Kalinina, N.O., Rakitina, D. V., Ryabov, E. V., Gillespie, T., Haupt, S., Brown, J.W.S., and Taliansky, M. (2007a). Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 104, 11115–11120.

Kim, S.H., Ryabov, E. V., Kalinina, N.O., Rakitina, D. V., Gillespie, T., MacFarlane, S., Haupt, S., Brown, J.W.S., and Taliansky, M. (2007b). Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. *EMBO J.* 26, 2169–2179.

Kramer, E.B., and Hopper, A.K. (2013). Retrograde transfer RNA nuclear import provides a new level of tRNA quality control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 21042 LP – 21047.

Kurihara, Y., and Watanabe, Y. (2004). Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12753–12758.

Lauber, E., Guilley, H., Tamada, T., Richards, K.E., and Jonard, G. (1998). Vascular movement of beet necrotic yellow vein virus in *Beta macrocarpa* is probably dependent on an RNA 3 sequence domain rather than a gene product. *J. Gen. Virol.* 79, 385–393.

Montavon, T., Kwon, Y., Zimmermann, A., Hammann, P., Vincent, T., Cognat, V., Michel, F., and Dunoyer, P. (2017). A specific dsRNA-binding protein complex selectively sequesters endogenous inverted-repeat siRNA precursors and inhibits their processing. *Nucleic Acids Res.* 45, 1330–1344.

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.

Ouillet, L., Guilley, H., Jonard, G., and Richards, K. (1989). In vitro synthesis of biologically active beet necrotic yellow vein virus RNA. *Virology* 172, 293–301.

Pakdel, A., Mounier, C., Klein, E., Hleibieh, K., Monsion, B., Mutterer, J., Erhardt, M., Bouzoubaa, S., Ratti, C., and Gilmer, D. (2015). On the interaction and localization of the beet necrotic yellow vein virus replicase. *Virus Res* 196, 94–104.

Peltier, C., Klein, E., Hleibieh, K., D'Alonzo, M., Hammann, P., Bouzoubaa, S., Ratti, C., and Gilmer, D. (2012). Beet necrotic yellow vein virus subgenomic RNA3 is a cleavage product leading to stable non-coding RNA required for long-distance movement. *J Gen Virol* 93, 1093–1102.

Qu, F., Ye, X., and Morris, T.J. (2008). Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 14732–14737.

Rahim, M.D., Andika, I.B., Han, C., Kondo, H., and Tamada, T. (2007). RNA4-encoded p31 of beet necrotic yellow vein virus is involved in efficient vector transmission, symptom severity and silencing suppression in roots. *J. Gen. Virol.* 88, 1611–1619.

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.

Schmidlin, L., Link, D., Mutterer, J., Guilley, H., and Gilmer, D. (2005). Use of a Beet necrotic yellow vein virus RNA-5-derived replicon as a new tool for gene expression. *J Gen Virol* 86, 463–467.

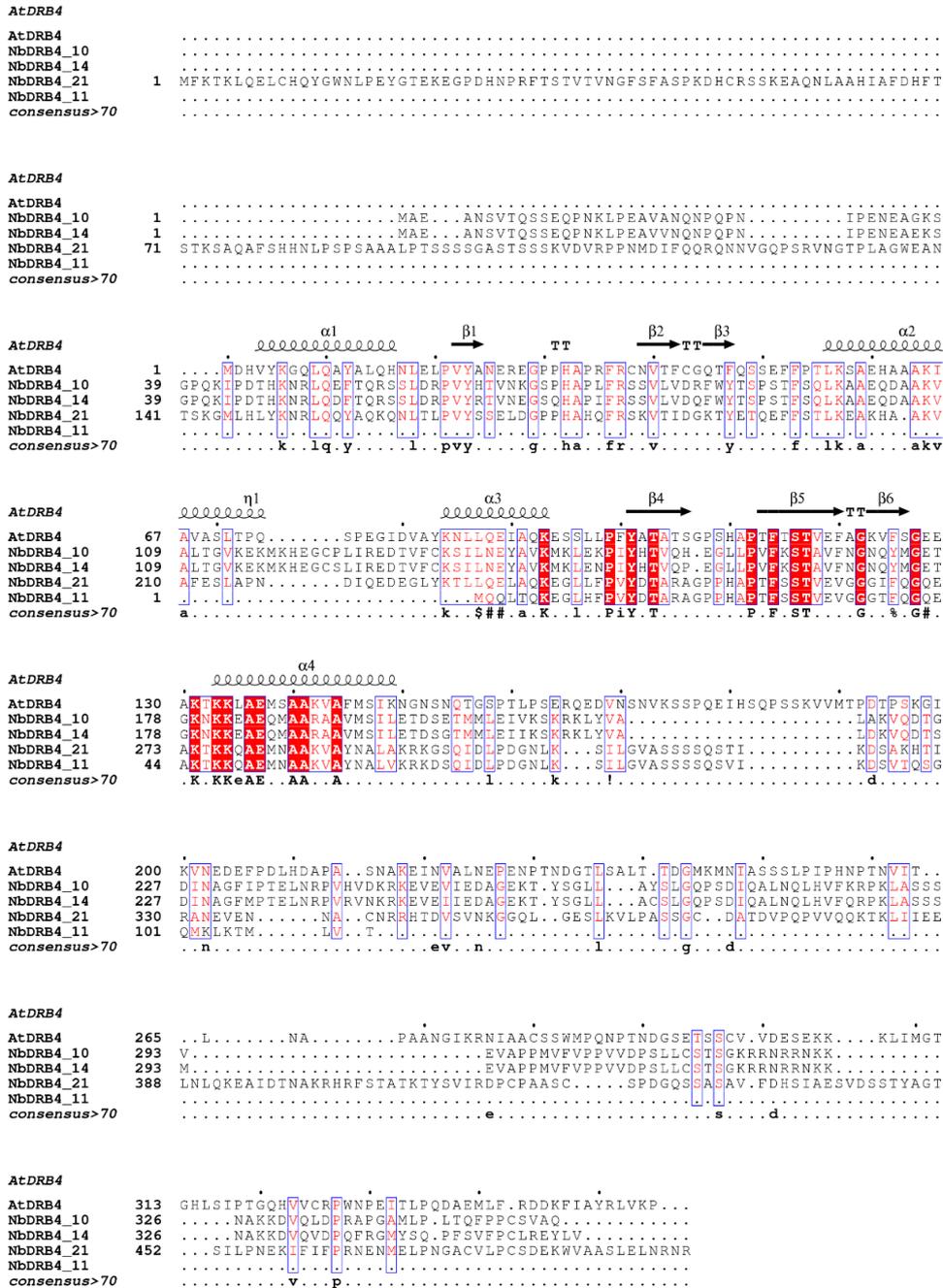
SenGupta, D.J., Zhang, B., Kraemer, B., Pochart, P., Fields, S., and Wickens, M. (1996). A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93, 8496 LP – 8501.

Singh, J., Mishra, V., Wang, F., Huang, H.-Y., and Pikaard, C.S. (2019). Reaction Mechanisms of Pol IV, RDR2, and DCL3 Drive RNA Channeling in the siRNA-Directed DNA Methylation Pathway. *Mol. Cell* 75, 576-589.e5.

Taliansky, M.E., Brown, J.W.S., Rajamäki, M.L., Valkonen, J.P.T., and Kalinina, N.O. (2010). Involvement of the plant nucleolus in virus and viroid infections: parallels with animal pathosystems. *Adv. Virus Res.* 77, 119–158.

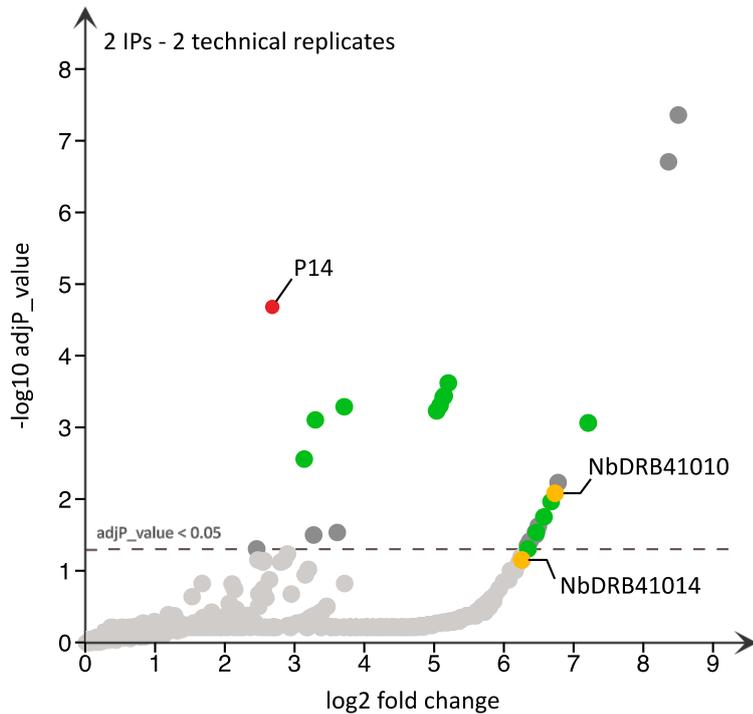
Walsh, D., and Mohr, I. (2011). Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nat. Rev. Microbiol.* 9, 860–875.

Zheng, L., Du, Z., Lin, C., Mao, Q., Wu, K., Wu, J., Wei, T., Wu, Z., and Xie, L. (2015). Rice stripe tenuivirus p2 may recruit or manipulate nucleolar functions through an interaction with fibrillarin to promote virus systemic movement. *Mol. Plant Pathol.* 16, 921–930.



Supplementary Figure 1: *Nicotiana benthamiana* and *Arabidopsis thaliana* DRB4 protein sequences alignment

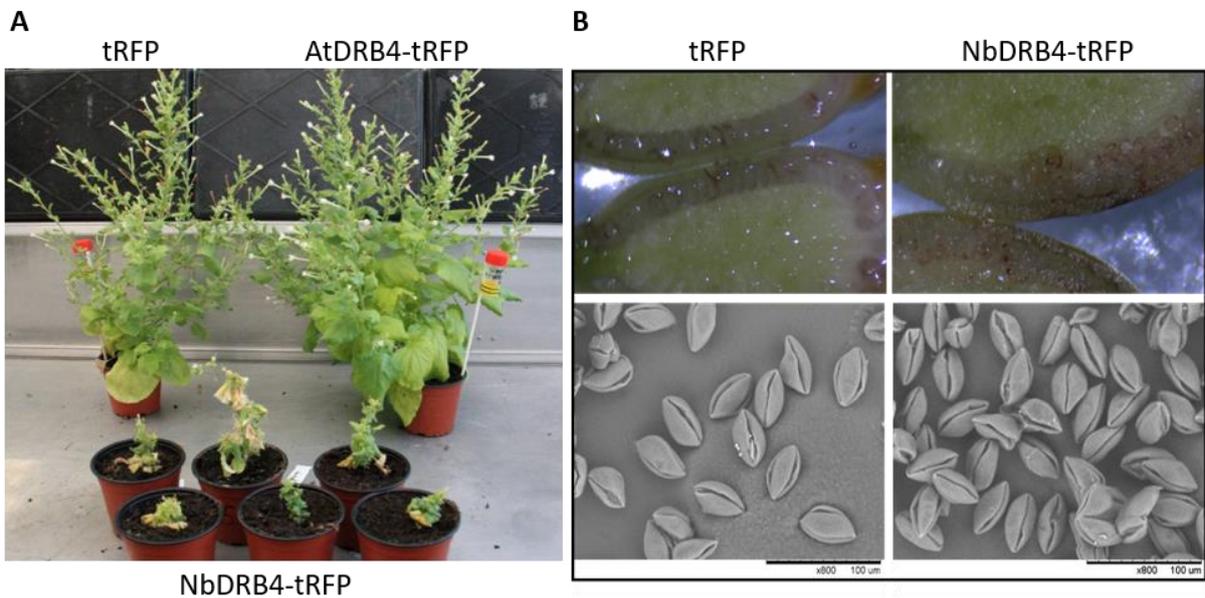
The four DRB4 protein sequences of *N. benthamiana* were aligned with DRB4 from *A. thaliana* using ESPrnt3.0 software. AtDRB4 refers to as DRB4 from *A. thaliana*. NbDRB4_10 (Niben101Scf06376g01010), NbDRB4_14 (Niben101Scf09861g01014), NbDRB4_21 (Niben101Scf05841g01021) and NbDRB4_11 (Niben101Scf05841g01011) refer to DRB4 protein from *N. benthamiana* with their accession number indicated here in brackets. The consensus sequence is indicated at the bottom of sequence alignment. Amino-acids conserved at 100 % are highlighted in red and indicated in capital letters in the consensus sequence, whereas those conserved at 70 % are written in red and indicated in lowercase letters in the consensus sequence. # represents N (asparagine), D (aspartic acid), Q (glutamine) or E (glutamic acid) ; \$ L (leucine) or M (methionine) ; % F (phenylalanine) or Y (tyrosine) and ! V (valine) or I (isoleucine) amino acids conservation in the consensus sequence. Alpha helix and beta strands composing DRB4 dsRBD (double-stranded RNA binding domain) from *A. thaliana* are depicted at the top of sequence alignment.



- P14 (Bait)
- Other proteins (adjP_value > 0.05)
- Other proteins (adjP_value < 0.05)
- Double-stranded RNA binding 4 (DRB4)
- Ribosomal proteins

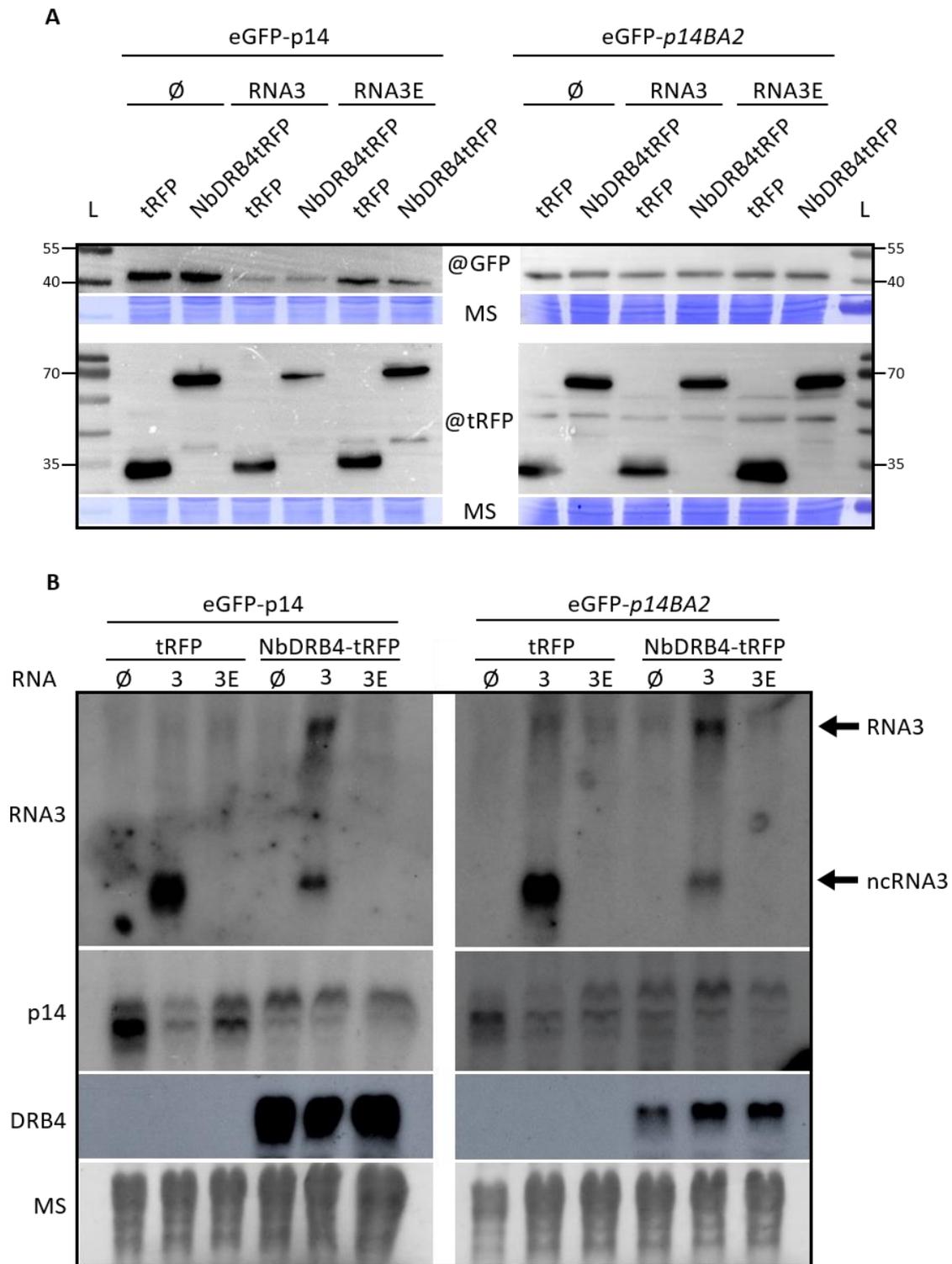
Supplementary Figure 2: Mass spectrometry data from ectopic IP performed on agroinfiltrated Flag-p14 *Nicotiana benthamiana*

Volcano plot representation showing the enrichment of proteins co-purified with FLAG-p14. The dashed line indicates the threshold above which proteins are significantly enriched (adjusted p value < 0.05, quasi-likelihood negative binomial generalized log-linear model).



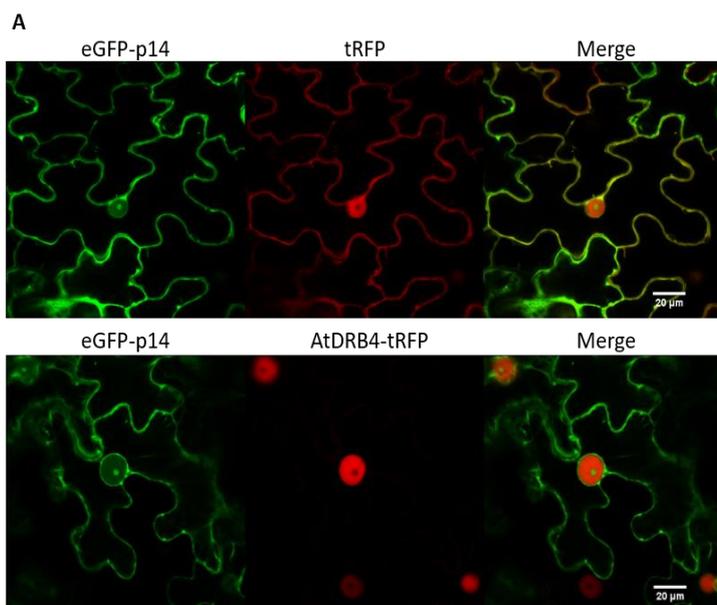
Supplementary Figure 3: Phenotypes of transgenic *Nicotiana benthamiana* overexpressing AtDRB4-tRFP and NbDRB4-tRFP fusion proteins

A) *Nicotiana benthamiana* plants expressing tRFP (upper panel, left), AtDRB4-tRFP (upper panel, right) do not present growth and reproductive defects while those expressing NbDRB4-tRFP (lower panel) are dwarfs and sterile. B) Flowers from transgenic *N. benthamiana* overexpressing tRFP as a control and NbDRB4-tRFP were dissected to observe ovules (upper panel) and pollen (lower panel) with scanning electron microscope.



Supplementary Figure 4: Molecular analyses of proteins and RNA accumulation in *Nicotiana benthamiana* leaves expressing eGFP-p14 or eGFP-p14BA2 and NbDRB4-tRFP, in the presence of RNA3 or RNA3E

Proteins (A) and RNA (B) extracted from *N. benthamiana* transiently expressing eGFP-p14 or eGFP-p14BA2 and tRFP or NbDRB4-tRFP and RNA3 or RNA3E were analysed by western blot and northern blot respectively. Antibodies and specific probes used for detection are indicated. RNA3 and ncRNA3 are shown by arrows on the right. Molecular weights (kDa) are indicated in A). MS, membrane staining; L, ladder.

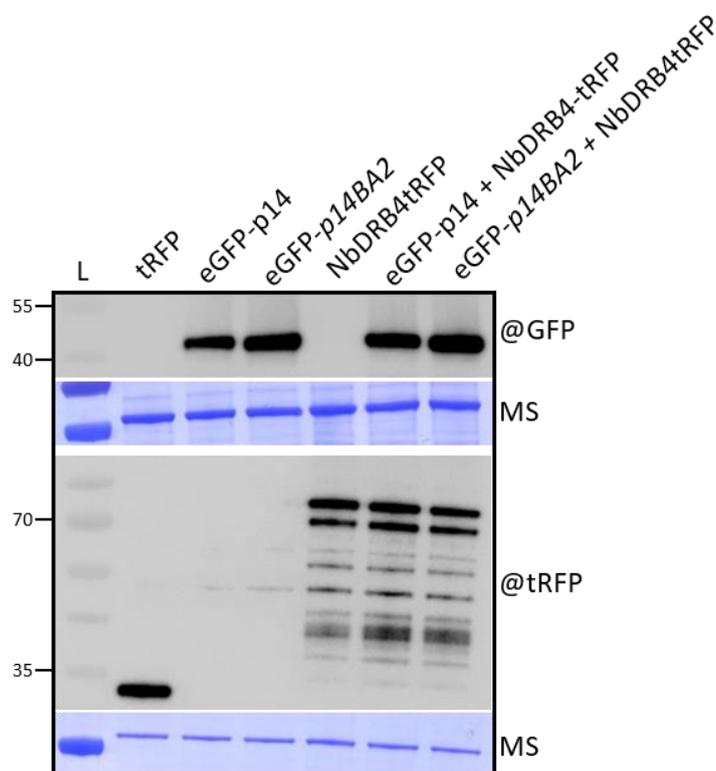


B

	FRET efficiency (%)	
	Rep 1	Rep 2
eGFP-p14 + AtDRB4-tRFP	-2,1 %	3,9 %

Supplementary Figure 5: Colocalization and interaction assay of eGFP-p14 and AtDRB4-tRFP

A) Transiently expressed eGFP-p14 and tRFP (upper panel) or AtDRB4-tRFP (lower panel). Observations are performed three days post-infiltration on a confocal microscope. Scale bars are indicated. B) FRET efficiency (%) was determined for two independent experiments (Replicate, Rep). No interaction is shown by a yellow background.



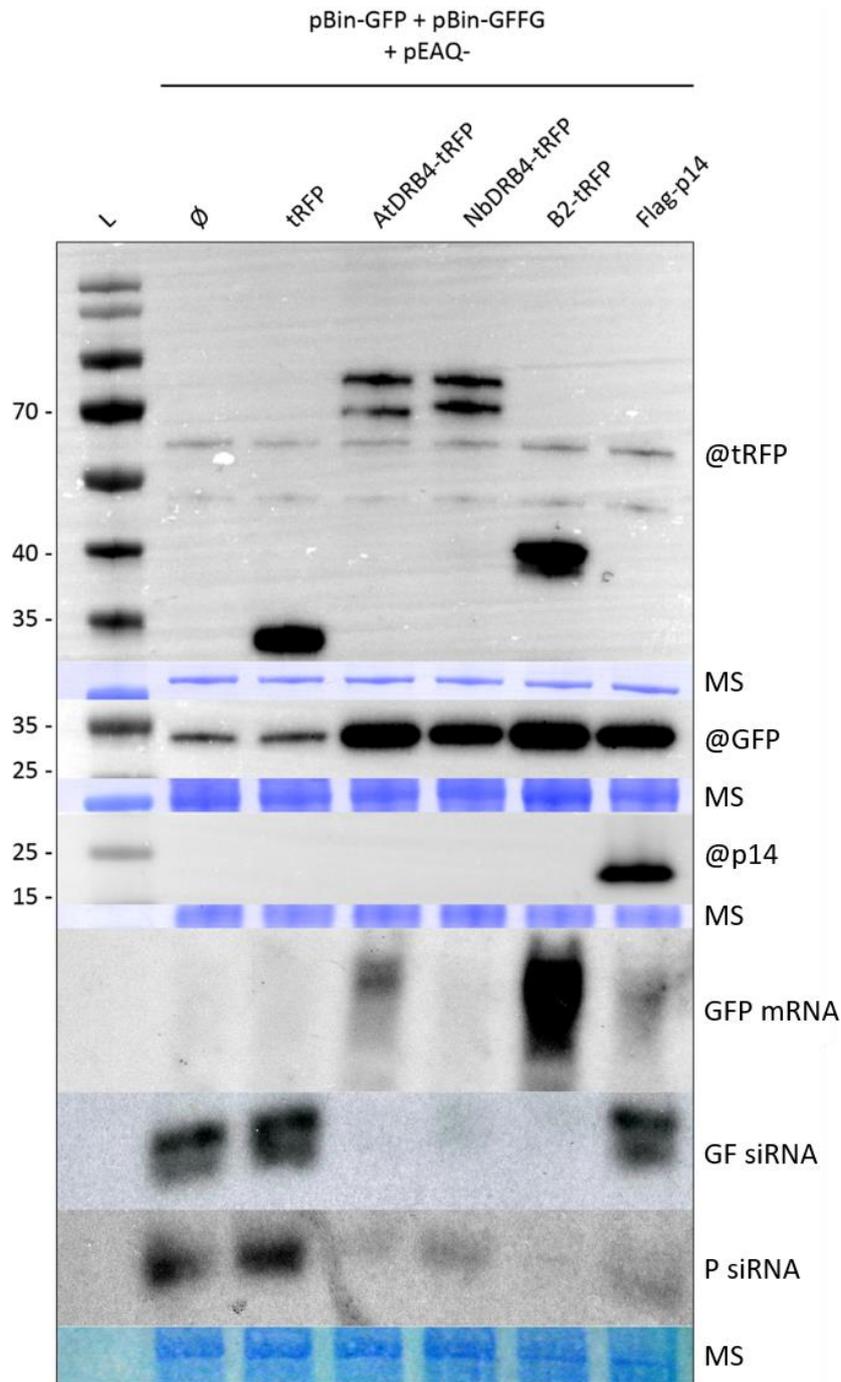
Supplementary Figure 6: Protein accumulation in RDR6i *Nicotiana benthamiana* leaves expressing eGFP-p14 or eGFP-p14BA2 and NbDRB4-tRFP

Proteins extracted from *N. benthamiana* transiently expressing eGFP-p14 or eGFP-p14BA2 and tRFP or NbDRB4-tRFP were analysed by western blot. Antibodies used for detection are indicated. Molecular weights (kDa) are indicated. MS, membrane staining; L, ladder.

	FRET efficiency (%)		
	eGFP-p14	eGFP-p14BA2	NbDRB4-eGFP
NbFib-tRFP +	-1,2 %	-3,1 %	-1,6 %

Supplementary Figure 7: Interaction assay between fibrillarlin and p14, p14BA2 and NbDRB4 transiently expressed in *Nicotiana benthamiana*

FRET efficiencies (%) were determined in leaves co-expressing NbFib-tRFP and eGFP-p14, eGFP-p14BA2 or NbDRB4-eGFP. Observations were performed three days post-infiltration. The absence of interaction is shown by a yellow background. For each condition, 20 to 25 nuclei were analysed.



Supplementary Figure 8: NbDRB4 suppresses GFP silencing in *Nicotiana benthamiana* GFP reporter assay

Agrobacterium mediated the transient expression of GFP (pBin-GFP), GFFG (pBin-GFFG) and empty vector (pEAQ-Ø) or ensuring the expression of a (potent) silencing suppressor were infiltrated in *N. benthamiana*. Samples were harvested at 3 dpi and analysed for protein accumulation by western blot, GFP messenger RNA by high molecular weight northern blot and siRNA by low molecular weight northern blot. The GFP silencing is monitored by GFP protein, GFP mRNA and GF and P siRNA accumulation levels. Antibodies and probes employed are indicated on the right. Molecular weights (kDa) are indicated on the left. MS, membrane staining; L, ladder.

4. Conclusions et discussion

Conclusions et discussion

4.1. Conclusions

Les objectifs de ces travaux de thèse étaient de préciser le mode d'action de la protéine p14, le VSR du BNYVV et de clarifier la complémentation apportée par l'ARN3 non-codant. Pour l'étudier, *N. benthamiana* a été majoritairement utilisée en raison de son mimétisme particulier vis à vis de l'infection virale qu'elle offre par rapport à l'hôte naturel, *Beta vulgaris*. En effet, l'ARN3 reste indispensable pour assurer l'infection systémique sur la betterave, une situation retrouvée chez *N. benthamiana* infectée par le mutant hypomorphe *p14BA2*, incapable d'assurer le mouvement viral à longue distance et partiellement complémenté par l'ARN3.

Parmi les approches mises en œuvre pour identifier de potentiels partenaires associés à p14, l'expression transitoire de la protéine Flag-p14 suivie de son immunoprécipitation couplée à la spectrométrie de masse a permis d'identifier la protéine DRB4 de *N. benthamiana* (NbDRB4), une protéine impliquée dans le mécanisme d'interférence par l'ARN chez *Arabidopsis thaliana*. Cependant, les efforts déployés pour confirmer cette interaction p14-NbDRB4 n'ont pas abouti. L'exclusion nucléolaire de p14 en présence de NbDRB4 n'a pas permis de valider leur interaction par FRET-FLIM. Lors des expériences de double hybride, une interaction entre p14 et NbDRB4 est observée sur un milieu peu stringent uniquement. Par contre, ces approches expérimentales ont révélé une interaction de NbDRB4 avec la version hypomorphe *p14BA2* dans les nucléoles des cellules de *N. benthamiana*. Compte tenu de la complémentation de ce mutant *p14BA2* par l'ARN3 (Flobinus et al., 2016), nous avons étudié l'effet de l'ARN3 sur cette interaction. Nous avons montré que cette interaction *p14BA2*-NbDRB4 est spécifiquement inhibée par une accumulation d'ARN3nc, alors qu'elle est maintenue en présence d'un ARN3 incapable de conduire à l'accumulation d'un ARN3nc (ARN3E). Cette spécificité pourrait s'expliquer par leur localisation subcellulaire distincte, *i.e.* cytoplasmique pour l'ARN3 génomique et nucléaire pour l'ARN3nc. Bien que ces deux ARN comportent la séquence Coremin, seul l'ARN3nc dispose du motif en position 5' proximale et dans une conformation structurale distincte de celle présente sur l'ARN génomique (D. Gilmer, communication personnelle). Le contact entre *p14BA2* et la séquence Coremin

pourrait perturber l'interaction *p14BA2*-NbDRB4, laissant le VSR hors d'un complexe où il serait séquestré. Ces éléments nous permettent de proposer un modèle pour une situation mise en place chez l'hôte naturel où la protéine p14 serait protégée d'une séquestration par DRB4 grâce à l'intervention de l'ARN3nc. Dans ce modèle, les mécanismes d'adressage de p14 et de l'ARN3nc aux noyaux/nucléoles restent toutefois méconnus.

En parallèle, les recherches visant à identifier les partenaires viraux et cellulaires de la protéine p14 en contexte d'infection n'ont pas abouti car la réalisation des immunoprécipitations est restée une étape limitante. Comme alternative, et à la suite de la caractérisation de DRB4 dans les IP réalisées lors de l'expression transitoire de p14, de multiples stratégies d'expression ont été déployées. En particulier, l'étude de l'interaction p14(*BA2*)-NbDRB4 en contexte viral a consisté à réaliser une infection par le BNYVV exprimant la protéine de fusion eGFP-p14(*BA2*) à l'aide du réplicon 3 et la protéine de fusion NbDRB4-tRFP à l'aide du réplicon 5. Pour le moment, la stratégie de clonage conventionnel utilisée n'a pas permis d'obtenir les clones désirés dans le réplicon 5. Initiés en fin de doctorat, ces clonages n'ont pas abouti et il sera primordial de trouver un moyen pour exprimer ces versions fluorescentes en contexte viral. En effet, cette stratégie pourrait s'avérer cruciale dans la validation des localisations subcellulaires et des interactions protéines-protéines établies en dehors du contexte viral. Des techniques de clonages plus adaptées seront déployées (GoldenGate, Gateway, Gibson assembly) et de nouvelles stratégies envisagées, notamment celles permettant de fusionner des étiquettes de taille réduites aux protéines p14 et NbDRB4 (split-GFP tripartite par exemple).

Pour compléter ce projet, des lignées transgéniques de *N. benthamiana* surexprimant NbDRB4 (fusionnée à l'eGFP ou à la tRFP) ont été générées. L'obtention de ces plantes avait deux objectifs principaux. Les versions NbDRB4-eGFP étaient surtout dédiées à l'immunoprécipitation de la protéine NbDRB4 pour identifier ses partenaires associés, en absence et en présence d'une infection virale par le BNYVV. Encore cultivées *in vitro* durant le premier confinement, mon passage au laboratoire autorisé à raison d'une demi-journée par semaine ne m'a pas permis de sauver ces plantes d'une infection fongique. Ces lignées ont malheureusement été perdues. Les plantes surexprimant la tRFP seule et NbDRB4-tRFP ont survécu et ont été mises en terre. Au terme des processus de sélection, neuf plantes « adultes » ont été obtenues : elles présentaient un phénotype de nanisme sévère et étaient

stériles. Ces plantes étaient destinées à être infectées par le BNYVV exprimant les versions fluorescentes eGFP-p14 et eGFP-*p14BA2* par l'intermédiaire du réplicon 3 afin de confirmer les expériences de colocalisation et d'interaction par FRET-FLIM en contexte viral. Là encore, ce projet s'est avéré être rapidement abortif en raison de l'absence de graines générées par ces plantes transgéniques. Les plantes surexprimant AtDRB4-tRFP et tRFP présentaient un phénotype de type sauvage avec une production de graines abondantes. Aux vues de ces données, il est possible que la surexpression de la protéine NbDRB4 dans *N. benthamiana* provoque un effet dominant négatif non compensé par la version génique sauvage et/ou un effet toxique du transgène. Nos connaissances limitées sur les protéines de *N. benthamiana* (dont DRB4) nous limitent dans la formulation d'hypothèses quant à la stérilité des plantes observées.

4.2. Discussion

La caractérisation des fonctions des protéines DRB4 de *N. benthamiana* représente l'un des axes prioritaires nécessaires à la compréhension des mécanismes de régulation des voies de l'interférence par l'ARN. Lors de cette thèse, en parallèle des expériences de surexpression de NbDRB4 dans des plantes transgéniques, des expériences d'extinction de l'expression de NbDRB4 par des approches de VIGS suivies d'une infection par le BNYVV ont été initiées. Les extinctions de l'expression de NbDRB4 et de phytoène désaturase (PDS) ont été réalisées dans des plantes de *N. benthamiana* sauvages et celles de la GFP dans des plantes transgéniques 16C. L'expérience de VIGS de la PDS n'a pas permis l'établissement d'une infection virale par le BNYVV contrairement aux travaux décrits par Flobinus *et al.* (Flobinus *et al.*, 2018). Cette absence d'infection n'est pas liée à l'inoculum puisqu'une majorité des plantes pour lesquelles l'expression de NbDRB4 était éteinte ont été infectées. Cependant, dans mes conditions, l'inhibition de l'expression de la PDS a entraîné un nanisme et probablement affecté le métabolisme, et par la même occasion perturbé l'établissement de l'infection par le BNYVV. Aucune conclusion ne peut être émise sur le rôle pro/antivirale de NbDRB4 suite à l'absence totale d'infection avec les ARN 1+2 et 1+2+3 et 1+2+3E dans ces plantes contrôles (PDS *silencée*). Pour disposer d'un contrôle permettant de conclure sur nos résultats, l'extinction de l'expression de la GFP a été conduite dans des plantes 16C en parallèle du VIGS de NbDRB4. Les niveaux d'accumulation des protéines virales et des ARN viraux restent à

analyser. Toutefois, aucune différence phénotypique d'infection virale n'a pu être observée dans les deux conditions de VIGS (GFP et NbDRB4). Les analyses moléculaires sont en cours et restent indispensables pour vérifier la mise en place et le maintien du *silencing* mais aussi pour comparer les niveaux d'infection virale.

Pour poursuivre la caractérisation fonctionnelle de NbDRB4, des expériences de complémentation ont été menées en tirant profit à la fois du rôle bien décrit de DRB4 d'*A. thaliana* dans la biogenèse des ta-siARN et de la disponibilité de lignées mutantes *drb4* d'*A. thaliana*. De surcroît, des lignées *dcl4*, *drb4/dr7*, *dcl3* et Col0 ont été transformées avec NbDRB4-tRFP. De façon surprenante, la lignée *dcl4* surexprimant NbDRB4-tRFP n'a pu être obtenue, toutes les plantes transformées sont mortes. L'effet de l'expression de NbDRB4 dans les lignées *dcl4* uniquement n'est pour l'instant pas expliqué. Certaines plantes transformées des lignées Col0 présentent un phénotype de retard de croissance, des tiges frêles alors que les lignées *drb4*, *drb4/dr7* et *dcl3* ne semblent pas affectées par l'expression de NbDRB4-tRFP. Les lignées F2 sont en cours d'analyse pour vérifier l'expression de NbDRB4-tRFP et étudier les niveaux d'accumulation des ta-siARN dans les inflorescences de ces différentes lignées. L'existence ou non d'une complémentation pourrait permettre d'orienter la fonction de DRB4 associée ou non à DCL4 chez *N. benthamiana*.

Les études sur la localisation subcellulaire de l'ARN3 et de l'ARN3nc devront être poursuivies. En effet, la détection de l'ARN3nc dans le noyau s'est révélée particulièrement pertinente. Les analyses de fractionnement seront répétées afin d'étudier la localisation des ARN en présence du mutant *p14BA2* qui ne se déplace pas à longue distance sans l'ARN3nc. Comme l'efficacité de cette complémentation se situe entre 25 et 45 % (Flobinus et al., 2016), une dizaine de plantes sera infectée pour étudier la localisation des ARN3 et ARN3nc dans les feuilles inoculées et apicales (des plantes symptomatiques). Un défaut de localisation de l'ARN3nc en présence de la version hypomorphe *p14BA2* pourrait expliquer le phénotype de ce mutant.

La localisation nucléaire de l'ARN3nc représente de nouvelles perspectives de recherches. Le mouvement du cytoplasme vers le noyau des petits ARN associés à AGO4 et impliqués dans le RdDM est décrit (Ye et al., 2012). De même, certains ARN de transfert rejoignent le compartiment nucléaire où un niveau supplémentaire de contrôle qualité est effectué

(Kramer and Hopper, 2013). L'import nucléaire des virus à ARN (*e.g.* Influenza) ou à ADN (*e.g.* Adenovirus) repose principalement sur l'interaction entre les complexes ribonucléoprotéiques (RNP) viraux ou les particules virales et les importines et/ou les nucléoporines de l'hôte (pour revue, voir (Cohen et al., 2011)). Les virus à ADN profitent de cet adressage nucléaire pour se répliquer et/ou se maintenir sous la forme d'épisome (*Herpesviridae*) ou de minichromosome (CaMV, hépatite B). Le virus influenza profite de l'adressage nucléaire des RNP pour se répliquer. Dans le cas du BNYVV, l'intérêt de l'adressage nucléaire de l'ARN3nc reste incertain. Il pourrait influencer l'interaction p14-NbDRB4 mais les mécanismes régissant son transport restent à déterminer. Son interaction spécifique avec la protéine p14 et aspécifique avec la protéine NbDRB4 pourrait lui permettre de rejoindre ce compartiment *via* l'adressage nucléaire/nucléolaire de ces deux protéines.

L'intérêt de l'adressage nucléolaire de la protéine p14 est aussi confus. Un signal de localisation nucléolaire (NoLS) présent sur la protéine p14 assure son import (Chiba et al., 2013) mais aucune protéine cellulaire (importine etc.) n'a pour l'instant été impliquée dans ce mécanisme. Le nucléole est fonctionnellement associé à la synthèse des ARN ribosomiaux et à la biogenèse des ribosomes. De nombreuses fonctions supplémentaires ne cessent d'être caractérisées (pour revue, voir (Kalinina et al., 2018) qui corrélient avec la connaissance croissante du protéome nucléolaire (Montacié et al., 2017). Chez les plantes, le nucléole est désormais associé aux mécanismes de surveillance, modifications et métabolismes des ARN. Certaines voies de signalisation et de défense en réponse aux stress ainsi que les mécanismes de réparation de l'ADN et de stabilité génomique sont dépendants de fonctions nucléolaires. De nombreuses protéines associées au *RNA silencing* et assurant la biogenèse des ta-siARN, miARN et hc-siARN (*heterochromatic siRNA*) ont été observées à la périphérie nucléolaire (Pontes et al., 2013). La localisation nucléolaire de p14 ne semble pas liée à sa fonction de suppression de *silencing* (Chiba et al., 2013), bien que cette conclusion soit plus mitigée suite aux travaux présentés dans ce manuscrit. L'interaction entre la protéine p14 et de nombreuses protéines ribosomales identifiées lors des expériences de co-immunoprécipitation pourrait expliquer cette localisation. Nous n'avons pas choisi d'explorer cette piste en raison des fonctions essentielles de ces protéines et des limitations génétiques liées à l'utilisation de *N. benthamiana*. De plus, il reste envisageable que ces protéines ribosomales reflètent le détournement massif de la machinerie traductionnelle et ne

représentent pas de réels interactants de la protéine p14. Ces protéines ribosomales sont en effet souvent trouvées associées à des protéines virales lors d'expériences d'IP et pourraient représenter un artefact expérimental (Marco Incarbone et Hélène Scheer, communications personnelles). De nombreuses descriptions de protéines virales adressées aux nucléoles sont publiées. Certaines d'entre elles ont une fonction associée au cycle viral qui dépend le plus souvent de la protéine majoritaire du nucléole, la fibrillarine. Son action provirale est particulièrement bien décrite lors d'une infection par le GRV. La protéine virale ORF3 relocalise la fibrillarine dans le cytoplasme où elle participe à la formation des RNP virales (Canetta et al., 2008). La protéine TGB1 du BSMV (barley stripe mosaic virus) et la fibrillarine interagissent et co-localisent au niveau des plasmodesmes et les ARN viraux sont associés à ce complexe TGB1-Fibrillarine (Li et al., 2018). La fibrillarine est ainsi détournée de son compartiment cellulaire pour favoriser la formation de complexe ribonucléoprotéique viraux, assurant le mouvement viral de cellule à cellule puis à longue distance (Kim et al., 2007). D'autres protéines virales interagissent avec la fibrillarine sans induire sa relocalisation cytoplasmique et la perturbation de ces interactions affecte le mouvement viral systémique (Zheng et al., 2015), diminue l'accumulation des ARN viraux et les symptômes d'infection (Wang et al., 2012). Dans nos travaux, aucune interaction entre p14(BA2) et la fibrillarine de *N. benthamiana* (NbFib) n'a été détectée, ni entre NbDRB4 et NbFib (FRET-FLIM). Toutefois, en raison de la polyvalence fonctionnelle du nucléole, de multiples possibilités restent envisageables et pourraient expliquer l'adressage nucléolaire de la protéine p14.

Il sera également intéressant de poursuivre les observations microscopiques pour étudier une éventuelle relocalisation de NbDRB4 lors d'une infection par le BNYVV. Des observations similaires ont permis d'associer une activité antivirale aux protéines DRB2, DRB3 et DRB5 de *N. benthamiana* et d'*A. thaliana*. Ces relocalisations subcellulaires ne sont pas toujours observées et certains résultats contradictoires sont décrits, notamment sur la relocalisation de AtDRB4 en fonction des virus étudiés (Barton et al., 2017; Incarbone et al., 2020b; Jakubiec et al., 2012). Aucun effet de l'expression ectopique de p14, p14BA2 et de l'ARN3 n'a été observé sur la localisation de NbDRB4. Ceci pourrait être lié à sa surexpression. L'étude d'une telle relocalisation n'a pas pu être poursuivie en contexte infectieux suite à la mort et à la stérilité des lignées transgéniques NbDRB4-eGFP et NbDRB4-tRFP et avec lesquelles des infections par le BNYVV auraient pu être initiées. Comme alternative, des plantes de

N. benthamiana infectées par diverses combinaisons d'ARN viraux (1+2 vs. 1+2+3) seront infiltrées pour exprimer NbDRB4-tRFP sur les feuilles infectées afin d'évaluer sa (re)localisation subcellulaire.

Des expériences de production et de purification de la protéine NbDRB4 étiquetée avaient été initiées et nous ont permis de sélectionner la souche bactérienne ainsi que les conditions de production. Faute de temps, les essais biochimiques concernant NbDRB4 ont été stoppés à ce niveau. Cette protéine sera produite en plus grande quantité pour initier la production d'anticorps spécifiques et pour vérifier et étudier sa capacité de liaison aux acides nucléiques (par des tests d'EMSA). Les expériences de tests d'interaction ARN/protéine en triple hybride de levure ont déjà montré l'interaction non spécifique de NbDRB4 pour les ARN. A l'aide de la protéine purifiée, des sites d'interactions potentiels avec l'ARN3 et/ou l'ARN3nc pourraient être recherchés et soumis à divers compétiteurs (protéine p14 et *p14BA2*). La purification de la protéine p14 reste problématique puisqu'elle a tendance à produire des agrégats. Sa co-production avec NbDRB4 pourrait être envisagée dans *E. coli* afin de favoriser la stabilité et/ou la solubilité de p14. Par exemple, la co-expression de protéines associées au sein d'un complexe a été employée pour produire les protéines VirE1 et VirE2 d'*A. tumefaciens* impliquées dans le transfert du T-DNA (Romier et al., 2006).

Des approches biochimiques similaires à celles menées chez *A. thaliana* et ayant permis de caractériser la protéine DRB4 puis le complexe DCL4/DRB4 pourraient être envisagées. Les travaux effectués sur *A. thaliana* pour étudier l'interaction entre DRB4 et DCL4 sont pour le moment difficilement transposables à *N. benthamiana*. La génétique de cette solanacée complique la génération de lignées mutantes et il n'existe pas d'anticorps permettant de détecter la version endogène de NbDRB4. Des travaux sur NbDCL4 seront aussi initiés pour tester sa co-localisation et son interaction avec NbDRB4. Les RT-PCR entreprises pour produire un ADNc de NbDCL4 n'ont pas abouti et la conception des amorces est compliquée par l'annotation du génome de *N. benthamiana* et de ses différentes versions géniques. La commande du gène synthétique de NbDCL4 constituerait une alternative afin de poursuivre la caractérisation d'un complexe DCL4/DRB4 et des protéines virales chez *N. benthamiana*. De plus, la création d'une lignée KO NbDRB4 est envisagée par la stratégie CRISPR/Cas9 maîtrisée à l'IBMP. Ce mutant KO (Δ NbDRB4) sera complété par une version étiquetée

de NbDRB4 pour initier des immunoprécipitations en vue d'identifier ses partenaires. L'identification des protéines ainsi associées à NbDRB4 permettrait de proposer une orientation fonctionnelle à NbDRB4. Cette approche d'immunoprécipitation couplée à la spectrométrie de masse pourra être étendue en contexte d'infection pour rechercher des protéines virales associées à NbDRB4. En plus, divers essais de complémentation pourront être menés dans ces plantes Δ NbDRB4. Les deux domaines de liaison aux ARN double brin (dsRBD) de NbDRB4 ont été prédits (Chapitre 2, **Supplementary figure 1**) et leur fonctionnalité pourra être évaluée par des expériences d'échanges de domaines, comme cela a déjà été réalisé pour caractériser les dsRBD de DRB1 et DRB2 d'*A. thaliana* (Reis et al., 2016). De plus, nous pourrions envisager des essais de complémentation de telles plantes à l'aide des protéines DRB4 de *Beta*.

Les plantes DCLi sont désormais caractérisées chez *N. benthamiana* (Katsarou et al., 2019). Les plantes DCL4i pourront être utilisées pour poursuivre les observations confocales et les études d'interaction. Les plantes DCL4i ont démontré l'action antivirale de DCL4 dans *N. benthamiana*, dont la fonction paraît redondante à celle de DCL2. Ces plantes DCL4i et Δ NbDRB4 permettraient de confirmer l'existence d'un complexe NbDRB4/NbDCL4 et d'en étudier la fonction dans le cycle viral du BNYVV.

Les mécanismes régissant le transport de l'ARN3nc sont inconnus. Comme p14 interagit avec la séquence Coremin, il est envisageable qu'un complexe p14-ARN3nc rejoigne le noyau grâce à cette interaction. Cet élément seul ne permet pas d'expliquer la localisation nucléaire de l'ARN3nc puisque la séquence Coremin est aussi présente sur l'ARN3. Un ou plusieurs éléments supplémentaires semblent nécessaires pour discriminer l'ARN3 qui reste cytoplasmique de l'ARN3nc nucléaire. Un premier élément de réponse pourrait être apporté en considérant que le BNYVV est majoritairement présent sous forme de RNP dans les cellules et qu'il assure son mouvement de cellule à cellule et aussi à longue distance sous cette forme. Des travaux sont en cours au laboratoire dont le but est d'identifier des interactions ARN-ARN entre les segments du BNYVV qui pourraient former et maintenir un tel complexe (Mattia Dall'Ara, Réjane Helfer). La région en 5' de l'ARN3 semble impliquée dans l'interaction avec l'ARN2 et l'ARN2 interagit avec l'ARN1. Ce réseau d'interactions exclut l'ARN3nc de la formation des RNP, maintient les ARN génomiques et évite aux ARN2 subgénomiques et aux non-codants de rejoindre un tel complexe où la perte d'information génétique serait délétère

pour le virus. Pour que l'ARN3nc puisse être transporté activement dans le noyau et vienne perturber l'interaction p14-NbDRB4, on ne peut pas exclure l'implication d'une protéine virale et/ou cellulaire de la plante hôte dans ce mouvement. Pour vérifier cette hypothèse, des expériences supplémentaires de localisation de l'ARN3 et de l'ARN3nc sont en cours. Ces travaux consistent à exprimer les ARN3 et ARN3nc dans les levures, en présence ou non des protéines virales à tester et de déterminer leur localisation après un fractionnement subcellulaire. Aussi, ces expériences pourront être transposées à des plantes de *N. benthamiana* surexprimant la protéine p14 et l'ARN3 ou l'ARN3E. Les mécanismes de *RNA silencing* et de dégradation des ARN (NMD par exemple) apparaissent de plus en plus interdépendants. Bien que la première ligne de défense antivirale soit assurée par le *silencing*, les voies de dégradation des ARN procurent elles aussi une protection antivirale (pour revue, voir (Li and Wang, 2019)). A ce titre, si la sous-expression de l'exoribonucléase XRN4 favorise l'infection par de nombreux virus (Jaag and Nagy, 2009; Jiang et al., 2018; Peng et al., 2011), elle réduit drastiquement celle par le BNYVV (Flobinus et al., 2018). Le rôle de XRN4 dans la formation de l'ARN3nc du BNYVV est bien établi, mais son devenir au niveau de la séquence Coremin reste incertain. L'enzyme pourrait rester complexée à l'ARN3nc à l'instar des sfRNA (Chapman et al., 2014) et son maintien en association à l'ARN3nc pourrait participer à l'import nucléaire de ce dernier. En effet, la distribution nucléo-cytoplasmique de XRN4 de *N. benthamiana* implique son import nucléaire (Li and Wang, 2018) et de ce fait, pourrait assurer le transport entre autres de l'ARN3nc vers le compartiment nucléaire.

Enfin, si l'interaction entre p14 et la séquence Coremin semble primordiale pour le mouvement systémique dans l'hôte *Beta* sp., elle pourrait à elle seule ne pas être suffisante pour maintenir une infection. Des mutants hypomorphes de la protéine p14 ont été testés pour leur interaction avec la séquence Coremin par triple hybride de levures. Parmi eux, le mutant *p14BA3* n'interagit pas avec la séquence Coremin mais est infectieux sur *N. benthamiana* en absence de l'ARN3 et assure le mouvement systémique viral sur *Beta* en présence de l'ARN3 (Chiba et al., 2013). Ainsi, l'étude approfondie de ce mutant pourrait apporter des données supplémentaires sur la fonction du VSR p14 et des mécanismes de complémentation par l'ARN3nc associés. Des expériences préliminaires de localisation confocale et de tests d'interaction par FRET-FLIM ont montré des résultats identiques à ceux exposés pour la protéine p14 WT. La localisation nucléolaire de l'eGFP-*p14BA3* est

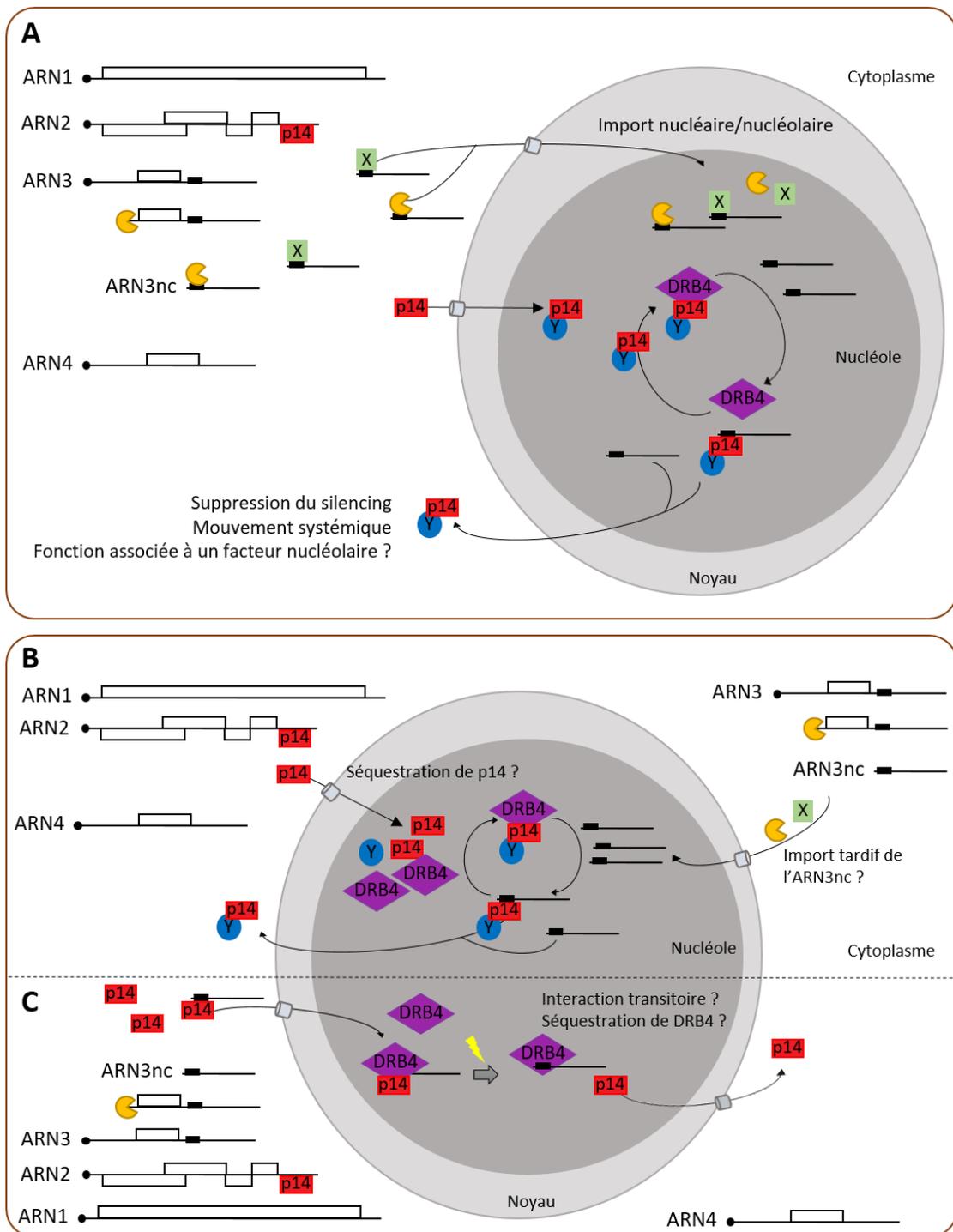


Figure 18 : Modèles fonctionnels de la protéine p14 et de l'ARN3nc dans l'hôte *Beta*

Les ARN viraux 1 à 4 du BNYVV sont représentés. La coiffe est symbolisée par une sphère noire, les cadres de lecture ouverts par les rectangles. La séquence Coremin de l'ARN3 et de l'ARN3nc est représentée par le rectangle plein noir. **A)** La protéine p14 est importée dans le nucléole grâce à son signal de localisation nucléolaire où elle serait séquestrée par DRB4. L'import de l'ARN3 non-codant (ARN3nc) serait assuré par une protéine cellulaire indéterminée (X) ou par XRN4 (pacman jaune) et permettrait de relarguer p14 par son interaction spécifique avec la séquence Coremin de l'ARN3nc. La fonction nucléolaire de p14 serait liée au recrutement d'un facteur (Y) dans ce compartiment. La protéine p14 serait exportée du noyau pour exercer sa fonction de suppresseur du *silencing*. **B)** L'import nucléolaire de la protéine p14 pourrait être plus précoce que celui de l'ARN3nc. A l'instar de la situation en A, l'ARN3nc pourrait rejoindre le compartiment nucléaire associée à X ou XRN4 et perturber l'interaction p14-NbDRB4 pré-établie. **C)** Le complexe p14-ARN3nc pourrait rejoindre le nucléole. Une interaction transitoire/flash (éclair jaune) entre p14 et NbDRB4 serait envisagée et déplacée par l'interaction entre l'ARN3nc et NbDRB4.

drastiquement réduite en présence de NbDRB4-tRFP et les deux protéines n'interagissent pas. L'ajout de l'ARN3 et de l'ARN3E n'ont aucun effet sur la localisation et l'interaction des protéines.

La banque « The *Beta vulgaris* Resource » a été interrogée avec les séquences protéiques des deux versions Niben101Scf05841g01021 et Niben101Scf06376g01010 de DRB4 de *N. benthamiana*. Pour chacune d'elle, une séquence homologue a été trouvée dans la betterave sucrière et permet d'envisager un réel intérêt à nos travaux. La betterave reste difficile à étudier. Bien que son génome soit disponible, l'utiliser comme plante modèle de laboratoire est peu envisagée. En plus, le virus exprimant la version *p14BA2* n'effectue pas d'infection systémique dans les betteraves, malgré la présence de l'ARN3nc. Ceci complique à la fois l'étude de ce mutant dans l'hôte naturel et laisse envisager une action d'autres facteurs viraux ou cellulaires spécifiques de la betterave pour asseoir l'infection virale.

4.3. Modèles envisagés dans l'hôte *Beta*

Les données générées nous permettent de proposer différents modèles d'action du suppresseur p14 et de l'ARN3nc chez l'hôte naturel *Beta* (**Fig.18**) :

1- La protéine p14 et l'ARN3nc pourraient indépendamment rejoindre le compartiment nucléolaire. Le signal de localisation nucléolaire de p14 assurerait son transport dans le nucléole où elle pourrait interagir avec DRB4. L'adressage nucléaire/nucléolaire de l'ARN3nc pourrait dépendre d'une protéine cellulaire non identifiée (X). La protéine XRN4 pourrait être impliquée dans ce mécanisme et participer à la sélection de l'ARN3nc et à son import dans le noyau. L'ARN3nc serait alors en mesure de dissocier le complexe p14-DRB4 par l'interaction spécifique entre p14 et la séquence Coremin. L'adressage nucléolaire de p14 pourrait être lié au recrutement d'une protéine (Y) pour assurer sa fonction dans ce compartiment. L'export nucléaire de p14, associée ou non à la protéine Y reste hypothétique. Voir (**Fig.18A**)

2- Comme l'expression des protéines virales et de tous les mécanismes de réplication/traduction sont hautement régulés, on pourrait envisager un modèle similaire au modèle A mais séquentiel. L'import nucléaire de l'ARN3nc, plus tardif que celui de la protéine

p14, serait assuré par les mêmes protéines X ou XRN4 et pourrait libérer p14 de son association binaire avec DRB4. Voir (**Fig.18B**)

3- L'interaction entre p14 et la séquence Coremin pourrait s'opérer dans le cytoplasme et leur import nucléaire serait ainsi simultanée. On pourrait ici imaginer une interaction transitoire entre DRB4 et p14 mais rapidement déplacée par l'interaction entre DRB4 et l'ARN3nc. En effet, si l'interaction entre p14 et l'ARN3nc semble spécifique, elle ne repose que sur l'interaction avec une vingtaine de nucléotides. En liant aspécifiquement une plus longue séquence de l'ARN3nc, DRB4 pourrait déplacer l'interaction p14-Coremin. Cette interaction DRB4-ARN3nc pourrait limiter l'action cellulaire de DRB4 et ainsi profiter au BNYVV. Voir (**Fig.18C**)

Dans ces trois modèles, l'export nucléaire de la protéine p14 est représenté et repose en partie sur l'hypothèse du recrutement d'un facteur nucléolaire. Dans les fractionnements subcellulaires réalisés, une majorité de la protéine p14 est observée dans le noyau. On peut envisager que la protéine p14 fonctionne comme une navette entre le cytoplasme et le noyau et que son accumulation soit préférentiellement nucléaire sans que l'on puisse l'expliquer pour l'instant.

Ces travaux offrent des perspectives de recherches multidisciplinaires et ambitieuses, à la fois dans le domaine de la virologie et aussi dans la compréhension de mécanismes cellulaires. A l'interface entre le *RNA silencing*, les voies de dégradation de l'ARN (avec XRN4) et la virologie fondamentale, l'étude de ce virus laisse envisager des avancées majeures dans la compréhension des cycles viraux.

5. Bibliographie

Bibliographie

- Adenot, X., Elmayan, T., Laressergues, 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.
- Aute, R., Chiliveri, S.C., Rai, U., and Deshmukh, M. V (2017). DRB4 dsRBD1 drives dsRNA recognition in *Arabidopsis thaliana* tasi/siRNA pathway. *Nucleic Acids Res.* *45*, 8551–8563.
- Bally, J., Jung, H., Mortimer, C., Naim, F., Philips, J.G., Hellens, R., Bombarely, A., Goodin, M.M., and Waterhouse, P.M. (2018). The Rise and Rise of *Nicotiana benthamiana*: A Plant for All Reasons. *Annu. Rev. Phytopathol.* *56*, 405–426.
- Balmori, E., Gilmer, D., Richards, K., Guilley, H., and Jonard, G. (1993). Mapping the promoter for subgenomic RNA synthesis on beet necrotic yellow vein virus RNA 3. *Biochimie* *75*, 517–521.
- Barton, D.A., Roovers, E.F., Gouil, Q., da Fonseca, G.C., Reis, R.S., Jackson, C., Overall, R.L., Fusaro, A.F., and Waterhouse, P.M. (2017). Live Cell Imaging Reveals the Relocation of dsRNA Binding Proteins Upon Viral Infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* *30*, 435–443.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* *431*, 356–363.
- Bouzoubaa, S., Ziegler, V., Beck, D., Guilley, H., Richards, K., and Jonard, G. (1986). Nucleotide Sequence of Beet Necrotic Yellow Vein Virus RNA-2. *J. Gen. Virol.* *67*, 1689–1700.
- Canetta, E., Kim, S.H., Kalinina, N.O., Shaw, J., Adya, A.K., Gillespie, T., Brown, J.W.S., and Taliansky, M. (2008). A Plant Virus Movement Protein Forms Ringlike Complexes with the Major Nucleolar Protein, Fibrillarin, In Vitro. *J. Mol. Biol.* *376*, 932–937.
- Chang, K.-Y., and Ramos, A. (2005). The double-stranded RNA-binding motif, a versatile macromolecular docking platform. *FEBS J.* *272*, 2109–2117.
- Chapman, E.G., Costantino, D.A., Rabe, J.L., Moon, S.L., Wilusz, J., Nix, J.C., and Kieft, J.S. (2014). The Structural Basis of Pathogenic Subgenomic Flavivirus RNA (sfrNA) Production. *Science* *344*, 307–310.
- Chiba, S., Hleibieh, K., Delbianco, A., Klein, E., Ratti, C., Ziegler-Graff, V., Bouzoubaa, S., and Gilmer, D. (2013). The benyvirus RNA silencing suppressor is essential for long-distance movement, requires both zinc-finger and NoLS basic residues but not a nucleolar localization for its silencing-suppression activity. *Mol Plant Microbe Interact* *26*, 168–181.
- Clavel, M., Pélissier, T., Montavon, T., Tschopp, M.-A., Pouch-Pélissier, 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.
- Cohen, S., Au, S., and Panté, N. (2011). How viruses access the nucleus. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1813*, 1634–1645.
- D’Alonzo, M., Delbianco, A., Lanzoni, C., Autonell, C.R., Gilmer, D., and Ratti, C. (2012). Beet soil-borne mosaic virus RNA-4 encodes a 32kDa protein involved in symptom expression and in virus transmission through *Polymyxa betae*. *Virology* *423*, 187–194.
- Denay, G., Schultz, P., Hänsch, S., Weidtkamp-Peters, S., and Simon, R. (2019). Over the rainbow: A practical guide for fluorescent protein selection in plant FRET experiments. *Plant Direct* *3*, e00189.
- Dilweg, I.W., Gultyaev, A.P., and Olsthoorn, R.C. (2019). Structural features of an Xrn1-resistant plant virus RNA. *RNA Biol.* *16*, 838–845.
- Dong, Z., Han, M.-H., and Fedoroff, N. (2008). The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate processing of pri-miRNA by DCL1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 9970 – 9975.

- 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.
- Eamens, A.L., Kim, K.W., Curtin, S.J., and Waterhouse, P.M. (2012a). DRB2 Is Required for MicroRNA Biogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* *7*, e35933.
- Eamens, A.L., Wook Kim, K., and Waterhouse, P.M. (2012b). DRB2, DRB3 and DRB5 function in a non-canonical microRNA pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal. Behav.* *7*, 1224–1229.
- Erdmann, R.M., and Picard, C.L. (2020). RNA-directed DNA Methylation. *PLOS Genet.* *16*, e1009034.
- Fang, Y., and Spector, D.L. (2007). Identification of Nuclear Dicing Bodies Containing Proteins for MicroRNA Biogenesis in Living *Arabidopsis* Plants. *Curr. Biol.* *17*, 818–823.
- Fátyol, K., Fekete, K.A., and Ludman, M. (2020). Double-Stranded-RNA-Binding Protein 2 Participates in Antiviral Defense. *J. Virol.* *94*, e00017-20.
- Fernando Gil, J., Liebe, S., Thiel, H., Lennefors, B.-L., Kraft, T., Gilmer, D., Maiss, E., Varrelmann, M., and Savenkov, E.I. (2018). Massive up-regulation of LBD transcription factors and EXPANSINS highlights the regulatory programs of rhizomania disease. *Mol. Plant Pathol.* *19*, 2333–2348.
- Flobinus, A., Hleibieh, K., Klein, E., Ratti, C., Bouzoubaa, S., and Gilmer, D. (2016). A Viral Noncoding RNA Complements a Weakened Viral RNA Silencing Suppressor and Promotes Efficient Systemic Host Infection. *Viruses* *8*.272
- Flobinus, A., Chevigny, N., Charley, P.A., Seissler, T., Klein, E., Bleykasten-Grosshans, C., Ratti, C., Bouzoubaa, S., Wilusz, J., and Gilmer, D. (2018). Beet Necrotic Yellow Vein Virus Noncoding RNA Production Depends on a 5'→3' Xrn Exoribonuclease Activity. *Viruses* *10*.137
- Flor, H.H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* *9*, 275–296.
- 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*.
- Gilmer, D., Bouzoubaa, S., Hehn, A., Guilley, H., Richards, K., and Jonard, G. (1992). Efficient cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus requires 3' proximal genes located on RNA 2. *Virology* *189*, 40–47.
- Gilmer, D., Ratti, C., and Consortium, I.R. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: *Benyviridae*. *J. Gen. Virol.* *98*, 1571–1572.
- Heijbroek, W., Musters, P.M.S., and Schoone, A.H.L. (1999). Variation in Pathogenicity and Multiplication of Beet Necrotic Yellow Vein Virus (BNYVV) in Relation to the Resistance of Sugar-beet Cultivars. *Eur. J. Plant Pathol.* *105*, 397–405.
- Hiraguri, A., Itoh, R., Kondo, N., Nomura, Y., Aizawa, D., Murai, Y., Koiwa, H., Seki, M., Shinozaki, K., and Fukuhara, T. (2005). Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB-family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* *57*, 173–188.
- Hleibieh, K. (2010). Etude des propriétés biologiques de la protéine p25, de l'ARN3 et de la protéine p14 du Beet necrotic yellow vein virus : vers de nouvelles stratégies de lutttes antivirales.
- Incarbone, M., Scheer, H., Hily, J.-M., Kuhn, L., Erhardt, M., Dunoyer, P., Altenbach, D., and Ritzenthaler, C. (2020a). Characterization of a DCL2-Insensitive Tomato Bushy Stunt Virus Isolate Infecting *Arabidopsis thaliana*. *Viruses* *12*.1121
- Incarbone, M., Clavel, M., Monsion, B., Kuhn, L., Scheer, H., Poignavent, V., Dunoyer, P., Genschik, P., and Ritzenthaler, C. (2020b). Immunocapture of dsRNA-bound proteins provides insight into tobacco rattle virus replication complexes and reveals *Arabidopsis* DRB2 to be a wide-spectrum antiviral effector. *BioRxiv*.
- Iwata, Y., Takahashi, M., Fedoroff, N. V., and Hamdan, S.M. (2013). Dissecting the interactions of SERRATE with RNA and DICER-LIKE 1 in *Arabidopsis* microRNA precursor processing. *Nucleic Acids Res.* *41*, 9129–9140.

- Jaag, H.M., and Nagy, P.D. (2009). Silencing of *Nicotiana benthamiana* Xrn4p exoribonuclease promotes tombusvirus RNA accumulation and recombination. *Virology*. *386*, 344–352.
- 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.
- Jiang, P., Lian, B., Liu, C., Fu, Z., Shen, Y., Cheng, Z., and Qi, Y. (2020). 21-nt phasiRNAs direct target mRNA cleavage in rice male germ cells. *Nat. Commun*. *11*, 5191.
- Jiang, S., Jiang, L., Yang, J., Peng, J., Lu, Y., Zheng, H., Lin, L., Chen, J., and Yan, F. (2018). Over-expression of *Oryza sativa* Xrn4 confers plant resistance to virus infection. *Gene* *639*, 44–51.
- Jupin, I., Guilley, H., Richards, K.E., and Jonard, G. (1992). Two proteins encoded by beet necrotic yellow vein virus RNA 3 influence symptom phenotype on leaves. *EMBO J*. *11*, 479–488.
- Kalinina, N.O., Makarova, S., Makhotenko, A., Love, A.J., and Taliansky, M. (2018). The Multiple Functions of the Nucleolus in Plant Development, Disease and Stress Responses. *Front. Plant Sci*. *9*, 132.
- Katsarou, K., Mitta, E., Bardani, E., Oulas, A., Dadami, E., and Kalantidis, K. (2019). DCL-suppressed *Nicotiana benthamiana* plants: valuable tools in research and biotechnology. *Mol. Plant Pathol*. *20*, 432–446.
- Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* *115*, 209–216.
- Kim, S.H., Ryabov, E. V., Kalinina, N.O., Rakitina, D. V., Gillespie, T., MacFarlane, S., Haupt, S., Brown, J.W.S., and Taliansky, M. (2007). Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. *EMBO J*. *26*, 2169–2179.
- Klein, E., Link, D., Schirmer, A., Erhardt, M., and Gilmer, D. (2007). Sequence variation within Beet necrotic yellow vein virus p25 protein influences its oligomerization and isolate pathogenicity on *Tetragonia expansa*. *Virus Res* *126*, 53–61.
- Kramer, E.B., and Hopper, A.K. (2013). Retrograde transfer RNA nuclear import provides a new level of tRNA quality control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci*. *110*, 21042 – 21047.
- Kurihara, Y., Takashi, Y., and Watanabe, Y. (2006). The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA* *12*, 206–212.
- Lauber, E., Guilley, H., Tamada, T., Richards, K.E., and Jonard, G. (1998). Vascular movement of beet necrotic yellow vein virus in *Beta macrocarpa* is probably dependent on an RNA 3 sequence domain rather than a gene product. *J. Gen. Virol*. *79*, 385–393.
- Leavesley, S.J., and Rich, T.C. (2016). Overcoming limitations of FRET measurements. *Cytom. Part A* *89*, 325–327.
- Lellis, A.D., Kasschau, K.D., Whitham, S.A., and Carrington, J.C. (2002). Loss-of-Susceptibility Mutants of *Arabidopsis thaliana* Reveal an Essential Role for eIF(iso)4E during Potyvirus Infection. *Curr. Biol*. *12*, 1046–1051.
- 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, F., and Wang, A. (2019). RNA-Targeted Antiviral Immunity: More Than Just RNA Silencing. *Trends Microbiol*. *27*, 792–805.
- Li, Z., Zhang, Y., Jiang, Z., Jin, X., Zhang, K., Wang, X., Han, C., Yu, J., and Li, D. (2018). Hijacking of the nucleolar protein fibrillarin by TGB1 is required for cell-to-cell movement of Barley stripe mosaic virus. *Mol. Plant Pathol*. *19*, 1222–1237.
- Link, D., Schmidlin, L., Schirmer, A., Klein, E., Erhardt, M., Geldreich, A., Lemaire, O., and Gilmer, D. (2005). Functional characterization of the Beet necrotic yellow vein virus RNA-5-encoded p26 protein: evidence for structural pathogenicity determinants. *J Gen Virol* *86*, 2115–2125.
- Machida, S., Chen, H.-Y., and Adam Yuan, Y. (2011). Molecular insights into miRNA processing by *Arabidopsis thaliana* SERRATE . *Nucleic Acids Res*. *39*, 7828–7836.

- 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.
- Maslah, G., Barraud, P., and Allain, F.H.-T. (2013). RNA recognition by double-stranded RNA binding domains: a matter of shape and sequence. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 1875–1895.
- Montacié, C., Durut, N., Opsomer, A., Palm, D., Comella, P., Picart, C., Carpentier, M.-C., Pontvianne, F., Carapito, C., Schleiff, E., and Saez Vasquez, J. (2017). Nucleolar Proteome Analysis and Proteasomal Activity Assays Reveal a Link between Nucleolus and 26S Proteasome in *A. thaliana*. *Front. Plant Sci.* 8, 1815.
- Montavon, T., Kwon, Y., Zimmermann, A., Hammann, P., Vincent, T., Cognat, V., Michel, F., and Dunoyer, P. (2017). A specific dsRNA-binding protein complex selectively sequesters endogenous inverted-repeat siRNA precursors and inhibits their processing. *Nucleic Acids Res.* 45, 1330–1344.
- Montavon, T., Kwon, Y., Zimmermann, A., Hammann, P., Vincent, T., Cognat, V., Bergdoll, M., Michel, F., and Dunoyer, P. (2018). Characterization of DCL4 missense alleles provides insights into its ability to process distinct classes of dsRNA substrates. *Plant J.* 95, 204–218.
- 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.
- Nedbal, J., Visitkul, V., Ortiz-Zapater, E., Weitsman, G., Chana, P., Matthews, D.R., Ng, T., and Ameer-Beg, S.M. (2015). Time-domain microfluidic fluorescence lifetime flow cytometry for high-throughput Förster resonance energy transfer screening. *Cytom. Part A* 87, 104–118.
- Ouillet, L., Guilley, H., Jonard, G., and Richards, K. (1989). In vitro synthesis of biologically active beet necrotic yellow vein virus RNA. *Virology* 172, 293–301.
- Pakdel, A., Mounier, C., Klein, E., Hleibieh, K., Monsion, B., Mutterer, J., Erhardt, M., Bouzoubaa, S., Ratti, C., and Gilmer, D. (2015). On the interaction and localization of the beet necrotic yellow vein virus replicase. *Virus Res* 196, 94–104.
- Pegler, J.L., Oultram, J.M.J., Grof, C.P.L., and Eamens, A.L. (2019). DRB1, DRB2 and DRB4 Are Required for Appropriate Regulation of the microRNA399/PHOSPHATE2 Expression Module in *Arabidopsis thaliana*. *Plants* 8.
- Pélissier, T., Clavel, M., Chaparro, C., Pouch-Pélissier, M.-N., Vaucheret, H., and Deragon, J.-M. (2011). Double-stranded RNA binding proteins DRB2 and DRB4 have an antagonistic impact on polymerase IV-dependent siRNA levels in *Arabidopsis*. *RNA* 17, 1502–1510.
- Peltier, C., Schmidlin, L., Klein, E., Taconnat, L., Prinsen, E., Erhardt, M., Heintz, D., Weyens, G., Lefebvre, M., Renou, J.P., et al. (2011). Expression of the Beet necrotic yellow vein virus p25 protein induces hormonal changes and a root branching phenotype in *Arabidopsis thaliana*. *Transgenic Res* 20, 443–466.
- Peltier, C., Klein, E., Hleibieh, K., D'Alonzo, M., Hammann, P., Bouzoubaa, S., Ratti, C., and Gilmer, D. (2012). Beet necrotic yellow vein virus subgenomic RNA3 is a cleavage product leading to stable non-coding RNA required for long-distance movement. *J Gen Virol* 93, 1093–1102.
- Peng, J., Yang, J., Yan, F., Lu, Y., Jiang, S., Lin, L., Zheng, H., Chen, H., and Chen, J. (2011). Silencing of NbXrn4 facilitates the systemic infection of Tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *Virus Res.* 158, 268–270.
- Pepperkok, R., Squire, A., Geley, S., and Bastiaens, P.I.H. (1999). Simultaneous detection of multiple green fluorescent proteins in live cells by fluorescence lifetime imaging microscopy. *Curr. Biol.* 9, 269–274.
- Pontes, O., Vitins, A., Ream, T.S., Hong, E., Pikaard, C.S., and Costa-Nunes, P. (2013). Intersection of Small RNA Pathways in *Arabidopsis thaliana* Sub-Nuclear Domains. *PLoS One* 8, e65652.
- 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.

- Qu, F., Ye, X., and Morris, T.J. (2008). Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 14732–14737.
- Rahim, M.D., Andika, I.B., Han, C., Kondo, H., and Tamada, T. (2007). RNA4-encoded p31 of beet necrotic yellow vein virus is involved in efficient vector transmission, symptom severity and silencing suppression in roots. *J. Gen. Virol.* *88*, 1611–1619.
- 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.
- Raja, P., Jackel, J.N., Li, S., Heard, I.M., and Bisaro, D.M. (2014). Arabidopsis double-stranded RNA binding protein DRB3 participates in methylation-mediated defense against geminiviruses. *J Virol* *88*, 2611–2622.
- 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.
- Ratcliff, F., Harrison, B.D., and Baulcombe, D.C. (1997). A Similarity Between Viral Defense and Gene Silencing in Plants. *Science.* *276*, 1558– 1560.
- Ratti, C., Hleibieh, K., Bianchi, L., Schirmer, A., Autonell, C.R., and Gilmer, D. (2009). Beet soil-borne mosaic virus RNA-3 is replicated and encapsidated in the presence of BNYVV RNA-1 and -2 and allows long distance movement in Beta macrocarpa. *Virology* *385*, 392–399.
- Reis, R.S., Hart-Smith, G., Eamens, A.L., Wilkins, M.R., and Waterhouse, P.M. (2015). Gene regulation by translational inhibition is determined by Dicer partnering proteins. *Nat. Plants* *1*, 14027.
- Reis, R.S., Eamens, A.L., Roberts, T.H., and Waterhouse, P.M. (2016). Chimeric DCL1-Partnering Proteins Provide Insights into the MicroRNA Pathway . *Front. Plant Sci.* *6*, 1201.
- Romier, C., Ben Jelloul, M., Albeck, S., Buchwald, G., Busso, D., Celie, P.H.N., Christodoulou, E., De Marco, V., van Gerwen, S., Knipscheer, P., et al. (2006). Co-expression of protein complexes in prokaryotic and eukaryotic hosts: experimental procedures, database tracking and case studies. *Acta Crystallogr. Sect. D* *62*, 1232–1242.
- Ruffel, S., Dussault, M.-H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C., and Caranta, C. (2002). A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J.* *32*, 1067–1075.
- Sainsbury, F., Thuenemann, E.C., and Lomonossoff, G.P. (2009). pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants. *Plant Biotechnol. J.* *7*, 682–693.
- Schiavinato, M., Marcet-Houben, M., Dohm, J.C., Gabaldón, T., and Himmelbauer, H. (2020). Parental origin of the allotetraploid tobacco *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* *102*, 541–554.
- Schirmer, A., Link, D., Cognat, V., Moury, B., Beuve, M., Meunier, A., Bragard, C., Gilmer, D., and Lemaire, O. (2005). Phylogenetic analysis of isolates of Beet necrotic yellow vein virus collected worldwide. *J Gen Virol* *86*, 2897–2911.
- Schmidlin, L., Link, D., Mutterer, J., Guilley, H., and Gilmer, D. (2005). Use of a Beet necrotic yellow vein virus RNA-5-derived replicon as a new tool for gene expression. *J Gen Virol* *86*, 463–467.
- Schmitt, C., Balmori, E., Jonard, G., Richards, K.E., and Guilley, H. (1992). In vitro mutagenesis of biologically active transcripts of beet necrotic yellow vein virus RNA 2: evidence that a domain of the 75-kDa readthrough protein is important for efficient virus assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *89*, 5715–5719.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D. (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* *115*, 199–208.
- SenGupta, D.J., Zhang, B., Kraemer, B., Pochart, P., Fields, S., and Wickens, M. (1996). A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *93*, 8496 – 8501.
- Tamada, T., and Kusume, T. (1991). Evidence that the 75K readthrough protein of beet necrotic yellow vein virus RNA-2 is essential for transmission by the fungus *Polymyxa betae*. *J. Gen. Virol.* *72*, 1497–1504.

Tamada, T., Schmitt, C., Saito, M., Guilley, H., Richards, K., and Jonard, G. (1996a). High resolution analysis of the readthrough domain of beet necrotic yellow vein virus readthrough protein: a KTER motif is important for efficient transmission of the virus by *Polymyxa betae*. *J. Gen. Virol.* *77*, 1359–1367.

Tamada, T., Kusume, T., Uchino, H., Kiguchi, T., and Saito, M. (1996b). Evidence that beet necrotic yellow vein virus RNS-5 is involved in symptom development of sugar-beet roots. *Proc. Third Symp. Int. Work. Gr. Plant Viruses with Fungal Vectors, West Park Conf. Centre, Dundee, Scotland, 6-7 August, 1996* 49–52.

Tamada, T., Uchino, H., Kusume, T., and Saito, M. (1999). RNA 3 Deletion Mutants of Beet Necrotic Yellow Vein Virus Do Not Cause Rhizomania Disease in Sugar Beets. *Phytopathology.* *89*, 1000–1006.

Tamada, T., Uchino, H., Kusume, T., Iketani-Saito, M., Chiba, S., Andika, I.B., and Kondo, H. (2021). Pathogenetic roles of beet necrotic yellow vein virus RNA5 in the exacerbation of symptoms and yield reduction, development of scab-like symptoms, and Rz1-resistance breaking in sugar beet. *Plant Pathol.* *70*, 219–232.

Thompson, J.R., Buratti, E., de Wispelaere, M., and Tepfer, M. (2008). Structural and functional characterization of the 5' region of subgenomic RNA5 of cucumber mosaic virus. *J. Gen. Virol.* *89*, 1729–1738.

Tilsner, J., Linnik, O., Wright, K.M., Bell, K., Roberts, A.G., Lacomme, C., Santa Cruz, S., and Oparka, K.J. (2012). The TGB1 Movement Protein of Potato virus X Reorganizes Actin and Endomembranes into the X-Body, a Viral Replication Factory. *Plant Physiol.* *158*, 1359–1370.

Tomari, Y., Matranga, C., Haley, B., Martinez, N., and Zamore, P.D. (2004). A Protein Sensor for siRNA Asymmetry. *Science.* *306*, 1377 – 1380.

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.

Verchot-Lubicz, J., Torrance, L., Solovyev, A.G., Morozov, S.Y., Jackson, A.O., and Gilmer, D. (2010). Varied Movement Strategies Employed by Triple Gene Block–Encoding Viruses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* *23*, 1231–1247.

Vetter, G., Hily, J.M., Klein, E., Schmidlin, L., Haas, M., Merkle, T., and Gilmer, D. (2004). Nucleo-cytoplasmic shuttling of the beet necrotic yellow vein virus RNA-3-encoded p25 protein. *J Gen Virol* *85*, 2459–2469.

Wang, X., Zhang, Y., Xu, J., Shi, L., Fan, H., Han, C., Li, D., and Yu, J. (2012). The R-rich motif of Beet black scorch virus P7a movement protein is important for the nuclear localization, nucleolar targeting and viral infectivity. *Virus Res.* *167*, 207–218.

Xie, D., Chen, M., Niu, J., Wang, L., Li, Y., Fang, X., Li, P., and Qi, Y. (2021). Phase separation of SERRATE drives dicing body assembly and promotes miRNA processing in Arabidopsis. *Nat. Cell Biol.* *23*, 32–39.

Yang, L., Liu, Z., Lu, F., Dong, A., and Huang, H. (2006a). SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in Arabidopsis. *Plant J.* *47*, 841–850.

Yang, S.W., Chen, H.-Y., Yang, J., Machida, S., Chua, N.-H., and Yuan, Y.A. (2010). Structure of Arabidopsis HYPONASTIC LEAVES1 and Its Molecular Implications for miRNA Processing. *Structure* *18*, 594–605.

Yang, X., Ren, W., Zhao, Q., Zhang, P., Wu, F., and He, Y. (2014). Homodimerization of HYL1 ensures the correct selection of cleavage sites in primary miRNA. *Nucleic Acids Res.* *42*, 12224–12236.

Yang, Z., Ebright, Y.W., Yu, B., and Chen, X. (2006b). HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res* *34*, 667–675.

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.

Zheng, L., Du, Z., Lin, C., Mao, Q., Wu, K., Wu, J., Wei, T., Wu, Z., and Xie, L. (2015). Rice stripe tenuivirus p2 may recruit or manipulate nucleolar functions through an interaction with fibrillarin to promote virus systemic movement. *Mol. Plant Pathol.* *16*, 921–930.

Ziegler-Graff, V., Bouzoubaa, S., Jupin, I., Guilley, H., Jonard, G., and Richards, K. (1988). Biologically Active Transcripts of Beet Necrotic Yellow Vein Virus RNA-3 and RNA-4. *J. Gen. Virol.* *69*, 2347–2357.

6. Annexes

Annexes

6.1. Bellott, L., Gilmer, D. and Michel, F. (2019). D'une pierre deux coups : Les multiples caractéristiques des supresseurs d'ARN interférence (viraux). Virologie. 23, 38-60.

D'une pierre deux coups : les multiples caractéristiques des suppresseurs (viraux) de l'interférence par l'ARN

Hit two birds with one stone: the multiple properties of (viral) RNA silencing suppressors

Lucie Bellott
David Gilmer
Fabrice Michel

Université de Strasbourg,
Institut de biologie moléculaire
des plantes, CNRS,
12, rue du Général-Zimmer,
67084 Strasbourg, France

Résumé. La régulation de l'expression des gènes est assurée chez tous les organismes pour maintenir un développement harmonieux de l'individu. Découverte à la fin des années 1990, l'ARN interférence a complètement révolutionné la façon dont étaient conçues ces régulations. L'ARN double brin est la molécule initiatrice de cette voie et sera reconnu puis clivé par une protéine Dicer en duplex d'une vingtaine de nucléotides : les petits ARN interférents ou siARN (*small interfering* ARN). L'un des brins du duplex est alors incorporé dans un complexe ribonucléoprotéique, RISC (*RNA-induced silencing complex*), avec une protéine ARGONAUTE. Dès lors, l'expression de tout ARN qui possède la séquence complémentaire au siARN sera réprimée au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel. Cette spécificité de séquence assure une régulation fine au niveau cellulaire et permet aux organismes de contrôler leur développement, maintenir leur intégrité génomique et lutter contre différents stress. En cas d'infection virale, l'ARN interférence est particulièrement sollicitée puisque de nombreuses molécules d'ARN exogènes sont néosynthétisées. Cette action antivirale associée à l'ARN interférence fut découverte chez les plantes à l'aube du XXI^e siècle. Depuis, deux décennies de recherche ont permis d'affiner nos connaissances sur les multiples protéines impliquées dans cette voie et aussi de découvrir des protéines capables de supprimer l'ARN interférence (*viral suppressor of RNA silencing* [VSR]). Les premiers VSR ont été identifiés sur des plantes virosées et permettent aux virus de contourner la défense antivirale de la plante. Chez les mammifères, le rôle antiviral de l'ARN interférence reste discuté par la communauté scientifique. En effet, l'infection virale y est contrôlée par la réponse interféron et le rôle de l'ARN interférence n'a pas été formellement démontré *in vivo*. Les principaux modes de suppression usités par les VSR, qu'ils soient exprimés par des virus animaux ou végétaux, seront présentés dans cette revue et accompagnés par la description de suppresseurs endogènes. Enfin, ces différents modèles de suppression seront complétés et complexifiés par les ARN viraux non codants (ARNnc). La suppression du *silencing* n'est pas restreinte aux VSR de nature protéique et plusieurs exemples d'ARNnc viraux assurant cette même fonction seront présentés.

Mots clés : VSR, *silencing*, PTGS, ARNi, ncARN, siARN

Abstract. In any organism, gene expression regulation is provided by multiple factors to maintain a harmonious development of individuals. Discovered in the late 1990s, RNA interference (RNAi) completely remodelled the way in which gene expression regulations were initially apprehended. RNAi provides fine regulation at the cellular level and allows organisms to control their development, maintain their genomic integrity and fight against different stresses like viral infection. Exogenous or endogenous double-stranded RNAs initiate RNAi and are recognized and cleaved by Dicer protein in about 20 nucleotide duplexes

Correspondance : D. Gilmer, F. Michel
<gilmer@unistra.fr>
<fabrice.michel@ibmp-cnrs.unistra.fr>

small RNAs (sRNAs). One strand of the duplex is loaded into a ribonucleoprotein complex, named RISC (RNA-induced silencing complex), composed of at least one ARGONAUTE protein and a sRNA. Therefore, the expression of any RNA possessing the complementary siRNA sequence of the small RNA will be specifically silenced either at the transcriptional or post-transcriptional level. RNAi plays a prominent role in the defence against viral infection and the last two decades of research have refined our knowledge of proteins involved in this pathway. Many viruses counteract the antiviral action of RNAi through the expression of factors (viral suppressor of RNA silencing [VSR]) that were first identified on virally infected plants. However, in mammals, the antiviral role of RNAi remains controversial. Indeed, viral infections are controlled by the interferon response and the antiviral action of RNAi has not been clearly demonstrated *in vivo*. In this review, the main modes of defence suppression used by VSR and endogenous RNAi suppressors will be presented. Finally, the role of viral non-coding RNAs (ncRNAs) acting as suppressors of RNAi will be discussed.

Key words: VSR, *silencing*, PTGS, RNAi, ncRNA, siRNA

Introduction

L'interférence par l'ARN, RNAi ou *RNA silencing*, dont l'effet fut initialement observé sur des pétunias en 1990 [1, 2], a été caractérisée en 1998 par Fire *et al.* sur le nématode *Caenorhabditis elegans* [3]. Véritable plateforme de régulation de l'expression des gènes chez les eucaryotes, ce mécanisme contrôle la réponse aux stress [4], le développement [5] et protège l'intégrité génomique d'éléments mobiles comme les transposons [6]. Ce mécanisme est retrouvé chez des organismes unicellulaires [7] jusqu'à l'espèce humaine [8]. Il est assuré par des ARN de 21 à 30 nucléotides (nt) qui, par spécificité de séquence, inhibent l'expression des gènes au niveau transcriptionnel en dirigeant le TGS (*transcriptional gene silencing*) [9, 10] et au niveau post-transcriptionnel par le PTGS (*post-transcriptional gene silencing*) [11]. L'ARN double brin (ARNdb) est la molécule initiateur de *RNA silencing* [3]. Il peut être d'origine exogène comme dans le cas d'infections virales ou endogènes :

- par l'action d'ARN polymérasés ARN-dépendants dirigeant la synthèse d'ARNdb ;
 - par la transcription de régions inversement répétées ou de séquences ayant des promoteurs convergents [12, 13].
- Ces ARNdb sont reconnus puis clivés par une endoribonucléase de type III, Dicer [14], qui génère des duplex de petits ARN. Ils sont divisés en deux classes majeures : les *small interfering* ARN (siARN) et les micro-ARN (miARN). S'ils diffèrent par leurs origines (endogène et/ou exogène), leurs voies de biogenèse, leurs cibles et leurs conséquences, leur mode d'action reste similaire. Ces petits ARN sont présents sous forme simple brin [15] dans le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*) et servent de guide pour reconnaître par hybridation une séquence nucléoti-

dique complémentaire [16]. Ce complexe contient *a minima* un petit ARN et une protéine effectrice ARGONAUTE (AGO). Il initie soit le PTGS par l'inhibition traductionnelle ou le clivage du message par l'activité *slicing* d'AGO [17], soit le TGS en régulant la méthylation de l'ADN ou des histones grâce à des protéines capables de modifier l'état de la chromatine [10]. L'orientation vers le *silencing* post-transcriptionnel ou transcriptionnel dépend de l'organisme, de la nature du petit ARN incorporé dans RISC et de la protéine AGO. En plus de préserver et de réguler l'expression du génome, l'ARN interférence possède une fonction antivirale essentielle chez les invertébrés [18] et chez les plantes mais qui reste contestée chez les mammifères [19]. C'est en 1999, soit un an après la publication des travaux de Fire *et al.*, qu'une action antivirale fut « timidement » associée au *RNA silencing* chez les plantes [20], puis largement démontrée au début du XXI^e siècle.

Chez les plantes, les enzymes « Dicer » sont nommées *Dicer-like* ou DCL [21]. DCL1 génère les miARN (*figure 1*) tandis que DCL3 est responsable de la synthèse de certains siARN endogènes de 24 nt associés au TGS [22, 23]. DCL4 est l'enzyme antivirale principale et génère des siARN de 21 nt ; en absence d'activité DCL4 (inhibition, mutation...), la protéine DCL2 possède une action antivirale redondante et génère des siARN de 22 nt [24]. Lors d'une infection par un virus à ARN, les intermédiaires de réplication double brin, générés par l'ARN polymérase ARN-dépendante virale et/ou les ARN viraux simples brins localement structurés sous forme double brin, représentent un signal de danger cellulaire. Ces formes doubles brins sont clivées par DCL4, générant ainsi les siARN viraux, ou vsiARN, de 21 nt. Ces derniers possèdent un groupement phosphate en 5' et 2 nt sortant à l'extrémité 3' hydroxyle [25, 26] et sont protégés de l'uridylation et

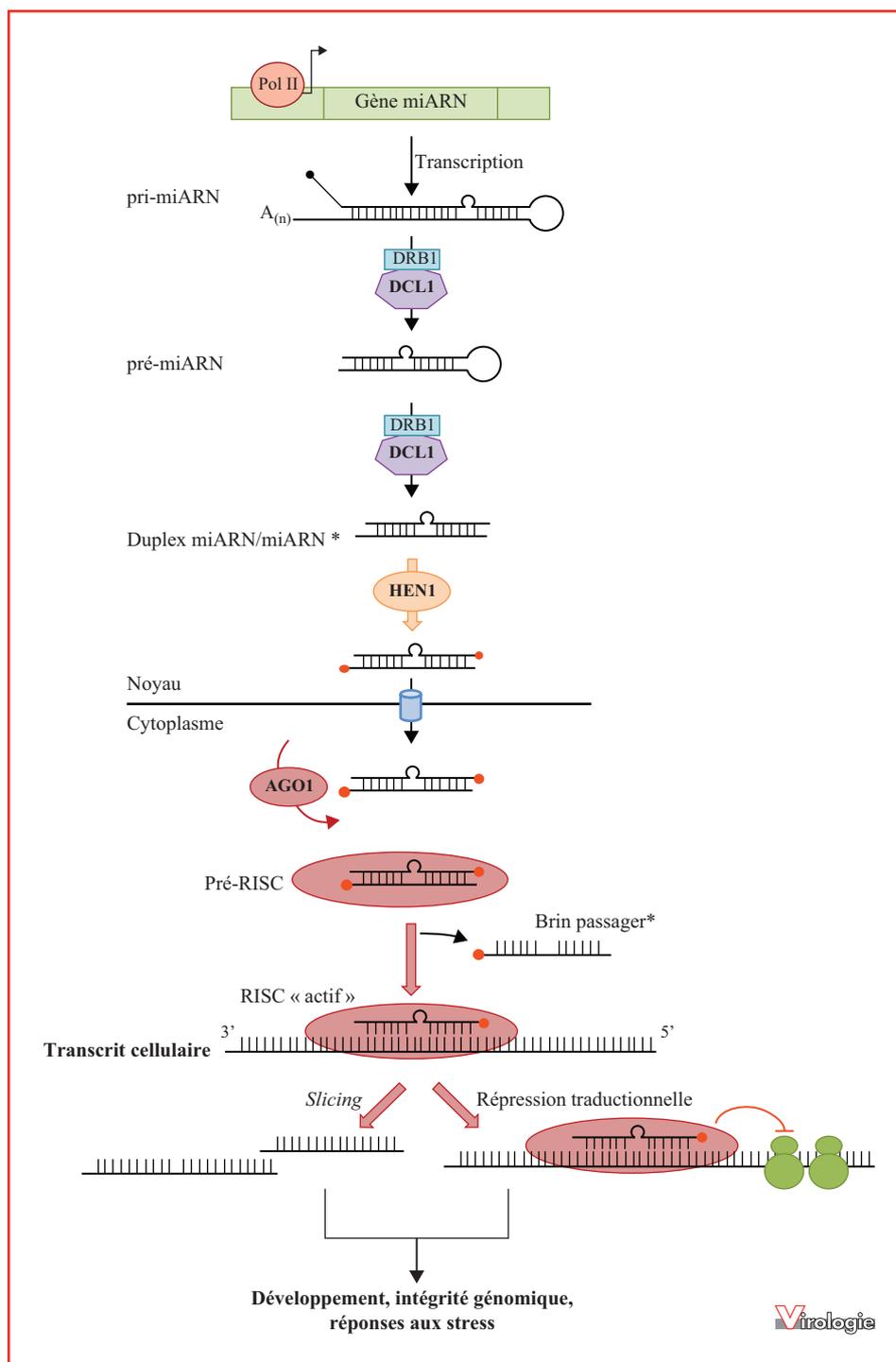


Figure 1. Schéma simplifié de la biogenèse et des modes d'action des miARN chez les plantes. Les pri-miARN sont transcrits par l'ARN polymérase II, coiffés (sphère noire) et polyadénylés ($A_{(n)}$). Ils sont pris en charge par DCL1 et ses cofacteurs, dont DRB1 (*double-stranded RNA binding 1*, aussi désigné sous HYL1), pour assurer leur maturation en pré-miARN. Une deuxième étape de *dicing* forme les duplex de miARN, méthylés à leur extrémité 3' par HEN1 (sphère orange). Le duplex est exporté dans le cytoplasme pour s'associer à AGO1 et former le complexe pré-RISC. Le brin passager est éliminé et le complexe RISC « actif » assure le *silencing* des transcrits cellulaires (hybridés au brin guide) par leur clivage ou l'inhibition de leur traduction.

de la dégradation grâce à un groupement méthyle ajouté par la méthyltransférase HEN1 [27, 28].

Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, dix protéines AGO ont été identifiées. Le brin incorporé dans AGO, aussi appelé brin guide, est positionné à son extrémité 3' dans le domaine PAZ [29, 30] tandis que l'extrémité 5' phosphate se loge dans une poche à l'interface des domaines MID/A et PIWI/B [31]. Ce repliement forme le domaine PIWI qui présente une structure de type RNase H et est responsable du clivage de l'ARN cible [32]. Une telle activité de *slicing* a été démontrée uniquement pour AGO1, -2, -4 et -7 [33-36]. Les virus à ARN sont principalement ciblés par AGO1 et AGO2 tandis que AGO5, AGO7 et AGO10 ne jouent qu'un rôle mineur dans la défense antivirale [34, 37-39]. La défense contre les virus à ADN est principalement assurée par AGO4, impliquée dans le TGS, où elle régule le niveau de méthylation de l'ADN viral et cellulaire [40-42]. La formation du complexe RISC a longtemps été source d'un débat où deux modèles s'opposaient. Pour certains, le duplex d'ARN était séparé avant l'incorporation du brin guide dans AGO. Pour d'autres, le duplex sous sa forme double brin était incorporé dans AGO (complexe pré-RISC) où s'effectuait la dissociation des brins ainsi que le choix du brin guide. Ce dernier modèle semble être favorisé suite à la détection de petits ARNdb chargés dans des protéines AGO humaines et de drosophiles [43, 44]. La sélection du brin guide n'est pas aléatoire mais dépend de la stabilité thermodynamique des extrémités du duplex : le brin qui présente une stabilité plus faible en 5' est sélectionné comme guide et l'autre appelé « passager* » est éliminé [45, 46]. Chez *A. thaliana*, un biais sélectif dépendant de la base présente à l'extrémité 5' du petit ARN semble dicter le recrutement des protéines AGO : AGO1 a tendance à sélectionner le brin présentant un uracile, AGO2 et AGO4 sélectionnent des brins présentant une adénine et AGO5 a une préférence pour la cytosine [47, 48]. La résolution structurale du domaine MID (*middle*) d'AGO2 humaine a aussi permis d'expliquer cette spécificité. En étudiant la voie des miARN chez les eucaryotes, plusieurs études ont montré que la sélection du brin guide dans AGO était soumise à un fort biais selon la base présente à l'extrémité 5' des miARN [49, 50]. Une boucle rigide du domaine MID assure la reconnaissance spécifique de l'adénosine monophosphate et de l'uridine monophosphate, tandis que son affinité pour la cytidine monophosphate et la guanosine monophosphate est 30 fois inférieure. En plus, dès qu'un acide aminé est ajouté dans la séquence de la boucle, cette sélection n'est plus assurée et confirme le rôle majeur du domaine MID dans ce processus sélectif [51]. Lorsqu'un duplex parfait d'ARN (siARN) est chargé dans AGO, le brin passager peut être clivé puis dégradé [52-54]. Le processus d'élimination du brin passager dans des AGO déficientes en clivage reste peu documenté. Néanmoins, un modèle en miroir a été pro-

posé dans le cas où le complexe pré-RISC est chargé d'un duplex de miARN-miARN*, hybride imparfait [55].

Chez les plantes, les ARN viraux sont ciblés par complémentarité de base avec le brin guide et seront majoritairement clivés par AGO1 ou AGO2 pour restreindre l'infection virale. Les produits de clivage générés sont utilisés comme matrice par les ARN polymérase ARN-dépendantes cellulaires (RDRP ou RDR) [56]. RDR6 est la principale ARN polymérase assurant l'amplification du *silencing* [57, 58] et est associée à son cofacteur majeur SGS3 (*suppressor of gene silencing 3*) [59, 60]. Ce complexe permet de synthétiser *de novo* des ARNdb qui représentent de nouveaux substrats pour les DCL qui génèrent les vsiARN appelés « secondaires » (*figure 2*, partie gauche encadrée, et *figure 3*). Cette population de siARN traverse les plasmodesmes cellulaires pour rejoindre le système vasculaire végétal et confère une immunité antivirale étendue [61, 62].

Les phytovirus ont évolué de sorte à exprimer des suppresseurs de *RNA silencing* afin de contrecarrer cette défense antivirale. Ces VSR sont majoritairement de nature protéique, bien que des VSR nucléiques aient été récemment décrits. La quasi-totalité des virus expriment de tels éléments de contre-défense mais aucune similarité de séquence ni de structure n'a été réellement établie [63], laissant présager une convergence évolutive d'une telle fonction virale. Cette convergence est agrémentée par les divers modes d'actions déjà caractérisés où chaque VSR cible l'une ou plusieurs des étapes de la voie du *RNA silencing*. Cette revue s'attachera à présenter les différents mécanismes de suppression du *silencing* employés par les VSR, sans pour autant prétendre en faire une liste exhaustive.

Découverte des VSR

La protéine HC-Pro (*helper component proteinase*) du *tobacco etch virus* (TEV) fut le premier VSR décrit et a permis de confirmer la fonction antivirale du *RNA silencing*. L'exacerbation des symptômes de plantes co-infectées avec le *potato virus Y* (PVY) et le *potato virus X* (PVX) a initialement été attribuée à l'expression de la protéine HC-Pro du PVY, décrite comme un *enhancer* de pathogénicité à large spectre et capable d'augmenter la réplication de virus hétérologue. L'expression de la protéine HC-Pro par transgène est suffisante pour augmenter la sévérité des symptômes et l'accumulation des ARN génomiques du *tobacco mosaic virus* (TMV), du *cucumber mosaic virus* (CMV) et du PVX [64]. De plus, HC-Pro est essentiel au mouvement viral à longue distance [65]. À la recherche de son mode d'action, certains ont pensé que HC-Pro pouvait inhiber un mécanisme de défense cellulaire [65]. Suite à la

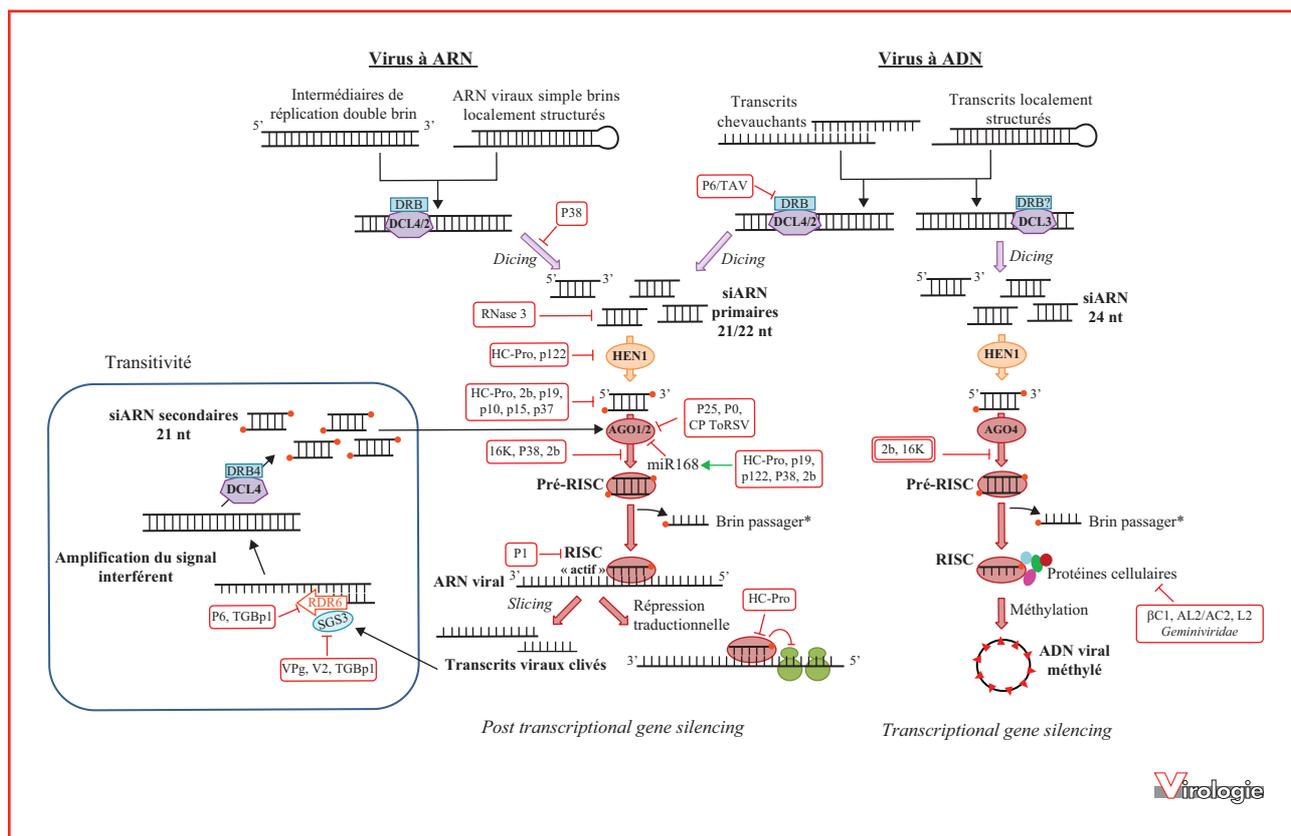


Figure 2. Schéma de la défense antivirale assurée par le RNA silencing et les contre-défenses conférées par les VSR. Les intermédiaires de réplication (ARN double brin) et/ou des structures doubles brins des virus à ARN ainsi que les transcrits chevauchants et/ou localement structurés des virus à ADN sont reconnus et clivés (dicing) par les enzymes Dicer-like (DCL). Les DCL sont associées à leurs cofacteurs DRB (double-stranded RNA binding protein) et génèrent des duplex de petits ARN interférents primaires (siARN). Un groupement méthyle (sphère orange) est ajouté à chaque extrémité 3' hydroxyle du duplex par l'enzyme HEN1 (*Hua enhancer 1*). Les siARN sont incorporés dans une protéine ARGONAUTE (AGO) pour former le complexe pré-RISC (RNA-induced silencing complex). L'un des brins du duplex, alors nommé brin passager, est éliminé pour former le complexe RISC actif. Lors d'infection par un virus à ARN, les transcrits viraux sont ciblés par complémentarité de bases avec le brin guide chargé dans AGO et seront majoritairement clivés par l'activité slicing d'AGO. Les produits de clivage sont pris en charge par les ARN polymérases ARN-dépendantes (RDR) cellulaires pour amplifier le signal interférent. Les siARN secondaires sont générés par DCL4 et s'associent à AGO pour former les complexes RISC. Dans le cas de virus à ADN, des protéines cellulaires impliquées dans la méthylation de l'ADN s'associent au complexe RISC pour initier la méthylation du génome viral (triangles rouges). Les VSR sont représentés dans les rectangles rouges. Les VSR exprimés par des virus à ARN, mais où une action a été démontrée dans le TGS, sont encadrés par un double trait. Les *Geminiviridae* expriment des VSR qui inhibent l'activité des protéines cellulaires impliquées dans la méthylation [192, 193].

découverte du *RNA silencing*, cette hypothèse est rapidement validée et HC-Pro devient le premier VSR identifié [66]. Après de multiples études, HC-Pro apparaît comme un VSR multifonctionnel, capable de cibler plusieurs étapes de la voie du *RNA silencing*. HC-Pro limite la mise en place du *RNA silencing* en séquestrant les vsiARN, ce qui limite l'assemblage du complexe RISC [67, 68]. L'expression de HC-Pro diminue également le niveau de méthylation des petits ARN, en interagissant, d'une part, avec HEN1 [69] et, d'autre part, avec deux enzymes-clés régulatrices du cycle de la biosynthèse de la méthionine [70]. Enfin, l'action du complexe effecteur RISC est inhibée par l'interaction de HC-Pro avec AGO1 au niveau des ribosomes et pourrait

lever la répression traductionnelle [70]. En parallèle, HC-Pro diminue le niveau d'expression de AGO1 en induisant l'expression de miR168, un micro-ARN ciblant l'ARNm de AGO1 [71]. La protéine HC-Pro n'est pas l'unique suppresseur du *RNA silencing* décrit chez les potyvirus. La protéine VPg (*viral protein genome-linked*) est également capable d'interagir avec SGS3, le cofacteur de RDR6, pour initier sa dégradation par le protéasome et l'autophagie. La dégradation subséquente de RDR6 est observée et semble dépendre de celle de SGS3 [72]. Cette interaction entre VPg et SGS3 est décrite pour quatre potyvirus divergents en séquence nucléotidique et en spectre d'hôte [72, 73].

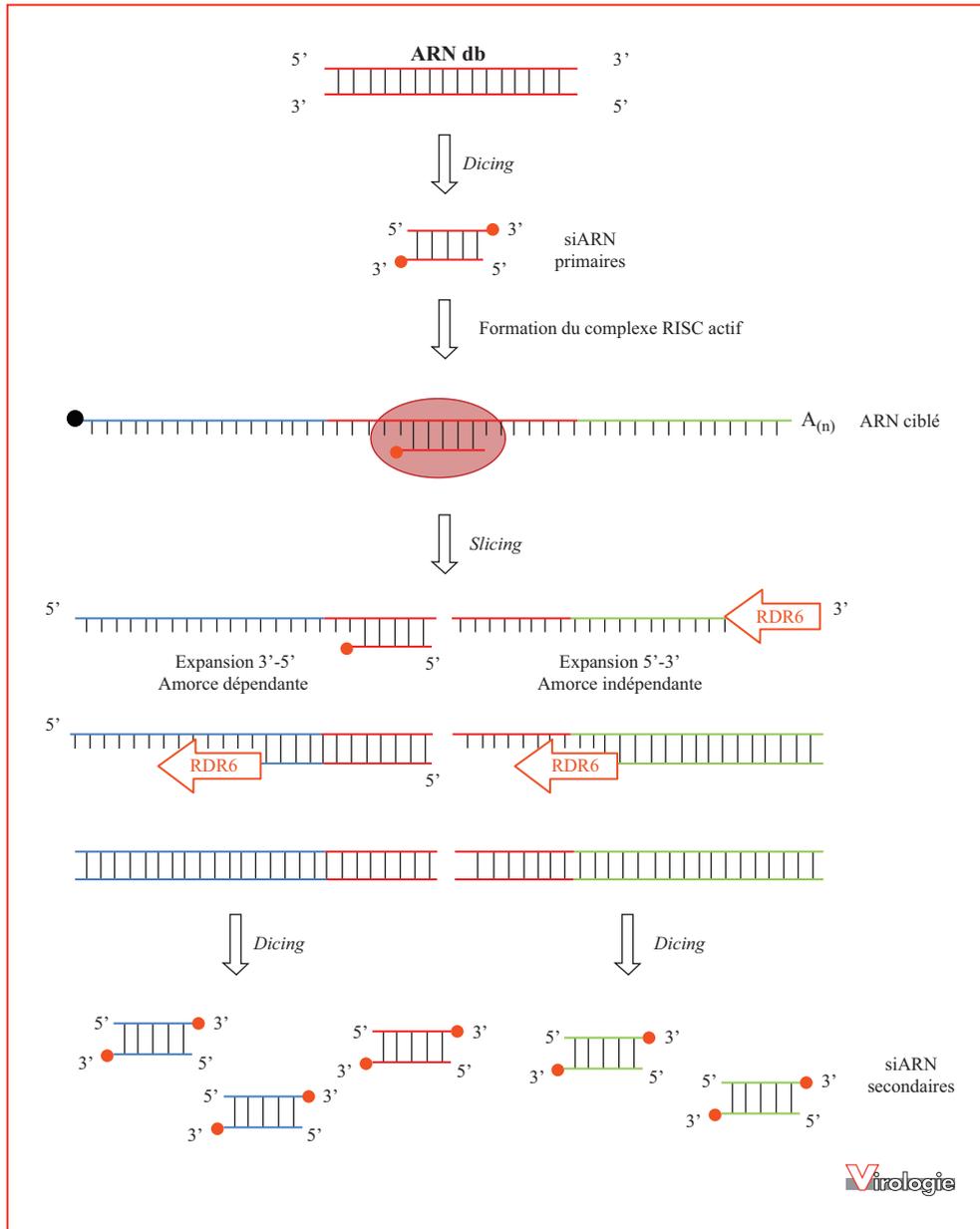


Figure 3. Représentation du mécanisme de transitivité. Après leur action initiale de *slicing*, les siARN primaires servent d'amorces à l'ARN polymérase ARN-dépendante 6 (RDR6) qui génère de nouvelles molécules d'ARNdb (cas de l'expansion amorce dépendante, à gauche). Le mode de recrutement de RDR6 reste à préciser dans l'expansion indépendante de siARN (à droite). Les molécules d'ARNdb néosynthétisées servent de substrat pour les DCL qui produisent des siARN secondaires. Cette population de siARN est spécifique de la séquence ciblée par les siARN primaires mais aussi de ses régions amont et aval, amplifiées par RDR6. La sphère noire représente la coiffe, la sphère orange le méthyle 3' et A_(n) la queue polyadénylée.

La protéine 2b de certains cucumovirus fait partie des premiers VSR décrits dès 1998 [74]. Des expériences de co-localisation et d'immunoprécipitation ont révélé une interaction nucléaire et cytoplasmique entre 2b et AGO1, diminuant l'activité de clivage (ou *slicing*) d'AGO1 [75]. De façon similaire, l'interaction nucléaire entre 2b et

AGO4 restreint son activité endonucléolytique [40]. Toutefois, la liaison à ces facteurs cellulaires n'est pas l'unique mécanisme de suppression usité par la protéine 2b. Sa liaison aux petits ARN semble également déterminante pour assurer une contre-défense virale effective [76]. Un modèle récent de la protéine 2b propose son organisation sous

forme homotétramérique où chaque dimère interagit avec un duplex de siARN [77].

Si les ARN viraux doubles brins induisent le *silencing*, peu de mécanismes de contre-défense virale sont décrits pour inhiber cette étape d'initiation. Les formes doubles brins sont en majorité prises en charge par les DCL cellulaires pour former les vsiARN ; ces derniers sont largement ciblés par divers VSR en vue de limiter la réponse antivirale de la plante. Néanmoins, le *cauliflower mosaic virus* (CaMV) est un virus à ADNdb qui exprime p6 (ou transactivateur/viroplasmine [TAV]), une protéine multifonctionnelle qui présente une activité VSR [78]. TAV possède une localisation cytoplasmique et nucléaire où elle interagit avec DRB4, un cofacteur de DCL4. Cette interaction limite (sans l'abolir) l'action de DCL4 puisque des vsiARN de 21 nt sont détectés [79].

VSR : protéines ubiquitaires et polymorphes des phytovirus

Les phytovirus semblent tous exprimer un VSR afin de contrer la défense antivirale assurée par le *RNA silencing*. Cette première partie s'attachera à décrire les diverses stratégies déployées par les VSR qui sont également présentées sur la *figure 2*.

Agir en amont de la voie du *silencing* : cibler les siARN viraux

Les vsiARN générés par Dicer peuvent devenir la cible de VSR qui mettent en œuvre plusieurs stratégies pour limiter leur incorporation dans le complexe RISC : les vsiARN peuvent être séquestrés, modifiés ou dégradés. Le *sweet potato chlorotic stunt virus* (SPCSV) exprime une RNase de type III (RNase 3) qui clive les vsiARN en fragments de 14 nt incapables d'être incorporés dans le complexe RISC, ce qui limite la défense antivirale [80]. À ce jour, cette dégradation directe de vsiARN par une enzyme virale reste le seul exemple décrit pour un VSR de phytovirus.

Une stratégie plus communément employée par les VSR consiste à séquestrer les vsiARN pour limiter et/ou empêcher leur prise en charge par le complexe RISC. La protéine p19 des Tombusvirus est l'un des VSR le mieux caractérisé : p19 fixe spécifiquement les duplex de siARN mais ne se lie pas aux siARN simples brins ou à des ARNdb de petite taille possédant des extrémités franches, ni aux longs ARNdb [81]. Des données cristallographiques ont permis d'expliquer cette spécificité de séquestration des siARNdb. Sous forme dimérique, p19 agit comme un pied à coulisse reconnaissant de préférence les siARN de 21 nt et son affinité diminue de cinq à six fois dès lors qu'une paire de base est déplétée et ajoutée, respectivement [82, 83]. La pro-

téine p10 du *grapevine virus A* (GVA) est un VSR limitant également la propagation systémique du signal de *silencing* par la séquestration des siARN, indépendamment de leur séquence [84]. Cependant, le VSR p10 reste moins bien caractérisé que p19. La caractérisation structurale sous forme octamérique et annulaire de la protéine p21 du *beet yellows virus* (BYV) a également permis de préciser son mode d'action dans la suppression du *silencing*. La surface interne de l'octamère regroupe des acides aminés conservés et chargés positivement pouvant lier les ARN. Toutefois, à l'inverse de p19, sa liaison n'est pas spécifique aux petits ARNdb puisque p21 est capable de se lier aux ARNsb et son affinité pour les ARNsb augmente en fonction de la taille de l'acide nucléique. De plus, p21 est également capable de fixer l'ADN, avec une moindre affinité [85]. Dès lors, p21 apparaît comme une protéine capable de se lier aux acides nucléiques sans réelle spécificité. Néanmoins, des siARN associés à p21 sont retrouvés lors de son immunoprécipitation dans *Nicotiana benthamiana*. Des expériences de retard sur gel ont confirmé la capacité de p21 à fixer également *in vitro* des miARN et des siARN sous forme de duplex mais pas sous la forme simple brin [67]. De plus, l'utilisation d'oligodésoxyribonucléotides de séquence identique à celle des siARN testés ne permet pas de former de tels complexes [86]. Ces résultats sont en adéquation avec ceux décrivant une meilleure affinité de p21 pour les ARN [85]. Cette capacité à fixer des ARN de plus grande taille permet d'envisager des cibles supplémentaires aux siARN comme par exemple les ARN viraux (intermédiaires de réplication et/ou les structures localement double brins) pour limiter leur clivage par les DCL. D'autres VSR sont également capables de fixer les duplex de siARN. C'est le cas de la protéine P15 du *peanut clump virus* (PCV), qui présente un mécanisme inédit de suppression du *silencing*. La protéine P15 possède une affinité suffisante pour lier les siARN de 22 nt et inhiber leur prise en charge par le complexe RISC. Sa moindre affinité vis-à-vis des siARN de 21 nt est compensée par leur adressage et leur séquestration sous la forme d'un complexe P15-siARN au sein des péroxysomes [87] grâce au signal d'adressage PTS1 (*peroxisome targeting signal 1*) [88, 89]. Si la séquence PTS1 est perdue, les siARN de 21 nt ne sont plus séquestrés de façon optimale, franchissent les plasmodesmes et « immunisent » les cellules adjacentes, limitant ou bloquant ainsi l'infection virale à longue distance [87].

Limiter l'amplification du signal interférent

Un mécanisme de suppression du *silencing* utilisé par certains virus consiste à inhiber l'amplification du signal interférent assurée par RDR6 et ses cofacteurs. Ce mécanisme, désigné sous le terme de transitivité (*figure 3*), existe chez les plantes [56] et *C. elegans* [90], mais n'est pas

retrouvé chez d'autres métazoaires comme la drosophile. La protéine P6 du *rice yellow stunt rhabdovirus* (RYSV) limite la mise en place du *silencing* à longue distance et diminue l'accumulation des siARN secondaires. Cependant, P6 n'a pas d'effet sur un *silencing* local établi en système d'expression transitoire (par agro-infiltration) ou dans des protoplastes de riz. Sa co-immunoprécipitation avec RDR6 ainsi que leur co-localisation orientent l'action de P6 dans la voie d'amplification du signal interférant [91]. SGS3, le cofacteur majeur de RDR6, est également ciblé par plusieurs VSR pour limiter la transitivity. La protéine V2 du *tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) partage des propriétés de fixation à l'ARN identiques à celles de SGS3, notamment la fixation aux ARNdb possédant des extrémités 5' sortantes. Plusieurs expériences ont permis de proposer un mode d'action par compétition où V2 déplace SGS3 de son substrat initial [92]. Le complexe SGS3-ARN serait alors compromis par V2, perturbant la fonction de cofacteur de SGS3 et l'accès de RDR6 aux ARN. Malgré une interaction démontrée par double hybride et microscopie entre SGS3 et V2 [93], celle-ci n'a pas pu être détectée par co-purification des versions étiquetées V2-GST [92]. Un troisième mécanisme agissant sur la transitivity est décrit pour la protéine TGBp1 du *plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV). La suppression du *silencing* assurée par TGBp1 dépend de sa capacité à former des homo-oligomères assurant l'agrégation conjointe de la protéine virale, de RDR6 et de son cofacteur SGS3 [94].

Cibler AGO, la protéine effectrice majeure du complexe RISC

Plusieurs VSR ciblent le complexe RISC dont la protéine effectrice AGO est responsable de l'inhibition traductionnelle ou du clivage des ARN ciblés. L'une des stratégies employées pour déstabiliser RISC consiste à induire la dégradation d'AGO. Décrite en 2002 comme suppresseur de *silencing* [95], la protéine P0 des *Polerovirus* renferme un domaine F-box nécessaire pour contourner le *silencing* antiviral. Ce domaine F-box est également responsable de l'interaction avec l'orthologue de la protéine SKP1 (*S-phase kinase related protein 1*) chez *A. thaliana* [96]. SKP1 appartient au complexe SCF (*Skp, Cullin, F-box*) responsable de l'ubiquitinylation de protéines destinées à être dégradées par le protéasome. Si l'importance du domaine F-box est démontrée pour maintenir la pathogénicité virale, la dégradation d'AGO1 est maintenue en présence d'inhibiteur de cette voie ubiquitine dépendante [97] et c'est par autophagie qu'AGO1 est dégradée [98]. Néanmoins, la protéine P0 ne semble pas interagir directement avec AGO1 [99]. P0 n'assure pas la contre-défense virale dès lors qu'AGO1 est pré-chargée avec un siARN

ou un miARN et elle ne fixe pas les siARN *in vitro* [100]. Le modèle actuel propose alors une interaction entre P0 et un partenaire protéique (restant à identifier) du complexe RISC empêchant son assemblage et menant à la dégradation subséquente d'AGO1.

À l'instar de P0, la protéine 16K du *tobacco rattle virus* (TRV) est incapable d'inhiber l'activité d'un complexe RISC pré-chargé et ne fixe pas les petits ARN. En revanche, 16K perturbe la formation *de novo* des complexes RISC et le clivage des messagers ciblés. Ces résultats concordent avec la diminution d'accumulation des siARN provoquée par 16K et pourraient s'expliquer par l'interaction entre 16K et les protéines AGO. En effet, l'interaction de 16K avec AGO1 et AGO4 est démontrée par BiFC (*bimolecular fluorescence complementation*) mais seule l'interaction avec AGO4 a pu être confirmée par co-immunoprécipitation. Ces données précisent l'action de 16K sur le complexe RISC mais l'importance des interactions avec les protéines AGO4 et/ou AGO1 reste à élucider [101].

La protéine P25 du PVX interagit avec les protéines AGO1, AGO2, AGO3 et AGO4 mais pas avec les protéines AGO5 et AGO9. Ces interactions ont été détectées par co-purification lors d'expression transitoire dans *N. benthamiana*. Dans cette étude, seul le niveau d'expression d'AGO1 diminue en présence de P25 mais est stabilisé par le MG132, un inhibiteur spécifique du protéasome. P25 semble ainsi induire la déstabilisation d'AGO1 par cette voie, bien qu'aucune forme ubiquitinylée d'AGO1 n'ait pu être détectée [102]. Toutefois, l'interaction directe entre P25 et les protéines AGO citées ci-dessus n'a pas pu être démontrée. Une interaction indirecte entre P25 et AGO1 n'est pas à exclure et pourrait s'expliquer par l'absence de motifs GW/WG dans P25, décrits comme des sites d'interaction majeurs avec les protéines de la famille ARGONAUTE [103]. Ces motifs GW/WG ont d'abord été décrits chez une protéine humaine isolée d'un sérum, nommée GW182 en raison de son poids moléculaire et de sa richesse en acides aminés glycine et tryptophane. Il existe trois paralogues de cette protéine GW182 chez les vertébrés (TNRC6A/GW182, TNRC6B et TNRC6C) et un orthologue chez les insectes (GW182). Les protéines de la famille GW182 sont bien caractérisées [104], notamment pour leur interaction directe avec les protéines AGO favorisée par les motifs GW/WG. Chez *A. thaliana*, *C. elegans* et *Schizosaccharomyces pombe*, des protéines à motifs GW/WG sont décrites comme interagissant avec AGO et nécessaires pour assurer la fonctionnalité du *RNA silencing*. Mais en raison d'un manque de conservation de certains autres domaines (*i.e.* autres que GW/WG), ces protéines ne sont pas inféodées à la famille GW182 bien que leur mode d'action soit similaire. Les virus ont su exploiter l'importance de ces interactions par l'expression de VSR qui contiennent un ou plusieurs motif(s) GW/WG.

Ces derniers assurent l'interaction avec les protéines AGO et permettent aux VSR de déstabiliser la formation et/ou la fonction du complexe RISC. La protéine P1 du *sweet potato mild mottle virus* (SPMMV) possède trois motifs GW/WG dans son domaine N-terminal. Des expériences d'immunoprécipitation et de mutagenèse dirigée ont montré qu'ils sont à la fois nécessaires pour maintenir la fonction de VSR de P1 et son interaction avec AGO1. P1 inhibe l'activité *slicing* d'AGO1 uniquement lorsqu'elle est chargée par un miARN ou un vsiARN [105]. Puisque la fonction d'AGO1 est inhibée dans un complexe RISC actif, P1 pourrait limiter l'interaction d'AGO1 avec l'ARN ciblé. Des précisions sont apportées en 2017 et confirment que P1 empêche la liaison de l'ARN cible au complexe AGO1-sARN [106]. Cette inhibition reste toutefois à caractériser puisque divers modèles sont possibles. Parmi eux, deux sont favorisés :

(1) une inhibition non compétitive où l'interaction de P1 avec AGO1 peut modifier la structure de AGO1 altérant ainsi la fixation de l'ARN cible ;

(2) une inhibition compétitive où P1 interagit avec AGO1 au niveau du site de fixation de l'ARN cible.

Des études menées sur AGO2 humaine et sur AGO1 de drosophile ont d'ailleurs montré que leurs sites d'interaction pour les protéines GW182 et pour les miARN sont partiellement chevauchants [31, 107]. Si l'on transpose au monde végétal, le modèle compétitif (2) semble le plus probable. Un tel mode d'action fut ensuite découvert chez d'autres VSR, à l'instar de la protéine de capsid P38 du *turnip crinkle virus* (TCV) qui possède deux motifs GW/WG, disposés à ses deux extrémités N- et C-terminales. Ses deux motifs sont nécessaires pour lier AGO1 et supprimer le *silencing* et leur mutation GW en GA empêche toute infection par le TCV. Une modélisation d'un dimère de P38 a permis de localiser le motif GW/WG de l'extrémité C-terminale à la surface de la protéine qui représente un site d'interaction favorable avec AGO1. Cependant, de telles données n'ont pas pu être obtenues pour le motif présent à l'extrémité N-terminale. Dans une plante transgénique exprimant de façon constitutive une séquence inversement répétée (IR) (plantes SUC:SUL), la co-expression de P38 (SUC:SUL × P38) entraîne une réduction drastique du taux d'AGO1 chargé par les siARN dérivés de l'IR, tandis qu'aucun effet majeur n'est observé lorsque P38 est amenée par une infection virale dans ces plantes transgéniques (SUC:SUL + TCV). La protéine P38 semble donc limiter l'incorporation de petits ARN dans AGO1 et peu efficace pour supprimer le *silencing* si le complexe effecteur RISC est préalablement formé [108]. Bien que cette interaction entre P38 et AGO1 soit nécessaire à la bonne progression du cycle viral, d'autres cibles et mécanismes utilisés par P38 ont également été décrits. *In vitro*, la protéine P38 est capable de fixer les longs ARNdb indépendamment de

leur taille, ainsi que les duplex de siARN de 21 nt [109-111]. En expression transitoire, les siARN dirigés contre l'ARNm de la GFP ne sont pas détectés au profit d'une stabilisation de l'ARNdb de la GFP [109, 110]. Selon ces résultats, P38 pourrait limiter l'action des DCL en empêchant leur accès aux ARNdb diminuant ainsi la production de vsiARN [110, 111]. Récemment, un lien a été établi entre l'interaction P38-AGO1 et la fixation aux ARNdb en montrant que les protéines P38 tronquées dans leur motif GW perdent à la fois leur liaison à AGO1 et aux ARN [111]. Ainsi, P38 pourrait cibler deux étapes distinctes dans la voie du *silencing*, où son orientation fonctionnelle pourrait être finement régulée et coordonnée lors de l'infection virale. L'interaction de P38 avec AGO1 pourrait, dans ce sens, favoriser la liaison et la séquestration des vsiARN *in vivo*.

L'interaction des protéines P1 du SPMMV et P38 du TCV avec AGO1 n'affecte pas pour autant la stabilité d'AGO1. À l'inverse, la protéine CP et VSR du *tomato ringspot virus* (ToRSV) semble induire une dégradation accrue d'AGO1 par autophagie. Cette dégradation est dépendante de l'interaction entre CP et AGO1 via un motif GW/WG [112]. Cependant, l'étude de la protéine p37 du *pelargonium line pattern virus* (PLPV) a légèrement complexifié la relation qui existe entre un motif GW/WG, AGO1 et la suppression du *silencing*. Si p37 possède un motif GW/WG impliqué dans sa fonction de suppression du *silencing*, c'est surtout sa capacité à fixer les petits ARN qui explique son action de VSR. Un lien fonctionnel entre la liaison aux ARN et la suppression du *silencing*, plutôt qu'une interaction avec AGO1, a été établi en étudiant des versions de p37 mutées dans son motif GW [111]. Si la liaison aux protéines AGO semble une stratégie largement décrite au sein des VSR, elle n'est probablement pas restreinte à une simple interaction entre deux partenaires. Elle pourrait représenter une première étape essentielle dans une – ou plusieurs – voie(s) de suppression du *silencing* bien plus complexe(s) à caractériser. Dans ce sens, en plus d'interagir avec AGO1, les VSR pourraient affecter d'autres protéines AGO comme cela est décrit pour la protéine P1 du SPMMV capable de lier AGO2. Le mécanisme biologique sous-jacent à cette interaction n'est pas connu car aucune inhibition d'AGO2 n'a pu être observée [106].

Si aucune homologie de séquence n'est identifiée au sein des VSR, il existe néanmoins une stratégie commune de contre-défense développée par des virus distincts. L'homéostasie d'AGO1 est en partie régulée par miR168. En réponse à une infection virale, le taux d'ARNm d'AGO1 augmente. En parallèle, l'expression de miR168 est spécifiquement induite par les VSR p122 du *crucifer-infecting tobamovirus* (crTMV), p19 du *cymbidium ringspot virus* (CymRSV), P38 du TCV, HC-Pro du TEV et 2b du CMV. Cette accumulation de miR168 pro-

voque une réduction drastique de la quantité de protéine AGO1 [71]. En plus de ce mode d'action partagé et conservé au sein de familles virales distinctes, chacun des VSR étudiés présente un mécanisme supplémentaire de suppression du *silencing* (séquestration de vsARN, interaction avec AGO. . .). Ainsi, le couplage entre l'induction de miR168 et l'action spécifique de chaque VSR semble favorable à ces virus capables de cibler plusieurs étapes ou plusieurs effecteurs de la voie du *silencing*.

Tirer profit des supprimeurs endogènes

Le PTGS a été initialement associé à un mécanisme de défense des plantes, capable d'être contourné par les virus exprimant un VSR. En plus de ces VSR viraux, le PTGS est aussi assuré par des supprimeurs endogènes. De tels produits de gènes sont nécessaires pour réguler négativement le RNAi. Cela est particulièrement essentiel chez les organismes disposant d'un mécanisme d'amplification et d'un mouvement à longue distance du signal interférent. En effet, sans régulation des facteurs impliqués dans ces deux mécanismes (transitivité et propagation systémique), divers ARN servant de matrice pour la synthèse d'ARNdb pourraient induire un *silencing* délétère des gènes endogènes et affecter l'ensemble de l'organisme. La fonction de ces supprimeurs endogènes peut ainsi être détournée de leur tâche cellulaire initiale lors d'une infection virale. Une telle situation rappelle la découverte des gènes *iap* (*inhibitor of apoptosis*), dont le prototype a été découvert chez un baculovirus puis des orthologues identifiés de la levure à l'homme [113]. La protéine Nt-Rgs-CaM (*regulator of gene silencing-calmodulin-like*) de *Nicotiana tabacum* a été le premier suppresseur endogène caractérisé lors d'un crible double hybride utilisant la protéine HC-Pro du TEV comme appât. La surexpression de Rgs-CaM induit des tumeurs dans les lignées transgéniques de tabac, à l'instar de HC-Pro. Son action dans la suppression du PTGS a été validée dans des lignées transgéniques de *N. benthamiana* qui expriment constitutivement la GFP, où l'efficacité de Rgs-CaM est comparable à celle de HC-Pro sur le *silencing* de l'ARNm GFP. Par ailleurs, l'expression de HC-Pro par un transgène ou une infection virale (TEV), induit l'expression de Rgs-CaM. Ainsi, HC-Pro semble activer l'expression de Rgs-CaM pour lutter contre le *RNA silencing* mis en place lors de l'infection virale [114]. Une étude menée en 2014 a permis d'apporter des conclusions très similaires en étudiant le suppresseur de *silencing* AL2 des geminivirus. Ce VSR induit également l'expression de rgs-CaM d'*A. thaliana* et l'interaction nucléaire de rgs-CaM avec AL2 a été confirmée par BiFC. La surexpression de rgs-CaM augmente à la fois la sensibilité au *tomato golden mosaic virus* (TGMV-geminivirus) et l'accumulation des ADN viraux tandis que les lignées *knockout* pour rgs-CaM

sont plus résistantes à l'infection [115]. La même année, le VSR β C1 exprimé par un ADN satellite (*tomato yellow leaf curl China betasatellite* [TYLCCNB]) associé à un geminivirus (*tomato yellow leaf curl China virus* [TYLCCNV]) est aussi décrit pour induire l'expression de Nb-Rgs-CaM dans *N. benthamiana*. La surexpression de β C1 et Nb-Rgs-CaM entraîne une diminution d'accumulation des ARNm de RDR6 et des siARN secondaires [116]. Si la fonction des protéines *calmoduline-like* dans la suppression du *silencing* était démontrée, un mode d'action n'a été proposé que récemment. Une interaction entre la protéine *calmoduline-like* de *N. benthamiana* (NbCaM) et SGS3 a été démontrée dans le système levure puis *in planta*. Cette interaction semble être un prérequis pour induire la dégradation de SGS3 par autophagie. La diminution de l'expression de plusieurs facteurs impliqués dans l'autophagie inhibe la dégradation de SGS3 par l'intermédiaire de NbCaM et de l'infection par un geminivirus (TYLCCNV) et son ADN betasatellite (TYLCCNB) [117]. Ainsi, NbCaM supprime le *silencing* en induisant la dégradation de SGS3 et plusieurs virus tirent profit de ce mécanisme en favorisant l'induction de ce suppresseur endogène. Une controverse persiste néanmoins quant à la fonction de suppresseur endogène associée à Nt-Rgs-CaM. En effet, l'interaction entre plusieurs VSR contenant des domaines de fixation à l'ARNdb et Nt-Rgs-CaM a été démontrée. Par un mécanisme similaire à celui décrit ci-dessus, ces VSR semblent être dégradés par autophagie à l'instar de SGS3, favorisant alors la défense antivirale des plantes infectées [118]. Des études complémentaires sont nécessaires pour expliquer cette dichotomie observée pour la fonction des protéines *calmoduline-like* dans la voie du *RNA silencing* où la nature des VSR et des virus étudiés semblent jouer un rôle non négligeable dans leur orientation fonctionnelle. Une hypothèse est avancée par Nakahara *et al.* où Nt-Rgs-CaM pourrait interagir avec certains VSR par l'intermédiaire de leurs résidus chargés négativement et positivement respectivement, déstabilisant alors l'interaction pré-établie entre les VSR et les siARN viraux [118].

La protéine AtRLI2 (*RNase L inhibitor 2*) d'*A. thaliana* est l'orthologue d'une protéine de mammifères impliquée dans la régulation de la réponse interféron [119] dont l'expression est induite par des ARNdb synthétiques et une infection virale dans des cellules HeLa [120, 121]. Par analogie, AtRLI2 est induit chez des plantes où un *silencing* a été mis en place [119] et a été identifié comme un suppresseur endogène du *silencing*. La surexpression de AtRLI2 provoque une réduction drastique du niveau d'accumulation des siARN [122]. Cette protéine est largement conservée chez les eucaryotes et les archées. Chez la drosophile, la levure ou les mammifères, elle intervient dans la régulation de la traduction et/ou dans la biogenèse et le recyclage des ribosomes, sans pour autant que ces fonctions

soient assurées par AtRLI2 chez les plantes. Néanmoins, l'orthologue humaine de AtRLI2, la protéine ABCE1 (*ATP-binding cassette sub-family E member 1*), a conservé sa fonction de suppression du *silencing* lorsqu'elle est exprimée dans *N. benthamiana*, *C. elegans* ou des cellules de mammifères. ABCE1 fut la première protéine humaine décrite comme un suppresseur endogène du *silencing* [123]. Chez les plantes, la dégradation des ARN associée au PTGS est principalement assurée par l'activité endonucléolytique d'AGO1, responsable du clivage de l'ARN ciblé, complémentaire au brin guide chargé dans le complexe RISC. Suite au clivage, deux ARN sont libérés : l'un en amont du site de clivage qui contient l'extrémité 5' (fragment 5') ; l'autre en aval qui contient l'extrémité 3' (fragment 3'). Le fragment 3' est dégradé de 5' vers 3' par l'exoribonucléase cytoplasmique XRN4. La dégradation du fragment 5' fait intervenir deux voies distinctes. Si l'ARN ciblé est coiffé, les protéines DCP (*decapping*) assurent l'élimination de la coiffe et permettent à XRN4 d'effectuer la dégradation 5'-3'. Ce fragment 5' possède une extrémité 3' non protégée suite au clivage et permet l'accès aux uridylyltransférases terminales (TUTase). HESO1 (*HEN1 suppressor1*) est la TUTase principale impliquée dans l'uridylation et la dégradation des siARN et miARN, dès lors qu'ils ne sont pas protégés par le groupement méthyle ajouté par HEN1. HESO1 pourrait être recrutée par le complexe RISC puisque AGO1 est co-immunoprécipitée par HESO1. De même, les exoribonucléases RICE1 et RICE2 (*RISC-interacting clearing 3'-5' exoribonucleases*) semblent être recrutées à l'extrémité 3' en interagissant avec AGO1 et AGO10 et initient la dégradation 3'-5' de l'ARN. L'exosome associé au complexe SKI assure la dégradation complète de l'ARN [124]. Pour certaines cibles, la dégradation du fragment 3' est diminuée dans un fond mutant *xrn4* chez *A. thaliana* [125]. En plus, une stimulation du *silencing* par les RDRP cellulaires est observée dans le fond mutant *xrn4* ainsi qu'une accumulation des produits de clivage [126]. Par ailleurs, l'identification de nouveaux suppresseurs endogènes de *silencing* pourrait être limitée par une efficacité supérieure des effecteurs de la voie du *silencing*. C'est ainsi qu'en 2007, l'analyse de deux lignées hypomorphes d'AGO1 a permis d'identifier XRN2, XRN3 et FRY1 comme des suppresseurs endogènes du *RNA silencing* [127]. Si la mise en place du *silencing* est déficiente dans les lignées *ago-1*, elle est totalement restaurée dans les doubles mutants *ago1/fry1* et *ago1/xrn4*, tandis qu'elle n'est que partielle pour *ago1/xrn2* et *ago1/xrn3*. Ainsi, la fonction d'AGO1 est restaurée lorsque FRY1, XRN2, XRN3 et XRN4 sont sous-exprimés, démontrant leurs rôles comme suppresseurs endogènes de *RNA silencing*. Le double mutant *xrn2/xrn3* présente une suraccumulation des précurseurs de miARN, générés par DCL avant l'export nucléaire du duplex miARN/miARN*. Ce phénotype est

en adéquation avec la localisation nucléaire de XRN2 et XRN3 [128]. Les mutants *fry1* développent à la fois un phénotype nucléaire identique au mutant *xrn2/xrn3* et aussi cytoplasmique avec une accumulation des produits de clivage 3' générés par AGO1, à l'instar du mutant *xrn4*. Pour confirmer le rôle de ces suppresseurs endogènes, les lignées *xrn2*, *xrn3*, *xrn4* et *fry1* ont été infectées par le CMV dont la réplication est cytoplasmique. Les lignées *xrn2* et *xrn3* se comportent comme une lignée sauvage avec une infection virale qui se développe sur 66 % à 75 % des plantes infectées. À l'inverse, les plantes *xrn4* et *fry1* présentent une diminution d'accumulation des ARN génomiques viraux et des vsiARN. Cette hyper-résistance des plantes mutantes confirme la capacité de suppression du *silencing* de FRY1 et XRN4 [127].

En 2001, RRF-1, RRF-2 et RRF-3, trois facteurs homologues à l'ARN polymérase ARN-dépendante EGO-1 [129], sont étudiés chez *C. elegans* en vue de préciser leur rôle dans la transitivity [90]. Seuls les individus *rrf-3* présentent une hypersensibilité à l'interférence par l'ARN [130], confirmant l'existence d'une régulation négative dans la voie du *RNA silencing* assurée par RRF-3. Un tel phénotype d'hypersensibilité est aussi décrit chez les nématodes *eri-1* [131]. *In vitro*, ERI-1 (*enhanced RNA interference 1*) dégrade spécifiquement des siARN aux extrémités 3' sortantes ; les espèces simples brins et totalement hybridées ne sont pas ciblées. L'analyse *in silico* de ERI-1 a mis en évidence un domaine exonucléasique et un domaine de fixation aux acides nucléiques. Ainsi, ERI-1 semble limiter l'interférence par l'ARN en fixant puis en initiant la dégradation des duplex de siARN par leur extrémité 3'. Par ailleurs, la localisation de ERI-1 dans les neurones et les gonades pourrait expliquer l'efficacité moindre du *RNA silencing* dans ces tissus.

Chez *A. thaliana*, les RNase de type III se répartissent en deux familles :

- les protéines *Dicer-like* DCL1 à DCL4 largement étudiées pour leurs fonctions dans le *RNA silencing* ;
- les protéines *RNase three-like* (RTL1 à RTL5) qui restent bien moins décrites.

Si elles possèdent toutes un domaine RNase III (à l'exception de RTL3 qui en compte deux), seules RTL1, RTL2 et RTL3 renferment respectivement un, deux et trois domaines de liaison aux ARN doubles brins (*DRB-double stranded RNA binding domain*). RTL1 et RTL3 sont peu exprimées dans les plantes ; RTL2, RTL4 et RTL5 semblent quant à eux être exprimés dans presque l'ensemble des tissus végétaux. Étonnamment, le niveau d'accumulation des ARNm de RTL1 est 20 fois supérieur en cas d'infection virale par rapport au contrôle non infecté alors que ceux de RTL2 et RTL3 restent inchangés. L'expression de RTL1 est induite par quatre virus à ARN simple brin de famille distincte (TCV ; CMV ; *turnip vein clearing virus* [TVCV] et

turnip yellow mosaic virus [TYMV]). RTL1 semble ainsi induite de façon généralisée par un stress viral. Lors de sa surexpression, RTL1 induit une diminution drastique des niveaux d'accumulation des trois classes majeures de siARN endogènes (*endogenous inverted repeat-derived-siRNA* [endoIR-siRNA] ; *polymerase IV-dependent siRNA* [p4-siRNA] et *transacting-siRNA* [ta-siRNA]) générés par DCL2, DCL3 et DCL4 respectivement alors que la biogenèse des miARN assurée par DCL1 n'est pas affectée. En plus, le *silencing* de l'ARN GUS induit par la tige-boucle 35S::GU-UG est supprimé par RTL1 qui inhibe l'accumulation des siARN, confirmant sa fonction de supprimeur endogène du *silencing* [132]. Par l'analogie de leurs domaines RNase III et DRB, RTL1 pourrait utiliser des substrats identiques à ceux clivés par les DCL, limitant la biogenèse des siARN par les DCL. Des expériences de clivage *in vitro* et *in planta* ont en effet montré la spécificité de RTL1 pour les longs ARNdb à proximité d'une structure en tige-boucle. Son affinité pour les longs ARN fortement appariés avait déjà été observée puisque RTL1 agit sur les précurseurs maturés par DCL2, DCL3 et DCL4 tandis que RTL1 n'a pas d'effet sur des précurseurs qui présentent de nombreux mésappariements (cas des pri- et pré-miARN). L'activité endoribonucléolytique de RTL1 génère des extrémités cohésives et la spécificité de clivage de RTL1 dépend d'une séquence consensus présente sous forme de duplex parfaitement apparié à la base de la structure en tige boucle [133]. Les produits de clivage générés par RTL1 semblent totalement dégradés par les exoribonucléases cellulaires. Ainsi, RTL1 pourrait exercer sa fonction antivirale en amont des DCL antivirales en initiant la dégradation des intermédiaires de réplication viraux et/ou les ARN viraux localement structurés. Cette barrière antivirale supplémentaire est toutefois supprimée par les VSR P38 (TCV), 2b (CMV) et HC-Pro (TEV) qui restaurent l'accumulation des siARN [132]. Les VSR, en plus de supprimer le PTGS dépendant des DCL antivirales, peuvent aussi cibler l'activité de RTL1.

Les virus animaux expriment des VSR

En 2002, une fonction de suppression du *silencing* a été associée à une protéine virale animale : la protéine B2 du *Flock house virus* (FHV), ce dernier infectant naturellement les insectes [134]. Exprimée de façon transitoire dans des plantes transgéniques où l'expression de la GFP est réprimée, la protéine B2 restaure la fluorescence de la GFP et réduit les niveaux d'accumulation des siARN dirigés contre l'ARNm de la GFP. La transfection de virus FHV et FHV- Δ B2 dans des lignées cellulaires de drosophiles sauvages ou sous-exprimant AGO2 ont confirmé la capacité de sup-

pression du *silencing* par B2. En 2005, deux structures de la protéine B2 sont obtenues par des équipes distinctes, l'une par résonance magnétique nucléaire (RMN) [135], l'autre par co-cristallisation avec un ARNdb de 18 nt [136]. B2 se présente sous forme dimérique, où chaque monomère renferme trois hélices α (α 1, α 2 et α 3). Si les deux structures sont quasi identiques, l'orientation d'une des trois hélices est très légèrement différente mais pourrait aisément s'expliquer par une adaptation conformationnelle de B2 suite à sa liaison à l'ARN dans l'étude cristallographique. Les résidus chargés positivement sont exposés à la surface du dimère assurant l'interaction avec les groupements phosphate du squelette de l'ARN, et ce indépendamment de sa séquence nucléotidique [136]. Contrairement à p19, le dimère de B2 n'assure pas la reconnaissance spécifique des extrémités 5' et 3' de l'ARN, laissant aussi présager une liaison aux ARN indépendamment de leur taille. Ces données structurales sont en accord avec des résultats publiés la même année qui confirment la fixation de B2 aux duplex de siARN et aux ARNdb plus longs [137, 138]. B2 semble aussi inhiber *in cellulose* et *in vitro* le clivage par Dicer des longs ARNdb, limitant alors la biogenèse des siARN [136, 137]. Ainsi, la suppression du *silencing* assurée par B2 pourrait s'opérer à deux niveaux : en masquant les longs ARNdb substrats de Dicer et/ou en séquestrant les siARN générés suite au *dicing*. En 2009, l'interaction entre le domaine C-terminal de B2 et le domaine PAZ de Dicer est démontrée par double hybride de levure et des expériences de *pull-down* [139]. Le domaine PAZ des protéines Dicer assurant l'ancrage de l'une des extrémités d'un ARNdb, B2 pourrait empêcher leur accès au domaine PAZ par un mécanisme de compétition. Dans cette hypothèse, B2 pourrait se substituer à Dicer dans la liaison aux ARNdb et serait en concordance avec l'affinité supérieure de B2 pour les longs ARNdb par rapport aux duplex de 21 nt [138]. Bien que les mammifères puissent compter sur leurs réponses immunitaires innées et adaptatives afin de contrer une infection virale, certains virus humains expriment des VSR. C'est d'ailleurs en utilisant le système d'expression transitoire en plantes que la fonction de supprimeur de *silencing* fut découverte pour la protéine NS1 du virus de la grippe influenza A [140, 141]. À l'instar de la protéine B2 du FHV, la protéine NS1 restaure l'expression de la GFP dans un système rapporteur et réduit de façon drastique le niveau d'accumulation des siARN dirigés contre l'ARNm de la GFP. La suppression du *silencing* par NS1 est confirmée *in planta* par l'utilisation du vecteur viral PVX où NS1 exacerbe les symptômes d'infection et augmente la pathogénicité virale. Le mode d'action de NS1 a été en partie élucidé par des études *in vitro* où NS1 fixe les siARN de 21 nt [140]. La co-cristallisation du domaine DRB de NS1 associé à un duplex de siARN a permis de confirmer les résultats précédents. L'étude

d'une protéine dans un règne différent n'est pas limitée à NS1. Une analyse « trans-règne » de la protéine NS3 du *rice hoja blanca virus* (RHBV) fut menée sur des cellules de mammifères pour tester la complémentation fonctionnelle de la protéine virale Tat du VIH-1. NS3 est en effet capable d'assurer cette complémentation fonctionnelle en présence de son domaine DRB et pourrait alors s'opérer par la séquestration des duplex de petits ARN. Cette étude a permis de confirmer la suppression du *silencing* assurée par Tat et de proposer un mode d'action par mimétisme à celui décrit pour NS3 [142]. Une combinaison de ces deux systèmes « trans-règne » a été utilisée pour préciser la fonction de la protéine virale Tat en la comparant au suppresseur p19 des Tombusvirus [143]. Leurs effets ont à la fois été étudiés *in planta* par l'expression transitoire de Tat et p19 dans des protoplastes de *N. benthamiana*, et aussi par leur transfection dans des cultures cellulaires de mammifères. Par-là, les auteurs ont montré qu'à l'instar de p19, la fonction de Tat dans la suppression du *silencing* intervient en aval de la biogenèse des duplex d'ARNdb. Aussi, Tat et p19 favorisent la traduction des ARNm du VIH assurant alors une augmentation de la production de virions. Ainsi, l'inhibition traductionnelle des ARN viraux induite par les miARN cellulaires semble contournée par le VSR Tat du VIH. Cette activité de suppression du *silencing* requiert la fonctionnalité de son domaine DRB. Des travaux similaires reposant sur la complémentation fonctionnelle de Tat du VIH-1 ont permis de confirmer la fonction de VSR de la protéine NS1 du virus influenza et aussi de l'attribuer aux protéines VP35 et E3L du virus Ebola et de la vaccine respectivement [144, 145].

L'étude du *RNA silencing* dans les cellules somatiques de mammifères est complexifiée par l'existence de la réponse interféron antivirale. Ces deux voies cellulaires semblent exclusives : si les protéines du *RNA silencing* sont exprimées et fonctionnelles, la réponse antivirale est toutefois assurée par la voie de l'interféron [146]. La relation entre l'immunité antivirale et le *RNA silencing* a été mise en évidence en utilisant des cellules souches embryonnaires (CSE) de souris déficientes dans la mise en place de la réponse interféron. L'infection par le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) de ces cellules non différenciées provoque l'accumulation de vsARN. La nature de ces petits ARN (taille, extrémités 3' sortantes de 2 nt...) et l'utilisation de lignées *Dicer knockout* confirment leur biogenèse *via* la machinerie du *RNA silencing*. L'effet antiviral de ces vsARN n'a pas été testé sur la réplication de l'EMCV, mais leur association avec AGO2 semble valider leur fonctionnalité pour rejoindre un complexe RISC actif. L'accumulation des vsARN diminue drastiquement lorsque les cellules sont différenciées, en accord avec la prévalence fonctionnelle de la réponse interféron dans les cellules somatiques. Pour évaluer le potentiel antiviral des

vsARN, le virus Nodamura (NoV) a été utilisé. NoV exprime une protéine B2 qui inhibe l'activité de Dicer à l'instar de la protéine B2 du FHV. Un NoV Δ B2 maintient l'accumulation des vsARN dans les CSE et dans des cellules somatiques ; leur biogenèse Dicer-dépendante est abolie lors d'une infection par NoV sauvage [147]. De plus, l'accumulation du virus NoV Δ B2 est amplifiée dans des CSE mutées pour AGO2 [147] et dans des cellules somatiques de rein de hamsters nouveau-nés qui expriment la protéine B2 du NoV ou le VSR VP35 du virus Ebola [148]. L'infection de souriceaux par le virus sauvage NoV est létale cinq jours après inoculation, et tous les souriceaux infectés par le virus NoV Δ B2 survivent. La clairance virale chez les souriceaux infectés par NoV Δ B2 est corrélée à l'accumulation de vsARN et à la perte de suppression du *silencing* assurée par la protéine B2 [148]. Ces résultats sont en faveur d'une réponse antivirale conférée par le *RNA silencing* chez les mammifères et des travaux menés sur l'entérovirus humain 71 (HEV71) viennent renforcer l'importance de cette voie antivirale [149]. La fonction de VSR a été attribuée à la protéine non structurale 3A qui limite la biogenèse des vsARN par la séquestration des longs ARN doubles brins. À l'instar du NoV, un virus HEV71 sauvage induit la production aberrante de petits ARN caractéristiques de produits de dégradation viraux, tandis que des mutations ponctuelles introduites dans la protéine 3A diminuent sa liaison aux ARN doubles brins et engendrent l'accumulation de vsARN. Ces vsARN sont générés par Dicer à partir des intermédiaires de réplication viraux, co-immunoprécipitent avec AGO et assurent la dégradation d'ARN exprimant des séquences virales. L'accumulation de ces vsARN est corrélée à la clairance virale et à la diminution drastique de la pathogénicité. Ces expériences, menées à la fois dans des cellules somatiques de mammifères et aussi sur des souris, ont également permis de montrer que ces résultats sont indépendants de la voie interféron et attestent du véritable rôle de l'interférence par l'ARN dans la défense antivirale chez les mammifères. Si plusieurs études confirment le rôle du *RNA silencing* comme défense antivirale chez les mammifères, cette récente attribution n'est pas encore unanime et offre de multiples perspectives. Le *tableau 1* reprend quelques exemples de suppresseurs viraux animaux.

Quand les ARN non codants viraux s'en mêlent

Le champ du « non-codant » ne cesse de passionner depuis la découverte des miARN à la fin du xx^e siècle [150]. Aujourd'hui, plus de 38 500 miARN sont référencés, toutes espèces confondues (<http://www.mirbase.org/index.shtml>,

Tableau 1 Tableau récapitulatif des supresseurs viraux animaux.

Famille	Genre/espèce	VSR	Types cellulaires/organismes où la fonction VSR a été démontrée	Références
<i>Orthomyxoviridae</i>	Virus influenza A (IAV) ⁱ	NS1 ^a	– Cellules d’insectes – Plantes : <i>N. benthamiana</i> – Cellules de mammifères	[140, 145, 194, 195]
<i>Poxviridae</i>	Virus de la vaccine ⁱ	E3L ^a	– Cellules d’insectes – Cellules de mammifères	[144, 145]
<i>Filoviridae</i>	Virus Ebola ⁱ	VP35 ^a	– Cellules de mammifères – Plante : <i>N. benthamiana</i>	[144, 196]
<i>Retroviridae</i>	Virus de l’immunodéficience humaine I (HIV-1) ⁱ	Tat ^a	– Cellules de mammifères – Protoplastes (cellules de plantes)	[143, 197, 198]
		TAR ^b	– Cellules de mammifères	[199]
		RRE ^b	– Cellules de mammifères	[200]
<i>Coronaviridae</i>	Syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) ⁱ	Nucléocapside N ^a	– Cellules de mammifères	[201]
<i>Adenoviridae</i>	Adénovirus ⁱ	VA RNA ^b	– Cellules de mammifères	[159, 202]
<i>Picornaviridae</i>	Entérovirus humain 71 ⁱ	3A ^a	– Cellules de mammifères – Souris	[149]
<i>Flaviviridae</i>	Virus de l’hépatite C (HCV) ⁱ	Core ^a	– Cellules de mammifères	[203-205]
	Virus de la fièvre jaune ⁱ	Capside C ^a	– Moustique vecteur	[206]
	Flavivirus ⁱ	sfRNA ^b	– Moustique vecteur – Cellules d’insectes – Cellules de mammifères	[163, 168]
<i>Nodaviridae</i>	Virus Nodamura ⁱ Virus Nodamura ⁱⁱ	B2 ^a	– Cellules d’insectes – Cellules de mammifères – Souris	[137, 145, 147, 148, 207]
	Virus Flock house (FHV) ⁱⁱ		– Plante : <i>N. benthamiana</i> – Cellules d’insectes – Insectes : drosophile	[134, 136, 139]
<i>Dicistroviridae</i>	Virus C de la drosophile (DCV) ⁱⁱ	1A ^a	– Cellules d’insectes – Insectes : drosophile	[208]
	Virus de la paralysie du criquet (CrPV) ⁱⁱ			[209]
<i>Birnaviridae</i>	Virus Y de <i>Culex</i> (CYV) ⁱⁱ	VP3 ^a	– Cellules d’insectes – Insectes : drosophile	[210]
	Virus X de la drosophile (DXV) ⁱⁱ			

La distinction entre les virus de mammifèresⁱ et les virus d’insectesⁱⁱ est indiquée dans la colonne « Genre/espèce ». Les VSR avec un exposant (a) ou (b) sont respectivement de nature protéique et nucléique.

consulté le 2 août 2019). La famille des petits ARN non codants associés au *silencing* des gènes est désormais étendue aux siARN (*small interfering*) ainsi qu'aux piARN (*piwi interacting*). Ces derniers sont toutefois restreints aux tissus gonadiques des animaux, Dicer-indépendants et spécifiques de séquences d'éléments transposables [151]. Les longs ARN non codants (lncARN-taille supérieure à 200 nt et jusqu'à des dizaines de kilobases) présentent eux aussi des rôles régulateurs majeurs. Les lncARN sont impliqués dans la majorité des processus cellulaires et, par conséquent, dans de multiples pathologies puisque certains lncARN affectent des régulations épigénétiques et contrôlent le cycle cellulaire ou des réponses immunitaires [152].

Les virus ne font pas exception dans le monde des ARN régulateurs. En plus d'exprimer des VSR de nature protéique, certains d'entre eux expriment aussi leurs propres ARN non codants. La régulation par les miARN viraux a été démontrée pour la première fois en 2004 en étudiant le virus d'Epstein-Barr (EBV) [153]. L'EBV assure une régulation fine de son cycle viral par l'expression de 44 miARN viraux dont les cibles cellulaires sont multiples. Ces miARN contrôlent par exemple l'évasion du système immunitaire, le maintien de la latence virale et l'inhibition de l'apoptose. Ils assurent aussi la régulation de l'expression des protéines virales comme l'ADN polymérase (BALF5), les protéines membranaires (LMP1 et LMP2) impliquées dans la transformation, et l'immortalisation des lymphocytes B et BFLF2 requise pour la translocation nucléocytoplasmique des nucléocapsides. En ciblant les messagers codant pour ces protéines, les miARN viraux semblent inhiber l'activation du cycle lytique au profit du maintien de la latence virale et promouvoir l'échappement au système immunitaire [154]. L'expression de tels miARN viraux a été identifiée chez plusieurs autres virus des *Herpesviridae* [155], mais aussi au sein des baculovirus [156]. En plus, deux transcrits non codants sont exprimés par l'EBV : EBER1 et EBER2 (*EBV-encoded small RNA*) de 167 et 172 nt, respectivement. Leurs interactions avec les protéines PKR (*protein kinase R*), TLR3 (*toll like receptor 3*) et RIG-1 (*retinoic acid-inducible gene 1*) modulent le système immunitaire pour favoriser la pathogénicité virale et leur pouvoir transformant [157]. L'expression d'ARN non codant ciblant PKR rappelle la situation retrouvée chez les adénovirus (AdV).

Les AdV humains sont des virus à ADN double brin d'environ 36 kilopaires de bases. Ils expriment tous un transcrit non codant, VA RNAI (*virus-associated RNA*), d'environ 160 nt. Un deuxième ARN non codant, VA RNAII, est exprimé par 80 % des AdV et sont tous deux transcrits par l'ARN polymérase III à partir de régions intragéniques. Ces ARN sont hautement structurés et VA RNAI présente trois domaines distincts : une tige apicale,

un domaine central et une tige terminale. Ces VA RNA sont exportés du noyau par l'exportine 5 (Exp5) qui assure la translocation cytoplasmique de protéines à DRB, de petits ARN comme les ARN de transfert et les précurseurs de miARN et l'ARNm de Dicer [158]. Exp5 assure l'export d'ARN qui présentent une extrémité courte 3' sortante, une extrémité 5' appariée ainsi qu'une tige de 15 nt minimum. Cette structure est présente à l'extrémité de la tige terminale de VA RNAI et interagit directement avec Exp5. Synthétisés jusqu'à 10^8 copies par cellule, VA RNAI semble saturer Exp5 rentrant ainsi en compétition directe pour l'export des pre-miARN et des ARNm de Dicer. Cette compétition a pour effet de diminuer drastiquement l'interaction entre les ARNm de Dicer et Exp5 et provoque une déplétion d'accumulation des protéines Dicer cytoplasmiques. VA RNAI limite ainsi l'export des pre-miARN ainsi que leur maturation cytoplasmique en diminuant la quantité de protéines Dicer. Dans le cytoplasme, les VA RNA vont limiter le *RNA silencing* en saturant les Dicer disponibles. VA RNA I et VA RNAII présentent en effet de nombreux mésappariements à l'instar des miARN faisant d'eux de bons substrats. Bien qu'ils soient moins abondants que les VA RNAI, les VA RNAII sont préférentiellement clivés par Dicer et incorporés dans le complexe RISC sous le nom de « mivaRNAs » (*VA RNA-derived miRNAs*). Plusieurs ARN cibles complémentaires aux mivaRNAs ont été identifiés sans toutefois établir un lien direct entre le *silencing* de ces gènes et le bénéfice pour le virus, à l'exception de la cullin 4A. La suppression post-transcriptionnelle de la cullin 4A par un mivaRNAII stimule la voie de signalisation des JNK (*Jun N-terminal kinase*) en faveur de la réplication virale [159]. Néanmoins, la séquence nucléotidique des VA RNA est peu conservée au sein des AdV, l'efficacité de clivage et le nombre de coupures réalisé par Dicer tout comme la sélection du brin guide dans AGO2 semblent spécifiques à chaque sérotype viral. L'ensemble de ces éléments diminue la possibilité d'obtenir des mivaRNAs que l'on pourrait considérer comme « consensus » en assurant le *knock-down* de gènes communs. Les VA RNA pourraient agir comme de simples compétiteurs qui saturent les Dicer cellulaires et provoquent une dérégulation globale de la population des miARN. Des travaux supplémentaires apparaissent nécessaires pour élucider la fonction de ces mivaRNAs dont la biogenèse par Dicer est conservée chez tous les AdV et confirme l'importance pour les AdV de produire de tels substrats à action pro-virale [158]. Chez les mammifères, la réponse interféron reste toutefois la voie antivirale majeure [160] où la protéine PKR est activée par l'ARNdb. VA RNAI est aussi capable de fixer PKR pour empêcher sa dimérisation, limitant ainsi l'activation de cette voie antivirale par compétition avec les ARNdb viraux [161, 162]. L'identification de VSR protéiques au sein des flavivirus fut peu fructueuse [163] jusqu'à ce que cette fonction VSR

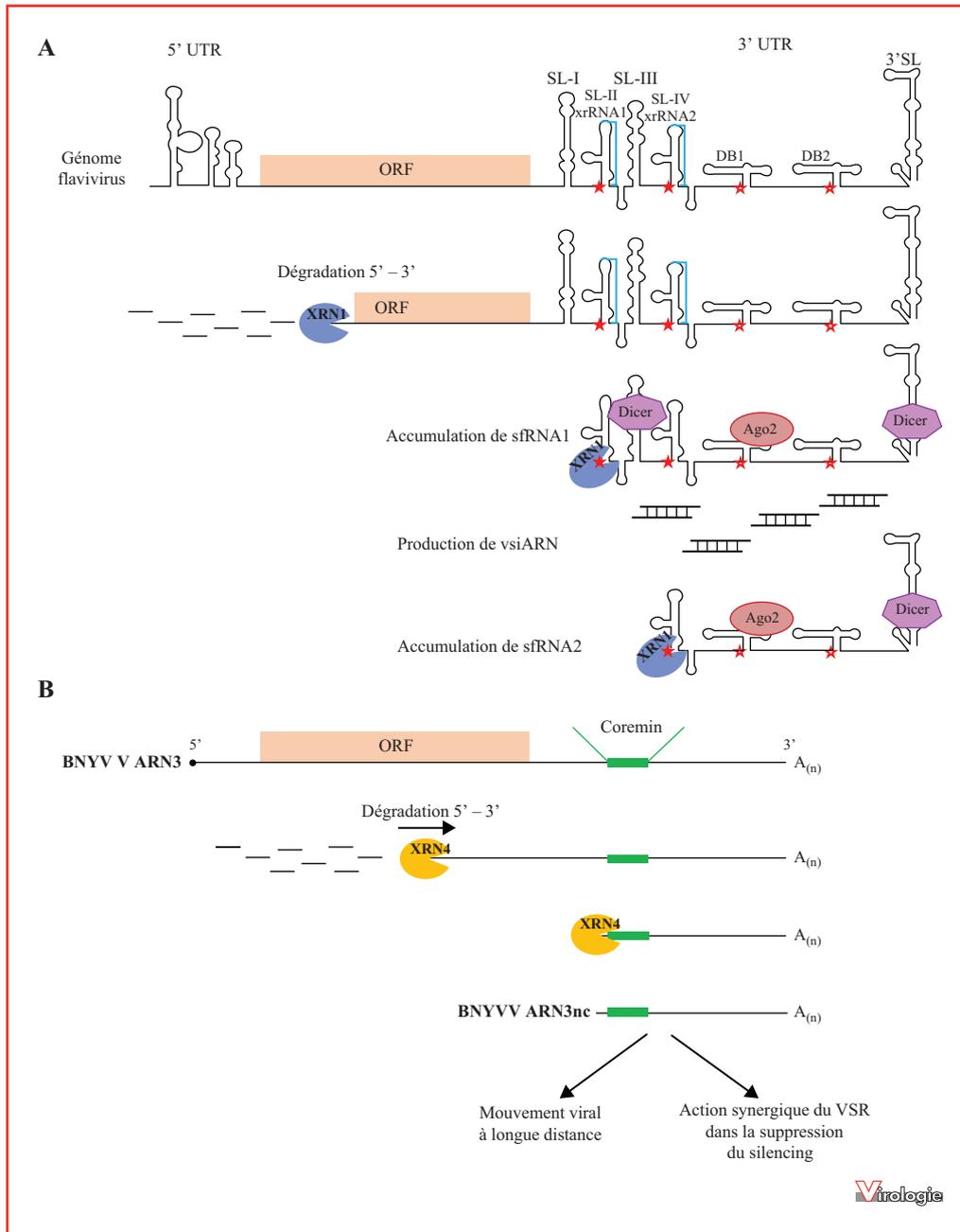


Figure 4. Modèles de biogenèse des sfRNA des flavivirus et de l'ARN3nc du BNYVV. A) Haut : représentation schématique du génome du *West Nile virus* (WNV). La sphère noire correspond à la coiffe. L'ARN viral est hautement structuré dans ses régions 5' et 3' UTR (*untranslated region*, région non traduite). Les structures SL-II et SL-IV sont aussi décrites sous le nom de *xrRNA1* et *xrRNA2* (*Xrn1-resistant RNA*), respectivement. La progression de XRN1 sur l'ARN est inhibée (étoiles rouge pleines) par la formation de pseudonœuds (représentés en bleu) au niveau de SL-II et SL-IV. La majorité des flavivirus exprime deux sfRNA : sfRNA1, qui s'accumule majoritairement, et sfRNA2. Des espèces supplémentaires, sfRNA3 et sfRNA4 (étoiles rouge vides), peuvent s'accumuler en fonction des flavivirus et de l'hôte étudiés (humain, moustique, cultures cellulaires). Les sfRNA semblent servir de leurre pour Dicer et Ago2, et des siARN viraux (*vsiARN*) s'accumulent. SL : *stem-loop* ; DB : *dumbbell* ; ORF : *open reading frame*. Pour revue, voir [211]. Image adaptée de [212]. **B)** Une population d'ARN3 génomique du BNYVV est dégradée de 5' en 3' par l'activité exoribonucléasique de XRN4. Environ 1 230 nucléotides de l'ARN3 sont ainsi éliminés, dont le cadre de lecture ouvert. La progression de XRN4 est bloquée par la séquence coremin et l'ARN3 non codant (ARN3nc) s'accumule. Un élément structural contenant la séquence coremin semble à l'origine du blocage de XRN4, mais cette structure reste à déterminer. Un mécanisme de dégradation comparable est décrit pour l'ARN5 du BNYVV [169].

soit associée à la protéine non structurale NS4B du virus de la dengue [164]. Cette suppression du *silencing* fut *a contrario* associée à la protéine structurale CP du virus de la fièvre jaune [165]. Si l'identification des VSR protéiques au sein des flavivirus semble divisée, ils assurent tous l'expression d'un ARN non codant (*subgenomic flavivirus RNA* [sfrRNA]), colinéaire à la région virale 3'UTR, essentielle à la pathogénicité virale [166]. Il était initialement nommé ARN viral subgénomique mais sa biogenèse fut rapidement associée à la dégradation incomplète des ARN viraux génomiques par XRN1, une exoribonucléase cellulaire impliquée dans la régulation du catabolisme des ARN [166]. Plusieurs travaux ont permis d'identifier les structures d'ARN assurant le blocage de XRN1 et l'accumulation subséquente des sfrRNA (*figure 4A*) [167]. La fonction des sfrRNA a été associée à la suppression du *silencing* en étudiant le *West Nile virus* (WNV), alors qu'aucune de ses protéines non structurales testées ne possède cette activité [163]. La suppression par l'intermédiaire des sfrRNA de WNV est efficace sur la voie des siARN et des miARN en cellules d'insectes et de mammifères. De tels résultats ont pu être transposés au virus de la dengue et complétés par l'étude du *Kunjin virus* (KUNV) confirmant l'importance des sfrRNA dans la suppression du *silencing* en contexte infectieux dans le moustique vecteur *Culex quinquefasciatus* [168]. Ces travaux ont également révélé une co-immunoprécipitation spécifique de la région 3'UTR avec Dicer et AGO2 dans des cellules infectées par le KUNV. De plus, les sfrRNA du WNV sont capables d'inhiber le clivage par Dicer d'un long ARNdb *in vitro* par un mécanisme qui semble compétitif puisque des produits de clivage spécifiques des sfrRNA sont obtenus [163]. Les sfrRNA pourraient, à l'instar des VA RNA, se substituer aux génomes viraux en saturant Dicer et AGO2 pour limiter la défense antivirale cellulaire.

Un mécanisme comparable est décrit pour le *beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV). Le génome de ce phytovirus multipartite est composé de quatre à cinq segments d'ARN de polarité positive, coiffés et polyadénylés, où chacun est encapsidé dans une particule hélicoïdale. Les ARN1 et ARN2 suffisent à assurer la réplication virale sur des plantes modèles comme *N. benthamiana*. Toutefois, sur les hôtes naturels (*i.e.* du genre *Beta*), les ARN4 et ARN3 sont nécessaires à la transmission et au mouvement viral systémique respectivement. Ce mouvement à longue distance n'est pas dépendant de l'ARN3 *per se*, mais repose plutôt sur l'accumulation d'un ARN viral non codant dérivé de l'ARN3 (ncRNA3) [169, 170], initialement désigné ARN3sub [171]. Au voisinage du domaine promoteur de la synthèse de l'ARN3sub se trouve la séquence « core », d'environ 250 nt impliquée dans le mouvement viral à longue distance [172]. L'étude détaillée de la séquence « core » a permis d'y identifier un motif de 20 nucléotides,

« coremin », conservé chez l'ensemble des Benyvirus [173] et connu sous « Box1 » au sein des Cucumovirus. Dans le cas du CMV, l'accumulation de l'ARN5 subgénomique est dépendante de cette séquence « Box1 » qui se structure sous la forme d'une tige-boucle [174]. Chez le BNYVV, la séquence « coremin » est indispensable à l'accumulation de l'ARN3sub et assure le mouvement viral à longue distance sur les espèces du genre *Beta* [169]. L'accumulation d'ARN3sub hors du contexte viral et *in vitro* définit cet ARN3sub comme un ARN non codant (ncRNA3) issu d'une dégradation incomplète de l'ARN3 [169]. La production de ncRNA3 est attribuée à la protéine cellulaire XRN4 d'*A. thaliana* qui dégrade l'ARN3 de 5' en 3' pour atteindre la séquence « coremin » où XRN4 semble bloquée par un élément structural (*figure 4B*) [175]. Les ARN viraux 1 et 2 du BNYVV suffisent à assurer l'infection et le mouvement viral à longue distance sur la plante modèle *N. benthamiana* où l'ARN1 permet d'exprimer les protéines nécessaires à la réplication virale tandis que les protéines structurales, de mouvement et le VSR p14 sont exprimées à partir de l'ARN2. La protéine p14 assure la suppression du *silencing* en limitant la production des siARN secondaires par le mécanisme de transitivity et est essentielle au mouvement viral systémique [176]. Toutefois, la version hypomorphe BA2 du VSR p14 est incapable d'assurer le mouvement viral à longue distance mais est partiellement complétée par l'ARN3nc. En effet, près de 40 % des plantes présentent une infection systémique lorsque l'ARN3 est supplémenté dans un inoculum contenant les ARN1 et ARN2-BA2. Cette complémentation n'est observée qu'en présence de l'ARN3 sauvage et non en présence d'ARN3 déficient dans l'accumulation de ncRNA3. Ainsi, le ncRNA3 assure la complémentation fonctionnelle d'un mutant de p14 déficient dans sa fonction de VSR [170].

Conclusions et perspectives

Chez de nombreux organismes, l'interférence par l'ARN assure les fonctions primordiales de régulation de l'expression des gènes, du maintien de leur développement et permet aussi de lutter contre différents stress biotiques. En effet, bien que cette revue soit focalisée sur les infections virales, le RNAi est aussi essentiel à la régulation des gènes lors d'infections bactériennes [177] et de stress abiotiques [178].

L'une des caractéristiques principales du *RNA silencing* est d'assurer la diminution d'expression de sa cible par homologie de séquence. Ce mécanisme permet en effet de cibler un quelconque ARN grâce à une séquence lui étant (partiellement) complémentaire portée par le brin guide. La régulation par le RNAi assure donc un potentiel infini et une

diversification totale des populations d'ARN à réprimer. Les phytovirus sont confrontés à cette redoutable machinerie et expriment une protéine et/ou un ARN capable(s) de contourner cette pression de sélection et de contrecarrer le *silencing* antiviral. Néanmoins, chaque virus exprime un VSR ayant un mode d'action unique alors que de fortes similarités persistent entre les facteurs cellulaires ciblés par les VSR : AGO, DCL, RDR, sARN. Les mécanismes de suppression sont bien plus diversifiés que les cibles disponibles. Cette polyvalence fonctionnelle des VSR complique leur étude où chaque VSR présente un nouvel enjeu de découverte scientifique. Une multitude de VSR sont décrits mais le mode d'action d'une minorité a pu être élucidé grâce à leur caractérisation structurale (ex. p19 et p21). Dans ce système, la fonction des supprimeurs endogènes du *silencing* est à prendre en compte également. Essentiels pour réguler le *RNA silencing* les virus ont su tirer profit de leurs fonctions initiales en induisant leur expression pour compléter l'action des VSR.

Si l'étude des VSR était initialement restreinte aux protéines, l'intérêt pour les ARN viraux ayant une action de VSR s'est depuis peu amplifié. Il n'est pas surprenant de retrouver des acides nucléiques voués à supprimer le *RNA silencing*, ce mécanisme étant lui-même initié et régi par des ARN. Un mécanisme de régulation permet de limiter le *silencing* endogène et consiste à dévier les miARN de leurs cibles initiales par des « éponges à miARN ». Un ARN possédant de multiples sites de liaison au miARN voulu est surexprimé de façon à favoriser la formation de complexes miRISC sur ces éponges de miARN. Les miARN sont ainsi séquestrés sur ces « éponges » et leur fonction initiale est détournée. Cette régulation est particulièrement étudiée en clinique mais le design des « éponges » reste compliqué et le risque d'*off-target* doit être contrôlé [179, 180]. La première « éponge » endogène à miARN a été découverte chez les plantes [181] puis chez les procaryotes [182]. Sans surprise, les virus sont parvenus à tirer profit de ce nouveau mécanisme de régulation, à l'instar de l'herpesvirus saimiri et du cytomégalovirus lytique murin [183, 184]. L'expression d'ARN non codants viraux a été démontrée pour plusieurs virus de plantes ou animaux. À l'inverse des VSR protéiques, une conservation fonctionnelle semble apparaître pour certains ARN non codants qui servent de leurres dans la machinerie du *silencing*. Leur fonction commune consiste à saturer les principales protéines antivirales de la voie du *RNA silencing* (Dicer-DCL, AGO, etc.). Un mécanisme de compétition est actuellement privilégié où DCL et AGO sont saturées par les leurres d'ARN non codants viraux, devenant alors déficientes dans leur fonction antivirale. Peu d'exemples sont donnés où ces ARN viraux non codants sont dédiés à intégrer un complexe RISC actif pour inhiber l'expression d'un gène précis. Ce processus de saturation n'est toutefois pas consensuel puisque certains virus,

comme l'EBV, expriment un certain nombre de miARN qui affectent le cycle cellulaire en faveur de l'infection virale. Enfin, le *RNA silencing* semble intimement lié aux différents mécanismes de dégradation des ARN dans la cellule, nommés RQC pour *RNA quality control*. Trois voies majeures de surveillance des ARN sont présentes dans la cellule : le NMD (*nonsense-mediated decay*), le NSD (*non-stop decay*) et le NGD (*no-go decay*). Ils assurent respectivement la dégradation des ARN qui contiennent des codons stop prématurés (*premature termination codon* [PTC]), des ARN dépourvus de codons stop et des ARN qui provoquent l'arrêt des ribosomes pendant la traduction. La taille des génomes viraux est souvent contrainte par la présence d'une capsidie et les virus ont développé plusieurs stratégies pour coder et exprimer des protéines à partir d'un génome le plus petit possible : les gènes chevauchants, la synthèse d'ARN subgénomiques, les mécanismes de translecture, etc. L'information génétique compactée chez les virus entraîne la formation de substrats idéaux pour la machinerie du RQC tels que (i) des micro-ORF ; (ii) des ARN non coiffés et non polyadénylés ; (iii) de longues séquences 3'UTR ; et (iv) des codons stop reconnus comme des PTC par les facteurs du NMD [185]. Chez les plantes [186] et les animaux [187], ces ARN viraux sont reconnus comme aberrants par la machinerie du NMD et soumis à la dégradation. Néanmoins, diverses stratégies sont utilisées par les virus pour contourner les effets délétères du NMD sur l'amplification virale. Par exemple, la résistance du virus du sarcome de Rous (RSV) au NMD est conférée par une structure d'ARN en aval d'un codon stop. Cette structure, riche en pyrimidine, assure le recrutement de la protéine PTBP1 (*polypyrimidine tract binding protein 1*) en lieu et place des protéines du NMD [188]. Une autre stratégie déployée par le virus T-lymphotropique humain de type I (HTLV-I) consiste à lier les protéines principales impliquées dans le NMD les empêchant ainsi d'exercer leur fonction [189]. Quelle que soit la stratégie employée, les ARN viraux sont stabilisés par l'inhibition du NMD. Initialement, une dichotomie semblait exister entre la fonction du RQC et celle de l'interférence par l'ARN où les ARN endogènes aberrants sont ciblés par les voies du RQC tandis que la régulation de l'expression de gènes endogènes mais aussi exogènes est assurée par le *RNA silencing*. Néanmoins, de multiples protéines impliquées dans les voies du RQC empêchent la mise en place du *RNA silencing*. La mutation de protéines associées au RQC stimule l'interférence par l'ARN et induit la dégradation d'ARN par la voie du *silencing* alors qu'ils n'y sont pas soumis en conditions sauvages. Dans cette revue, un exemple a été donné pour les exoribonucléases XRN2, XRN3 et XRN4, mais ce principe est désormais étendu à d'autres facteurs du RQC : les protéines associées à l'exosome et ses cofacteurs, responsables de la déadénylation, du decapping, etc. [190].

Bien que ces supresseurs endogènes du *silencing* aient été identifiés, une question restait en suspens dans la régulation négative du *RNA silencing* : comment expliquer que la transitivity régule la réponse antivirale et l'expression des transgènes tandis que les ARN endogènes (majoritairement régulés par la voie des miARN) n'y sont pas soumis ? Là encore, l'intrication entre RQC et *RNA silencing* est indéniable. En effet, la protéine SKI2 est associée à l'exosome afin d'assurer la dégradation 3'-5' des ARN dans le RQC. En plus, SKI2 assure la dégradation des produits de clivage 5' libérés après l'action du complexe RISC dans la voie des miARN. SKI2 empêche donc l'activation de la transitivity dans la voie des miARN en inhibant la biogenèse des siARN secondaires alors qu'ils s'accumulent dans les plantes *ski2* dépendamment de RDR6 [191]. La régulation de l'expression des gènes endogènes est ainsi préférentiellement soumise au RQC alors que leur prise en charge par la machinerie du *silencing* leur serait délétère.

L'interférence par l'ARN se présente ainsi comme un mécanisme hors-pair de régulation d'expression des gènes. Il est lui-même finement régulé par de multiples facteurs protéiques et/ou nucléiques. Son intrication avec diverses voies cellulaires (*RNA quality control*, édition des ARN) assure une régulation hiérarchique mais également coordonnée des processus d'expression. S'il est d'une complexité édifiante, le *RNA silencing* est aisément contourné lors d'infection virale. Les virus se présentent comme de redoutables perturbateurs capables d'éviter les effets de ce mécanisme antiviral ou même d'en tirer profit. Il reste toutefois de nombreuses perspectives de recherche en vue d'élucider les mécanismes du contournement viral, médié par les VSR et leur(s) ARN non codants associé(s).

Remerciements. Lucie Bellott a rédigé le manuscrit et réalisé les figures. Fabrice Michel et David Gilmer ont corrigé et édité la revue. Les auteurs remercient les deux reviewers pour leurs commentaires et suggestions.

Lucie Bellott est financée par une allocation doctorale du ministère de l'Éducation et de la Recherche.

Liens d'intérêt : Les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec l'article.

Références

- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 1990 ; 2 : 279-89.
- Van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR. Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 1990 ; 2 : 291-9.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998 ; 391 : 806-11.
- Sunkar R, Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Sci* 2007 ; 12 : 301-9.
- Chen X. Small RNAs and their roles in plant development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2009 ; 25 : 21-44.
- Ito H. Small RNAs and transposon silencing in plants. *Dev Growth Differ* 2012 ; 54 : 100-7.
- Molnar A, Bassett A, Thuenemann E, et al. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* 2009 ; 58 : 165-74.
- He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet* 2004 ; 5 : 522-31.
- Morris KV, Chan SW, Jacobsen SE, Looney DJ. Small interfering RNA-induced transcriptional gene silencing in human cells. *Science* 2004 ; 305 : 1289-92.
- Moazed D. Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature* 2009 ; 457 : 413-20.
- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008 ; 9 : 102-14.
- Vazquez F, Legrand S, Windels D. The biosynthetic pathways and biological scopes of plant small RNAs. *Trends Plant Sci* 2010 ; 15 : 337-45.
- Borsani O, Zhu J, Verslues PE, Sunkar R, Zhu J-K. Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell* 2005 ; 123 : 1279-91.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 2001 ; 409 : 363-6.
- Martinez J, Patkaniowska A, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* 2002 ; 110 : 563-74.
- Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 2000 ; 404 : 293-6.
- Hutvagner G, Simard MJ. Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008 ; 9 : 22-32.
- Wang XH, Aliyari R, Li WX, et al. RNA interference directs innate immunity against viruses in adult *Drosophila*. *Science* 2006 ; 312 : 452-4.
- Petitjean O, Montavon T, Pfeffer S. En avoir ou pas, l'interférence par l'ARN comme défense antivirale chez les mammifères. *Virologie* 2018 ; 22 : 251-60.
- Hamilton AJ, Baulcombe DC. Species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 1999 ; 286 : 950-2.
- Gascioli V, Mallory AC, Bartel DP, Vaucheret H. Partially redundant functions of *Arabidopsis* DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. *Curr Biol* 2005 ; 15 : 1494-500.
- Kurihara Y, Watanabe Y. *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 ; 101 : 12753-8.
- Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM, et al. Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biol* 2004 ; 2 : e104.
- Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, Kasschau KD, Carrington JC, Voinnet O. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 2006 ; 313 : 68-71.

25. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 2001 ; 15 : 188-200.
26. Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T. Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J* 2001 ; 20 : 6877-88.
27. Li J, Yang Z, Yu B, Liu J, Chen X. Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 2005 ; 15 : 1501-7.
28. Yang Z, Ebright YW, Yu B, Chen X. HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res* 2006 ; 34 : 667-75.
29. Song JJ, Liu J, Tolia NH, *et al.* The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol* 2003 ; 10 : 1026-32.
30. Yan KS, Yan S, Farooq A, Han A, Zeng L, Zhou MM. Structure and conserved RNA binding of the PAZ domain. *Nature* 2003 ; 426 : 468-74.
31. Ma JB, Yuan YR, Meister G, Pei Y, Tuschl T, Patel DJ. Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* 2005 ; 434 : 666-70.
32. Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 2004 ; 305 : 1434-7.
33. Baumberger N, Baulcombe DC. *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005 ; 102 : 11928-33.
34. Carbonell A, Fahlgren N, Garcia-Ruiz H, *et al.* Functional analysis of three *Arabidopsis* ARGONAUTES using slicer-defective mutants. *Plant Cell* 2012 ; 24 : 3613-29.
35. Montgomery TA, Howell MD, Cuperus JT, *et al.* Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell* 2008 ; 133 : 128-41.
36. Qi YJ, He XY, Wang XJ, Kohany O, Jurka J, Hannon GJ. Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature* 2006 ; 443 : 1008-12.
37. Garcia-Ruiz H, Carbonell A, Hoyer JS, *et al.* Roles and programming of *Arabidopsis* ARGONAUTE proteins during turnip mosaic virus infection. *PLoS Pathog* 2015 ; 11 : e1004755.
38. Harvey JJW, Lewsey MG, Patel K, *et al.* An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS One* 2011 ; 6 : e14639.
39. Jaubert M, Bhattacharjee S, Mello AF, Perry KL, Moffett P. ARGONAUTE2 mediates RNA-silencing antiviral defenses against potato virus X in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2011 ; 156 : 1556-64.
40. Hamera S, Song X, Su L, Chen X, Fang R. Cucumber mosaic virus suppressor 2b binds to AGO4-related small RNAs and impairs AGO4 activities. *Plant J* 2012 ; 69 : 104-15.
41. Raja P, Jackel JN, Li S, Heard IM, Bisaro DM. *Arabidopsis* double-stranded RNA binding protein DRB3 participates in methylation-mediated defense against geminiviruses. *J Virol* 2014 ; 88 : 2611-22.
42. Raja P, Sanville BC, Buchmann RC, Bisaro DM. Viral genome methylation as an epigenetic defense against geminiviruses. *J Virol* 2008 ; 82 : 8997-9007.
43. Miyoshi K, Tsukumo H, Nagami T, Siomi H, Siomi MC. Slicer function of *Drosophila* Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes Dev* 2005 ; 19 : 2837-48.
44. Yoda M, Kawamata T, Paroo Z, *et al.* ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat Struct Mol Biol* 2010 ; 17 : 17-23.
45. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003 ; 115 : 209-16.
46. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 2003 ; 115 : 199-208.
47. Mi S, Cai T, Hu Y, *et al.* Sorting of small RNAs into *Arabidopsis* argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* 2008 ; 133 : 116-27.
48. Takeda A, Iwasaki S, Watanabe T, Utsumi M, Watanabe Y. The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. *Plant Cell Physiol* 2008 ; 49 : 493-500.
49. Hu HY, Yan Z, Xu Y, *et al.* Sequence features associated with microRNA strand selection in humans and flies. *BMC Genomics* 2009 ; 10 : 413.
50. Ghildiyal M, Xu J, Seitz H, Weng Z, Zamore PD. Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs partitions microRNA* strands into the RNA interference pathway. *RNA* 2010 ; 16 : 43-56.
51. Frank F, Sonenberg N, Nagar B. Structural basis for 5'-nucleotide base-specific recognition of guide RNA by human AGO2. *Nature* 2010 ; 465 : 818-22.
52. Leuschner PJ, Ameres SL, Kueng S, Martinez J. Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep* 2006 ; 7 : 314-20.
53. Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 2005 ; 123 : 607-20.
54. Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X. Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 2005 ; 123 : 621-9.
55. Kawamata T, Seitz H, Tomari Y. Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nat Struct Mol Biol* 2009 ; 16 : 953-60.
56. Vaistij FE, Jones L, Baulcombe DC. Spreading of RNA targeting and DNA methylation in RNA silencing requires transcription of the target gene and a putative RNA-dependent RNA polymerase. *Plant Cell* 2002 ; 14 : 857-67.
57. Curaba J, Chen X. Biochemical activities of *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerase 6. *J Biol Chem* 2008 ; 283 : 3059-66.
58. Wang X-B, Wu Q, Ito T, *et al.* RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 ; 107 : 484-9.
59. Kumakura N, Takeda A, Fujioka Y, Motose H, Takano R, Watanabe Y. SGS3 and RDR6 interact and colocalize in cytoplasmic SGS3/RDR6-bodies. *FEBS Lett* 2009 ; 583 : 1261-6.
60. Yoshikawa M, Peragine A, Park MY, Poethig RS. A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 2005 ; 19 : 2164-75.
61. Dunoyer P, Himber C, Voinnet O. 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* 2005 ; 37 : 1356-60.
62. Himber C, Moissiard G, Ritzenthaler C, Voinnet O, Dunoyer P. Transitivity dependent and independent cell to cell movement of RNA silencing. *EMBO J* 2003 ; 22 : 4523-33.
63. Burgyan J, Havelda Z. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci* 2011 ; 16 : 265-72.

64. Pruss G, Ge X, Shi XM, Carrington JC, Bowman Vance V. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 1997; 9: 859-68.
65. Kasschau KD, Cronin S, Carrington JC. Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology* 1997; 228: 251-62.
66. Anandalakshmi R, Pruss GJ, Ge X, *et al.* A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 13079-84.
67. Lakatos L, Csorba T, Pantaleo V, *et al.* Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J* 2006; 25: 2768-80.
68. Del Toro FJ, Donaire L, Aguilar E, Chung B-N, Tenllado F, Canto T. Potato virus Y HCPro suppression of antiviral Silencing in *Nicotiana benthamiana* plants correlates with its ability to bind *in vivo* to 21- and 22-nucleotide small RNAs of viral sequence. *J Virol* 2017; 91: e00367-417.
69. Jamous RM, Boonrod K, Fuellgrabe MW, Ali-Shtayeh MS, Krczal G, Wassenegger M. The helper component-proteinase of the zucchini yellow mosaic virus inhibits the Hua enhancer 1 methyltransferase activity *in vitro*. *J Gen Virol* 2011; 92: 2222-6.
70. Ivanov KI, Eskelin K, Bašić M, *et al.* Molecular insights into the function of the viral RNA silencing suppressor HCPro. *Plant J* 2016; 85: 30-45.
71. Varallyay E, Havelda Z. Unrelated viral suppressors of RNA silencing mediate the control of ARGONAUTE1 level. *Mol Plant Pathol* 2013; 14: 567-75.
72. Cheng X, Wang A, Simon AE. The potyvirus silencing suppressor protein VPg mediates degradation of SGS3 via ubiquitination and autophagy pathways. *J Virol* 2017; 91: e01478-1516.
73. Rajamäki M-L, Streng J, Valkonen JP. Silencing suppressor protein VPg of a potyvirus interacts with the plant silencing-related protein SGS3. *Mol Plant Microbe Interact* 2014; 27: 1199-210.
74. Brigneti G, Voinnet O, Li W-X, Ji L-H, Ding S-W, Baulcombe DC. Retracted: viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J* 1998; 17: 6739-46.
75. Zhang X, Yuan Y-R, Pei Y, *et al.* Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev* 2006; 20: 3255-68.
76. González I, Rakitina D, Semashko M, *et al.* RNA binding is more critical to the suppression of silencing function of cucumber mosaic virus 2b protein than nuclear localization. *RNA* 2012; 18: 771-82.
77. Nemes K, Gellért Á, Almási A, *et al.* Phosphorylation regulates the subcellular localization of cucumber mosaic virus 2b protein. *Sci Rep* 2017; 7: 13444.
78. Love AJ, Laird J, Holt J, Hamilton AJ, Sadanandom A, Milner JJ. Cauliflower mosaic virus protein P6 is a suppressor of RNA silencing. *J Gen Virol* 2007; 88: 3439-44.
79. Haas G, Azevedo J, Moissiard G, *et al.* Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *EMBO J* 2008; 27: 2102-12.
80. Cuellar WJ, Kreuze JF, Rajamaki ML, Cruzado KR, Untiveros M, Valkonen JP. Elimination of antiviral defense by viral RNase III. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 10354-8.
81. Silhavy D, Molnar A, Lucioli A, *et al.* A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J* 2002; 21: 3070-80.
82. Ye K, Malinina L, Patel DJ. Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* 2003; 426: 874-8.
83. Vargason JM, Szittyá G, Burgyan J, Hall TM. Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 2003; 115: 799-811.
84. Zhou ZS, Dell'Orco M, Saldarelli P, Turturo C, Minafra A, Martelli GP. Identification of an RNA-silencing suppressor in the genome of grapevine virus A. *J Gen Virol* 2006; 87: 2387-95.
85. Ye K, Patel DJ. RNA silencing suppressor p21 of beet yellows virus forms an RNA binding octameric ring structure. *Structure* 2005; 13: 1375-84.
86. Chapman EJ, Prokhnevsky AI, Gopinath K, Dolja VV, Carrington JC. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev* 2004; 18: 1179-86.
87. Incarbone M, Zimmermann A, Hammann P, Erhardt M, Michel F, Dunoyer P. Neutralization of mobile antiviral small RNA through peroxisomal import. *Nat Plants* 2017; 3: 17094.
88. Dunoyer P, Pfeffer S, Fritsch C, Hemmer O, Voinnet O, Richards KE. Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clump virus. *Plant J* 2002; 29: 555-67.
89. Hu J, Baker A, Bartel B, *et al.* Plant peroxisomes: biogenesis and function. *Plant Cell* 2012; 24: 2279-303.
90. Sijen T, Fleenor J, Simmer F, *et al.* On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 2001; 107: 465-76.
91. Guo H, Song X, Xie C, *et al.* Rice yellow stunt rhabdovirus protein 6 suppresses systemic RNA silencing by blocking RDR6-mediated secondary siRNA synthesis. *Mol Plant Microbe Interact* 2013; 26: 927-36.
92. Fukunaga R, Doudna JA. dsRNA with 5' overhangs contributes to endogenous and antiviral RNA silencing pathways in plants. *EMBO J* 2009; 28: 545-55.
93. Glick E, Zrachya A, Levy Y, *et al.* Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 157-61.
94. Okano Y, Senshu H, Hashimoto M, *et al.* In planta recognition of a double-stranded RNA synthesis protein complex by a potyviral RNA silencing suppressor. *Plant Cell* 2014; 26: 2168-83.
95. Pfeffer S, Dunoyer P, Heim F, Richards KE, Jonard G, Ziegler-Graff V. P0 of beet western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J Virol* 2002; 76: 6815-24.
96. Pazhouhandeh M, Dieterle M, Marrocco K, *et al.* F-box-like domain in the *Polevirus* protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 1994-9.
97. Baumberger N, Tsai CH, Lie M, Havecker E, Baulcombe DC. The *Polevirus* silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr Biol* 2007; 17: 1609-14.
98. Derrien B, Schepetilnikov M, Viotti C, *et al.* Degradation of the antiviral component ARGONAUTES1 by the autophagy pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109: 15942-6.
99. Bortolamiol D, Pazhouhandeh M, Marrocco K, Genschik P, Ziegler-Graff V. The *Polevirus* F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Curr Biol* 2007; 17: 1615-21.
100. Csorba T, Lozsa R, Hutvagner G, Burgyan J. *Polevirus* protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1. *Plant J* 2010; 62: 463-72.
101. Fernández-Calvino L, Martínez-Priego L, Szabo EZ, *et al.* Tobacco rattle virus 16K silencing suppressor binds ARGONAUTE 4 and inhibits formation of RNA silencing complexes. *J Gen Virol* 2016; 97: 246-57.

- 102.** Chiu MH, Chen IH, Baulcombe DC, Tsai CH. The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Mol Plant Pathol* 2010; 11 : 641-9.
- 103.** El-Shami M, Pontier D, Lahmy S, *et al.* Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes Dev* 2007; 21 : 2539-44.
- 104.** Eulalio A, Tritschler F, Izaurralde E. The GW182 protein family in animal cells: new insights into domains required for miRNA-mediated gene silencing. *RNA* 2009; 15 : 1433-42.
- 105.** Giner A, Lakatos L, Garcia-Chapa M, Lopez-Moya JJ, Burgyan J. Viral protein inhibits RISC activity by argonaute binding through conserved WG/GW motifs. *PLoS Pathog* 2010; 6 : e1000996.
- 106.** Kenesi E, Carbonell A, Lózsza R, Vértessy B, Lakatos L. A viral suppressor of RNA silencing inhibits ARGONAUTE 1 function by precluding target RNA binding to pre-assembled RISC. *Nucleic Acids Res* 2017; 45 : 7736-50.
- 107.** Till S, Lejeune E, Thermann R, *et al.* A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14 : 897-903.
- 108.** Azevedo J, Garcia D, Pontier D, *et al.* Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev* 2010; 24 : 904-15.
- 109.** Qu F, Ren T, Morris TJ. The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *J Virol* 2003; 77 : 511-22.
- 110.** Merai Z, Kerényi Z, Kertesz S, Magna M, Lakatos L, Silhavy D. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol* 2006; 80 : 5747-56.
- 111.** Perez-Canamas M, Hernandez C. Key importance of small RNA binding for the activity of a glycine-tryptophan (GW) motif-containing viral suppressor of RNA silencing. *J Biol Chem* 2015; 290 : 3106-20.
- 112.** Karran RA, Sanfacon H. Tomato ringspot virus coat protein binds to ARGONAUTE 1 and suppresses the translation repression of a reporter gene. *Mol Plant Microbe Interact* 2014; 27 : 933-43.
- 113.** O’Riordan MX, Bauler LD, Scott FL, Duckett CS. Inhibitor of apoptosis proteins in eukaryotic evolution and development: a model of thematic conservation. *Dev Cell* 2008; 15 : 497-508.
- 114.** Anandalakshmi R, Marathe R, Ge X, *et al.* A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 2000; 290 : 142-4.
- 115.** Chung HY, Lacatus G, Sunter G. Geminivirus AL2 protein induces expression of, and interacts with, a calmodulin-like gene, an endogenous regulator of gene silencing. *Virology* 2014; 460-461 : 108-18.
- 116.** Li F, Huang C, Li Z, Zhou X. Suppression of RNA silencing by a plant DNA virus satellite requires a host calmodulin-like protein to repress RDR6 expression. *PLoS Pathog* 2014; 10 : e1003921.
- 117.** Li F, Zhao N, Li Z, *et al.* A calmodulin-like protein suppresses RNA silencing and promotes geminivirus infection by degrading SGS3 via the autophagy pathway in *Nicotiana benthamiana*. *PLoS Pathog* 2017; 13 : e1006213. doi: 10.1371/journal.ppat.1006213.
- 118.** Nakahara KS, Masuta C, Yamada S, *et al.* Tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNA silencing suppressors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012; 109 : 10113-8.
- 119.** Braz AS, Finnegan J, Waterhouse P, Margis R. A plant orthologue of RNase L inhibitor (RLI) is induced in plants showing RNA interference. *J Mol Evol* 2004; 59 : 20-30.
- 120.** Martinand C, Salehzada T, Silhol M, Lebleu B, Bisbal C. The RNase L inhibitor (RLI) is induced by double-stranded RNA. *J Interferon Cytokine Res* 1998; 18 : 1031-8.
- 121.** Martinand C, Montavon C, Salehzada T, Silhol M, Lebleu B, Bisbal C. RNase L inhibitor is induced during human immunodeficiency virus type 1 infection and down regulates the 2-5A/RNase L pathway in human T cells. *J Virol* 1999; 73 : 290-6.
- 122.** Sarmiento C, Nigul L, Kazantseva J, Buschmann M, Truve E. AtRLI2 is an endogenous suppressor of RNA silencing. *Plant Mol Biol* 2006; 61 : 153-63.
- 123.** Kärblane K, Gerassimenko J, Nigul L, *et al.* ABCE1 is a highly conserved RNA silencing suppressor. *PLoS One* 2015; 10 : e0116702.
- 124.** De Almeida C, Scheer H, Gobert A, *et al.* RNA uridylation and decay in plants. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2018; 373 : 20180163.
- 125.** Souret FF, Kastenmayer JP, Green PJ. AtXRN4 degrades mRNA in *Arabidopsis* and its substrates include selected miRNA targets. *Mol Cell* 2004; 15 : 173-83.
- 126.** Gazzani S, Lawrenson T, Woodward C, Headon D, Sablowski R. A link between mRNA turnover and RNA interference in *Arabidopsis*. *Science* 2004; 306 : 1046-8.
- 127.** Gy I, Gascioli V, Laursseguies D, *et al.* *Arabidopsis* FIERY1, XRN2, and XRN3 are endogenous RNA silencing suppressors. *Plant Cell* 2007; 19 : 3451-61.
- 128.** Kastenmayer JP, Green PJ. Novel features of the XRN-family in *Arabidopsis*: evidence that AtXRN4, one of several orthologs of nuclear Xrn2p/Rat1p, functions in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97 : 13985-90.
- 129.** Smardon A, Spoerke JM, Stacey SC, Klein ME, Mackin N, Maine EM. EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr Biol* 2000; 10 : 169-78.
- 130.** Simmer F, Tijsterman M, Parrish S, *et al.* Loss of the putative RNA-directed RNA polymerase RRF-3 makes *C. elegans* hypersensitive to RNAi. *Curr Biol* 2002; 12 : 1317-9.
- 131.** Kennedy S, Wang D, Ruvkun G. A conserved siRNA-degrading RNase negatively regulates RNA interference in *C. elegans*. *Nature* 2004; 427 : 645-9.
- 132.** Shamandi N, Zytnicki M, Charbonnel C, *et al.* Plants encode a general siRNA suppressor that is induced and suppressed by viruses. *PLoS Biol* 2015; 13 : 1-28.
- 133.** Charbonnel C, Niazi AK, Elvira-Matlot E, *et al.* The siRNA suppressor RTL1 is redox-regulated through glutathionylation of a conserved cysteine in the double-stranded-RNA-binding domain. *Nucleic Acids Res* 2017; 45 : 11891-907.
- 134.** Li H, Li WX, Ding SW. Induction and suppression of RNA silencing by an animal virus. *Science* 2002; 296 : 1319-21.
- 135.** Lingel A, Simon B, Izaurralde E, Sattler M. The structure of the flock house virus B2 protein, a viral suppressor of RNA interference, shows a novel mode of double-stranded RNA recognition. *EMBO Rep* 2005; 6 : 1149-55.
- 136.** Chao JA, Lee JH, Chapados BR, Debler EW, Schneemann A, Williamson JR. Dual modes of RNA-silencing suppression by flock house virus protein B2. *Nat Struct Mol Biol* 2005; 12 : 952-7.
- 137.** Sullivan CS, Ganem D. A virus-encoded inhibitor that blocks RNA interference in mammalian cells. *J Virol* 2005; 79 : 7371-9.
- 138.** Lu R, Maduro M, Li F, *et al.* Animal virus replication and RNAi-mediated antiviral silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2005; 436 : 1040-3.

139. Singh G, Popli S, Hari Y, Malhotra P, Mukherjee S, Bhatnagar RK. Suppression of RNA silencing by flock house virus B2 protein is mediated through its interaction with the PAZ domain of Dicer. *FASEB J* 2009; 23 : 1845-57.
140. Bucher E, Hemmes H, De Haan P, Goldbach R, Prins M. The influenza A virus NS1 protein binds small interfering RNAs and suppresses RNA silencing in plants. *J Gen Virol* 2004; 85 : 983-91.
141. Delgadillo MO, Sáenz P, Salvador B, García JA, Simón-Mateo C. Human influenza virus NS1 protein enhances viral pathogenicity and acts as an RNA silencing suppressor in plants. *J Gen Virol* 2004; 85 : 993-9.
142. Schnettler E, De Vries W, Hemmes H, *et al.* The NS3 protein of rice hoja blanca virus complements the RNAi suppressor function of HIV-1 Tat. *EMBO Rep* 2009; 10 : 258-63.
143. Qian S, Zhong X, Yu L, Ding B, De Haan P, Boris-Lawrie K. HIV-1 Tat RNA silencing suppressor activity is conserved across kingdoms and counteracts translational repression of HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106 : 605-10.
144. Haasnoot J, De Vries W, Geutjes EJ, Prins M, De Haan P, Berkhout B. The Ebola virus VP35 protein is a suppressor of RNA silencing. *PLoS Pathog* 2007; 3 : e86.
145. Li W-X, Li H, Lu R, *et al.* Interferon antagonist proteins of influenza and vaccinia viruses are suppressors of RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101 : 1350-5.
146. Maillard PV, Van der Veen AG, Deddouch-Grass S, Rogers NC, Merits A, Reis e Sousa C. Inactivation of the type I interferon pathway reveals long double-stranded RNA-mediated RNA interference in mammalian cells. *EMBO J* 2016; 35 : 2505-18.
147. Maillard PV, Ciaudo C, Marchais A, *et al.* Antiviral RNA interference in mammalian cells. *Science* 2013; 342 : 235-8.
148. Li Y, Lu J, Han Y, Fan X, Ding SW. RNA interference functions as an antiviral immunity mechanism in mammals. *Science* 2013; 342 : 231-4.
149. Qiu Y, Xu Y, Zhang Y, *et al.* Human virus-derived small RNAs can confer antiviral immunity in mammals. *Immunity* 2017; 46 : 992-1004.
150. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75 : 843-54.
151. Czech B, Munafò M, Ciabrelli F, *et al.* piRNA-guided genome defense: from biogenesis to silencing. *Annu Rev Genet* 2018; 52 : 131-57.
152. Beermann J, Piccoli M-T, Viereck J, Thum T. Non-coding RNAs in development and disease: background, mechanisms, and therapeutic approaches. *Physiol Rev* 2016; 96 : 1297-325.
153. Pfeffer S, Zavolan M, Grässer FA, *et al.* Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 2004; 304 : 734-6.
154. Barth S, Meister G, Grässer FA. EBV-encoded miRNAs. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1809 : 631-40.
155. Pfeffer S, Sewer A, Lagos-Quintana M, *et al.* Identification of microRNAs of the herpesvirus family. *Nat Methods* 2005; 2 : 269-76.
156. Singh J, Singh CP, Bhavani A, Nagaraju J. Discovering microRNAs from *Bombyx mori* nucleopolyhedrosis virus. *Virology* 2010; 407 : 120-8.
157. Iwakiri D. Multifunctional non-coding Epstein-Barr virus encoded RNAs (EBERs) contribute to viral pathogenesis. *Virus Res* 2016; 212 : 30-8.
158. Vachon VK, Conn GL. Adenovirus VA RNA: an essential pro-viral non-coding RNA. *Virus Res* 2016; 212 : 39-52.
159. Wakabayashi K, Machitani M, Tachibana M, Sakurai F, Mizuguchi H. A MicroRNA derived from adenovirus virus-associated RNAII promotes virus infection via posttranscriptional gene silencing. *J Virol* 2019; 93 : e01265-1318.
160. Randall RE, Goodbourn S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J Gen Virol* 2008; 89 : 1-47.
161. Kitajewski J, Schneider RJ, Safer B, *et al.* Adenovirus VAI RNA antagonizes the antiviral action of interferon by preventing activation of the interferon-induced eIF-2 α kinase. *Cell* 1986; 45 : 195-200.
162. Clarke PA, Mathews MB. Interactions between the double-stranded RNA binding motif and RNA: definition of the binding site for the interferon-induced protein kinase DAI (PKR) on adenovirus VA RNA. *RNA* 1995; 1 : 7-20.
163. Schnettler E, Sterken MG, Leung JY, *et al.* Noncoding *Flavivirus* RNA displays RNA interference suppressor activity in insect and mammalian cells. *J Virol* 2012; 86 : 13486-500.
164. Kakumani PK, Ponia SS, Rajgokul KS, *et al.* Role of RNA interference (RNAi) in dengue virus replication and identification of NS4B as an RNAi suppressor. *J Virol* 2013; 87 : 8870-83.
165. Samuel GH, Wiley MR, Badawi A, Adelman ZN, Myles KM. Yellow fever virus capsid protein is a potent suppressor of RNA silencing that binds double-stranded RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113 : 13863-8.
166. Pijlman GP, Funk A, Kondratieva N, *et al.* A highly structured, nuclease-resistant, noncoding RNA produced by flaviviruses is required for pathogenicity. *Cell Host Microbe* 2008; 4 : 579-91.
167. Slonchak A, Khromykh AA. Subgenomic flaviviral RNAs: what do we know after the first decade of research. *Antiviral Res* 2018; 159 : 13-25.
168. Moon SL, Dodd BJT, Brackney DE, Wilusz CJ, Ebel GD, Wilusz J. *Flavivirus* sRNA suppresses antiviral RNA interference in cultured cells and mosquitoes and directly interacts with the RNAi machinery. *Virology* 2015; 485 : 322-9.
169. Peltier C, Klein E, Hleibieh K, *et al.* Beet necrotic yellow vein virus subgenomic RNA3 is a cleavage product leading to stable non-coding RNA required for long-distance movement. *J Gen Virol* 2012; 93 : 1093-102.
170. Flobinus A, Hleibieh K, Klein E, Ratti C, Bouzoubaa S, Gilmer D. A viral noncoding RNA complements a weakened viral RNA silencing suppressor and promotes efficient systemic host infection. *Viruses* 2016; 8 : 272.
171. Balmori E, Gilmer D, Richards K, Guilley H, Jonard G. Mapping the promoter for subgenomic RNA synthesis on beet necrotic yellow vein virus RNA 3. *Biochimie* 1993; 75 : 517-21.
172. Lauber E, Guilley H, Tamada T, Richards KE, Jonard G. Vascular movement of beet necrotic yellow vein virus in *Beta macrocarpa* is probably dependent on an RNA 3 sequence domain rather than a gene product. *J Gen Virol* 1998; 79 : 385-93.
173. Ratti C, Hleibieh K, Bianchi L, Schirmer A, Autonell CR, Gilmer D. Beet soil-borne mosaic virus RNA-3 is replicated and encapsidated in the presence of BNYVV RNA-1 and -2 and allows long distance movement in *Beta macrocarpa*. *Virology* 2009; 385 : 392-9.
174. Thompson JR, Buratti E, De Wispelaere M, Tepfer M. Structural and functional characterization of the 5' region of subgenomic RNA5 of cucumber mosaic virus. *J Gen Virol* 2008; 89 : 1729-38.
175. Flobinus A, Chevigny N, Charley PA, *et al.* Beet necrotic yellow vein virus noncoding RNA production depends on a 5' \rightarrow 3' Xrn exoribonuclease activity. *Viruses* 2018; 10 : 137.
176. Chiba S, Hleibieh K, Delbianco A, *et al.* The benyvirus RNA silencing suppressor is essential for long-distance movement, requires both zinc-finger and NoLS basic residues but not a nucleolar localization for its silencing-suppression activity. *Mol Plant Microbe Interact* 2013; 26 : 168-81.
177. Staedel C, Darfeuille F. MicroRNAs and bacterial infection. *Cell Microbiol* 2013; 15 : 1496-507.

- 178.** Guleria P, Mahajan M, Bhardwaj J, Yadav SK. Plant small RNAs: biogenesis, mode of action and their roles in abiotic stresses. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2011 ; 9 : 183-99.
- 179.** Tay FC, Lim JK, Zhu H, Hin LC, Wang S. Using artificial microRNA sponges to achieve microRNA loss-of-function in cancer cells. *Adv Drug Deliv Rev* 2015 ; 81 : 117-27.
- 180.** Barta T, Peskova L, Hampl A. miRNAsong: a web-based tool for generation and testing of miRNA sponge constructs *in silico*. *Sci Rep* 2016 ; 6 : 36625.
- 181.** Franco-Zorrilla JM, Valli A, Todesco M, *et al*. Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat Genet* 2007 ; 39 : 1033-7.
- 182.** Figueroa-Bossi N, Valentini M, Malleret L, Bossi L. Caught at its own game: regulatory small RNA inactivated by an inducible transcript mimicking its target. *Genes Dev* 2009 ; 23 : 2004-15.
- 183.** Cazalla D, Yario T, Steitz JA. Down-regulation of a host MicroRNA by a *Herpesvirus saimiri* noncoding RNA. *Science* 2010 ; 328 : 1563-6.
- 184.** Marcinowski L, Tanguy M, Krmpotic A, *et al*. Degradation of cellular miR-27 by a novel, highly abundant viral transcript is important for efficient virus replication *in vivo*. *PLoS Pathog* 2012 ; 8 : e1002510.
- 185.** Balistreri G, Bognanni C, Mühlemann O. Virus escape and manipulation of cellular nonsense-mediated mRNA decay. *Viruses* 2017 ; 9 : 24.
- 186.** Garcia D, Garcia S, Voinnet O. Nonsense-mediated decay serves as a general viral restriction mechanism in plants. *Cell Host Microbe* 2014 ; 16 : 391-402.
- 187.** Balistreri G, Horvath P, Schweingruber C, *et al*. The host nonsense-mediated mRNA decay pathway restricts mammalian RNA virus replication. *Cell Host Microbe* 2014 ; 16 : 403-11.
- 188.** Ge Z, Quek BL, Beemon KL, Hogg JR. Polypyrimidine tract binding protein 1 protects mRNAs from recognition by the nonsense-mediated mRNA decay pathway. *eLife* 2016 ; 5 : e11155.
- 189.** Mocquet V, Neusiedler J, Rende F, *et al*. The human T-lymphotropic virus type 1 tax protein inhibits nonsense-mediated mRNA decay by interacting with INT6/EIF3E and UPF1. *J Virol* 2012 ; 86 : 7530-43.
- 190.** Liu L, Chen X. RNA quality control as a key to suppressing RNA silencing of endogenous genes in plants. *Mol Plant* 2016 ; 9 : 826-36.
- 191.** Branscheid A, Marchais A, Schott G, *et al*. SKI2 mediates degradation of RISC 5'-cleavage fragments and prevents secondary siRNA production from miRNA targets in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* 2015 ; 43 : 10975-88.
- 192.** Yang X, Xie Y, Raja P, *et al*. Suppression of methylation-mediated transcriptional gene silencing by β C1-SAHH protein interaction during geminivirus-beta satellite infection. *PLoS Pathog* 2011 ; 7 : e1002329.
- 193.** Buchmann RC, Asad S, Wolf JN, Mohannath G, Bisaro DM. Geminivirus AL2 and L2 proteins suppress transcriptional gene silencing and cause genome-wide reductions in cytosine methylation. *J Virol* 2009 ; 83 : 5005-13.
- 194.** De Vries W, Haasnoot J, Fouchier R, De Haan P, Berkhout B. Differential RNA silencing suppression activity of NS1 proteins from different influenza A virus strains. *J Gen Virol* 2009 ; 90 : 1916-22.
- 195.** Li Y, Basavappa M, Lu J, *et al*. Induction and suppression of antiviral RNA interference by influenza A virus in mammalian cells. *Nat Microbiol* 2016 ; 2 : 16250.
- 196.** Zhu Y, Cherukuri NC, Jackel JN, *et al*. Characterization of the RNA silencing suppression activity of the Ebola virus VP35 protein in plants and mammalian cells. *J Virol* 2012 ; 86 : 3038-49.
- 197.** Bennasser Y, Le S-Y, Benkirane M, Jeang K-T. Evidence that HIV-1 encodes an siRNA and a suppressor of RNA silencing. *Immunity* 2005 ; 22 : 607-19.
- 198.** Bennasser Y, Jeang K-T. HIV-1 Tat interaction with Dicer: requirement for RNA. *Retrovirology* 2006 ; 3 : 95.
- 199.** Bennasser Y, Yeung ML, Jeang K-T. HIV-1 TAR RNA subverts RNA interference in transfected cells through sequestration of TAR RNA-binding protein, TRBP. *J Biol Chem* 2006 ; 281 : 27674-8.
- 200.** Daniels SM, Sinck L, Ward NJ, *et al*. HIV-1 RRE RNA acts as an RNA silencing suppressor by competing with TRBP-bound siRNAs. *RNA Biol* 2015 ; 12 : 123-35.
- 201.** Cui L, Wang H, Ji Y, *et al*. The nucleocapsid protein of coronaviruses acts as a viral suppressor of RNA silencing in mammalian cells. *J Virol* 2015 ; 89 : 9029-43.
- 202.** Andersson MG, Haasnoot PCJ, Xu N, Berenjian S, Berkhout B, Akusjärvi G. Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA. *J Virol* 2005 ; 79 : 9556-65.
- 203.** Wang Y, Kato N, Jazag A, *et al*. Hepatitis C virus core protein is a potent inhibitor of RNA silencing-based antiviral response. *Gastroenterology* 2006 ; 130 : 883-92.
- 204.** Ji J, Glaser A, Wernli M, Berke JM, Moradpour D, Erb P. Suppression of short interfering RNA-mediated gene silencing by the structural proteins of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2008 ; 89 : 2761-6.
- 205.** Chen W, Zhang Z, Chen J, *et al*. HCV core protein interacts with Dicer to antagonize RNA silencing. *Virus Res* 2008 ; 133 : 250-8.
- 206.** Samuel GH, Wiley MR, Badawi A, Adelman ZN, Myles KM. Yellow fever virus capsid protein is a potent suppressor of RNA silencing that binds double-stranded RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016 ; 113 : 13863-8.
- 207.** Johnson KL, Price BD, Eckerle LD, Ball LA. Nodamura virus nonstructural protein B2 can enhance viral RNA accumulation in both mammalian and insect cells. *J Virol* 2004 ; 78 : 6698-704.
- 208.** Van Rij RP, Saleh M-C, Berry B, *et al*. The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*. *Genes Dev* 2006 ; 20 : 2985-95.
- 209.** Nayak A, Berry B, Tassetto M, *et al*. Cricket paralysis virus antagonizes Argonaute 2 to modulate antiviral defense in *Drosophila*. *Nat Struct Mol Biol* 2010 ; 17 : 547.
- 210.** Van Cleef KWR, Van Mierlo JT, Miesen P, *et al*. Mosquito and *Drosophila* entomobirnaviruses suppress dsRNA- and siRNA-induced RNAi. *Nucleic Acids Res* 2014 ; 42 : 8732-44.
- 211.** Slonchak A, Khromykh AA. Subgenomic flaviviral RNAs: what do we know after the first decade of research. *Antiviral Res* 2018 ; 159 : 13-25.
- 212.** Roby JA, Pijlman GP, Wilusz J, Khromykh AA. Noncoding subgenomic *Flavivirus* RNA: multiple functions in West Nile virus pathogenesis and modulation of host responses. *Viruses* 2014 ; 6 : 404-27.

6.2. Bellott, L., Chaib, A., Petitjean, O., Rigo, P. and Gilmer, D. (2017). Apports et enseignements de la virologie en biologie contemporaine. Virologie. 21, 199-210.

Apports et enseignements de la virologie en biologie contemporaine

Lucie Bellott^{1,a}
 Amel Chaïb^{1,a}
 Olivier Petitjean^{1,a}
 Pauline Rigo^{1,a}
 David Gilmer²

¹ Master de biologie
 des micro-organismes-
 parcours virologies, promotion Jules
 Hoffmann,
 Faculté des sciences de la vie,
 Université de Strasbourg,
 67000 Strasbourg, France
² Université de Strasbourg,
 CNRS, IBMP UPR 2357,
 67000 Strasbourg, France
 <david.gilmer@ibmp-cnrs.unistra.fr>

Résumé. La virologie est une science jeune et à l'origine de nombreuses découvertes qui ont révolutionné notre vision de la biologie. Souvent associée à l'étude de pathologies, cette science répond à des questions beaucoup plus fondamentales où elle apporte les outils moléculaires nécessaires à la manipulation cellulaire. Si les virus sont considérés comme des ennemis ils sont utilisés, parfois en dernier recours, contre des bactéries résistantes aux antibiotiques ou pour le traitement de certains cancers.

Mots clés : virologie, histoire des sciences, enseignement, master

Abstract. Virology is a young discipline at the origin of discoveries that revolutionized our vision of biology. Often associated to pathological studies, this science raises more fundamental questions and brings molecular tools required for cellular manipulation. If viruses are considered as our enemies, they are used, sometimes as a last attempt, against multidrug resistant bacteria or to treat cancer.

Key words: Virology, history of science, teaching, master degree

Introduction

L'heure est aux questionnements multiples sur l'édition de génomes et l'utilisation d'organismes génétiquement modifiés. La mise en œuvre de l'édition de gènes est facilitée par des outils de plus en plus performants et de moins en moins coûteux. L'origine de ces outils est liée à la découverte de Lederberg et Tatum de la transduction généralisée par les bactériophages lytiques [1, 2], puis à l'émergence d'idées visant à utiliser des virus, vecteurs de gènes pour des protocoles de thérapie génique [3] ; de nos jours les virus sont utilisés dans la quasi-totalité des protocoles de thérapie génique [4-6].

La rétrospective de grandes découvertes en biologie contemporaine (nous) amène à placer la virologie sur un piédestal, première marche d'un podium largement passée sous silence. Exception faite des émois médiatiques (parfois dignes de ceux de romans de science-fiction et films de série Z) liés à des épidémies virales, qui a réellement conscience des apports de la virologie en biologie moderne ? Notre considération pour cette discipline n'est pas partagée par tous, même au sein de la communauté scientifique « mère » de la virologie, la microbiologie.

Tirés à part : D. Gilmer

^a Tous ces étudiants ont contribué de façon égale à l'élaboration du point de vue.

Les virus ne possèdent pas en propre de système de traduction. Ils usent et abusent de celui de leur hôte, ce qui fait d'eux des parasites intracellulaires obligatoires, comme l'indique avec précision la définition donnée par A. Lwoff [7] dans laquelle les virus sont, entre autres, des entités ultrafiltrables ne renfermant qu'un seul type d'acide nucléique comme génome. Cette définition est devenue obsolète depuis la découverte, entre autres, des virus géants non ultrafiltrables. Cela implique une révision de la définition des virus comme le suggèrent J.-M. Claverie et C. Abergel [8]. Toutefois une telle révision n'empêche pas la classification des virus selon les règles édictées par l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses, <http://www.ictvonline.org/>) en dehors du vivant puisque les séquences codant les ARNr 16S ou 18S sont absentes des génomes viraux.

Cependant l'émergence du concept de *virocell*, définissant la cellule parasitée comme l'entité virale à part entière [9], apporte une nouvelle dimension à cette discipline née quelques années après Jeanne Calment¹. Nos capacités à envoyer des engins dans l'espace repoussent les limites de l'exploration aux confins du système solaire, mais sachons que non loin de nous se cache un nombre incalculable de

¹ https://fr.wikipedia.org/wiki/Jeanne_Calment ; liberation.fr/ evenement/1997/08/05/la-doyenne-de-l-humanite-est-decedee-hier-a-122-ansjeanne-s-en-est-allee-calmement-nee-en-1875-a-arl_213690 (consulté le 02/10/17)

virus qui défie l'entendement. À l'échelle de la planète, la taille cumulée des virus infectant bactéries et archées avoisine 1700 fois le diamètre de notre galaxie². Par conséquent notre monde est aussi celui des virus, eux-mêmes en constante évolution. La majorité d'entre eux reste à caractériser et pourrait apporter comme leurs aïeux lambda, T4, T7, ØX174, M13, MS2, Qβ, de nouveaux outils pour aborder le futur désert thérapeutique lié aux résistances croissantes des pathogènes vis-à-vis des chimiothérapies conventionnelles. D'Herelle l'avait bien compris : quelle que soit la bactérie pathogène il y aura toujours un phage (virus infectant les bactéries) pour la détruire [10]. Malheureusement l'usage des antibiotiques a globalement étouffé cette approche thérapeutique, exception faite de pays de l'Europe de l'Est où l'institut Eliava (Géorgie) a pérennisé l'utilisation de cocktails de virus pour lutter contre des infections bactériennes. Un recours à la phagothérapie (thérapie à l'aide de bactériophages) pourrait peut-être endiguer les populations de bactéries multirésistantes aux antibiotiques [11]. Une approche comparable a été initiée pour rechercher des virus capables de lutter efficacement contre des cellules tumorales. Cet aspect plus contemporain de la biologie ne peut pas être développé sans un bilan historique des grandes découvertes effectuées grâce à l'étude des virus et sans savoir comment celles-ci sont perçues, en particulier dans l'enseignement supérieur.

Après un aperçu chronologique illustré par les frises de la figure 1 incluant des contributions majeures apportées par la virologie, nous avons établi une liste non exhaustive de l'apport des découvertes récentes en virologie dans la biologie actuelle et tenté de lister certaines formations de master en virologie proposées dans les universités françaises. Parmi ces offres nous avons recherché s'il existait une formation universitaire dispensant des enseignements non orientés vers la biomédecine et par conséquent traitant de l'ensemble de la discipline. Les résultats de notre enquête sont décrits dans la seconde partie de cet article.

Historique

Le lecteur est invité à consulter la version pdf du livre de Frederick A. Murphy *The Foundations of Virology* (accessible sur <https://www.utmb.edu/virusimages>) [12].

Découverte des virus

Hippocrate (400 av. J.-C.) avait établi certaines corrélations entre les maladies infectieuses et contagieuses et leurs symptômes, l'hygiène ou les cycles saisonniers.

Beaucoup plus tard, les observations d'un champignon microscopique³ par Robert Hooke en 1665, puis celle de bactéries par Antonie van Leeuwenhoek trois ans après, n'ont cependant pas permis d'établir de lien entre micro-organismes et pathologies (figure 1A). Il faudra attendre les travaux de Koch sur *Bacillus anthracis* publiés en 1876 (figure 1A, pour revue voir [24]) et de Pasteur pour identifier les agents étiologiques de nombreuses maladies liées aux infections bactériennes et fongiques ; ces découvertes sont à l'origine des postulats de Koch (1884) reliant sans ambiguïté un pathogène et une maladie. L'existence des virus a scientifiquement été démontrée grâce aux travaux de Martinus W. Beijerinck (1898) qui a défini le terme *contagium vivum fluidum* en travaillant sur la mosaïque du tabac et ceux de Friedrich Loeffler & Paul Frosch concernant l'étiologie de la fièvre aphteuse (*foot-and-mouth disease virus*). Ce n'est qu'en 1938 que des particules virales sont observées pour la première fois par Von Borries, Ruska & Knoll grâce à l'invention du microscope électronique à transmission (figure 1B) [25].

La présence ancienne des virus ou de leurs effets est attestée par diverses gravures, écrits, peintures, voire ADN anciens (momies...). Des pratiques vaccinales empiriques mais efficaces ont apporté les fondements de l'immunologie (variolisation, figure 1A). La fin du second millénaire voit l'essor des descriptions de maladies d'origine virale et d'un lien entre certaines de ces infections et le développement de cancers. Un dogme apparaît : tout être vivant est cible d'au moins un virus, même certains virus. En effet la description du virophage Spoutnik par La Scola [20] étaye la notion que les virus (les *virocells*) sont « vivants » (figure 1C). L'existence de virophages est à rapprocher de la description des virus satellites et ARN satellites décrits chez certains virus animaux (AAV, HDV⁴) et chez les virus de plantes [26] voire chez les bactériophages [27]. Ces satellites nécessitent l'aide d'un virus assistant pour leur encapsidation ou leur réplication. Une telle relation affecte nécessairement la biologie du virus assistant, à l'instar de Spoutnik et du virus géant mamavirus.

Les virus peuvent être considérés par certains comme étant à l'origine de la vie, directeurs de l'évolution [28-30] ou, de façon plus conventionnelle, comme des agents infectieux et pathogènes. Quelle que soit l'opinion, la contribution des virus dans les équilibres biologiques est indéniable tout comme l'apport de la virologie dans la biologie contemporaine. En effet les virus, dont le matériel génétique est constitué soit d'acide désoxyribonucléique soit d'acide ribonucléique, sont rapidement apparus comme des outils de choix pour l'investigation des processus biologiques.

² Microbiology by numbers. *Nat Rev Microbiol* 2011 ; 9 : 628. (Éditorial)

³ *Mucor* de la classe des Zygomycètes.

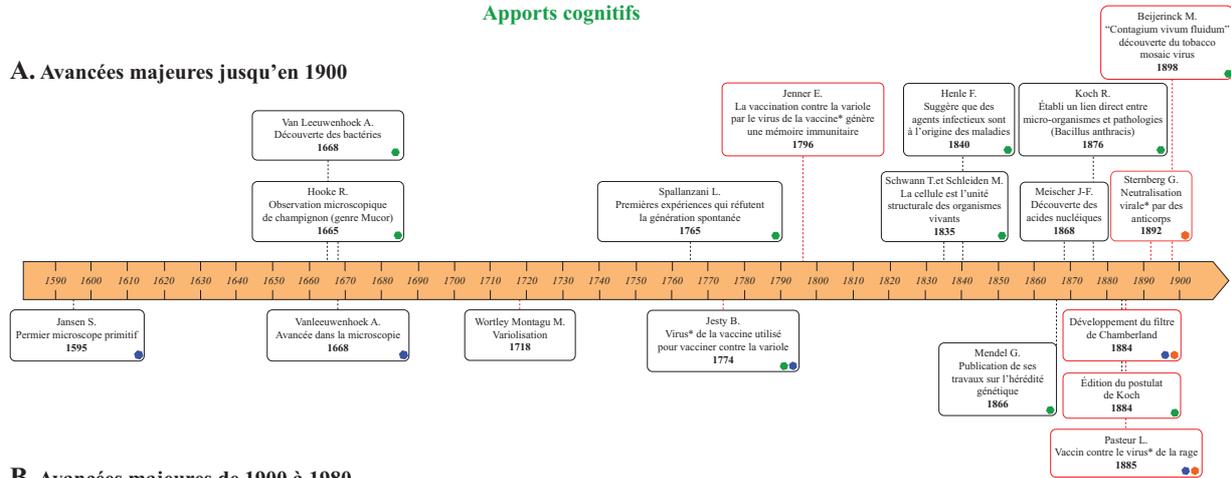
⁴ AAV : *adeno associated virus* ; HDV : *hepatitis delta virus*.

Découvertes liées aux virus

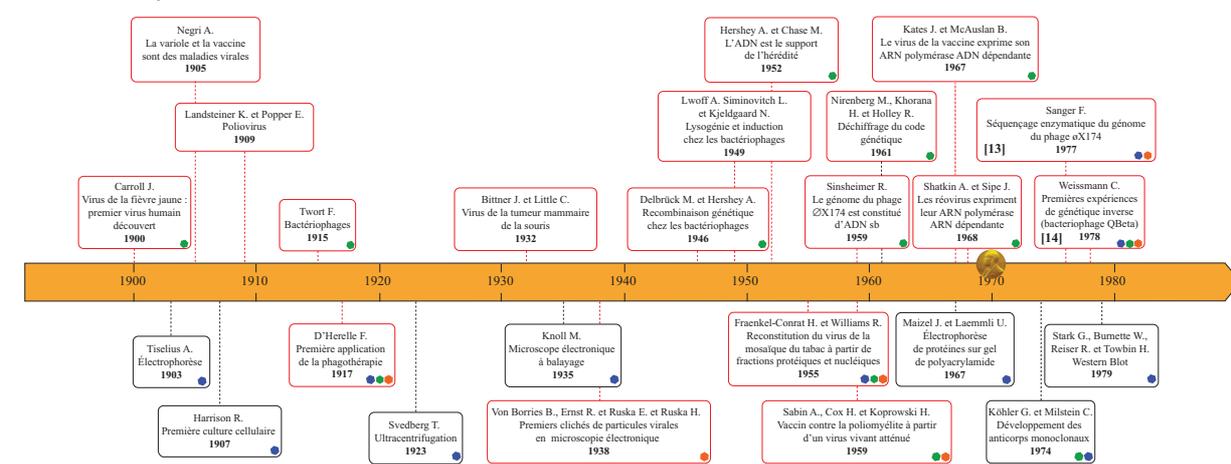
Méthodes nées de la virologie
Apports cognitifs

Avancées techniques fondamentales

A. Avancées majeures jusqu'en 1900



B. Avancées majeures de 1900 à 1980



C. Avancées majeures de 1980 à 2017

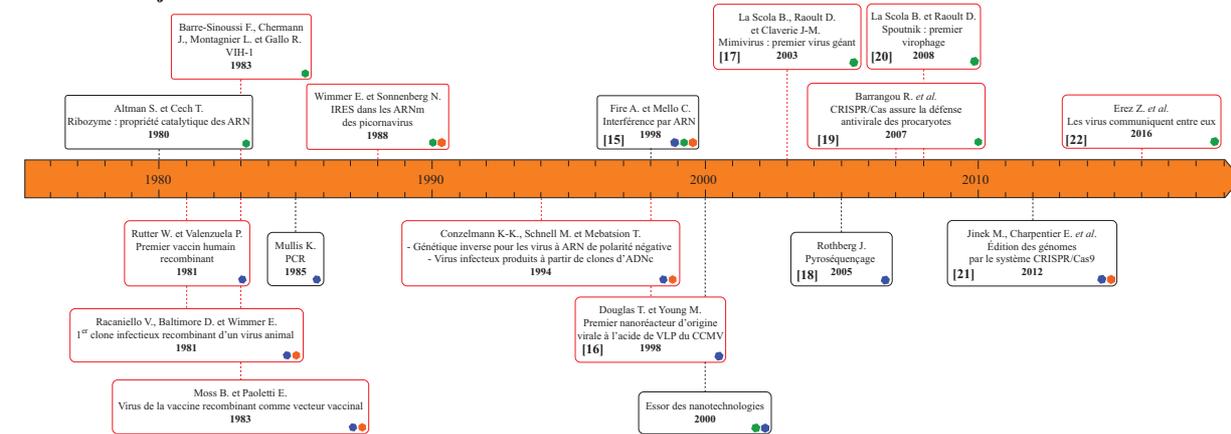


Figure 1. Représentation chronologique des découvertes et techniques ayant contribué à l'essor de la biologie (A) avant 1900, (B) entre 1900 et 1980 et (C) de 1980 à nos jours. Les éléments associés à la virologie sont encadrés en rouge, les avancées techniques (indiquées par des hexagones bleus), liées à la virologie (hexagones orange) ayant enrichi nos connaissances (hexagones verts) sont indiquées. Le terme « virus » du panneau A (indiqué par des astérisques) est utilisé dans une description actualisée des découvertes et ne se réfère en rien à son utilisation à la date considérée. Seules les dernières références bibliographiques sont indiquées [13–22]. L'icône du prix Nobel (1970) illustre la découverte de la transcriptase inverse par David Baltimore [23]. Les frises ont été créées à l'aide de l'outil en ligne frisechronos.fr/.

La virologie et sa contribution à l'essor de la biologie (moléculaire)

De la virologie à la science actuelle

La virologie a fortement contribué et contribue encore à l'essor d'une meilleure compréhension de la biologie de la cellule. La description des principaux mécanismes constituant le « dogme de la biologie moléculaire » (réplication, transcription et traduction) a été rendue possible grâce à des outils biologiques dont le génome est de taille limitée et qui se multiplient rapidement : les virus. L'établissement d'une liste exhaustive de l'ensemble de ces découvertes induirait certainement un effet opposé à celui escompté. Aussi nous avons décidé de présenter les découvertes ayant conduit à des réorientations majeures en biologie, laissant au lecteur le libre choix d'explorer d'autres aspects non développés ici et, pourquoi pas, de les décrire dans un prochain volet de ce type de revue.

Par leur forte diversité génomique (ADN ou ARN), leurs stratégies d'expression variées, et les mécanismes utilisés pour détourner la machinerie cellulaire (traduction cellulaire limitée au profit de l'ARN génomique ou des messagers viraux, induction du cycle cellulaire, etc.) les virus constituent des outils de choix pour l'étude de chacune des étapes du dogme de la biologie moléculaire. Ces caractéristiques ont permis de décrypter le code génétique, de détailler les mécanismes de la réplication de l'ADN, de la recombinaison, de la transcription et de sa régulation, de découvrir la transcription inverse... La compréhension (parfois partielle) des cycles viraux a également permis de détourner des fonctions virales à des fins biotechnologiques, de créer des outils moléculaires (vecteurs d'expression) ou thérapeutiques (comme par exemple des vecteurs viraux utilisés en thérapie génique) ou encore d'immortaliser des lignées cellulaires grâce à des protéines virales à action mitogène comme par exemple l'antigène T du virus simien n° 40 (SV40).

La virologie, la génétique et l'ADN

Dès 1944 les expériences d'Avery, MacLeod & McCarty [31] suggèrent que l'ADN est le support de l'information génétique. Cette démonstration ne convainquit pas immédiatement la communauté scientifique pour laquelle la complexité de la structure des protéines semblait suffisante pour rejeter toute implication de l'ADN comme support de l'hérédité. Ce n'est qu'en 1952 qu'Alfred Hershey et

Martha Chase [32] démontrent que l'ADN est le support de l'information génétique (*figure 1B*) en utilisant le bactériophage T2 et *Escherichia coli*. Leur approche prouve sans ambiguïté que le virus injecte son acide nucléique dans la bactérie et que ce transfert est suffisant pour assurer la réplication virale. Le déchiffrement du code génétique est commencé dès 1961 par Marshall Nirenberg et Heinrich J. Matthaei [33] (*figure 1B*). Le premier génome entièrement séquencé est celui du bactériophage Φ X174, grâce à la méthode de Sanger [13] (*figure 1B*). En étudiant les séquences virales furent découverts les gènes chevauchants et des variations dans la fréquence d'utilisation des codons en fonction des organismes [13, 34–36]. Par ailleurs, les travaux de J. Monod sur la régulation de l'expression des systèmes inductibles (*i.e.* à l'aide de la bêta-galactosidase) ont montré qu'une substance endogène, soit inductrice soit répressive, doit être présente [37]. La combinaison de ces résultats avec ceux de F. Jacob sur la régulation du cycle du bactériophage lambda [38] mène à partir de la fin des années 50 à la notion d'opéron [39, 40]. L'utilisation des bactériophages a aussi largement contribué à la compréhension des mécanismes de la recombinaison génétique mis en évidence dès 1946 grâce à l'étude des *Myoviridae* (*i.e.* phages T2, T4, *figure 1B*) [41, 42]. Une telle découverte a d'ailleurs été récompensée par le prix Nobel de physiologie et de médecine attribué à Max Delbrück, Alfred D. Hershey et Salvador Luria en 1969. Les études réalisées sur le phage T4 mettent en avant la notion de cistron et de gènes *cis* et *trans* actifs [43, 44].

La virologie et l'ARN (ARN support d'hérédité et ARN messagers)

En 1949, Markham & Smith [45] démontrent que l'ARN viral est nécessaire pour assurer l'infectiosité du *turnip yellow mosaic virus* (TYMV) en présentant deux particules virales différentes : une infectieuse et une non infectieuse, se différenciant uniquement par la présence ou non d'ARN génomique. En 1956, Gierer & Schramm [46] complètent ces travaux en démontrant que de l'ARN du TMV frotté sur une feuille végétale suffit à déclencher l'infection virale, indiquant que les ARN (viraux) sont également support d'information génétique, une propriété jusqu'alors réservée à l'ADN.

Les ARNm ont eux aussi été découverts et largement étudiés à l'aide de virus. Sydney Brenner, François Jacob and Matthew Meselson illustrent l'existence de cet

intermédiaire entre l'ADN et la synthèse protéique en infectant *E. coli* par le phage T4 [47]. Peu après, Joseph Kates met en évidence la présence d'une queue polyadénylée (polyA) sur les ARN messagers produits par le virus de la vaccine, ce qui donne l'essor aux études sur le système traductionnel. Plusieurs équipes dont celle de James Darnell effectuent des observations identiques pour les ARNm eucaryotes. Ce n'est qu'en 1975 que la présence d'une coiffe est découverte sur des ARN messagers là encore d'origine virale (virus de la vaccine) [48, 49].

En 1964, le principe de colinéarité entre un gène (les triplets nucléotidiques de la phase codante) et la chaîne polypeptidique est établi en étudiant la tryptophane synthase d'*E. coli* et une protéine constitutive de la tête du bactériophage T4 [50, 51]. Bien que la colinéarité entre l'ADN et les protéines fût admise au sein du monde procaryote elle restait à confirmer chez les eucaryotes et semblait moins conservée. C'est en analysant les complémentarités de séquences entre les ARNm viraux et l'ADN viral de l'adénovirus que Phillip Sharp et Richard Roberts ont découvert en 1977 le mécanisme d'épissage par élimination d'introns confirmant ainsi l'universalité de la colinéarité entre ADN codant et protéine [52-54]. Durant la même période des agents subviraux constitués d'ARN simple brin circulaire de 246 à 401 nucléotides et appelés viroïdes sont découverts par Theodore Diener [55]. Les viroïdes infectent exclusivement les plantes et ont la particularité de ne pas coder de protéine. Ces ARN détournent la machinerie transcriptionnelle de leurs hôtes pour se multiplier selon un mécanisme particulier [56]. Les intermédiaires réplcatifs de la famille *Avsunviroidae* forment des oligomères qui se structurent localement pour former des sites autocatalytiques impliquant une fonction ribozyme (voir *infra*, § « Des ARN autocatalytiques ou chefs d'orchestre de la traduction »).

Les premiers systèmes de transcription *in vitro* ont été mis au point par R.G. Roeder et son équipe en 1979 [57]. Quelques temps après avoir réalisé la première transcription *in vitro* de gènes de classe III tels que de l'ARN 5S ou les ARN VA de l'adénovirus 2, ils réalisent celle de gènes de l'Ad 2 sous le contrôle d'un promoteur de classe II [58]. La découverte de la liaison des facteurs de transcription à leur séquence d'ADN cible est liée aux études menées sur l'antigène T de SV40 par Tjian et son équipe [59] et à celles menées sur les récepteurs aux glucocorticoïdes, dont le domaine est aujourd'hui appelé HRE (*hormone response element*), qui sont présents dans le promoteur du virus des tumeurs mammaires de la souris ou MMTV [60]. Le dogme de la biologie moléculaire se précise et prend une tournure cyclique, où les gènes sont transcrits en ARN non codants (voir plus bas) ou en ARN messagers traduits en protéines pouvant réguler l'expression des gènes.

Des ARN autocatalytiques ou chefs d'orchestre de la traduction

Les pré-ARN ribosomiques du protiste *Tetrahymena* sont maturés par autocatalyse [61, 62] où la structure de l'ARN assure la fonction enzymatique nécessaire au clivage, cette structure est appelée ribozyme (*figure 1C*). Un mécanisme similaire intervient dans la maturation de la sous-unité ribonucléique des ribonucléases P qui effectuent la maturation des ARN de transfert [63]. Ces découvertes ont été récompensées par le prix Nobel de chimie de 1989. Des activités ribozymes distinctes de celles décrites sont par la suite découvertes sur l'ARN satellite du *tobacco ringspot virus* [64] et de l'*avocado sunblotch viroid* [65].

Si les mécanismes de traduction canoniques sont précisés par de nombreuses équipes, ce n'est qu'en 1988 que l'équipe de Sonenberg décrit la présence d'un site interne d'entrée du ribosome (*internal ribosome entry sites*, IRES, *figure 1C*) présent sur l'extrémité 5' non traduite du génome du poliovirus [66]. Cette séquence d'ARN très structurée assure l'initiation de la synthèse de la polyprotéine virale de manière indépendante de la coiffe. Ce mécanisme de traduction, différent de celui connu jusqu'alors (dépendant de la coiffe), n'est pas uniquement inféodé aux virus bien qu'un grand nombre d'entre eux l'utilisent. Des ARN cellulaires dépourvus de coiffe sont également traduits suite à la fixation des ribosomes sur des structures IRES comme par exemple le messenger de la protéine Bip (*immunoglobulin heavy-chain binding protein*) [67].

La virologie change le dogme : quand l'ARN sert de matrice à l'ADN

Le mécanisme de transcription inverse conduisant à la synthèse d'ADN à partir d'ARN a été décrit simultanément par Baltimore et Temin & Mizutani [23, 68] en étudiant différents rétrovirus tels que *Rous sarcoma virus*. Très rapidement cette découverte a renversé le dogme classique et est à la base de la création des premières banques d'ADNc et d'applications de génétique inverse [14]. De nos jours la transcriptase inverse reste une protéine clé couramment utilisée en biologie moléculaire (pour revue, voir [69]).

À la fin des années 1960, la découverte de rétrovirus endogènes (ERV) a mené à des avancées majeures sur les fonctions biologiques comme la reproduction vivipare. Les rétrovirus endogènes pourraient dériver de rétrovirus ayant infecté il y a des millions d'années les cellules germinales d'un ancêtre commun des espèces vivipares et avoir perdu leur virulence. Les ERV ont été longtemps considérés comme de l'ADN « poubelle » en raison de l'absence d'expression de leur génome majoritairement réprimé par des modifications épigénétiques. Les ERV semblent pourtant avoir dirigé l'évolution des mammifères grâce à l'expression de la syncytine, une protéine

d'enveloppe rétrovirale. La syncytine est exprimée dans le syncytiotrophoblaste, elle permet la formation du placenta et assure une fonction dans l'échange de nutriments de la mère au fœtus. Ce type d'intégration de rétrovirus (HERV-W, HERV-FRD et ERV-3 chez l'homme) pourrait constituer un tournant majeur de l'évolution [70].

Défenses antivirales au service de la biologie actuelle

Interférence par ARN

La découverte de l'interférence par ARN (ARNi ou extinction post transcriptionnelle des gènes) reste l'une des révolutions scientifiques de la fin du xx^e siècle (*figure 1C*). Andrew Fire et Craig Mello ont publié en 1998 leurs travaux dans lesquels ils présentent ce nouveau mécanisme de régulation [15]. Dès lors, un engouement international s'installe dans l'étude de ce processus qui apparaît comme un mécanisme d'immunité innée et impliqué dans le développement chez les métazoaires. Les petits ARN (miARN, siARN. . .) sont des effecteurs nécessaires à l'extinction post-transcriptionnelle des gènes. Chez les plantes et les invertébrés, l'interférence par l'ARN constitue une voie de défense antivirale majeure. Les virus contournent cette voie grâce à l'expression de protéines appelées suppresseur d'ARNi (VSR, *viral suppressor of RNA silencing*) (pour revue, voir [71]), voire d'ARN non codants qui interfèrent sur l'action de ce mécanisme antiviral [72]. L'action des VSR affecte souvent la voie de régulation des gènes par les miARN ce qui contribue à la modification de l'homéostasie cellulaire. Certains virus expriment leur propre répertoire de petits ARN (miARN) pour réguler l'expression de leurs gènes ou moduler les défenses cellulaires.

Des enzymes de restriction à CRISPR/Cas9

Le système de restriction-modification présent chez les bactéries permet de lutter contre l'invasion d'ADN étranger (viral, entre autres) grâce au clivage de l'ADN par des enzymes qui sont devenus les ciseaux moléculaires nécessaires à la manipulation de l'ADN *in vitro*. Bien que cette technologie soit de plus en plus remplacée par l'utilisation de recombinases de bactériophage actives *in vitro* (e.g. *gateway cloning*) ou de recombinase virale (*infusion cloning*) la modification « à façon » de certains génomes est très vite apparue complexe, peu efficace, voire inefficace. L'ingénierie d'outils comme les nucléases à doigts de zinc ou TALENs a fourni de nouveaux outils moléculaires intéressants pour l'édition de gènes mais leur conception reste laborieuse, coûteuse et leur utilisation restreinte. Ces approches ont été récemment remplacées par l'outil CRISPR/Cas9 désormais utilisé dans la quasi-totalité des laboratoires de recherche. Ce nouvel outil d'édition de gènes dérive de la découverte des systèmes CRISPR/Cas (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated protein*), identifiés chez

les eubactéries et les archées où ils constituent un système immunitaire adaptatif contre les bactériophages et les acides nucléiques invasifs. Le séquençage du génome de *H. mediterranei* a révélé la présence d'un *locus* composé de régions répétées, séparées par des séquences uniques de longueur invariable appelées *spacers* [73]. Le terme « CRISPR » est né en 2002 [74]. L'origine extrachromosomique des *spacers* apparaît en 2005 [75, 76] et le lien entre la séquence d'un *spacer* et une immunité vis-à-vis de l'infection par un phage possédant cette séquence (appelée *protospacer*) est établi dans le laboratoire industriel du Dr. P. Horvath (*figure 1C*) [19]. Le mécanisme d'acquisition, d'expression et d'action de cette voie de restriction est largement étudié et met en œuvre plusieurs types de nucléases guidées par de courtes séquences d'ARN (*crRNA*) dérivées du locus CRISPR/Cas. Actuellement six types de CRISPR/Cas sont recensés selon la nucléase requise et le ciblage de l'acide nucléique invasif [77] et certains coexistent au sein d'une même espèce. Si l'ADN est la cible majeure des systèmes de type I, II, IV et V, les types III et VI sont capables de cibler l'ARN et représentent donc un nouveau système de manipulation directe de l'ARN [78-80]. Le système de type II utilise une seule protéine effectrice, l'endonucléase CAS9 guidée par deux ARN effecteurs appelés *crRNA* (*CRISPR RNA*) et *tracrRNA* (*transacting crRNA*). La protéine CAS9 charge un hybride imparfait des deux ARN effecteurs et la séquence du *crRNA* (correspondant à un *spacer*) guide le clivage séquence spécifique de l'ADN cible [81-83]. Ce système de type II est dérivé en outil d'édition de gènes grâce à un ARN chimérique (*gRNA*, *guide RNA*) mimant l'hybride entre *crRNA* et *tracrRNA* qui reste fonctionnel. Ainsi l'expression de CAS9 étiquetée par une séquence d'adressage subcellulaire (nucléaire, mitochondriale. . .) et d'un ou plusieurs ARN guide permet de provoquer des coupures à façon dans l'ADN [21, 84]. Les enzymes de réparation de l'ADN réparent les cassures et peuvent conduire à une recombinaison homologue si un ADN est apporté conjointement au système [85-87]. La simplicité de mise en œuvre de cette technologie l'a très vite rendue disponible pour tout un chacun, pour le meilleur [88] et pour le pire [89]. À l'instar de l'interférence par l'ARN, les phages peuvent porter leur propre système CRISPR/Cas [90] ou coder des protéines qui inhibent cette défense adaptative [91]. Il y a fort à parier que l'utilisation de telles protéines virales permettra d'affiner l'action de ce nouveau type de nucléase pour limiter les effets hors cible constatés dans de nombreuses études.

Virologie, (nano)technologie et thérapie

Nanotechnologie

Les nanotechnologies sont à l'heure actuelle en plein essor comme en témoigne l'augmentation exponentielle du nombre de publications relatives à ce domaine

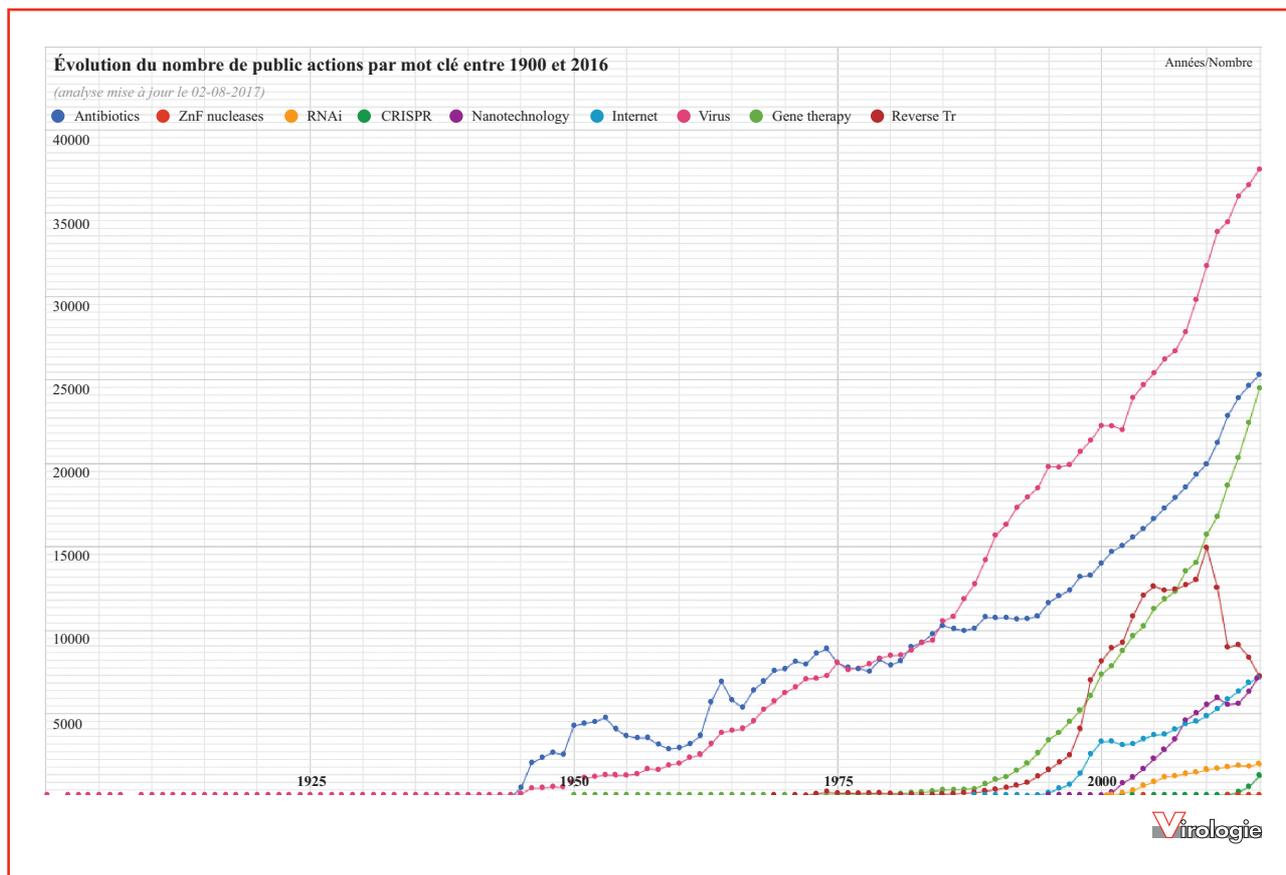


Figure 2. L'évolution temporelle de 1900 à 2016 du nombre de citations par l'outil PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=motcle>) illustre l'envolée des articles relatifs aux virus et à leurs outils dérivés. Les mots clés utilisés au sein de l'URL sont indiqués par des codes couleur.

technologique depuis les années 2000 (*figure 1C, figure 2, courbe violette*). Les nanotechnologies se définissent par l'utilisation et l'étude de systèmes de 1 à 100 nm et se retrouvent à l'interface de nombreuses disciplines qui décrivent l'assemblage de composés de diverses natures, tant chimiques que biologiques. Par leur taille les virus entrent dans la catégorie des nano-objets. Bien que les structures virales divergent, les propriétés d'auto-assemblage de certaines protéines structurales et les possibilités de modification à la carte de leur génome ont immédiatement propulsé les virus comme des matériaux et des outils de choix. Cependant ces applications technologiques restent restreintes à l'utilisation de virus que l'on peut produire en grandes quantités, à coût réduit et sans risque pour la santé publique ; ainsi sont majoritairement concernés les virus infectant les plantes et les bactéries. L'utilisation des bactériophages en nanotechnologie voit son origine dans les travaux de Georges Smith [92-94] avec la modification du génome du bactériophage filamentueux M13 pour fusionner une séquence peptidique avec l'une des

protéines structurales du virion de manière orientée à la surface de la capsid. Cette technique connue sous le nom de *phage display* permet, entre autres, l'étude moléculaire d'interaction entre protéines, la caractérisation de peptides reconnus par des anticorps, l'évolution dirigée de protéines ou la conception d'outils de diagnostic [95]. Des banques de peptides exposés en surface des particules phagiques ont permis la description de capacités de fixation des phages à des métaux, des nanotubes de carbone par exemple et initié la conception de l'assemblage de nanomatériaux comparables à des pièces d'un Lego [96-98] laissant libre cours à l'imagination de l'expérimentateur pour créer des assemblages complexes aux propriétés chimiques et/ou électriques hors du commun (diodes, catalyseurs...). Toutefois la biologie reste la maîtresse de ce système car certaines modifications affectent la viabilité virale et ne sont pas réalisables. Des virus infectant les plantes sont également utilisés en nanotechnologies comme par exemple le *tobacco mosaic virus* [99-102].

Vecteurs viraux

Les génomes viraux portent toutes les fonctions nécessaires au piratage des cellules qu'ils infectent. Cet atout est grandement apprécié en biologie moléculaire comme en témoigne l'utilisation de nombreuses séquences virales dans la construction de vecteurs d'expression et de clonage (promoteurs, terminateurs de transcriptions, origines de réplication, intégrases. . .).

La capacité de transduction des virus et leur tropisme spécifique en font des candidats de choix pour la conception de vecteurs utilisés dans des protocoles de thérapie génique. Ces virus thérapeutiques assurent principalement l'expression de gènes d'intérêt. Les virus majoritairement utilisés dans le cadre de la thérapie génique sont les rétrovirus et les adénovirus. Les vecteurs rétroviraux conservent leur capacité d'intégration dans le génome des cellules qu'ils ciblent mais ne peuvent engendrer un cycle infectieux permettant la formation de nouvelles particules virales. Ces virus sont surtout utilisés pour apporter des gènes dits « médicaments » en limitant considérablement les risques de propagation [103]. Si les premiers essais thérapeutiques n'ont pas fourni les résultats escomptés [104], plusieurs succès thérapeutiques utilisant des outils rétroviraux ont souligné le potentiel de cette technique [5]. Cependant, il est important de préciser que l'insertion de séquences rétrovirales peut s'effectuer au niveau de pro-oncogènes et ainsi activer la prolifération cellulaire [105] pouvant conduire à une oncogenèse redoutée.

L'essor de la thérapie génique est en partie lié aux caractérisations moléculaires des déficiences génétiques et de régulation de l'expression des gènes ; ces avancées ont alors mis en exergue le potentiel des rétrovirus pour l'apport de gènes dans les cellules. De plus l'utilisation de rétrovirus combinée à la protéine CAS9 (exprimée par le vecteur ou apportée en *trans*) issue du système CRISPR/Cas permettant de cibler l'intégration de segments d'ADN à des loci précis du génome est en cours de développement [106]. Ce même système CRISPR/Cas peut être utilisé avec d'autres virus et servir à l'édition de génomes. C'est par exemple le cas du *cabbage leaf curl virus* qui a permis l'édition de génomes de plantes et ainsi d'obtenir des modèles d'étude. Cette technique est nommée le *virus induced genome editing* (VIGE) [107].

Les *virus-like particles* (VLP) sont d'autres outils pouvant être considérés comme des vecteurs viraux. Ces particules permettent à certains virus de contrer les défenses de leurs hôtes en les leurrant comme dans le cas du virus de l'hépatite B (HBV) [108]. En effet les VLP ne comportent pas d'acide nucléique viral et ne sont donc pas infectieuses. Elles sont produites par auto-assemblage des protéines de capsid. Ces particules sont en premier lieu utilisées dans l'élaboration de vaccins, contre le virus

de l'hépatite B et les papillomavirus humains notamment [109]. Cette capacité d'auto-assemblage des protéines structurales est également détournée pour encapsider puis délivrer des acides nucléiques voire des protéines à des cellules d'intérêt. Certaines modifications des protéines sont possibles tout en préservant l'intégrité des capsides, ce qui permet de présenter ou de transporter des nanomolécules [16]. Récemment l'équipe de C. Ritzenthaler a découvert qu'un phytovirus (*grapevine fanleaf virus*) pouvait subir des modifications sur les deux extrémités de la protéine de capsid sans affecter la formation de VLP. L'extrémité C-terminale se situe à l'extérieur de la particule et permet donc la présentation de protéines alors que l'extrémité N-terminale est retrouvée à l'intérieur de la particule et permet l'encapsidation de protéines d'intérêt. Ainsi il est possible de délivrer des molécules de manière ciblée [110]. Ce concept pourrait également être une piste thérapeutique en l'appliquant de manière plus large à des structures de virus animaux.

En plus des applications thérapeutiques de nombreuses avancées dans le domaine de la virologie fondamentale ont permis la caractérisation fine de ces VLP ou de ces particules virales et ainsi de mettre en exergue des modifications d'acides aminés de capsid qui permettent leur couplage chimique à des petites molécules, des fluorophores, voire la fusion des séquences protéiques à celles de peptides ou protéines conduisant alors à leur adressage à des cellules initialement hôte ou non hôte du virus. De nombreuses applications d'utilisation de ces virus vecteurs ou plateforme d'assemblage sont décrites (*figure 3*, pour revue, voir [111]) et continuent d'être développées. À titre d'exemple une étude a présenté la production de VLP en utilisant la protéine de capsid du bactériophage Q β couplée à un peptide dérivé de l'angiotensine II pour générer des anticorps permettant une réponse dirigée contre l'angiotensine II [112].

L'enseignement de la virologie en France

Les enseignements de biologie dispensés dans les universités s'appuient sur des concepts généraux mis en évidence grâce à l'utilisation de virus et d'outils dérivés de cycles viraux (*figure 1*). Malheureusement la (re)présentation de cette discipline reste souvent cantonnée à une description structurale des virions ou de pathologies associées à des virus très médiatisés. Souvent incluse dans sa discipline parente, la microbiologie, la virologie se retrouve parfois travestie dans des unités d'enseignement traitant d'infectiologie, de parasitologie, de pathologie voire de biotechnologies. Il est évident que de nombreux aspects

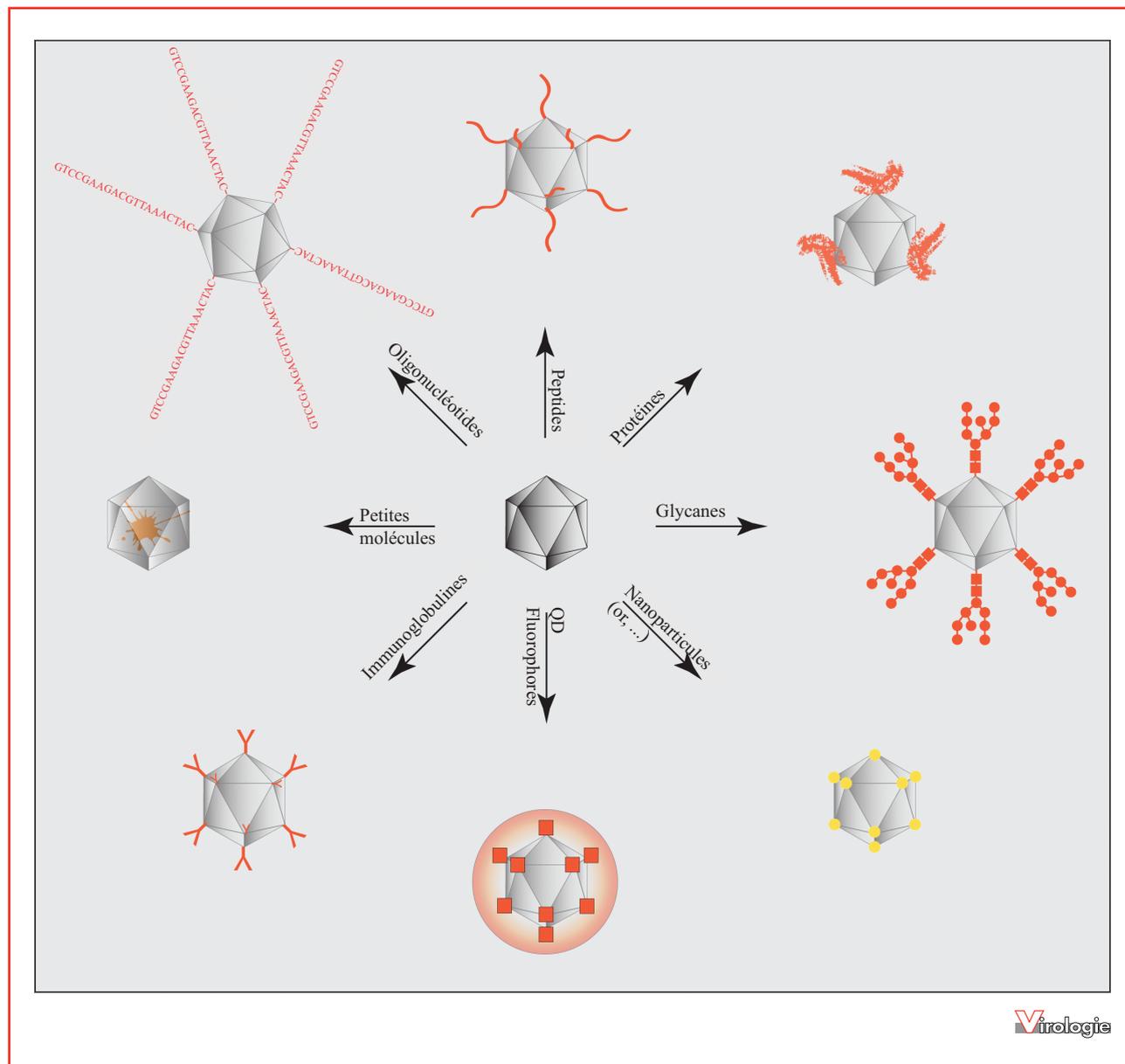


Figure 3. Exemples d'utilisation de virus en biologie et nanotechnologie. Les virus sont présentés comme une plate-forme permettant l'adressage d'une multitude de ligands à des cellules cibles. QD : *quantum dot*. Le positionnement des ligands sur les sommets est purement esthétique et n'est pas représentatif de la nature des objets produits qui arborent de tels groupements sur les faces. La taille des ligands n'est pas respectée (adapté de [111]).

de la virologie se trouvent occultés en raison du nombre d'heures contraint. *A contrario* l'enseignement de la virologie au sens large limite la description de la pathogenèse aux aspects moléculaires et cellulaires sans s'attarder sur un effet systémique. Aussi l'apport d'enseignements comme l'immunologie, la biochimie ou la microbiologie est sans nul doute à considérer comme complémentaire et essentiel

pour appréhender toute situation virologique quel que soit le modèle considéré.

Les résultats d'une enquête malheureusement peu fructueuse (et par conséquent à considérer avec prudence) effectuée auprès d'associations étudiantes des universités françaises indiquent que des notions de virologie sont effectivement perçues par les étudiants de licence de biologie

dans 55 % des universités. Seules les universités de certaines villes proposent un master clairement dédié à la virologie et à ses applications (par exemple : Lyon, Paris, Strasbourg, Tours. . .). De nombreux enseignements de la discipline se focalisent sur certains règnes du vivant telles que virologie végétale, virologie humaine ou vétérinaire (comme par exemple Bordeaux, Montpellier, Nantes, Toulouse. . .) et orientent leurs enseignements principalement sur les agents étiologiques de pathologies.

Conclusion

Les débats persistent autour des questions : « Doit-on considérer les virus comme des organismes vivants ? », « Sont-ils des alliés ou des ennemis ? ».

Quelle que soit la réponse [113] il est certain que la virologie, l'étude des cycles et des stratégies virales ont largement contribué et contribuent toujours à l'essor de la biologie comme en témoignent les données présentées dans la figure 1 et l'évolution du nombre de publications scientifiques liées au mot clé « virus » (figure 2). L'intérêt ou la pertinence de l'utilisation des virus apparaît dans de nombreux domaines sans pour autant placer le virus au-devant de la scène sauf dans de rares cas [114]. Amis de l'ombre du biologiste moléculaire les virus outils sont partout. Leur présence au sein de l'ensemble des règnes du vivant en fait des outils puissants pour des applications sans limites en particulier grâce à l'intégration des mécanismes moléculaires issus de différents règnes. Une telle intégration des concepts de biologie/virologie est fondamentale pour aborder la biologie actuelle comme en témoigne l'application des nouvelles technologies d'édition de gènes ou le décryptage de mécanismes pouvant expliquer la différenciation procaryotes et eucaryotes dans laquelle les virus pourraient être à l'origine de l'invention du noyau [115].

Remerciements. Les auteurs remercient particulièrement Denis Gerlier, Renaud Mahieux et Benoît Kammerer pour leurs suggestions. L'ensemble des personnes ayant répondu à l'enquête, Pierre Goepfert, Lucas Hoehn et Anne-Caroline Jousset sont également remerciés pour leur aide et conseils.

Liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Lederberg J Genetic transduction *American Scientist* 1956 ; 44 : 264-80.
2. Zinder ND, Lederberg J. Genetic exchange in Salmonella. *J Bacteriol* 1952 ; 64 : 679-99.
3. Tatum EL. Molecular biology, nucleic acids, and the future of medicine. *Perspect Biol Med* 1966 ; 10 : 19-32.

4. Wolff JA, Lederberg J. An early history of gene transfer and therapy. *Hum Gene Ther* 1994 ; 5 : 469-80.
5. Wirth T, Parker N, Yla-Herttuala S. History of gene therapy. *Gene* 2013 ; 525 : 162-9.
6. Keeler AM, ElMallah MK, Flotte TR. Gene therapy 2017 : Progress and future directions. *Clin Transl Sci* 2017 ; 10 : 242-8.
7. Lwoff A. The concept of virus. *J Gen Microbiol* 1957 ; 17 : 239-53.
8. Claverie J-M, Abergel C. Les virus sont-ils vraiment des virus ? *Virologie* 2013 ; 17 : 217-28.
9. Forterre P. The virocell concept and environmental microbiology. *ISME J* 2013 ; 7 : 233-6.
10. D'Herelle F. *Préparation de bactériophage thérapeutique*. Appendix 1. Le phénomène de la guérison dans les maladies infectieuses. Paris Massons et Cie ; 1938.
11. Loc-Carrillo C, Abedon ST. Pros and cons of phage therapy. *Bacteriophage* 2011 ; 1 : 111-4.
12. Murphy FA. *The foundations of virology*. West Conshohocken (PA) : Infinity Publishing, 2016. <https://ispace.utmb.edu/collaboration/VirusImages/webfiles/presentations/Foundations%20eBook/INDD%20FINAL%20COMBINED%20INDEXED%20SMALLEST%20FILE.pdf> (consulté le 02/10/2017).
13. Sanger F, Air GM, Barrell BG, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 1977 ; 265 : 687-95.
14. Taniguchi T, Palmieri M, Weissmann C. QB DNA-containing hybrid plasmids giving rise to QB phage formation in the bacterial host. *Nature* 1978 ; 274 : 223-8.
15. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998 ; 391 : 806-11.
16. Douglas T, Young M. Host-guest encapsulation of materials by assembled virus protein cages. *Nature* 1998 ; 393 : 152-5.
17. La Scola B, Audic S, Robert C, et al. A giant virus in amoebae. *Science* 2003 ; 299 : 2033.
18. Margulies M, Egholm M, Altman WE, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 2005 ; 437 : 376-80.
19. Barrangou R, Fremaux C, Deveau H, et al. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 2007 ; 315 : 1709-12.
20. La Scola B, Desnues C, Pagnier I, et al. The viroplasm as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature* 2008 ; 455 : 100-4.
21. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 2012 ; 337 : 816-21.
22. Erez Z, Steinberger-Levy I, Shamir M, et al. Communication between viruses guides lysis-lysogeny decisions. *Nature* 2017 ; 541 : 488-93.
23. Baltimore D. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* 1970 ; 226 : 1209-11.
24. Blevins SM, Bronze MS. Robert Koch and the "golden age" of bacteriology. *Int J Infect Dis* 2010 ; 14 : e744-51.
25. Kausche GA, Pfankuch E, Ruska H. Die sichtbarmachung von pflanzlichem virus im übermikroskop. *Naturwissenschaften* 1939 ; 27 : 292-9.
26. Briddon RW, Ghabrial S, Lin N-S, et al. The subviral agents. In : King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ, eds. *Virus taxonomy : classification and nomenclature of viruses : Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses*. San Diego : Elsevier, 2012, 1211-19.
27. Christie GE, Dokland T. Pirates of the Caudovirales. *Virology* 2012 ; 434 : 210-21.
28. Forterre P. The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions. *Virus Res* 2006 ; 117 : 5-16.
29. Kostyrka G. What roles for viruses in origin of life scenarios? *Stud Hist Philos Biol Biomed Sci* 2016 ; 59 : 135-44.

30. Podolsky S. The role of the virus in origin-of-life theorizing. *J Hist Biol* 1996; 29: 79-126.
31. Avery OT, Macleod CM, McCarty M. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types : Induction of transformation by a desoxyribonucleic acid fraction isolated from *Pneumococcus* type III. *J Exp Med* 1944; 79: 137-58.
32. Hershey AD, Chase M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J Gen Physiol* 1952; 36: 39-56.
33. Nirenberg MW, Matthaei JH. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1961; 47: 1588-602.
34. Air GM. Amino acid sequences from the gene F (capsid) protein of bacteriophage phiX174. *J Mol Biol* 1976; 107: 433-43.
35. Air GM, Blackburn EH, Coulson AR, Galibert F, Sanger F, Sedat JW, et al. Gene F of bacteriophage phiX174. Correlation of nucleotide sequences from the DNA and amino acid sequences from the gene product. *J Mol Biol* 1976; 107: 445-58.
36. Air GM, Sanger F, Coulson AR. Nucleotide and amino acid sequences of gene G of omegaX174. *J Mol Biol* 1976; 108: 519-33.
37. Monod J, Pardee AB, Jacob F. Sur l'expression et le rôle des allèles inductible et constitutif dans la synthèse de la β -galactosidase chez des zygotes d'*Escherichia coli*. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1958; 246: 3125-8.
38. Jacob F, Wollman E. Sur les processus de conjugaison et de recombinaison chez *Escherichia coli*. I. L'induction par conjugaison ou induction zygotique. *Ann Inst Pasteur (Paris)* 1956; 91: 486-510.
39. Jacob F, Monod J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 1961; 3: 318-56.
40. Jacob F, Perrin D, Sanchez C, Monod J. [Operon : a group of genes with the expression coordinated by an operator]. *C R Hebd Seances Acad Sci* 1960; 250: 1727-9.
41. Delbrück M, Bailey WT. Induced mutations in bacterial viruses. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1946; 11: 33-7.
42. Hershey AD, Rotman R. Genetic recombination between host-range and plaque-type mutants of bacteriophage in single bacterial cells. *Genetics* 1949; 34: 44-71.
43. Benzer S. Fine structure of a genetic region in bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1955; 41: 344-54.
44. Benzer S. The elementary units of heredity. In: McElroy WD, Glass B, eds. *The chemical basis of heredity*. Baltimore (Md): The Johns Hopkins Press, 1957, pp. 70-93.
45. Markham R, Smith KM. Studies on the virus of turnip yellow mosaic. *Parasitology* 1949; 39: 330-42.
46. Gierer A, Schramm G. Infectivity of ribonucleic acid from tobacco mosaic virus. *Nature* 1956; 177: 702-3.
47. Brenner S. RNA, ribosomes, and protein synthesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1961; 26: 101-10.
48. Furuichi Y, Morgan M, Muthukrishnan S, Shatkin AJ. Reovirus messenger RNA contains a methylated, blocked 5'-terminal structure : m-7G(5')ppp(5')G-MpCp. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72: 362-6.
49. Wei CM, Moss B. Methylated nucleotides block 5'-terminus of vaccinia virus messenger RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1975; 72: 318-22.
50. Sarabhai AS, Stretton AO, Brenner S, Bolle A. Co-linearity of the gene with the polypeptide chain. *Nature* 1964; 201: 13-7.
51. Yanofsky C, Carlton BC, Guest JR, Helinski DR, Henning U. On the colinearity of gene structure and protein structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1964; 51: 266-72.
52. Berget SM, Moore C, Sharp PA. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1977; 74: 3171-5.
53. Chow LT, Gelinis RE, Broker TR, Roberts RJ. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* 1977; 12: 1-8.
54. Chow LT, Roberts JM, Lewis JB, Broker TR. A map of cytoplasmic RNA transcripts from lytic adenovirus type 2, determined by electron microscopy of RNA :DNA hybrids. *Cell* 1977; 11: 819-36.
55. Diener TO. Viroids. *Adv Virus Res* 1972; 17: 295-313.
56. Gago-Zachert S. Viroids, infectious long non-coding RNAs with autonomous replication. *Virus Res* 2016; 212: 12-24.
57. Weil PA, Segall J, Harris B, Ng SY, Roeder RG. Faithful transcription of eukaryotic genes by RNA polymerase III in systems reconstituted with purified DNA templates. *J Biol Chem* 1979; 254: 6163-73.
58. Weil PA, Luse DS, Segall J, Roeder RG. Selective and accurate initiation of transcription at the Ad2 major late promoter in a soluble system dependent on purified RNA polymerase II and DNA. *Cell* 1979; 18: 469-84.
59. Tjian R, Fey G, Graessmann A. Biological activity of purified simian virus 40 T antigen proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1978; 75: 1279-83.
60. Payvar F, Wrangé O, Carlstedt-Duke J, Okret S, Gustafsson JA, Yamamoto KR. Purified glucocorticoid receptors bind selectively in vitro to a cloned DNA fragment whose transcription is regulated by glucocorticoids in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; 78: 6628-32.
61. Cech TR, Brehm SL. Replication of the extrachromosomal ribosomal RNA genes of *Tetrahymena thermophila*. *Nucleic Acids Res* 1981; 9: 3531-43.
62. Cech TR, Zaug AJ, Grabowski PJ. In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena* : involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. *Cell* 1981; 27: 487-96.
63. Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 1983; 35: 849-57.
64. Prody GA, Bakos JT, Buzayan JM, Schneider IR, Bruening G. Autolytic processing of dimeric plant virus satellite RNA. *Science* 1986; 231: 1577-80.
65. Hutchins CJ, Rathjen PD, Forster AC, Symons RH. Self-cleavage of plus and minus RNA transcripts of avocado sunblotch viroid. *Nucleic Acids Res* 1986; 14: 3627-40.
66. Pelletier J, Kaplan G, Racaniello VR, Sonenberg N. Cap-independent translation of poliovirus mRNA is conferred by sequence elements within the 5' noncoding region. *Mol Cell Biol* 1988; 8: 1103-12.
67. Yang Q, Sarnow P. Location of the internal ribosome entry site in the 5' non-coding region of the immunoglobulin heavy-chain binding protein (BiP) mRNA : evidence for specific RNA-protein interactions. *Nucleic Acids Res* 1997; 25: 2800-7.
68. Temin HM, Mizutani S. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* 1970; 226: 1211-3.
69. Coffin JM, Fan H. The discovery of reverse transcriptase. *Annu Rev Virol* 2016; 3: 29-51.
70. Black SG, Arnaud F, Palmarini M, Spencer TE. Endogenous retroviruses in trophoblast differentiation and placental development. *Am J Reprod Immunol* 2010; 64: 255-64.
71. Burgyan J, Havelda Z. Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci* 2011; 16: 265-72.
72. Andersson MG, Haasnoot PC, Xu N, Berenjian S, Berkhout B, Akusjarvi G. Suppression of RNA interference by adenovirus virus-associated RNA. *J Virol* 2005; 79: 9556-65.
73. Mojica FJ, Ferrer C, Juez G, Rodriguez-Valera F. Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea *Haloferax mediterranei* and *Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning. *Mol Microbiol* 1995; 17: 85-93.
74. Jansen R, Embden JD, Gastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol Microbiol* 2002; 43: 1565-75.
75. Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol* 2005; 60: 174-82.

76. Pourcel C, Salvignol G, Vergnaud G. CRISPR G elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology* 2005 ; 151 : 653-63.
77. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, *et al.* An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 2015 : 13.
78. Marraffini LA, Sontheimer EJ. CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* 2008 ; 322 : 1843-5.
79. Barrangou R, Gersbach CA. Expanding the CRISPR toolbox : Targeting RNA with Cas13b. *Molecular Cell* 2017 ; 65 : 582-4.
80. Smargon AA, Cox DB, Pyzocha NK, Zheng K, Slaymaker IM, Gootenberg JS, *et al.* Cas13b is a type VI-B CRISPR-Associated RNA-Guided RNase differentially regulated by accessory proteins Csx27 and Csx28. *Mol Cell* 2017 ; 65 : 618-30 e7.
81. Brouns SJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuys RJ, Snijders AP, *et al.* Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 2008 ; 321 : 960-4.
82. Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, *et al.* CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 2011 ; 471 : 602-7.
83. Garneau JE, Dupuis ME, Villion M, Romero DA, Barrangou R, Boyaval P, *et al.* The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature* 2010 ; 468 : 67-71.
84. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012 ; 109 : E2579-86.
85. Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* 2013 ; 339 : 819-23.
86. Mali P, Yang L, Esvelt KM, *et al.* RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science* 2013 ; 339 : 823-6.
87. Shmakov S, Smargon A, Scott D, *et al.* Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 2017 ; 15 : 169-82.
88. Huang Z, Tomitaka A, Raymond A, Nair M. Current application of CRISPR/Cas9 gene-editing technique to eradication of HIV/AIDS. *Gene Ther* 2017 ; 24 : 377-84.
89. Shapiro B. Mammoth 2.0 : will genome engineering resurrect extinct species? *Genome Biol* 2015 ; 16 : 228.
90. Seed KD, Lazinski DW, Calderwood SB, Camilli A. A bacteriophage encodes its own CRISPR/Cas adaptive response to evade host innate immunity. *Nature* 2013 ; 494 : 489-91.
91. Maxwell KL. Phages fight back : inactivation of the CRISPR-Cas bacterial immune system by anti-CRISPR proteins. *PLoS Pathog* 2016 ; 12 : e1005282.
92. Parmley SF, Smith GP. Filamentous fusion phage cloning vectors for the study of epitopes and design of vaccines. *Adv Exp Med Biol* 1989 ; 251 : 215-8.
93. Smith GP. Filamentous fusion phage : novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 1985 ; 228 : 1315-7.
94. Smith GP. Surface presentation of protein epitopes using bacteriophage expression systems. *Curr Opin Biotechnol* 1991 ; 2 : 668-73.
95. Rakonjac J, Bennett NJ, Spagnuolo J, Gagic D, Russel M. Filamentous bacteriophage : biology, phage display and nanotechnology applications. *Curr Issues Mol Biol* 2011 ; 13 : 51-76.
96. Lee SW, Mao C, Flynn CE, Belcher AM. Ordering of quantum dots using genetically engineered viruses. *Science* 2002 ; 296 : 892-5.
97. Wong IY, Bhatia SN, Toner M. Nanotechnology : emerging tools for biology and medicine. *Genes Dev* 2013 ; 27 : 2397-408.
98. Farr R, Choi DS, Lee SW. Phage-based nanomaterials for biomedical applications. *Acta Biomater* 2014 ; 10 : 1741-50.
99. Kadri A, Wege C, Jeske H. In vivo self-assembly of TMV-like particles in yeast and bacteria for nanotechnological applications. *J Virol Methods* 2013 ; 189 : 328-40.
100. Peyret H, Gehin A, Thuenemann EC, Blond D, El Turabi A, Beales L, *et al.* Tandem fusion of hepatitis B core antigen allows assembly of virus-like particles in bacteria and plants with enhanced capacity to accommodate foreign proteins. *PLoS One* 2015 ; 10 : e0120751.
101. Sainsbury F, Canizares MC, Lomonosoff GP. Cowpea mosaic virus : the plant virus-based biotechnology workhorse. *Annu Rev Phytopathol* 2010 ; 48 : 437-55.
102. Schneider A, Eber FJ, Wenz NL, Altintoprak K, Jeske H, Eiben S, *et al.* Dynamic DNA-controlled "stop-and-go" assembly of well-defined protein domains on RNA-scaffolded TMV-like nanotubes. *Nanoscale* 2016 ; 8 : 19853-66.
103. Vannucci L, Lai M, Chiuppesi F, Ceccherini-Nelli L, Pistello M. Viral vectors : a look back and ahead on gene transfer technology. *New Microbiol* 2013 ; 36 : 1-22.
104. Terheggen HG, Lowenthal A, Lavinha F, Colombo JP, Rogers S. Unsuccessful trial of gene replacement in arginase deficiency. *Z Kinderheilkd* 1975 ; 119 : 1-3.
105. Fischer A, Hacein-Bey-Abina S, Cavazzana-Calvo M. Thérapie génique du déficit immunitaire combiné sévère lié à l'X. *Medecine sciences* 2004 ; 20 : 115-7.
106. Choi JG, Dang Y, Abraham S, Ma H, Zhang J, Guo H, *et al.* Lentivirus pre-packed with Cas9 protein for safer gene editing. *Gene Ther* 2016 ; 23 : 627-33.
107. Yin K, Han T, Liu G, Chen T, Wang Y, Yu AY, *et al.* A geminivirus-based guide RNA delivery system for CRISPR/Cas9 mediated plant genome editing. *Sci Rep* 2015 ; 5 : 14926.
108. Hu J, Liu K. Complete and incomplete hepatitis B virus particles : formation, function, and application. *Viruses* 2017 ; 9.
109. Roldao A, Mellado MC, Castilho LR, Carrondo MJ, Alves PM. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Rev Vaccines* 2010 ; 9 : 1149-76.
110. Belval L, Hemmer C, Sauter C, Reinbold C, Fauny JD, Berthold F, *et al.* Display of whole proteins on inner and outer surfaces of grapevine fanleaf virus-like particles. *Plant Biotechnol J* 2016 ; 14 : 2288-99.
111. Singh P, Gonzalez MJ, Manchester M. Viruses and their uses in nanotechnology. *Drug Development Research* 2006 ; 67 : 23-41.
112. Ambuhl PM, Tissot AC, Fulurija A, Maurer P, Nussberger J, Sabat R, *et al.* A vaccine for hypertension based on virus-like particles : pre-clinical efficacy and phase I safety and immunogenicity. *J Hypertens* 2007 ; 25 : 63-72.
113. Forterre P. To be or not to be alive : How recent discoveries challenge the traditional definitions of viruses and life. *Studies in History and Philosophy of Science Part C : Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences* 2016 ; 59 : 100-8.
114. Pfeiffer JK. The importance of model systems : why we study a virus on the brink of global eradication. *PLoS Pathog* 2017 ; 13 : e1006330.
115. Forterre P, Raoult D. La transformation d'une bactérie en cellule virale à noyau relance l'hypothèse de l'eucaryogenèse virale. *Virologie* 2017 ; 21 : 157-9.

L'interaction entre le suppresseur de l'ARN interférence du BNYVV et sa cible DRB4 est modulée par un ARN viral non codant

Résumé

L'ARN interférence est un mécanisme de défense antivirale chez les plantes qui fait intervenir les protéines DCL et leurs cofacteurs, les protéines DRB. Pour le contourner, les phytovirus expriment des suppresseurs de l'ARN interférence, ou VSR.

Les ARN1 et ARN2 du virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave (BNYVV) suffisent à assurer l'infection sur *Nicotiana benthamiana* et l'ARN3 non-codant (ARN3nc), dérivé de l'ARN3, est nécessaire au mouvement viral à longue distance sur l'hôte naturel du genre *Beta*. La protéine p14 est le VSR du BNYVV, essentielle au mouvement systémique. Le mutant *p14BA2* est incapable d'assurer ce mouvement mais est complété par l'accumulation de l'ARN3nc.

Pour préciser le mode d'action de p14, ses partenaires ont été recherchés dans *N. benthamiana*. La protéine DRB4 a ainsi été identifiée. Ces travaux montrent une interaction entre *p14BA2* et NbDRB4, restreinte aux nucléoles où les deux protéines co-localisent, tandis que la protéine p14 sauvage est relocalisée et exclue du nucléole. L'interaction *p14BA2*-NbDRB4 est spécifiquement abolie par l'accumulation nucléaire de l'ARN3nc.

Mots-clés : RNA silencing, ARN viral non-codant, DRB4, mouvement systémique, BNYVV, localisation subcellulaire

Abstract

In plants, RNA silencing (RNAi) is an antiviral defense mechanism involving DCL proteins and their associated DRB proteins. To overcome RNAi, phytoviruses express viral suppressors RNA silencing, or VSRs.

Beet yellow necrotic vein virus (BNYVV) RNA1 and RNA2 are sufficient to ensure infection on *Nicotiana benthamiana* and non-coding RNA3 (RNA3nc), derived from genomic RNA3 degradation by XRN4, is necessary for viral long distance movement on natural *Beta* host. The p14 protein is the VSR expressed by the BNYVV, essential for systemic movement. The *p14BA2* mutant is unable to provide this movement but is complemented by the accumulation of ncRNA3.

In order to unravel p14 silencing suppression mechanism, its potential partners were searched in *N. benthamiana*. The DRB4 protein has thus been identified. Our studies show an interaction between *p14BA2* and NbDRB4, restricted to nucleoli where both proteins co-localize, while the wild-type p14 protein is relocated and excluded from the nucleolus. The *p14BA2*-NbDRB4 interaction is specifically abolished by nuclear accumulation of ncRNA3.

Keywords: RNA silencing, viral non-coding RNA, DRB4, BNYVV, systemic movement, subcellular localization