

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

Complexe multiprotéique formé autour de la VPg-Pro du
Virus de la mosaïque du navet (TuMV)

Par
Catherine Viel

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

Jury d'évaluation

Directeur de recherche

Jean-François Laliberté

Président du jury et examinateur interne

Veronika Von Messling

Examineur externe

Normand Brisson

Résumé

Le virus de la mosaïque du navet (TuMV), faisant partie du genre *Potyvirus*, est le plus important des virus affectant la culture des *Brassicaceae* telles que le colza et les choux. Il est également le second en importance pour les pertes causées aux cultures par les maladies virales (Tomlinson, 1987).

L'ARN viral de polarité positive du TuMV code pour une polyprotéine initiale de haut poids moléculaire qui est clivée par l'intermédiaire de trois protéases virales. La forme précurseure VPg-Pro est une de ces protéases qui, par autoprotéolyse, permet la libération de la protéine mature VPg. Cette protéase est également retrouvée sous la forme précurseure 6K₂-VPg-Pro (Ménard *et al.*, 1995).

La forme mature VPg est liée à l'extrémité 5' de l'ARN génomique du TuMV. Il a été démontré que cette protéine pouvait également se lier à un facteur clé de l'initiation de la traduction des eucaryotes, le facteur eIF-4E (Wittmann *et al.*, 1997). Lors de l'initiation de la traduction, le facteur eIF-4E s'associe à la structure coiffe m⁷GpppN des ARNm cellulaires et favorise le recrutement du complexe ribosomale 43S (Gingras *et al.*, 1999). L'interaction entre les protéines eIF(iso)4E et VPg est essentielle au succès de l'infection du TuMV chez *B. perviridis* (Léonard *et al.*, 2000).

Sachant l'importance de cette interaction chez le TuMV, la présente recherche souhaitait mieux comprendre l'importance de la protéine VPg chez ce virus. Plus précisément, elle avait pour but de vérifier l'hypothèse selon laquelle la protéine VPg-Pro du TuMV pourrait servir de point d'ancrage à un complexe de protéines cellulaires et virales qui permettraient la traduction et la réplication selon une conformation circulaire de l'ARN viral.

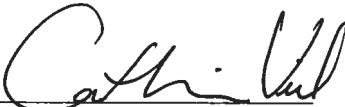
Comme le facteur eIF(iso)4E est essentiel au succès de l'infection du TuMV. Son patron d'expression a d'abord été étudié. Chez les végétaux, au moins deux isomères du facteur eIF4E ont été identifiés, c'est-à-dire les isomères eIF4E et eIF(iso)4E (Browning,

1996). Le facteur eIF(iso)4E a été détecté au niveau des plantes saines et infectées par le TuMV tandis que le facteur eIF4E a été détecté uniquement chez les plantes infectées. Ce résultat laisse entrevoir une fonction spécifique à chacun des isomères.

Une seconde série d'expérimentations a été réalisée afin de séparer les membranes cellulaires de feuilles de *B. perviridis* saines ou infectées au TuMV sur gradient de sucrose. L'analyse des fractions récoltées a montré une co-localisation des formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro avec le reticulum endoplasmique, les protéines cellulaires eIF4E/eIF(iso)4E et eIF(iso)4G et PABP₂, des protéines impliquées dans l'initiation de la traduction des ARNm cellulaires, ainsi qu'avec la polymérase virale RdRp.

Les formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro ont ensuite été purifiées *in planta* par chromatographie d'affinité au nickel à partir des fractions membranaires issues d'un gradient de sucrose. Les isomères eIF4E, la protéine PABP₂ et les protéines virales RdRp et CI ont été co-purifiées *in planta* avec les formes 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro.

Les résultats de la présente étude suggèrent l'existence d'un complexe multiprotéique formé autour des formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro. D'autres résultats obtenus en laboratoire et chez divers *Potyvirus* laissent présager que les formes précurseurs de VPg pourraient servir de point d'ancrage afin de recruter les protéines nécessaires à la réplication et la traduction du virus. Ces deux processus seraient possiblement effectués selon une conformation circulaire de l'ARN viral possiblement par l'intermédiaire de l'un ou l'autre des complexes suivants : 6K₂-VPg-Pro/VPg-Pro-PABP₂ ou encore 6K₂-VPg-Pro/VPg-Pro-eIF(iso)4E-eIF(iso)4G-PABP₂.


Catherine Viel
Étudiante

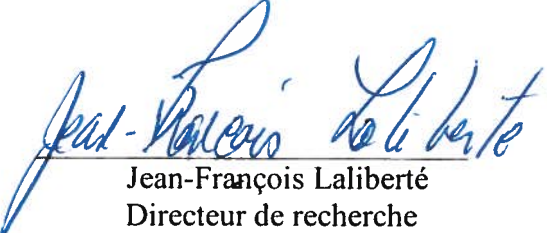

Jean-François Laliberté
Directeur de recherche

Table des matières

Résumé.....	ii
Table des matières.....	iv
Liste des figures	vii
Tableau.....	viii
Liste des acronymes du nom des virus mentionnés	ix
Chapitre 1	1
Introduction.....	1
1 Les <i>Potyvirus</i>	1
1.1 Impact agricole.....	1
1.2 Propagation	1
1.3 Organisation de la structure	2
1.4 Clivage de la polyprotéine	3
1.5 Comparaison des <i>Potyvirus</i> avec d'autres virus à ARN	5
1.6 Caractérisation de la forme précurseure 6K ₂ -NIa des <i>Potyvirus</i>	7
1.6.1 Domaine Pro	7
1.6.2 Clivage de la forme précurseure 6K ₂ -NIa.....	7
1.6.3 Fonction régulatrice de la protéine NIa.....	8
1.6.4 Localisation cellulaire de la protéine NIa	8
1.6.5 Domaine 6K ₂	9
1.6.6 Liaison à l'ARN génomique	9
1.6.7 Uridylylation de la protéine mature VPg	10
1.6.8 Protéine VPg et infection systémique	12
1.6.9 Phosphorylation de la protéine mature VPg	14
1.7 Caractérisation des protéines produites par les <i>Potyvirus</i>	15
1.7.1 CP.....	15
1.7.2 CI.....	16
1.7.3 Nlb	17
1.7.3.1 Généralités	17
1.7.3.2 Interactions de la protéine Nlb avec d'autres protéines.....	18
1.7.4 HCPro	19
1.7.5 P3 et 6K ₁	19
1.7.6 P1	20
1.8 Protéine NIa et interactions avec des protéines virales et cellulaires	20
1.8.1 Interaction NIa - Nlb.....	21
1.8.2 NIa - NIa	22
1.8.3 NIa - HCPro	22
1.8.4 NIa - PVIP	23
1.8.5 NIa et isomères eIF4E.....	23

2	Implication du facteur eIF4E dans la pathogenèse des <i>Potyvirus</i>	24
2.1	Interaction entre la protéine VPg du TuMV et le facteur eIF(iso)4E	24
2.2	Le complexe eIF4F et la traduction des ARNm	26
2.2.1	Initiation de la traduction des ARNm	26
2.2.2	Isoformes eIF4F	30
2.2.3	Facteur eIF4E.....	31
2.2.3.1	Généralités	31
2.2.3.2	Régulation de l'activité post-traductionnelle des facteurs eIF4E ...	31
2.2.3.3	Implication des facteurs eIF4E dans les cancers.....	33
2.2.4	Facteurs eIF4G.....	34
2.2.5	Conformation circulaire du complexe d'initiation de la traduction ...	34
2.2.5.1	Interactions impliquées	34
2.2.5.2	Protéine PABP	36
2.3	Facteurs de l'initiation de la traduction ciblés par les virus.....	38
2.4	Les facteurs eIF4E et la résistance végétale aux virus.....	40
3	Hypothèse et objectifs de travail	43
3.1	Hypothèse	43
3.2	Objectifs.....	44
	Chapitre 2.....	45
	Matériel et méthodes.....	45
2.1	Inoculation de plantes de <i>B. perviridis</i> avec le TuMV.....	45
2.2	Séparation des membranes cellulaires sur gradient de sucrose.....	45
2.3	Purification <i>in planta</i> de 6K ₂ -VPg-Pro et de VPg-Pro	46
2.4	Immunobuvardages	47
2.5	Extraction d'ARN	50
2.6	Northern blot.....	50
2.6.1	Préparation de la sonde liée à l'isotope radioactif α -P ³²	50
2.6.2	Séparation de l'ARN total et transfert sur membrane.....	51
2.6.3	Hybridation de la sonde	52
	Chapitre 3.....	53
	Résultats.....	53
3.1	Expression des isomères eIF4E chez <i>B. perviridis</i> après infection au TuMV	53
3.1.1	Symptômes des plantes infectées au TuMV	53
3.1.2	Expression des isomères eIF4E.....	54
3.2	Localisation membranaire de 6K ₂ -VPg-Pro/VPg-Pro et d'autres protéines.....	57
	virales et cellulaires.....	57
3.2.1	Caractérisation des membranes séparées sur gradient de sucrose	57
3.2.2	Localisation membranaire de 6K ₂ -VPg-Pro/VPg-Pro, des isomères.....	63
	eIF4E et des protéines PABP ₂ et RdRp.	63
3.3	Purification de 6K ₂ -VPg-Pro et VPg-Pro et co-purification de protéines.....	75
	cellulaires et virales.....	75
3.3.1	Purification <i>in planta</i> de 6K ₂ -VPg-Pro et VPg-Pro	75
3.3.2	Co-purification <i>in planta</i> des isomères eIF4E/eIF(iso)4E, PABP ₂ ,.....	78
	RdRp et CI en présence de 6K ₂ -VPg-Pro et VPg-Pro	78
3.4	Distribution de l'ARN viral	83

Chapitre 4.....	86
Discussion.....	86
4.1 Modification de l'expression des isomères eIF4E après infection au TuMV.....	86
4.2 Co-localisation et co-purification <i>in planta</i> des protéines cellulaires et virales avec les formes précurseurs 6K ₂ -VPg-Pro et VPg-Pro.....	94
4.3 Modèle de traduction et de réplication du TuMV selon une conformation..... circulaire de l'ARN génomique.....	104
Conclusion.....	114
Remerciements.....	117
Bibliographie.....	118

Liste des figures

Figure 1 : Schématisation de la structure des potyvirus et photographie prise en microscopie électronique à transmission du <i>Plum pox virus</i> (PPV).	2
Figure 2 : Schématisation de l'ARN génomique du TuMV et du clivage de la polyprotéine obtenue.....	4
Figure 3 : Comparaison de l'organisation des génomes des membre du supergroupe des virus « <i>Picornalike</i> ».....	6
Figure 4 : Représentation schématique de l'initiation de la traduction des ARNm chez les végétaux.	29
Figure 5 : Plantes de <i>B. perviridis</i> infectées au TuMV.....	54
Figure 6 : Expression des isomères eIF4E après inoculation de plantes de <i>B. perviridis</i> au TuMV.....	56
Figure 7 : Détection de la protéine BiP après séparation des membranes cellulaires par ultracentrifugation sur gradient de sucrose.	59
Figure 8 : Détection des protéines présentant les modifications xylose β ,1 \rightarrow 2mannose et de la protéine PAM2 après séparation des membranes cellulaires par ultracentrifugation sur gradient de sucrose.	62
Figure 9 : Détection des formes précurseurs de VPg après séparation des membranes cellulaires par ultracentrifugation sur gradient de sucrose.....	64
Figure 10 : Détection des isomères eIF4E et eIF(iso)4E après séparation des membranes cellulaires par ultracentrifugation sur gradient de sucrose.	68
Figure 11 : Détection des isomères eIF4G et eIF(iso)4G après séparation des membranes cellulaires par ultracentrifugation sur gradient de sucrose.	70
Figure 12 : Détection de la protéine PABP ₂ après séparation des membranes cellulaires par ultracentrifugation sur gradient de sucrose.....	72
Figure 13 : Détection de la RdRp après séparation des membranes cellulaires par ultracentrifugation sur gradient de sucrose.....	74
Figure 14 : Purification <i>in planta</i> de 6K ₂ -VPg Pro et VPg-Pro.	77
Figure 15 : Co-purification <i>in planta</i> des protéines eIF4E/eIF(iso)4E, PABP ₂ , RdRp et CI avec les protéines virales 6K ₂ -VPg-Pro et VPg-Pro.....	79
Figure 16 : Détection de l'ARN génomique du TuMV après séparation des membranes cellulaires de feuilles de <i>B. perviridis</i> infectées au TuMV par ultracentrifugation sur gradient de sucrose.....	85
Figure 17 : Modèle d'initiation de la synthèse du brin d'ARN de polarité négative lors de la réplication du poliovirus	107

Tableau

Tableau 1 : Noms et dilutions appropriées des sérums utilisés dans les immunobuvardages.....49

Liste des acronymes du nom des virus mentionnés

Le premier nom mentionné entre parenthèse indique la famille auquel appartient le virus et le second, le genre.

- BMV : *Brome mosaic virus* (*Bromoviridae*, *Bromovirus*)
 CIYVV : *Clover yellow vein virus* (*Potyviridae*, *Potyvirus*)
 CMV : *Cucumber mosaic virus* (*Bromoviridae*, *Cucumovirus*)
 CPMV : *Cowpea mosaic virus* (*Comoviridae*, *Comovirus*)
 CV : *Coxsackievirus* (*Picornaviridae*, *Enterovirus*)
 EMCV : *Encephalomyocarditis virus* (*Picornaviridae*, *Cardiovirus*)
 FCV : *Feline calicivirus* (*Caliciviridae*, *Vesivirus*)
 FLUAV : *Influenza A* (*Orthomyxoviridae*, *Influenzavirus A*)
 GCMV : *Grapevine chrome mosaic virus* (*Comoviridae*, *Nepovirus* sous-groupe B)
 GFLV : *Grapevine fanleaf nepovirus* (*Comoviridae*, *Nepovirus* sous-groupe A)
 HHAV : *Hépatite A* (*Picornaviridae*, *Hepatovirus*)
 LMV : *Lettuce mosaic virus* (*Potyviridae*, *Potyvirus*)
 NV : *Norwalk virus* (*Caliciviridae*, *Norovirus*)
 PSbMV : *Pea seed born mosaic virus* (*Potyviridae*, *Potyvirus*)
 PPV : *Plum pox virus* (*Potyviridae*, *Potyvirus*)
 PV : *poliovirus* (*Picornaviridae*, *Enterovirus*)
 PVA : *Potato virus A* (*Potyviridae*, *Potyvirus*)
 PVY : *Potato virus Y* (*Potyviridae*, *Potyvirus*)
 TEV : *Tobacco etch virus* (*Potyviridae*, *Potyvirus*)
 TMV : *Tobacco mosaic virus* (*Tetraviridae*, *Tobamovirus*)
 ToRSV : *Tomato ringspot virus* (*Comoviridae*, *Nepovirus* sous-groupe C)
 TuMV : *Turnip mosaic virus* (*Potyviridae*, *Potyvirus*)
 TVMV : *Tobacco vein mottling virus* (*Potyviridae*, *Potyvirus*)
 ZYMV : *Zucchini yellow mosaic virus* (*Potyviridae*, *Potyvirus*)

Chapitre 1

Introduction

1 Les *Potyvirus*

1.1 Impact agricole

Le virus de la mosaïque du navet, TuMV, appartient au genre potyvirus et affecte plus de 318 espèces végétales réparties dans 156 genres différents. Il s'agit du virus le plus répandu de la famille des brassicacées (ancienne famille des crucifères) qui inclue notamment le colza, les choux, le navet, le brocoli et diverses plantes ornementales. Le TuMV est présent dans plusieurs régions du monde incluant les zones tropicales ou tempérées d'Afrique, d'Asie, d'Europe, d'Océanie et des Amériques (Ohshima *et al.*, 2002). Il s'agit donc d'un virus dont l'incidence économique est importante. Au niveau mondial, il a d'ailleurs été catégorisé parmi les cinq virus les plus dommageables des cultures maraîchères (Sánchez *et al.*, 2003). Le genre potyvirus auquel le TuMV appartient renferment 30% de tous les virus végétaux connus (Johansen *et al.*, 2001).

1.2 Propagation

La propagation des potyvirus est assurée par les pucerons. La transmission se fait selon un mode non-persistant, c'est-à-dire que les virus sont retenus sur la cuticule du stylet de l'insecte pendant un temps limité avant d'être inoculé par régurgitation sur un nouvel hôte (Sánchez *et al.*, 2003). Une fois dans l'hôte, l'infection systémique est possible si le virus peut se propager d'une cellule à l'autre par l'intermédiaire des plasmodemes et sur de longues distances via le phloème (Revers *et al.*, 1999).

1.3 Organisation de la structure

Les virions non-enveloppés du TuMV sont des particules flexibles et filamenteuses d'une longueur de 720nm (figure 1). Le simple brin d'ARNviral de polarité positive est entouré de 2000 protéines de la capsid (Sánchez *et al.*, 1998). Le génome du virus, constitué de 9830 nucléotides, renferme un seul cadre de lecture. Il est traduit directement en une polyprotéine précurseur de 3863 acides aminés (Nicolas et Laliberté, 1992). La protéine virale VPg, «Viral Protein genome-linked», est liée de façon covalente à l'ARNviral par l'intermédiaire d'un résidu tyrosine à son extrémité 5' (Murphy *et al.*, 1996). L'extrémité 3' est quant à elle polyadénylée (Laliberté *et al.*, 1992).

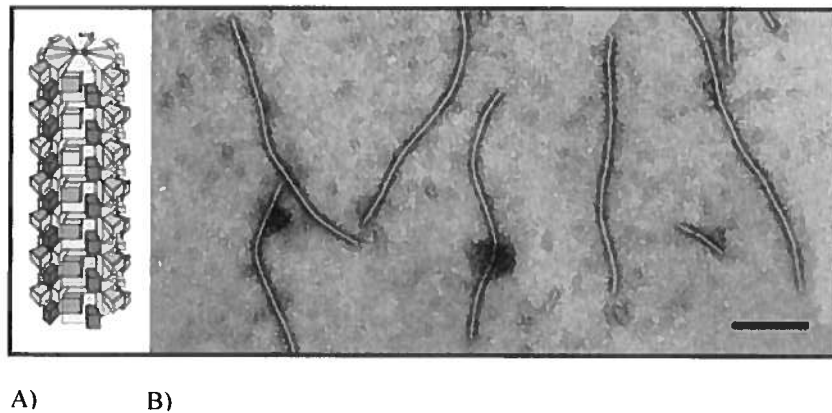


Figure 1 : Schématisation de la structure des potyvirus et photographie prise en microscopie électronique à transmission du *Plum pox virus* (PPV).

A) Représentation des protéines de la capsid (CP) entourant le brin d'ARN viral des potyvirus. Les prismes rectangulaires de couleur gris pâle correspondent à la partie N-terminale de la capsid tandis que la partie C-terminale correspond aux prismes rectangulaires de couleur gris foncé. B) Structure flexible et filamenteuse du PPV, un potyvirus, visualisé en microscopie électronique. La barre de référence correspond à 200nm.

Source : <http://www.danforthcenter.org/iltab/potyviridae/descriptionfiles/properties.html>

1.4 Clivage de la polyprotéine

Chez le TuMV, la polyprotéine initiale de haut poids moléculaire est clivée en dix protéines matures à l'aide des trois protéases virales P1, HCPro, VPg-Pro. Le clivage se fait de façon co-translationnelle ou post-translationnelle et est effectué en *cis* ou en *trans* par le domaine catalytique spécifique de chaque protéase (figure 2). La présence des formes intermédiaires ou matures de la polyprotéine est fonction de l'efficacité hydrolytique de ces protéases et joue donc le rôle de régulateur de l'expression des gènes viraux (Riechmann *et al.*, 1992).

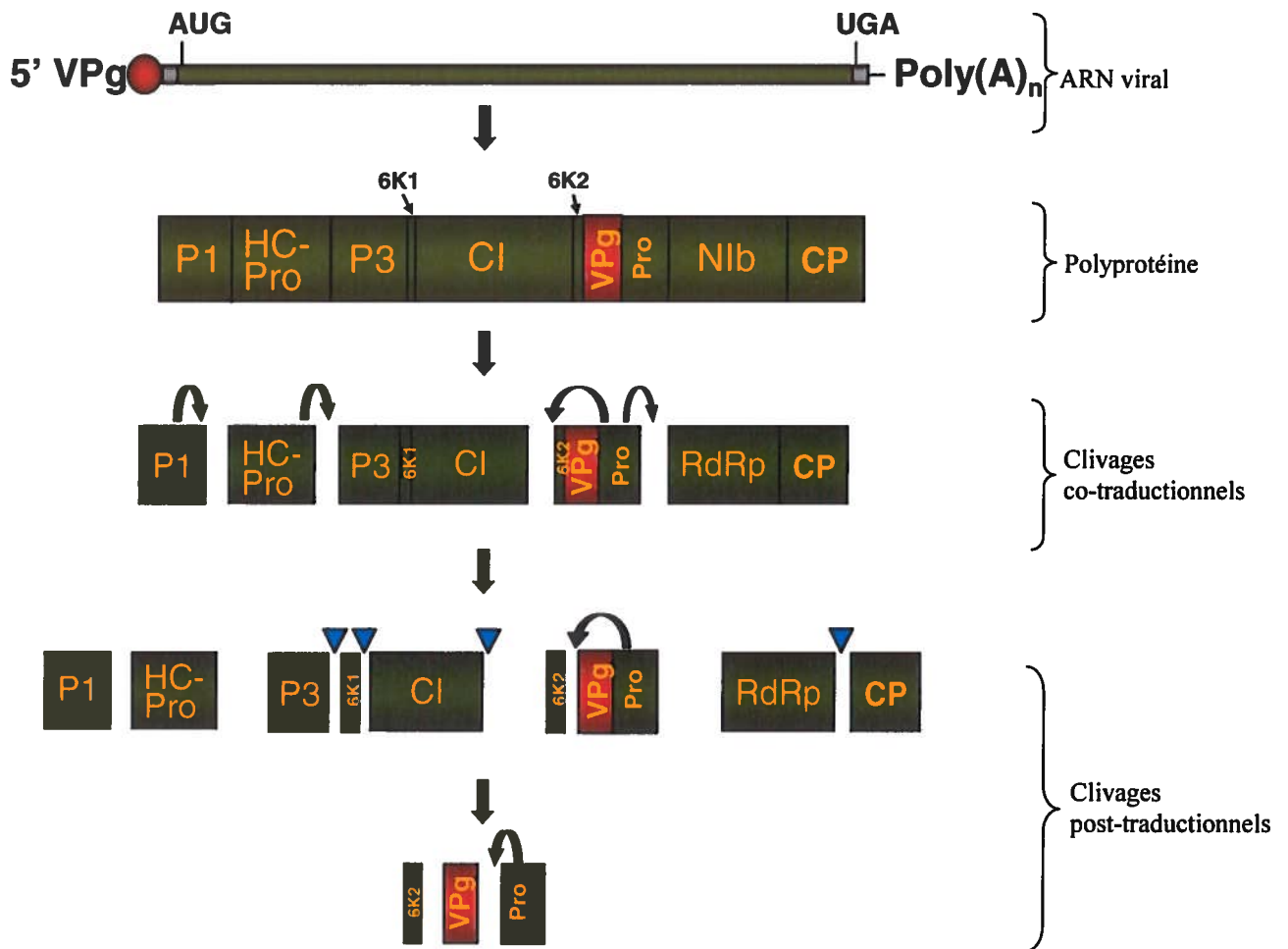


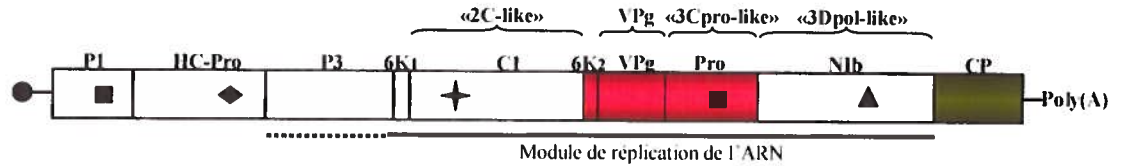
Figure 2 : Schématisation de l'ARN génomique du TuMV et du clivage de la polyprotéine obtenue.

L'ARN génomique du TuMV est illustré par un trait vert. Les zones grises représentent les régions non-traduites (NTR). La VPg est représentée par un cercle rouge. L'extrémité 3' polyadénylée est indiquée par l'abréviation Poly(A)_n. Le trait vert et large illustre la polyprotéine initiale du TuMV. Les divisions verticales de ce trait délimitent les protéines matures. La polyprotéine est clivée en *cis* sur les sites indiqués par les flèches courbées par les protéases virales P1, HCPro et VPg-Pro. Les triangles bleus indiquent les clivages effectués en *trans* par la protéase VPg-Pro. Les clivages sont réalisés de façon co-traductionnelle ou post-traductionnelle et dix protéines matures sont obtenues. Le schéma n'est pas à l'échelle et est inspiré de Riechmann *et al.* (1992).

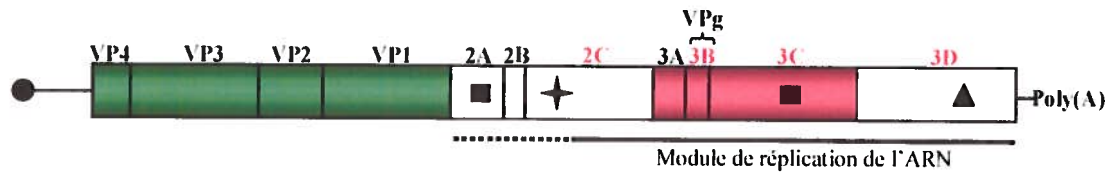
1.5 Comparaison des *Potyvirus* avec d'autres virus à ARN

Le genre *Potyvirus* appartient à la famille des *Potiviridae*. Cette famille fait elle-même partie du supergroupe des virus «*Picornalike*» regroupant à la fois des virus de plantes et d'animaux (Sánchez *et al.*, 2003). Les *Picornaviridae* et les *Comoviridae*, incluant respectivement le poliovirus (PV) et le *Cowpea mosaic virus* (CPMV) sont membres de ce supergroupe. Les virus membre de ces familles partagent plusieurs points en commun (figure 3). Leur génome consiste à un ou deux segments d'ARN simple brin de polarité positive et il ne possède qu'un seul cadre de lecture par segment. L'extrémité 5' du génome est liée à un résidu tyrosine ou sérine appartenant à une VPg. Leur génome est initialement exprimé sous forme d'une polyprotéine de haut poids moléculaire qui est ensuite clivée par des protéases encodées par le génome viral. Enfin, les protéines impliquées dans la réplication virale présentent un ordre et une séquence en acides nucléiques relativement conservés (ICTV database, *Picornaviridae* : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>).

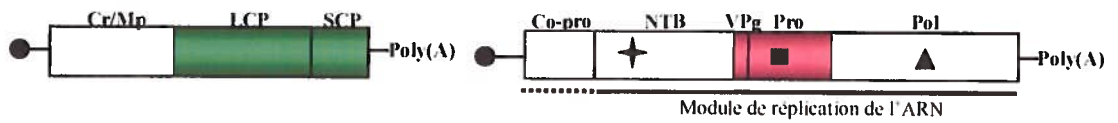
Potyvirus : famille des *Potyviridae* (ex : TuMV)



Poliovirus : famille des *Picornaviridae* (ex : poliovirus)



Comovirus : famille des *Comoviridae* (ex : CPMV)



Népotavirus : famille des *Comoviridae* (ex : GCMV)

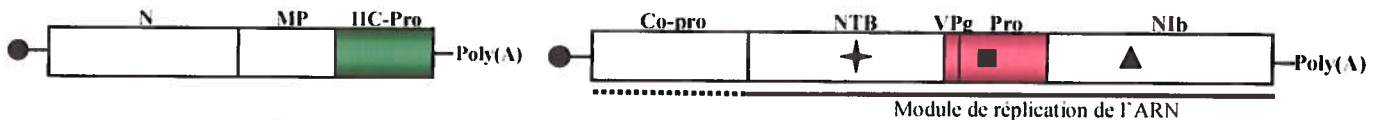


Figure 3 : Comparaison de l'organisation des génomes des membres du supergroupe des virus «*Picorna-like*».

Le ou les cadres de lecture d'un virus représentant une familles donnée sont schématisés par les traits rectangulaires et les sites de clivage, par des lignes transversales. La protéine VPg est représentée par un cercle à l'extrémité N-terminale de la polyprotéine. Les protéines ayant la fonction de capsid (CP) sont ombragées de couleur vert et celles ayant une fonction similaire à celle de la forme précurseure 6K₂-VPg-Pro sont ombragées de couleur rouge. + représente le motif de liaison aux nucléotides, ◆ le domaine protéasique de type cystéine, ▲ le domaine de la polymérase et ■ le domaine protéasique de type sérine. CPMV : *Cowpea mosaic virus*. GCMV : *Grapevine chrome mosaic virus*. Schéma inspiré de Sadowy *et al.* (2001) ; Riechmann *et al.* (1992) ; Thompson *et al.* (2002).

1.6 Caractérisation de la forme précurseure 6K₂-NIa des *Potyvirus*

La forme précurseure 6K₂-NIa des potyvirus est un élément central de la présente étude. L'implication de cette protéine à divers niveaux dans le cycle d'infection des potyvirus est donc largement détaillée. À noter que chez le TuMV, la désignation de la protéine 6K₂-NIa est remplacée par l'expression 6K₂-VPg-Pro (voir figures 1 et 2).

1.6.1 Domaine Pro

Le domaine protéasique, Pro, positionné en C-terminal de la protéine précurseure 6K₂-NIa possède une séquence en acides aminés et un repliement similaire aux protéases de type sérine (Daròs et Carrington, 1997). Ce domaine présente également des similarités avec la protéase 3C retrouvée chez les *Picornavirus* (Schaad *et al.*, 1996). Chez le TuMV, une histidine, en position 2161, est nécessaire à l'activité protéolytique du domaine Pro. Son remplacement par un résidu glutamine inhibe le processus de maturation de la protéine VPg-Pro exprimée dans *Escherichia coli* (Laliberté *et al.*, 1992). Chez les *Potyvirus*, le domaine Pro reconnaît sept sites de clivage sur l'ensemble de la polyprotéine initiale. Il joue donc un rôle important dans la régulation de l'expression du génome viral (Riechmann *et al.*, 1992).

1.6.2 Clivage de la forme précurseure 6K₂-NIa

La protéine précurseure 6K₂-NIa est clivée en *cis* par le domaine protéasique Pro afin de produire les protéines matures 6K₂, VPg et Pro (figure 2). Des formes intermédiaires sont cependant produites ce qui contribuerait à faire de la protéine précurseure 6K₂-NIa une protéine multifonctionnelle (Nicolas et Laliberté, 1992). La séquence de la protéine précurseure 6K₂-VPg-Pro du TuMV a été introduite dans un vecteur de haut niveau d'expression chez *E. coli*. Les formes 6K₂-VPg-Pro, VPg-Pro, 6K₂-VPg et VPg correspondant aux poids moléculaires attendus ont été observées sur gel d'acrylamide. Seules les formes matures 6K₂ et Pro n'ont pu être détectées. L'absence de la première forme s'expliquant par le type d'anticorps utilisé et, pour la seconde forme,

par une éventuelle instabilité du domaine Pro ou encore par sa dégradation via les protéases hôtes ou via le domaine Pro lui-même. Cette étude a également impliquée l'utilisation de mutants 6K₂-VPg-Pro dont les sites de clivage interne, conservés chez le genre potyvirus, ont été modifiés. L'étude a permis de confirmer, chez le TuMV, que le domaine catalytique Pro agissait à la jonction des domaines 6K₂ et VPg (E-P-V-T-H-E ↑ A : positions 1918 à 1924) et à la jonction des domaines VPg et Pro (V-P-V-D-H-E ↑ S : positions 2110 à 2116 ; Laliberté *et al.*, 1992).

1.6.3 Fonction régulatrice de la protéine NIa

L'importance du clivage entre les deux domaines de la protéine Nia (ou VPg-Pro) a été démontrée chez le *Tobacco etch virus* (TEV). Des mutations ont été insérées dans le site de clivage situé à la jonction des domaines VPg et Pro ce qui a eu pour résultat d'inhiber la réplication des clones infectieux dans des protoplastes de tabac (Carrington *et al.*, 1993). Par ailleurs, ce site de clivage interne constituerait un substrat pauvre pour l'activité du domaine catalytique de Pro. En effet, dans le site de clivage de la protéine NIa du TEV, le motif heptapeptidique entourant le lien de coupure entre les résidus Glu-188 et Gly-189 serait possiblement inefficace. Il diffère des autres sites de clivage consensus habituellement reconnus par le domaine Pro. Des mutants encodant une protéine NIa avec un motif heptapeptidique favorisant une protéolyse interne accélérée, introduits dans des clones infectieux du TEV, ont présenté une amplification génomique débilante. Il a donc été suggéré que la maturation «lente» de la protéine NIa jouait un rôle de fonction régulatrice (Schaad *et al.*, 1996).

1.6.4 Localisation cellulaire de la protéine NIa

Le terme NIa signifie «Nuclear Inclusion a». Chez la plupart des potyvirus, la protéine NIa est effectivement localisée dans le noyau des cellules infectées. Chez le TEV, la translocation de la protéine NIa vers le noyau serait assurée par la présence d'un signal de localisation nucléaire (NLS). La fonction de cette protéine dans le noyau est cependant encore inconnue (Urcuqui-Inchina *et al.*, 2001). De plus, la distribution

nucléaire et cytoplasmique de protéines non-structurales de 19 potyvirus a été étudiée et les résultats ont entre autres démontré que la localisation de la protéine NIa sous forme de corps d'inclusion ne se faisait pas toujours dans le noyau. La protéine pouvait également être accumulée dans des corps d'inclusion au niveau du cytoplasme. Dans plusieurs cas, ces corps d'inclusion étaient d'ailleurs composés de plus d'une protéine non-structurale. Il a été suggéré que les corps d'inclusions nucléaires ou cytoplasmiques des potyvirus correspondaient à des sites de dépôt des protéines non-structurales produites en excès lors de l'infection virale (Riedel *et al.*, 1998).

1.6.5 Domaine 6K₂

Le domaine 6K₂ ne possède pas de fonction enzymatique déterminée chez les *Potyvirus* (Urcuqui-Inchina *et al.*, 2001). Ce domaine est toutefois essentiel car l'élimination de la séquence codant pour cette protéine s'est avérée non-viable pour le *Potato virus A* (PVA ;Merits *et al.*, 2002). Il a aussi été démontré que l'élimination du site de clivage entre les protéines 6K₂ et NIa était non-viable pour le TEV (Restrepo-Hartwig et Carrington, 1994). Enfin, la protéine 6K₂ est la seule protéine virale présentant une affinité spécifique pour le RE. Cette affinité serait rendue possible grâce à un domaine de 19 acides aminés hydrophobiques localisés au centre de la séquence de la protéine 6K₂ du TEV.

1.6.6 Liaison à l'ARN génomique

De nombreux virus à ARN simple brin possèdent la protéine mature VPg en liaison avec l'extrémité 5' de leur ARN génomique (liste élaborée dans Sadowy *et al.*, 2001). Chez les *Potyvirus*, la liaison covalente entre la protéine VPg et l'ARN est assurée par un lien phosphodiester (Daròs et Carrington, 1997). Chez le *Tobacco vein mottling virus* (TVMV), un résidu tyrosine a été localisé en position 1860 (Tyr1860) et ce résidu assurerait la liaison phosphodiester. Une comparaison des 18 acides aminés entourant le résidu Tyr1860 a été effectuée pour divers potyvirus et a montré une forte identité des séquences analysées. Dans chacun des cas, la présence d'un résidu tyrosine a coïncidé

avec la position de Tyr1860 du TVMV (Murphy *et al.*, 1991 : Murphy *et al.*, 1996). Chez le TuMV, un résidu tyrosine (aa 1986) se retrouve également dans une séquence d'acides aminés très similaire à celle dans laquelle est retrouvé le résidu Tyr1860 du TVMV.

L'importance du lien entre la protéine VPg et l'extrémité 5' de l'ARN génomique a été démontrée par l'utilisation de clones infectieux du TVMV dans lesquels le résidu tyrosine a été modifié pour un résidu serine ou phénylalanine. Les clones infectieux mutants ont ensuite été utilisés pour infecter des plantes et pour transfecter des protoplastes de *Nicotiana tabacum*. Dans les deux cas, les virus mutants n'ont pu s'accumuler à des niveaux détectables dans les plantes et ne semblaient pas pouvoir se répliquer dans les protoplastes (Murphy *et al.*, 1996).

En plus du lien phosphodiester liant l'extrémité de l'ARN viral et la protéine VPg mature, le domaine Pro de la protéine NIa du TEV possède une activité de liaison à l'ARN. L'interaction a été mesurée sur des brins d'ARN de polarité positive et négative et sur des brins correspondant aux régions 5'- et 3'-NTR du TEV. La liaison à l'ARN s'est avérée indépendante de la séquence ribonucléique et a présentée une affinité approximativement identique aux différents types d'ARN testés. Parmi les explications possibles de cette interaction, il a été suggéré que des protéines cellulaires ou virales contribuaient à la création d'un complexe NIa-ARN viral (Daròs et Carrington, 1997).

1.6.7 Uridylylation de la protéine mature VPg

Une étude récente a montré que la protéine mature VPg du PVA pouvait être uridylylée par l'intermédiaire de la polymérase virale NIb (Puustinen *et al.*, 2004). Un mécanisme semblable est très bien détaillé chez le *Poliovirus* (PV). En effet, chez ce virus, le processus d'uridylylation permet l'ajout d'UTP à la protéine VPg (nommée 3B chez le PV). Le processus est catalysé par la présence de la polymérase virale 3D^{pol} qui assurerait la formation d'un pont phosphodiester entre un UMP et le groupement hydroxyle d'un résidu tyrosine de la protéine VPg du virus. Selon le modèle développé

chez le PV, l'amorce VPg-poly(U) permettrait ensuite à la polymérase 3D^{pol} d'entamer la transcription du brin d'ARN complémentaire (Paul *et al.*, 1998).

Dans le cas du PVA, l'uridylylation de la protéine VPg purifiée a été vérifiée *in vitro* par mesure de l'incorporation d'UTP, marqués à l'isotope radioactif α -P³², en présence de quantités croissantes de la polymérase virale N1b purifiée. La présence de la protéine N1b a permis l'uridylylation de la protéine VPg alors que son absence ne l'a pas permise. Ce résultat supporte la possibilité que l'uridylylation de la protéine VPg du PVA soit assurée par la présence de la polymérase virale comme il a été observé chez le PV. Toutefois, l'ajout de séquences correspondant à l'ARN du PVA ou de matrices de poly(A) n'a pas stimulé l'uridylylation *per se* de la VPg contrairement aux résultats qui ont été obtenus chez le PV. De plus, aucune élongation du brin d'ARN viral complémentaire n'a été détectée suite à l'uridylylation de la VPg du PVA. Ce résultat implique possiblement que l'initiation de l'élongation du brin complémentaire nécessite d'autres protéines virales ou cellulaires, absentes de la réaction *in vitro*, ou encore, qu'une propriété structurale de la protéine N1b ait été modifiée au cours de l'expérimentation (Puustinen *et al.*, 2004).

Une autre série d'expériences a mis en évidence un site de liaison aux nucléotides à l'intérieur de la protéine VPg du PVA. Une délétion des acides aminés 38 à 44 à l'intérieur de ce site a réduit de 80% la capacité de la protéine à se lier aux nucléotides. Elle a aussi réduit à 30% l'efficacité de la réaction d'uridylylation *in vitro* de la protéine VPg. Un domaine fonctionnel de liaison aux nucléotides serait donc nécessaire au processus d'uridylylation. Le site de liaison aux nucléotides aurait une fonction importante au niveau de l'interaction entre les protéines VPg et N1b. L'ensemble de ces résultats laisse entrevoir que la protéine VPg des potyvirus, une fois uridylylée, puisse jouer le rôle d'amorce à la polymérase N1b, selon un mécanisme similaire à l'initiation de la réplication du PV (Puustinen *et al.*, 2004). Cette fonction demeure encore à vérifier chez d'autres potyvirus.

1.6.8 Protéine VPg et infection systémique

Il existe plusieurs exemples de gènes de résistance récessive utilisés pour contrôler les pathogènes importants du point de vue agronomique. Chez les végétaux, une résistance récessive est le résultat d'un mécanisme passif découlant de l'absence ou de la modification d'un facteur de l'hôte requis pour l'infection virale (Borgstrom et Johansen, 2001). Quarante pourcent des gènes de résistance récessive connus permettent le contrôle des infections causées par les potyvirus (Nicaise *et al.*, 2003). Quelques potyvirus ont aussi évolués de façon à contourner certaines de ces résistances entre autres grâce à la protéine mature VPg considérée comme un déterminant pathogénique (Borgstrom et Johansen, 2001).

Parmi ces résistances récessives, il existe le gène *va* qui a été sélectionné au niveau des cultivars commerciaux de *N. tabacum* pour la protection qu'il confère contre les infections causées par le TVMV. Le cultivar de tabac TN 86 est homozygote pour le gène *va* et une fois infecté au TVMV, la réplication virale n'est pas inhibée mais il semble que le mouvement du virus de cellule-à-cellule soit affecté. Une souche du TVMV, la souche TVMV-S, peut toutefois contourner la résistance conférée par le gène *va* et infecter les cultivars de tabac TN 86. L'utilisation de transcrits chimériques combinant des régions d'une souche sauvage du TVMV et de la souche TVMV-S a permis d'identifier 4 acides aminés responsables du contournement de la résistance. Ces acides aminés ont été localisés dans le domaine central de la VPg du virus. À partir de ces résultats, il a été suggéré que la structure de la protéine VPg de la souche TVMV-S pouvait interagir, seule ou à l'aide d'autres protéines virales, avec un ou des facteurs cellulaires de l'hôte favorisant ainsi le mouvement du virus à partir de la cellule initialement infectée. Cette interaction ne serait toutefois pas possible avec la conformation de la VPg de la souche TVMV sauvage. La protéine VPg de la souche TVMV-S serait donc un déterminant pathogénique qui assure le mouvement de cellule-à-cellule, via les plasmodemes, dans les plantes de tabac (Nicolas *et al.*, 1997).

Une autre résistance récessive étudiée est celle retrouvée chez le cultivar *N. tabacum* V20. Ce cultivar est connu pour restreindre le mouvement du TEV sur longue distance, c'est-à-dire à l'intérieur du système vasculaire de la plante. Le blocage de l'infection systémique survient lorsque le virus atteint les cellules compagnes (Schaad *et al.*, 1997b). Ces dernières font partie de la structure du phloème et leur fonction est d'assurer le chargement et le déchargement de la sève dans l'ensemble de la plante (Essau, 1977 : 169). À l'exception de la souche TEV-Oxnard, le cultivar V20 n'est pas susceptible à la plupart des souches de TEV. Des génomes hybrides ont été construits à l'aide de la souche TEV-Oxnard et de la souche TEV-HAT, une souche restrictive chez ce cultivar, et ont permis de démontrer qu'une séquence de 67 nucléotides, localisée dans la séquence correspondant à la protéine VPg, constituait le déterminant pathogénique conditionnant la capacité du mouvement de la souche TEV-Oxnard sur longue distance. À l'intérieur de cette séquence, 5 acides aminés se sont avérés différents. De plus, des essais de co-infection de la souche TEV-Oxnard et d'une souche restrictive dans deux cultivars de tabac différents, incluant le cultivar V20, ont montré que la souche restrictive ne stimulait pas une réaction de défense systémique de l'hôte. Les résultats suggèrent donc que la protéine VPg a interagit directement ou indirectement avec des composantes cellulaires afin de permettre le déplacement du virus sur longue distance (Schaad *et al.*, 1997b).

La protéine VPg a aussi été ciblée comme déterminant pathogénique chez le *Pea seed Born Mosaic Virus* (PSbMV). Le souche P-1 de ce virus est incapable de se répliquer dans le cultivar PI269818 de *Pisum sativum* (pois) alors que le souche P-4 peut le faire. Le cultivar PI269818 est homozygote pour gène de résistance récessive *sbm-1*. Ce cultivar a été infecté avec une série de clones infectieux P-1/P-4 recombinants. Il s'est avéré que la séquence correspondant à la protéine VPg du pathotype P4 était responsable du contournement de la résistance conférée par le gène *sbm-1*. L'inoculation de la souche P1 dans le cultivar PI269818 résulte en une répllication virale limitée de façon hâtive. Sachant que la protéine VPg est fort possiblement impliquée dans la répllication des potyvirus, son identification à titre de déterminant pathogénique du PBsMV dans le

cultivar PI269818 serait en accord avec une perturbation d'un évènement hâtif de la réplication du pathotype P-1 (Keller *et al.*, 1998).

Une simple substitution d'un acide aminé, His118Tyr, à l'intérieur de la séquence correspondant à la protéine VPg du PVA, souche B11, a également été suffisante pour permettre une infection systémique chez *Solanum commersonii* (pomme de terre), cultivar PI 458319, normalement résistant à cette souche (Rajamaki et Valkonen, 2002). Le résidu tyrosine¹¹⁸ de la protéine permettrait le chargement du PVA à l'intérieur du phloème. Les auteurs de l'étude ont approfondi leur recherche en comparant les résultats obtenus chez le PVA avec des résultats obtenus chez d'autres potyvirus pour lesquels la protéine VPg avait déjà été identifiée comme déterminant pathogénique. Chez les virus comparés tels que le TVMV, TEV et le PbSMV, qui ont été présentés dans cette section, il s'est avéré que le domaine central de la protéine VPg était nécessaire à une invasion systémique des plantes hôtes. Ce domaine posséderait donc un domaine d'importance universelle lors des interactions hôtes-potyvirus. Il a été suggéré que les diverses substitutions d'acides aminés à l'intérieur de la séquence de la protéine VPg pouvaient induire un changement conformationnel de la protéine qui à son tour était susceptible de modifier sa fonction dans les processus de mouvement ou de réplication viral. Il a aussi été mentionné de la possibilité que la protéine VPg puisse être impliquée dans un mécanisme de suppression ou de détournement d'un mécanisme de défense général de la plante hôte (Rajamaki et Valkonen, 2002).

1.6.9 Phosphorylation de la protéine mature VPg

Un équilibre entre la déphosphorylation et la phosphorylation des protéines régule la fonction d'une grande majorité d'entre elles. Il a été démontré que les protéines de mouvement (MPs) de certains virus végétaux étaient phosphorylées par des kinases d'origine végétale. La phosphorylation de ces protéines pourrait être impliquée dans des mécanismes permettant le mouvement des virus dans la plante (Ivanov *et al.*, 2001).

Il n'existe pas de protéines MP spécifiques chez les potyvirus. Le mouvement de ces virus serait plutôt assuré par un ensemble de protéines multifonctionnelles incluant notamment les protéines CP, HCPro, CI et VPg (Revers *et al.*, 1999). Certaines d'entre elles pourraient être phosphorylées. À l'aide d'un extrait total de protéines provenant de *N. tabacum*, il a été démontré, en système *in vitro*, que les protéines virales recombinantes CP et VPg du PVA pouvaient être phosphorylées par les kinases présentes dans l'extrait (Ivanov *et al.*, 2001). La protéine VPg native du même virus, liée à l'extrémité 5' de l'ARN génomique a aussi été phosphorylée par les kinases de *N. tabacum*. Les kinases responsables de la phosphorylation de la protéine VPg se sont avérées différentes de celles responsables de la phosphorylation des protéines CP du PVA et MP du *Tobacco mosaic virus* (TMV). À la lumière de ces résultats, il a été suggéré que les diverses fonctions de la protéine VPg, liée à l'extrémité 5' des potyvirus, étaient susceptibles d'être régulées par la phosphorylation de la protéine. Des évidences suggèrent que l'une de ces fonctions correspond notamment au transport du virus par l'intermédiaire d'interactions entre la protéine VPg phosphorylée et des protéines cellulaires. Un tel mécanisme a d'ailleurs été observé chez le TMV pour lequel la phosphorylation de la protéine MP du virus régulerait son mouvement de cellule-à-cellule (Puustinen *et al.*, 2002).

1.7 Caractérisation des protéines produites par les *Potyvirus*

1.7.1 CP

La protéine de la capsid CP, «Coat protein», est la principale protéine de structure du TuMV. La protéine CP possède trois domaines. Deux d'entre eux sont situés aux extrémités N- et C-terminales et sont présents à la surface du virion encapsidé (figure 1). Le domaine central assure l'attachement de la capsid à l'ARN viral. Des mutations dirigées dans la séquence codant la protéine CP ont démontré qu'elle était requise chez les potyvirus pour le mouvement de cellule-à-cellule, via les plasmodesmes, et sur longue distance, via le phloem (Revers *et al.*, 1999 ; Schaad *et al.*, 1997b). Un triplet d'acides

aminés Asp-Ala-Gly, localisé à l'extrémité N-terminale de la protéine CP, serait par ailleurs essentiel à la transmission du virus par les pucerons (Revers *et al.*, 1999).

1.7.2. CI

La production des 2000 protéines de la capside (CP) nécessaires afin d'envelopper chaque virion naissant entraîne une accumulation des protéines non-structurales. Ces dernières sont accumulées sous forme de corps d'inclusion et sont retrouvées, selon le potyvirus, dans le cytoplasme et/ou le noyau des cellules infectées (Riedel *et al.*, 1998).

Une caractéristique propre à tous les potyvirus est la présence de corps d'inclusion de forme cylindrique dans le cytoplasme des cellules infectées. Ceux-ci sont produits par l'accumulation de la protéine CI, «Cylindrical inclusion», et constituent d'ailleurs un des critères d'assignement au genre potyvirus (Riechmann *et al.*, 1992). La CI est une hélicase à ARN appartenant à la superfamille SF2 (Jenner *et al.*, 2000). Elle possède effectivement une activité ATPase, lui permettant de dérouler les duplexes d'ARN, et une activité NTPase. Deux domaines de liaison à l'ARN ont été caractérisés chez cette protéine isolée à partir du PPV (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

L'activité hélicase de la protéine CI implique probablement un rôle dans la réplication. Cette possibilité a été appuyée par une expérience dans laquelle des clones infectieux du *Tobacco etch virus* (TEV) présentant les diverses mutations dans la région codant la protéine CI ont été inoculés chez *N. tabacum*. Chacune des mutations affectant le motif hautement conservé de la fonction hélicase a inhibé la capacité de réplication des clones. Par ailleurs, d'autres mutants, ne présentant pas de modifications dans la région hélicase, pouvaient se répliquer sans toutefois se propager. La protéine CI serait donc impliquée de façon distincte dans la réplication virale et le mouvement de cellule-à-cellule (Carrington *et al.*, 1998). Le long du front de l'infection virale, il a été démontré que la protéine CI du PSbMV, un potyvirus, était associée de façon transitoire avec les plasmodesmes (Roberts *et al.*, 1998). Un modèle suggère que la protéine interagirait directement avec ces derniers

et avec un complexe ribonucléoprotéique entourant la CP. Cette interaction permettrait la propagation du virus d'une cellule à l'autre (Carrington *et al.*, 1998).

1.7.3 Nib

1.7.3.1 Généralités

La protéine Nib, «Nuclear Inclusion b», correspond à l'ARN polymérase dépendante d'ARN (RdRp) des potyvirus. Chez ces derniers, la protéine Nib assure la réplication de l'ARN viral de polarité positive à partir de son extrémité 3'. Les brins de polarité négative obtenus sont à leur tour transcrits en ARN de polarité positive et ils constituent les virions naissants (Sadowy *et al.*, 2001).

Chez le TEV, la polymérase du virus fonctionnerait en *trans*. L'activité *trans* de la protéine a été suggérée après que des clones infectieux de ce virus, mutans pour la protéine Nib, aient pu être complétés par une protéine Nib fonctionnelle et exprimée dans des cellules transgéniques inoculées par ces mêmes clones infectieux. L'activité *trans* de la polymérase virale impliquerait donc qu'elle interagisse avec d'autres facteurs viraux ou cellulaires afin d'être recrutée sur un complexe de réplication actif (Li *et al.*, 1998). D'autres essais *in vitro* ont démontré que la protéine Nib du TVMV était en mesure d'utiliser diverses matrices hétérologues d'ARN. Ce résultat laisse entrevoir que la protéine Nib pourrait lier l'ARN indépendamment du type de séquence présenté (Hong et Hunt, 1996).

La protéine Nib du TEV possède deux signaux indépendants de localisation nucléaire (NSL I et II). Cette protéine s'accumule dans le noyau de certains potyvirus pour y créer des corps d'inclusion. Ce phénomène soulève de nombreuses questions car la réplication du virus s'effectue dans le cytoplasme (Li *et al.*, 1997 ; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). L'accumulation de la protéine NIB au niveau du noyau n'est pas caractéristique du TuMV (Wittmann, 1997) et dans ce cas précis, le terme RdRp est préféré à Nib pour nommer la polymérase de ce virus.

1.7.3.2 Interactions de la protéine NlB avec d'autres protéines

Quelques études touchent les interactions entre la protéine NlB et des protéines cellulaires et virales. À l'aide du système du double-hybride chez la levure, il a été démontré que la protéine NlB du *Zucchini Yellow Mosaic Virus* (ZYMV) interagissait avec la protéine cellulaire PABP₁ («Poly(A)-binding protein») de *Cucumis sativus* L. (concombre). La protéine PABP est une protéine impliquée dans le contrôle de la stabilité des ARNm cellulaires et dans l'initiation de leur traduction (Belostotsky, 2003). L'interaction entre les deux protéines a été abolie lorsque l'une ou l'autre des extrémités amino- ou carboxy-terminale de la protéine NlB a été éliminée. Ce résultat refléterait la nécessité de la présence d'une structure secondaire ou tertiaire afin de permettre l'interaction de la NlB avec la protéine cellulaire PABP₂ (Wang *et al.*, 2000).

La technologie du double hybride chez la levure a démontré que la protéine NlB TVMV interagissait avec la protéine CP de ce virus. Des mutations dans le domaine conservé GDD de la polymérase ont diminué sensiblement l'interaction entre les deux protéines. Le rôle biologique de cette interaction pourrait se situer au niveau de la régulation de la synthèse de l'ARN viral. La CP pourrait également faciliter le mouvement des ARN viraux vers ou depuis le complexe de réplication (Hong *et al.*, 1995).

Toujours chez le TVMV, les interactions mesurées *in vivo* ont mis en évidence que la protéine NlB interagissait avec elle-même. Ce résultat suggère un rôle particulier des homodimères ou d'une organisation structurale particulière nécessaire au fonctionnement de la protéine NlB (Hong *et al.*, 1995). L'auto-interaction NlB-NlB mesurée chez le TVMV n'a toutefois pas été répétée chez le TEV et le ZYMV. De plus, l'interaction NlB-CP mesurée chez le TVMV n'a pas été observée chez le ZYMV. Les raisons pouvant expliquer ces différences parmi les polymérases des potyvirus demeurent inconnues. Il pourrait s'agir de différences réelles ou d'artéfacts au niveau des méthodes utilisées (Wang *et al.*, 2000). Enfin, une liaison entre les protéines virales NlB et NIa a été

mesurée chez deux potyvirus. Cette interaction est détaillée dans la section 1.8.1 du présent ouvrage consacrée à la protéine NIa.

1.7.4 HCPro

La protéine HCPro, «Helper component-proteinase», est une protéine multifonctionnelle qui est impliquée dans les différentes étapes du cycle d'amplification des potyvirus. Un domaine protéasique de type cystéine est présent du côté C-terminal de la protéine et permet son clivage autocatalytique en *cis* à sa jonction avec la protéine P3 (Maia *et al.*, 1996).

HCPro serait un régulateur de la spécificité de la transmission des potyvirus par les pucerons. (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). Un motif de quatre peptides, K(I/L)(T/S)C, situé dans un domaine conservé et riche en cystéines, est présent à l'extrémité N-terminale de la protéine. La présence de ce motif serait essentielle à la transmission du virus par les pucerons (Revers *et al.*, 1999).

HC-Pro, en collaboration avec P1, pourrait également agir comme activateur de la pathogenèse virale en interférant avec les mécanismes de défense de l'hôte qui limitent normalement l'invasion des virus. HC-Pro aurait la capacité de supprimer un de ces mécanismes de défense, le «Gene-silencing» post-transcriptionnel (PTGS), ce qui aurait pour conséquence de favoriser la réplication du virus (Revers *et al.*, 1999 ; Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001).

1.7.5 P3 et 6K₁

La protéine mature 6K₁ ne possède pas de fonction connue car elle est généralement retrouvée sous la forme précurseure 6K₁-P3. La protéine mature P3 est par ailleurs difficilement caractérisable car il y a peu d'homologie de séquence entre les protéines P3 des diverses espèces potyvirales. Des motifs de structure et de fonction

spécifique n'ont pas été déterminés pour cette protéine. Son implication dans la réplication pourrait être médiée par sa liaison à la protéine CI (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). La protéine P3 demeure cependant essentielle à la réplication du TuMV car des mutants de ce virus, possédant des insertions au niveau de la séquence de la protéine, n'ont pas supporté la réplication du virus dans des plantes et des protoplastes de tabac (Klein *et al.*, 1994).

1.7.6 P1

La protéine P1 possède un domaine d'activité catalytique de type serine. Elle assure son propre clivage en *cis* à son extrémité C-terminale (Riechmann *et al.*, 1992). À l'exception des résidus His, Asp et Ser présents dans le domaine catalytique, la séquence de la protéine P1 est relativement peu conservée dans le genre potyvirus. La fonction précise de cette protéine dans l'infection virale n'a pas été clairement établie. Des analyses fonctionnelles par délétions et mutations ont montré que la P1 n'était pas strictement essentielle à la réplication virale. La séparation physiques des protéines P1 et de HCPro le serait cependant (Verchot et Carrington, 1995).

1.8 Protéine NIa et interactions avec des protéines virales et cellulaires

Une multitude d'interactions entre la protéine virale NIa et d'autres protéines virales ou cellulaires ont été identifiées au cours des huit dernières années. Le développement de la technologie du double hybride a certainement contribué à cet essor qui permet déjà de dresser un schéma préliminaire des interactions possibles entre les potyvirus et leur hôte. Certaines de ces interactions impliquant la protéine NIa sont présentées dans cette section.

1.8.1 Interaction NIa - NIB

À l'aide du système du double hybride, une interaction a été mesurée entre les protéines NIB et NIa du TVMV. Chez le TVMV, le domaine VPg et non le domaine Pro de la protéine NIa, est responsable de l'interaction entre les deux protéines. Diverses mutations effectuées au niveau du résidu tyrosine (Y₁₈₆₀), qui assure aussi le lien covalent de la protéine NIa à l'ARN viral, a supprimé la liaison avec la protéine NIB. L'interaction entre les deux protéines s'effectuerait donc directement dans le voisinage du site d'attachement de la protéine VPg à l'ARN viral. De plus, une mutation dans le motif conservé GDD de la polymérase virale, réduisant de 85% l'activité de la polymérase, a eu très peu d'effets sur l'interaction entre les deux protéines. L'interaction ne serait donc pas dépendante de l'activité polymérase de la protéine (Hong *et al.*, 1995).

Le précédent résultat a été confirmé *in vitro* par co-purification de la protéine VPg du TVMV avec la protéine de fusion GST-NIB retenue sur colonne d'affinité. Contrairement aux travaux de Hong *et al.* (1995), la purification *in vitro* n'a pas permis de confirmer l'absence d'interaction entre la protéine NIa, mutée au niveau du résidu tyrosine (Y₁₈₆₀), et la protéine NIB du TVMV. Par ailleurs, l'étude a permis de démontrer que le domaine VPg de la protéine NIa du virus avait la capacité de stimuler la fonction polymérase de la protéine NIB *in vitro*. L'effet stimulateur n'est pas affecté par l'insertion d'une mutation dans le motif conservé GDD qui confère la fonction polymérase à la protéine NIB (Fellers *et al.*, 1998).

Le système du double-hybride a été utilisé afin de vérifier l'existence d'interactions entre les protéines NIa et NIB du TEV. À l'opposé des études effectuées chez le TVMV, le domaine Pro de la NIa, et non le domaine VPg, a été impliqué dans l'interaction entre les deux protéines de ce virus. Il n'a toutefois pas été exclu que le domaine VPg soit nécessaire à la stabilisation du complexe NIa-NIB. De plus, des mutations effectuées sur l'ensemble de la séquence codant pour la protéine NIB du TEV ont abolie l'interaction entre les deux protéines. Il a donc été suggéré que l'interaction

entre les deux protéines dépendait de plusieurs régions de la N1b ou encore, qu'elle reposait sur une conformation structurale précise de l'ensemble de la protéine (Li *et al.*, 1997).

1.8.2 N1a - N1a

Tout comme pour la protéine N1b, la protéine N1a a la capacité d'interagir avec elle-même. La formation d'homodimère N1a-N1a a été observée chez le *Clover yellow vein virus* (CIYVV), le PVA, le PSbMV et le TVMV (Yambao *et al.*, 2003 ; Oruetxebarria *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2001 ; Hong *et al.*, 1995). Elle n'a toutefois pas été observée chez le TEV (Li *et al.*, 1997). La partie C-terminale de 38 acides aminés de la VPg du CIYVV serait indispensable à l'auto-interaction de la protéine (Yambao *et al.*, 2003). Les interactions protéiques N1a-N1a ou N1b-N1b pourraient être le reflet du processus d'accumulation de ces protéines, observé chez certains potyvirus, dans le noyau de leur hôte. Puisque ce phénomène n'est pas commun à tous les potyvirus, l'homodimère N1a-N1a pourrait avoir un rôle spécifique ou être impliquées dans une organisation structurale particulière assurant le fonctionnement approprié de la protéine N1a (Hong *et al.*, 1995). Enfin, en supposant que la protéine N1a soit liée à l'extrémité 3' de l'ARN viral, par l'intermédiaire d'interactions avec d'autres protéines, il serait possible que l'auto-interaction de la protéine VPg avec son homologue, liée de façon covalente à l'extrémité 5', permette de lier les deux extrémités de l'ARN viral afin de faciliter la réplication du virus (Oruetxebarria *et al.*, 2001).

1.8.3 N1a - HCPro

L'interaction entre les protéines virales VPg et HCPro a été mesurée uniquement chez le CIYVV. L'interaction a été détectée à l'aide du système du double hybride et *in vitro* par buvardages de type far-Western. Ces techniques ont permis de montrer qu'une région centrale de 19 acides aminés de la protéine VPg du CIYVV était nécessaire à la liaison entre les deux protéines. Cette région serait par ailleurs impliquée dans le mouvement du virus chez le PVA. Il serait donc probable que l'interaction entre les

protéines VPg et HCPro facilite le mouvement du virus dans la plante. Il n'est pas à exclure également que l'interaction entre ces protéines ait une fonction au niveau de la réplication du CIYVV. Il a déjà été démontré que chacune de ces deux protéines multifonctionnelles avaient un rôle à jouer dans la réplication chez d'autres potyvirus (Yambao *et al.*, 2003).

1.8.4 NIa – PVIP

À l'aide du système du double hybride, un facteur cellulaire présent chez *Pisum sativum* (pois), *A. thaliana* et *N. benthamiana* a interagi avec la protéine VPg de cinq potyvirus. Le facteur, nommé «Potyvirus VPg-interacting protein» (PVIP), ne possède pas de fonction connue quoique la présence d'un domaine doigt-PHD est susceptible d'impliquer la protéine dans le contrôle de la transcription par l'intermédiaire d'un remodelage de la chromatine. L'interaction entre les deux protéines repose essentiellement sur un acide aminé précis de la VPg et ce, dans une région de la protéine ne possédant pas de rôle fonctionnel connu. Des clones infectieux du TuMV présentant diverses mutations effectuées au niveau de cet acide aminé ont été inoculés chez *N. benthamiana*. Les plantes ont présenté des symptômes d'infection systémique réduits. Il s'est également avéré que le mouvement de cellule-à-cellule ainsi que le mouvement systémique et non la réplication virale étaient affectés par la mutation. Une réduction de l'expression de la protéine PVIP chez *A. thaliana* a par ailleurs réduit la susceptibilité de ces plantes au TuMV. À la lumière de ces résultats, il semble que cette protéine serve d'auxiliaire permettant le mouvement des potyvirus dans leur hôte et par conséquent, le développement de la maladie (Dunoyer *et al.*, 2004).

1.8.5 NIa et isomères eIF4E

Une interaction a été mesurée entre la VPg du TuMV et le facteur d'initiation de la traduction eIF4E d'*A. thaliana*. La signification biologique de cette interaction fait l'objet de la section 2.1 du présent ouvrage.

2 Implication du facteur eIF4E dans la pathogenèse des *Potyvirus*

2.1 Interaction entre la protéine VPg du TuMV et le facteur eIF(iso)4E

Une chasse à l'interaction entre la protéine-appât VPg-Pro et une banque d'ADNc d'*A. thaliana* a été entreprise à l'aide de la technologie du double-hybride. Les essais d'interactions ont mené à l'isolation de quatre clones, dont un sélectionné au cours de trois criblages différents. Ce dernier correspondait au facteur eucaryotique d'initiation de la traduction 4E (eIF(iso)4E) qui a pour fonction spécifique de lier la coiffe des ARNm lors de l'initiation de la traduction (Gingras *et al.*, 1999). La fonction des protéines exprimées par les autres clones identifiés lors du criblage n'a pas été identifiée (Wittmann *et al.*, 1997).

Le domaine de liaison de la protéine VPg-Pro au facteur eIF(iso)4E nouvellement identifié a été déterminé par délétions successives de la protéine VPg-Pro. Cette méthode a ensuite permis de démontrer que le domaine VPg était responsable de l'interaction entre les deux protéines. Une séquence de 35 acides aminés du domaine VPg (aa 59 à 93) a été ciblée essentielle à l'interaction. À l'intérieur de cette même séquence, la substitution d'un résidu acide aspartique a complètement abolie l'interaction entre les protéines eIF(iso)4E et VPg. La séquence de 35 acides aminés a été comparée chez huit autres potyvirus et s'est avérée hautement conservée au sein du genre. Fait intéressant, cette séquence conservée comprend également le résidu tyrosine assurant la liaison de la protéine VPg à l'ARN viral (Wittmann *et al.*, 1997 ; Léonard *et al.*, 2000).

Une fois le domaine de liaison identifié, la compétitivité possible de la protéine VPg-Pro et des ARNm pour la liaison au facteur eIF(iso)4E a été vérifiée par tests ELISA. Des essais compétitifs ont été réalisés en présence de m⁷GTP, un analogue de la coiffe des ARNm. L'ajout de m⁷GTP a inhibé 60% de la formation du complexe entre les protéines VPg-Pro et eIF(iso)4E. Les résultats obtenus ont également permis de conclure que la protéine VPg-Pro et l'analogue de coiffe m⁷GTP pouvaient se lier de façon simultanée au facteur eIF(iso)4E. Il s'est avéré que la relation des ligands, VPg-Pro et

m⁷GTP, au facteur eIF(iso)4E correspondait à une coopération négative, c'est-à-dire que la liaison d'un ligand diminuait l'affinité de liaison du second ligand au facteur eIF(iso)4E. Le résultat obtenu laisse entrevoir que lors d'une infection virale, l'interaction de la protéine VPg avec le facteur eIF(iso)4E diminuerait l'affinité du facteur eIF(iso)4E pour la coiffe des ARNm. Par conséquent, il y aurait réduction de la synthèse protéique de l'hôte (Léonard *et al.*, 2000).

Les conséquences biologiques de l'interaction entre la protéine VPg-Pro et le facteur eIF(iso)4E ont été étudiées *in planta*. Un clone infectieux du TuMV, mutant pour le résidu acide aspartique nécessaire à la liaison entre les deux protéines, a été introduit par bombardement particulaire dans des plantes de *Brassica perviridis*. Les symptômes d'infection n'étaient pas visibles chez les plantes transfectées avec le clone infectieux muté. Celles transfectées avec le clone infectieux sauvage ont toutefois présentées des symptômes d'infection dans les 20 jours suivant l'inoculation. La présence du résidu acide aspartique permettant l'interaction entre les deux protéines s'est donc avéré essentielle. Les résultats obtenus *in vivo* ont démontré l'importance de l'interaction entre le facteur eIF(iso)4E et la protéine VPg-Pro dans le succès de l'infection virale (Léonard *et al.*, 2000).

L'interaction entre les protéines VPg-Pro et eIF(iso)4E obtenue par Wittmann *et al.* (1997) s'est aussi avérée positive entre la protéine VPg-Pro et les isomères eIF4E d'*A. thaliana* et eIF(iso)4E de *Triticum aestivum* (blé ; Léonard *et al.*, 2000). L'expérience a aussi été répétée avec la protéine NIa du TEV. La protéine a été utilisée comme appât dans le système du double hybride afin de cribler une banque d'ADNc de *Lycopersicon esculentum* (tomate). Parmi les 26 clones positifs sélectionnés, 11 correspondaient au facteur eIF4E. D'autres essais ont également démontré que la protéine NIa du TEV interagissait avec le facteur eIF4E de *N. tabacum* (Schaad *et al.*, 2000).

2.2 Le complexe eIF4F et la traduction des ARNm

2.2.1 Initiation de la traduction des ARNm

La protéine eIF(iso)4E identifiée lors du criblage réalisé par Wittmann *et al.* (1997) fait partie du complexe eIF4F. Lors de l'initiation de la traduction, ce complexe assure le recrutement des ribosomes sur les ARNm cellulaires (figure 4). Le complexe eIF4F fait partie intégrante du processus d'initiation de la traduction qui est très bien régulé par la cellule (Gingras *et al.*, 1999). Dans la littérature, ce processus est souvent divisé en trois étapes majeures.

La première étape de l'initiation de la traduction consiste à la liaison de la méthionine de départ (Met-tRNA_i^{Met}) à la petite sous-unité ribosomale de 40S. Pour ce faire, un complexe est formé en présence du facteur eIF2 et d'une molécule de GTP. Une structure ternaire stable est alors formée avec la méthionine de départ. À cette structure, se joignent les facteurs eIF3, eIF1, eIF1A et la sous-unité ribosomale de 40S pour former le complexe de pré-initiation de 43S (Dever, 2002). Le facteur eIF3, constitué de onze sous-unités, aurait pour rôle de lier la sous-unité ribosomale de 40S. Cette liaison permettrait de stabiliser l'assemblage du complexe ternaire avec la petite sous-unité ribosomale. eIF3 serait assisté par le facteur eIF1A dont la fonction est de catalyser le transfert du complexe ternaire à la sous-unité ribosomale de 40S (Gallie, 2002).

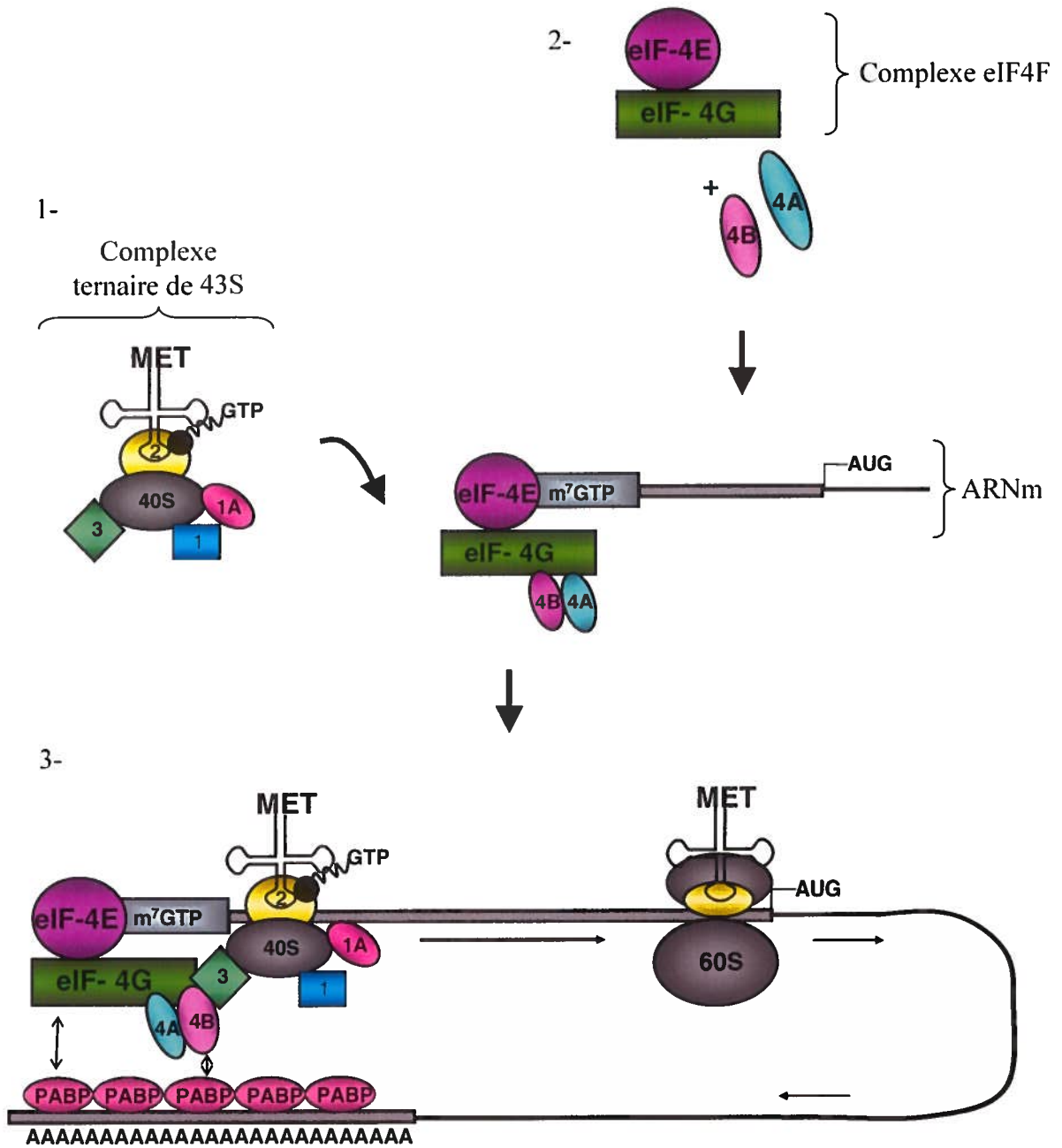
La deuxième étape de l'initiation de la traduction correspond à la liaison du complexe de pré-initiation de 43S à l'ARNm afin de former le complexe de 48S. (Dever, 2002). La liaison serait favorisée par la présence de la protéine eIF3 et des facteurs du complexe eIF4F. Ce complexe est constitué des facteurs eIF4E, eIF4G, chez les végétaux, et du facteur eIF4A, chez les animaux. Le facteur eIF4E a pour fonction spécifique de lier la coiffe m⁷GpppN (où N représente un nucléotide quelconque) des ARNm (Gallie, 2002). Ce facteur eIF4E posséderait également un domaine de liaison avec l'extrémité N-terminale du facteur eIF4G et un second domaine de liaison avec la boîte DEAD de l'hélicase eIF4A. Le facteur eIF4A, en collaboration avec le facteur eIF4B, faciliterait la liaison de la sous-unité ribosomale de 40S à l'ARNm en assurant le déroulement des

structures secondaires. eIF4G posséderait quant à lui un domaine de liaison au facteur eIF3 (Dever, 2002). Le complexe eIF4F en association avec la protéine eIF3 assurerait donc la liaison du complexe de pré-initiation de 43S avec l'extrémité 5' des ARNm. Une fois lié à l'extrémité 5', le complexe de 43S, associé à sa cohorte de facteurs, effectuerait un balayage de l'ARNm, en direction 5' → 3', jusqu'à la rencontre d'un codon d'initiation AUG localisé dans un contexte favorable (Gingras *et al.*, 1999).

La liaison de la grosse sous-unité ribosomale 60S au complexe 43S-ARNm constitue la troisième étape de l'initiation de la traduction (Dever, 2002). À cette étape, les facteurs d'initiation seraient largués par l'intermédiaire du facteur eIF5, une protéine activatrice de la fonction GTPase. Celle-ci permettrait l'hydrolyse de la molécule de GTP associée à la protéine eIF2 (Gingras *et al.*, 1999). La dissociation des facteurs d'initiation de la traduction favoriserait la liaison de la sous-unité ribosomale de 60S à la méthionine de départ, Met-tRNA_i^{Met}, positionnée sur le site P de la petite sous-unité ribosomale. L'élongation du polypeptide pourrait ensuite être initiée (Dever, 2002).

Figure 4 : Représentation schématique de l'initiation de la traduction des ARNm chez les végétaux.

1- Formation du complexe ternaire de pré-initiation de la traduction de 43S. 2- Assemblage du complexe eIF4F et chargement de ce complexe sur l'ARNm. 3- Balayage, en direction 5' → 3', du complexe ternaire jusqu'au codon de départ AUG et liaison de la sous-unité ribosomale de 60S à la petite sous-unité ribosomale de 40S. L'ARNm traduit est illustré par un trait noir. Le trait gris représente les séquences d'ARNm non-traduites (NTR). Les flèches à double sens représentent les interactions entre les protéines PABP, eIF4G et eIF4B. Légende : 1 : eIF1, 1A : eIF1A, 3 : eIF3, 2 : eIF2, 40S : petite sous-unité ribosomale de 40S, 60S : grosse sous-unité ribosomale de 60S, MET : méthionine de départ (Met-tRNA_i), m⁷GTP : 7-méthyl guanine (coiffe), PABP : «poly-(A) binding protein». Inspiré de Gallie (2002).



2.2.2 Isoformes eIF4F

Une grande différence entre le processus de traduction des plantes et celui des autres eucaryotes, réside dans la structure et la fonction du complexe eIF4F. Chez les mammifères, le complexe eIF4F est composé de trois sous-unités : les facteurs eIF4E, eIF4G et eIF4A. Chez le blé cependant, le complexe eIF4F ne renferme que deux sous-unités : les facteurs eIF4E et eIF4G (Browning, 1996). De plus, contrairement aux mammifères, chez les végétaux supérieurs il existe deux isomères du complexe eIF4F nommés complexes eIF4F et eIF(iso)4F (Rodriguez *et al.*, 1998). Chacune des deux protéines formant ce complexe, les facteurs eIF4E et eIF4G, possède donc une forme isomérique (Gingras *et al.*, 1999). Aucune forme isomérique du facteur eIF4A n'a toutefois été identifiée chez les végétaux même s'il existe une grande famille de protéines nommées «eIF4A-like» présentant les activités d'hélicases à ARN et d'ATPase dépendante de l'ARN caractéristiques du facteur eIF4A (Aubourg *et al.*, 1999).

Les complexes eIF(iso)4F et eIF4F possèdent les mêmes propriétés fonctionnelles : le complexe eIF(iso)4F peut être substitué au complexe eIF4F dans un système de traduction *in vitro* déficient en complexe eIF4F (Browning, 1996). Les fonctions respectives des deux isomères à savoir s'ils permettent la traduction d'ARNm spécifiques ou s'ils sont mis à profit dans des situations particulières est discuté à la section 4.1.

2.2.3 Facteur eIF4E

2.2.3.1 Généralités

À l'intérieur du complexe eIF4F, le facteur eIF4E assure spécifiquement la reconnaissance de la coiffe des ARNm ce qui permet le recrutement d'autres facteurs nécessaires à l'initiation de la traduction (Gingras *et al.*, 1999). Chez *A. thaliana*, les deux isoformes du facteur eIF4E, les facteurs eIF4E et eIF(iso)4E, possèdent une identité de séquences en acides aminés de 52%. Chacune d'elles possède environ 70% d'identité en acides aminés avec leur équivalent respectif chez le blé (Rodriguez *et al.*, 1998).

Un troisième isomère, le facteur nCBP pour «novel Cap Binding Protein», qui possède les propriétés de liaison à la coiffe similaires à celle des isomères eIF4E a par ailleurs été identifié chez *A. thaliana*. La séquence en acides aminés de cet isomère diffère de façon significative de celle des deux autres isoformes. Sa fonction biologique n'est toutefois pas encore bien définie (Ruud *et al.*, 1998).

2.2.3.2 Régulation de l'activité post-traductionnelle des facteurs eIF4E

Dans la plupart des circonstances, l'étape limitante de l'initiation de la traduction correspond à la liaison du complexe de pré-initiation de 43S à l'ARNm qui est facilité par la présence du complexe eIF4F. Cette étape est une cible importante du contrôle de la traduction des ARNm cellulaires (Gingras *et al.*, 1999). Le facteur eIF4E, sous-unité du complexe eIF4F, est d'ailleurs une protéine clé dans l'initiation de la traduction. Comme ce facteur est présent en faible quantité en comparaison avec les autres facteurs d'initiation de la traduction il pourrait servir de cible intéressante pour la régulation de la traduction (Sonenberg et Gingras, 1998). Chez les animaux, le facteur eIF4E peut être régulé au niveau transcriptionnel, par phosphorylation ou par liaison à des protéines inhibitrices (Gingras *et al.*, 1999).

L'état de phosphorylation du facteur eIF4E dans les cellules animales est fortement corrélé avec la synthèse protéique. La phosphorylation du facteur eIF4E augmente le taux de traduction des ARNm et la croissance cellulaire. Elle est favorisée par la présence d'hormones, de facteurs mitogènes ou de facteurs de croissance. La déphosphorylation du facteur eIF4E est favorisée lors d'infections virales ou de stress cellulaires thermiques ce qui provoque l'inhibition de la synthèse de protéines cellulaires (Rodriguez *et al.*, 1998). Un tel processus de régulation n'a pas encore été déterminé chez les plantes (Ruud *et al.*, 1998). Cependant, une multitude d'isoformes des facteurs eIF4E et eIF(iso)4E chez le blé ont été détectées sur gel à deux dimensions ce qui laisse entrevoir qu'un mécanisme de phosphorylation pourrait affecter ces isomères. Les sites de phosphorylation et les effets d'une éventuelle phosphorylation sur la synthèse des protéines végétales demeurent toutefois inconnus (Browning, 1996).

Chez les animaux, le facteur eIF4E est ciblé par la protéine 4E-BP («eIF4E-binding protein»). Selon l'état de phosphorylation de cette dernière, la protéine 4E-BP module la capacité du facteur eIF4E à se lier à la coiffe des ARNm. En se liant avec le facteur eIF4E, la protéine 4E-BP inhibe l'interaction du facteur eIF4E avec le facteur eIF4G ce qui prévient la formation du complexe eIF4F. Chez les animaux, la phosphorylation de la protéine 4E-BP se fait au niveau de certains résidus sérines et thréonines par l'intermédiaire de plusieurs stimuli extracellulaires tels que les hormones, les facteurs de croissance, les facteurs mitogènes et les cytokinines. La protéine 4E-BP hypophosphorylée lie efficacement le facteur eIF4E tandis que la forme phosphorylée ne permet pas cette liaison (Gingras *et al.*, 1999). Par ailleurs, il existerait au moins trois formes isomériques de la protéine 4E-BP chez les mammifères (Poulin *et al.*, 1998). Aucun équivalent de la protéine 4E-BP n'a été déterminé chez les végétaux. Chez la levure cependant, une protéine nommée Caf20p, possédant une fonction analogue à la protéine 4E-BP, a été clonée. Elle ne partage aucune homologie avec les diverses protéines 4E-BP identifiées jusqu'à présent à l'exception d'une séquence conservée au niveau du site de liaison au facteur eIF4E (Gingras *et al.*, 1999). Pour le moment, il n'existe aucune information sur les mécanismes de régulation de l'activité des isomères eIF4E chez les plantes (Dinkova, *et al.*, 2000).

2.2.3.3 Implication des facteurs eIF4E dans les cancers

Le facteur eIF4E est impliqué dans le contrôle de la croissance cellulaire (Rousseau *et al.*, 1996). Diverses expériences ont par ailleurs montré l'importance de la régulation de son activité et son rôle clé dans la croissance cellulaire. Premièrement, la surexpression du facteur eIF4E murin dans des lignées cellulaires de souris (NIH3T3) a provoqué des transformations oncogéniques. La surexpression de ce facteur a aussi dramatiquement amplifié la morphologie néoplasique de cellules humaines HeLa. Deuxièmement, l'inhibition de la fonction du facteur eIF4E par l'expression de transcrits d'ARNm antisenses ou de la protéine inhibitrice 4E-BP a ralenti la croissance cellulaire. Elle a aussi fait revenir au phénotype «normal» des cellules malignes, transformées avec l'oncogène *ras*. Troisièmement, l'expression du facteur eIF4E devient constitutive, c'est-à-dire indépendante de la présence des facteurs de croissance extracellulaires, dans des cultures de cellules tumorales. Enfin, un certain nombre d'oncogènes, *ras*, *src*, *abl* et *myc*, augmentent le niveau et/ou l'activité du facteur eIF4E. Toutes ces observations laissent entrevoir que l'accroissement du niveau et/ou de l'activité du facteur eIF4E pourrait constituer un élément clé de l'action des oncogènes menant ainsi à des transformations néoplasiques (Rosenwald *et al.*, 1999 ; Berkel *et al.*, 2001).

Le facteur eIF4E serait effectivement impliqué dans le développement de certaines formes de tumeurs solides, notamment au niveau des cancers du colon, du sein, de la tête, du cou et de la vessie (Berkel *et al.*, 2001). Le rôle du facteur eIF4E dans la carcinogenèse serait d'augmenter de façon général la synthèse protéique et préférentiellement, d'augmenter la synthèse d'un ensemble de protéines favorisant la croissance cellulaire (Rosenwald *et al.*, 1999).

2.2.4 Facteurs eIF4G

Le facteur eIF4G, en plus du facteur eIF4E, fait partie intégrante du complexe eIF4F dont il a été question précédemment. Les plantes, les animaux et les levures possèdent deux isomères du facteur eIF4G. Chez le blé, les isomères, eIF4G et eIF(iso)4G, possèdent 30% d'identité et leur poids moléculaire respectif est de 165kDa et 86kDa (Browning, 1996). Les isoformes eIF4G chez les plantes et les mammifères possèdent une activité biochimique similaire. Les sites de liaison aux facteurs d'initiation de la traduction eIF4E, eIF4A, eIF3, de la «poly(A)-binding protein» (PABP) et à un domaine de reconnaissance de l'ARN ont été retrouvés dans la séquence des deux isoformes. Ces sites de liaison sont conservés pour l'ensemble des facteurs eIF4G étudiés. Chez les mammifères seulement, un site de liaison à la «MAP-kinase-integrating kinase-1» (MNK1) a, en plus, été localisé à l'extrémité C-terminale de la protéine. Il s'agit d'une kinase spécifique au facteur eIF4E (Gingras *et al.*, 1999 ; Gallie et Browning, 2001).

2.2.5 Conformation circulaire du complexe d'initiation de la traduction

2.2.5.1 Interactions impliquées

L'efficacité de l'initiation de la traduction des ARNm ne serait pas uniquement le résultat des interactions entre le facteur eIF4F, le complexe de pré-initiation de 43S et les ribosomes. En effet, des études ont montré que la coiffe et la queue de poly(A) des ARNm agiraient d'une manière coopérative afin de réguler la traduction (Bi et Goss, 2000). D'autres études ont mis en évidence que l'effet coopératif était relié à une interaction directe entre le facteur eIF4G et la «poly(A)-binding protein» (PABP ; figure 5 ; Gingras *et al.*, 1999).

Une multitude de protéines PABP enrobent la queue de poly(A) des ARNm. Ainsi, d'un côté, une interaction simultanée du facteur eIF4G avec les protéines PABP, et de l'autre, une interaction du facteur eIF4G avec le facteur de liaison à la coiffe eIF4E, assurerait le rapprochement des deux extrémités de l'ARNm (Belostotky, 2003). D'autres

protéines entreraient aussi en jeu afin de «solidifier» la liaison entre les protéines eIF4G et PABP pour faciliter la traduction des ARNm. Le facteur eIF4G, par sa nature modulaire, jouerait le rôle de protéine échafaud, pour assurer un lien entre toutes ces protéines. En plus de ses interactions avec les protéines eIF4E et PABP, le facteur eIF4G possède deux domaines d'interaction permettant la liaison aux facteurs eIF4A et eIF3 (Le *et al.*, 2000 ; Gallie et Browning, 2001). À son tour, le facteur eIF3 peut se lier au facteur eIF4B (Browning *et al.*, 2001) alors que le facteur eIF4B possède un domaine de liaison à la protéine PABP (Bushell *et al.*, 2001).

Deux conséquences fonctionnelles résultant de ces diverses interactions ont été observées. D'abord, il semblerait que, de façon individuelle, la présence des protéines eIF(iso)4G et eIF4B accroisse l'activité de liaison de la protéine PABP à la queue de poly(A). La présence simultanée de ces deux protéines aurait, en plus, un effet synergétique sur l'activité de liaison de la protéine PABP. Par ailleurs, l'interaction de la protéine PABP avec le facteur eIF4G (ou eIF(iso)4G) assurerait une stabilisation mutuelle des protéines eIF4E (ou eIF(iso)4E) et PABP sur leur site de liaison respectif (Gallie, 2002).

L'interaction entre les protéines PABP et eIF4G (ou eIF(iso)4G) est importante dans l'initiation de la traduction. La conformation circulaire des ARNm en processus de traduction a même été visualisée par microscopie de force atomique. En effet, le complexe de protéines recombinantes eIF4E-eIF4G-Paip1 permettrait la jonction des extrémités 5' et 3' des ARNm coiffés et polyadénylés. Chez les mammifères, la protéine de régulation nommée Paip1 («PABP-interacting protein 1») présente une forte affinité pour la protéine PABP (Wells *et al.*, 1998). Aucun homologue de la protéine Paip1 n'a encore été trouvé chez les plantes. La fonction de la protéine PABP et les interactions moléculaires entre les protéines PABP, eIF4G et eIF4B seraient cependant hautement conservées chez les plantes et les animaux (Gallie, 2002).

Enfin, l'interaction entre les protéines PABP et eIF4G, en favorisant une conformation circulaire des ARNm, permettrait un meilleur alignement des ribosomes sur

l'extrémité 5'. À la fin de la synthèse du polypeptide, la conformation circulaire aurait aussi pour avantage de permettre aux ribosomes d'être dissociés puis recrutés plus efficacement par l'extrémité 5' afin d'initier un nouveau cycle de traduction (Sonenberg et Dever, 2003).

2.2.5.2 Protéine PABP

La protéine PABP possède un rôle important dans l'initiation de la synthèse protéique en facilitant le rapprochement des extrémités 5' et 3' des ARNm. Cette protéine serait également impliquée dans deux autres processus post-transcriptionnels : la biogenèse des ARNm et leur recyclage cellulaire (Belostotsky, 2003).

La protéine PABP est conservée d'un point de vue phylogénétique. (Sonenberg et Dever, 2003). La structure primaire des gènes *PABP* s'est avérée très similaire d'un organisme à l'autre. Cette structure comprend quatre motifs de reconnaissance de l'ARN (RBDs), localisés à l'extrémité N-terminale de la protéine et un autre domaine, de fonction inconnue, localisé dans la partie C-terminale de la protéine (Palanivelu *et al.*, 2000a).

Une protéine PABP nécessite un minimum de 12 résidus adénosine afin de se lier à la queue de poly(A) des ARNm. Chez les mammifères un ARNm typique accommoderait environ 6 protéines PABP. La liaison de plusieurs molécules de PABP à l'ARN a soulevé la possibilité que la protéine puisse interagir avec elle-même. Chez *Xenopus* il a effectivement été montré que la protéine PABP pouvait former des homodimères grâce à la présence d'un domaine d'interaction localisé en C-terminal des quatre domaines RBDs. Par ailleurs, chez les plantes, plusieurs espèces de PABP différemment phosphorylées ont été détectées. Il semblerait que l'état de phosphorylation de la protéine détermine son affinité et son type de liaison à la queue de poly(A) (Gallie, 2002).

La plupart des organismes eucaryotes étudiés possèdent seulement un à trois gènes *PABP* fonctionnels. Chez *A. thaliana* cependant, huit gènes *PABP* ont été observés. Du point de vue transcriptionnel, tous les gènes *PABP* sont actifs chez cette espèce. Les membres de cette famille présentent toutefois une divergence de séquence inhabituellement élevée pour une même espèce. Ils ont d'ailleurs été regroupés en trois classes différentes selon l'analyse de leur séquence en acides aminés, le nombre et la disposition de leurs introns ainsi que le patron d'expression des gènes. La première classe comprend les gènes *PABP*₂, *PABP*₄, *PABP*₈, hautement exprimés dans l'ensemble des tissus de la plante. Les gènes *PABP*₃ et *PABP*₅, de la seconde classe, sont spécifiquement exprimés dans les tissus reproducteurs. Les gènes de la troisième classe, *PABP*₆ et *PABP*₇, sont faiblement exprimés et/ou restreints à un petit sous-ensemble de cellules. Le gène *PABP*₁ serait quant à lui un gène orphelin dont l'expression est très faible et restreinte. Chacune des trois classes de gènes de la famille des gènes *PABP* chez *A. thaliana* pourrait avoir une fonction spécifique. Tous les gènes *PABP* seraient aussi potentiellement fonctionnels. Au moins trois d'entre eux, *PABP*₂, *PABP*₃, *PABP*₅, ont d'ailleurs la capacité de compléter un mutant nul pour le gène *pab1* chez *S. cerevisiae* (la levure ne possède qu'un seul gène *PABP*, soit *pab1* [Palanivelu *et al.*, 2000a]). Enfin, une fonction redondante des huit protéines de la famille des gènes *PABP* ne peut être exclue (Belostotsky, 2003).

2.3 Facteurs de l'initiation de la traduction ciblés par les virus

La traduction des ARNm eucaryotiques est un processus qui implique un grand nombre de protéines interagissant de façon régulée. Les virus détournent régulièrement ce système à leur avantage (Lamphear *et al.*, 1995) car la compétition pour les ressources cellulaires est importante (Gale *et al.*, 2000). Les virus ont la capacité de modifier les exigences métaboliques de l'hôte par l'intermédiaire d'une régulation négative de l'expression des gènes cellulaires, phénomène portant le nom de «shutoff» (Aranda et Maule, 1998).

Certains virus ont ciblé le processus de régulation du facteur eIF4E afin de faciliter la sélection de la traduction de leurs ARN viraux. Un résidu sérine du facteur eIF4E, une fois phosphorylé, a un effet stimulant sur la traduction. La phosphorylation du résidu sérine augmente l'affinité du facteur pour la coiffe des ARNm. Le taux de phosphorylation de ce résidu est toutefois grandement réduit lors des infections virales causées par les *Adénovirus* et le virus de l'influenza. La réduction de la phosphorylation du facteur eIF4E a pour conséquence de réduire le niveau de traduction des ARNm, tandis que peu ou aucun effet n'est observé en ce qui concerne les niveaux de traduction des ARN viraux. Le mécanisme de réduction de la traduction des ARNm suite à une infection causée par ces virus n'est pas encore éclairci. Chez le virus de l'influenza, il se pourrait toutefois que la longue séquence 5'-NTR («Non-Translated Region»), qui dirige la traduction du virus, soit moins sensible que les ARNm cellulaires à la réduction de la disponibilité du complexe eIF4F, et de l'activité hélicase associée, imposées par la déphosphorylation du facteur eIF4E (Gale *et al.*, 2000).

Une régulation virale du facteur eIF4E est aussi faite par l'intermédiaire de l'activité de la protéine 4E-BP. L'interaction entre cette protéine et le facteur eIF4E empêche la formation du complexe eIF4F. L'activité de la protéine est régulée par phosphorylation. Le PV et le virus de l'encéphalomyocardite (EMCV) auraient la capacité d'inhiber le processus de phosphorylation de la protéine 4E-BP, ce qui empêcherait ensuite la dissociation du complexe inhibiteur eIF4E - 4E-BP. L'inhibition

de la phosphorylation de la protéine 4E-BP serait susceptible d'expliquer l'interruption pratiquement complète de la traduction des ARNm cellulaires en faveur de la traduction des ARN viraux lors des infections causées par les picornavirus (Gale *et al.*, 2000 ; Bushell et Sarnow, 2002).

En plus de l'inhibition de la phosphorylation de la protéine 4E-BP, le phénomène de «shutoff» de l'expression des gènes cellulaires observé lors des infections aux picornavirus pourrait aussi s'expliquer par le clivage de la protéine eIF4G. Chez le PV, le clivage de ce facteur est effectué par la protéase 2A. Deux fragments sont produits : le premier renferme le domaine de liaison au facteur eIF4E et à la protéine PAPB et le second, les domaines de liaison aux facteurs eIF3 et eIF4A. Il semblerait que seul le second segment soit nécessaire à la traduction de type indépendante de la coiffe du PV (Lamphear *et al.*, 1995). Le clivage du facteur eIF4G préviendrait la formation d'un complexe eIF4F fonctionnel perturbant ainsi une étape cruciale de l'initiation de la traduction de type dépendante de la coiffe des ARNm cellulaires (Gale *et al.*, 2000). Cette conclusion a toutefois été remise en cause par Ali *et al.* (2001).

D'autres études ont permis de déterminer que le PV et le *Coxsackievirus* clivaient la protéine PABP sur quatre sites distincts à l'aide des protéases virales 2A et, de façon moins importante chez le poliovirus, à l'aide de la protéase 3C (Gale *et al.*, 2000 ; Bushell et Sarnow, 2002). Chez le PV et le *Coxsackievirus*, le clivage de la protéine PABP a entraîné une diminution drastique de l'activité traductionnelle cellulaire, *in vitro* et *in vivo*. Le dérèglement du fonctionnement de la protéine PABP par ces virus pourrait conduire à l'altération de la stabilité des ARNm et/ou à la réduction du taux général ou de l'efficacité de la traduction dépendante de la coiffe des ARNm cellulaires. La contribution du clivage de la protéine PABP au «shutoff» de l'expression des protéines cellulaires en comparaison avec celui résultant du clivage du facteur eIF4G n'a toutefois pas encore été analysé (Gale *et al.*, 2000).

2.4 Les facteurs eIF4E et la résistance végétale aux virus

Les végétaux et leurs pathogènes ont évolué en parallèle de sorte que des changements dans la virulence des pathogènes semblent continuellement balancés par des changements de la résistance de leurs hôtes (Agrios, 1997 : 127). Tel que présenté à la section 1.6.9, chez les *Potyvirus*, la partie centrale de la protéine VPg est fréquemment un déterminant pathogénique permettant de contourner la résistance génétique d'un cultivar donné. Par ailleurs, chez les végétaux, il existe plusieurs exemples d'utilisation de gènes de résistance récessive pour contrer les infections causées par les *Potyvirus* (Nicaise *et al.*, 2003). Dans certains de ces cas, il s'est avéré que les gènes de résistance récessive des plantes hôtes étaient liés aux isoformes eIF4E ou eIF(iso)4E.

Ce type de résistance est répertorié chez *Capsicum annuum* (piment). Divers cultivars de cette espèce sont résistants ou susceptibles à certaines souches du *Potato virus Y* (PVY). Les cultivars ont été analysés par RFLP et un locus nommé *pvr2* a été identifié chez les cultivars résistants. Une ségrégation identique entre le gène de résistance *pvr2* et le gène *eIF4E* a été obtenue. La séquence du gène *eIF4E* chez deux cultivars résistants présentait une différence au niveau de deux acides aminés en comparaison à celle des cultivars susceptibles au PVY. L'importance de cette mutation dans la résistance de l'hôte a été démontrée par transfection transitoire. Un réplicon viral du PVY, construit de façon à pouvoir exprimer la séquence du gène *eIF4E* provenant des cultivars susceptibles, a été utilisé pour inoculer des cultivars normalement résistants à l'infection au PVY. Suite à l'inoculation avec le réplicon viral modifié, les cultivars résistants ont présentés des symptômes d'infection. Sachant que le facteur eIF4E et la protéine potyvirale VPg interagissaient entre eux, il a été suggéré que la résistance s'expliquait par une incompatibilité de l'interaction entre la protéine VPg et le facteur eIF4E chez les génotypes résistants (Ruffel *et al.*, 2002).

L'ADNc des gènes *eIF4E* et *eIF(iso)4E* de divers cultivars de *Lactuca sativa* (laitue), renfermant ou non les gènes de résistance récessive *mol¹* et *mol²*, a été directement cloné et séquencé. Aucune différence de séquences n'a été observée pour les

gènes *eIF(iso)4E* étudiés. L'analyse des ADNc codant pour le gène *eIF4E* a cependant montré l'existence de trois types alléliques, dont la variation de séquence correspondait, pour deux d'entre eux, à des mutations spécifiques (*Ls-eIF4E¹*, *Ls-eIF4E²*) ou, pour le troisième, à une courte délétion en phase (*Ls-eIF4E⁰*). Une corrélation a ensuite été démontrée entre ces trois allèles et la résistance des cultivars de laitue à l'infection au *Lettuce mosaic virus* (LMV). Il y avait une stricte corrélation entre l'allèle *Ls-eIF4E¹* et le locus de résistance *mol¹*, l'allèle *Ls-eIF4E²* et le locus *mol²*, alors que tous les cultivars susceptibles exprimaient l'allèle *Ls-eIF4E⁰*. Cette corrélation connue, l'importance de l'interaction entre le LMV et le facteur eIF4E, exprimé dans les cultivars résistants, a été montrée. Les résultats obtenus ont d'abord montré que l'expression ectopique transitoire du gène *Ls-eIF4E⁰* dans un cultivar renfermant le gène de résistance *mol¹* permettait de restaurer l'accumulation systémique d'un clone infectieux du LMV. Et de façon similaire aux résultats obtenus par Ruffel *et al.* (2002), un clone infectieux du LMV, recombinant pour l'expression du gène *Ls-eIF4E⁰*, a produit des symptômes dans des cultivars de *L. sativa* renfermant les gènes *mol¹* et *mol²*. Ces résultats ainsi qu'une cartographie génétique fine a permis de conclure que les locus de résistance *mol¹* et *mol²* étaient des allèles correspondant à des formes différentes de la protéine eIF4E incapable d'assurer une interaction appropriée avec le LMV (Nicaise *et al.*, 2003).

Un résultat similaire a été obtenu chez une lignée de cultivars d'*A. thaliana*. Dans cette lignée nommée *AteIF(iso)4E-1*, l'insertion d'un transposon dans le gène correspondant à la forme isomérique *eIF(iso)4E* a complètement inhibé l'expression de l'ARNm et la production de la protéine eIF(iso)4E. Le phénotype et la fertilité des plantes de cette lignée étaient cependant similaires aux plantes sauvages. L'analyse des polysomes extraient de jeunes plantes de la lignée modifiée a toutefois montré que l'ARNm codant pour l'isomère eIF4E était traduit à un niveau plus élevé. Des plantes de la lignée *AteIF(iso)4E-1* ont ensuite été inoculées avec les potyvirus TuMV et TEV. Aucun symptôme d'infection n'a été observé chez les plantes de la lignée mutante tandis qu'ils étaient présents chez les plantes sauvages. L'inactivation du gène *eIF(iso)4E* des plantes de la lignée *AteIF(iso)4E-1* n'a fourni aucune protection contre une infection causée par des souches virales appartenant au genre népovirus. Les résultats obtenus

laissent entrevoir que la protéine eIF(iso)4E est spécifiquement recrutée lors du cycle de réplication de ces potyvirus (Duprat *et al.*, 2002).

Enfin, une autre approche expérimentale a exploité le pouvoir mutagène de l'éthyle méthanesulfonate (EMS) sur près de 14 000 plants d'*A. thaliana*. La progéniture, c'est-à-dire la génération M2 issue des plantes mères mutées, ont été inoculés avec le TuMV et le TEV. Certaines plantes mutantes se sont avérées résistantes aux infections. Celles-ci ont été auto-polinisées afin de produire la génération de mutants fertiles, M3. Dans ce cas également, il s'est avéré que le locus de résistance *LSP1* des plantes mutantes M3 correspondait au gène *eIF(iso)4E* (Lellis *et al.*, 2002).

Les deux isoformes eIF4E seraient donc impliquées dans les diverses résistances contre les *Potyvirus* : eIF(iso)4E dans le cas des résistances au TEV et au TuMV dans des cultivars d'*A. thaliana* (Duprat *et al.*, 2002 ; Lellis *et al.*, 2002), et eIF4E dans le cas de la résistance au PVY chez *C. annuum* (Ruffel *et al.*, 2002) ainsi que pour la résistance au LMV chez *L. sativa* (Nicaise *et al.*, 2003). L'interaction entre les isoformes eIF4E et les *Potyvirus* semble donc conservée même si celle-ci n'est pas comprise de façon précise (Nicaise *et al.*, 2003).

3 Hypothèse et objectifs de travail

3.1 Hypothèse

Les virus ne possèdent pas tout le bagage nécessaire pour assurer leur propre réplication. Il est donc nécessaire qu'ils soient compétitifs par rapport aux ARNm cellulaires afin de soutenir efficacement leur réplication et leur traduction (Bushell et Sarnow, 2002). Pour y arriver, les virus détournent à leur avantage certains processus cellulaires tels que la traduction des ARNm. Chez les végétaux, cette prise en charge cellulaire et son impact sur la synthèse protéique de la cellule n'a pas été étudiée autant que chez les animaux (Aranda et Maule, 1998). Une avancée importante a toutefois été réalisée par la découverte de l'interaction la protéine VPg du TuMV et du facteur d'initiation de la traduction eIF(iso)4E. Cette interaction s'est avérée essentielle au succès de l'infection du virus (Léonard *et al.*, 2000).

La présente recherche a pour but de mieux comprendre l'implication de la protéine VPg du TuMV en relation avec les facteurs d'initiation de la traduction, particulièrement avec les facteurs eIF4E, provenant de la plante *B. perviridis*. Plus précisément, elle a pour objectif de vérifier l'hypothèse selon laquelle la protéine virale VPg-Pro puisse servir de point d'ancrage à un complexe de protéines cellulaires et virales qui permettrait la traduction et la réplication de l'ARN génomique du TuMV selon une conformation circulaire.

Une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires de prise en charge de la cellule hôte lors d'une infection au TuMV permettrait de mettre en place des moyens de lutte contre les infections causées par les *Potyvirus*. Celles-ci pourraient alors être plus efficaces et plus respectueuses de l'environnement. Il pourrait être envisagé de créer des cultivars dont certains gènes, codant pour des facteurs d'initiation de la traduction, seraient légèrement modifiés de façon à empêcher une interaction fonctionnelle avec la protéine VPg des potyvirus. La modification inhiberait l'infection virale sans pour autant avoir de conséquences négatives sur la croissance de l'hôte.

3.2 Objectifs

Le premier objectif de l'étude consiste à évaluer l'expression des isomères de eIF4E à la suite de l'infection de plantes de *B. perviridis* au TuMV. Une seconde série d'expérimentations aura pour but de séparer les membranes d'un surnageant de feuilles de *B. perviridis* saines ou infectées au TuMV sur gradient de sucrose. Les diverses fractions récoltées seront caractérisées par immunobuvardages afin de déterminer le type de membranes cellulaires ainsi que les protéines virales et cellulaires présentes dans chacune d'elles. Enfin, le dernier objectif consiste à purifier les formes précurseuses 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro *in planta* par chromatographie d'affinité au nickel à partir des fractions issues des gradients de sucrose. Cette purification permettra de vérifier une éventuelle co-purification de protéines végétales et virales avec les formes précurseuses de VPg.

Chapitre 2

Matériel et méthodes

2.1 Inoculation de plantes de *B. perviridis* avec le TuMV

Des graines de *B. perviridis* (Lawn & Garden) ont été déposées et légèrement enfoncées dans de la terre noire humidifiée (Pro-mix BX, Premier Tech). Les plantes âgées de trois semaines et ayant au moins trois feuilles ont été placées à la noirceur pendant 16 heures avant l'inoculation. L'inoculum a été préparé en broyant dans l'azote liquide des feuilles de *B. perviridis* infectées au TuMV et présentant des symptômes d'infection. Pour chaque gramme de feuilles en poudre obtenu, 1,2ml de tampon d'inoculation [tampon phosphate de potassium 0,5 M à pH 7.5, 10 mM EDTA et 0,1% (v/v) d'acide thioglycolique] a été ajouté. Une fois la solution d'inoculum homogénéisée, deux feuilles par plantes ont été infectées à l'aide de carborundum, un agent abrasif, et de 15µl d'inoculum. Après 15 minutes, les feuilles ont été rincées à l'eau distillée pour éliminer les résidus de carborundum. Les plantes témoins ont subi le même traitement : l'inoculum a toutefois été remplacé par 15µl de tampon d'inoculation sans ajout de feuilles broyées. Une fois inocuées, les plantes ont été placées en chambre de croissance pendant 10 jours, à raison de 16 heures d'éclairage par jour (fluorescents Agrosun : Hydrofarm Gardening Products) et à une température d'environ 21°C. Les jeunes feuilles développées à proximité des feuilles inocuées et présentant des symptômes de mosaïques et/ou de déformations foliaires ont ensuite été récoltées et conservées à -80°C. Les feuilles des plantes témoins ont été récoltées de façon similaire.

2.2 Séparation des membranes cellulaires sur gradient de sucrose

2g de feuilles de *B. perviridis* saines ou infectées au TuMV ont été broyées dans l'azote liquide jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Cette poudre a été suspendue dans 6ml de tampon d'homogénéisation [50mM Tris-Cl à pH 8.0, 10mM KCl, 1mM EDTA, 0,3% Dextran de poids moléculaires variés (Nutritional Biochemicals Corp.), 0,1% BSA

(Albumin, fraction V : Boehinger Mannheim), 10mM DTT, 3mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, sucrose 13% et 1 pastille de «Protease Cocktail Inhibitors» (Roche) par 10ml de tampon, ajouté au moment de l'emploi]. Le mélange de feuilles broyées a ensuite été réduit en particules plus fines à l'aide d'un «Potter», pendant 10 minutes. L'homogénat obtenu a été filtré sur une pièce de gaze à fromage de 4,5 cm² et le filtrat a été centrifugé pendant 10 minutes à 3700g. Le surnageant issu de cette centrifugation a été centrifugé à nouveau, à la même vitesse. 2,5ml du surnageant récupéré a été déposé sur un gradient de sucrose linéaire de 20% à 45% préparé dans le tampon d'homogénéisation sans sucrose. Le gradient linéaire a été obtenu en déposant délicatement 4,5ml de la solution de sucrose à 20% sur un volume identique de la solution de sucrose à 45%. Le tube à ultracentrifugation (Beckman Ultra-Clear Centrifuge Tube) renfermant les deux phases a été placé lentement à l'horizontal pendant 1 heure et, suite à la diffusion des deux phases, retourné à la verticale. L'ultracentrifugation a été faite à 111 132g dans un rotor Beckman SW41 Ti, pendant 3 heures (freins hors-fonction). 13 fractions de 880µl ont ensuite été récoltées à l'aide d'une seringue de type «Vacutainer» (Precision Glide[®] : 21G 1^{1/2}). La partie inférieure du tube à ultracentrifugation a été perforée par la seringue qui était reliée à son tour à une pompe péristaltique (BioRad). Les fractions récoltées ont été immédiatement aliquotées et conservées à -80°C. La préparation des gradients a été effectuée à 4°C.

Des gradients ont été préparés en absence de $MgCl_2$ dans le cadre des expériences permettant vérifier l'intégrité de l'association ribosomale aux membranes du RE. Le $MgCl_2$ a donc été éliminé des tampons d'homogénéisation dans ces cas précis. La méthodologie demeure cependant identique à celle utilisée pour les gradients réalisés avec $MgCl_2$.

2.3 Purification *in planta* de 6K₂-VPg-Pro et de VPg-Pro

L'analyse des 13 fractions issues d'un gradient de sucrose a été effectuée par SDS-Page et par immunobuvardages. Les 5 fractions contenant les plus fortes concentrations des formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro ont été mélangées entre

elles. 300mM de KCl et 0,5% de Tween-20 ont été ajoutés au mélange. Ce dernier a ensuite été incubé pendant 1 heure, à 4°C, sous légère agitation, avec 400µl de résine d'agarose couplée à l'acide nickel-nitrilotriacétique (Qiagen) pré-conditionnée dans le tampon A [50mM Tris-Cl à pH8.0, 300mM KCl, 0,5% Tween-20, 10mM β-mercaptoéthanol]. La résine a été montée sur colonne et lavée avec 15 volumes de colonne (Vc) de tampon A. Des mesures de densité optique à 280nm ont été prises en fin de lavage afin de s'assurer qu'elle avoisinait 0. L'élution finale a été faite avec l'équivalent de 5 volumes de colonne (Vc) de tampon B [tampon phosphate 50mM à pH6.0 contenant 300mM KCl, 10% glycérol, 0,5% de Tween-20, 10mM de β-mercaptoéthanol et 130mM d'imidazol] et l'éluât a été récupéré en 10 fractions de 200µl auxquelles ont été immédiatement ajoutés 5mM de DTT. Un aliquot de chaque fraction a ensuite été analysé par SDS-Page.

2.4 Immunobuvardages

Les échantillons ont été dilués 1:4 dans un tampon de chargement Laemli [62,5mM Tris-HCl à pH6.8, 10% glycérol, 2% (p/v) SDS, 0,0125% (p/v) de bleu de bromophénol et 750mM de β-mercaptoéthanol] puis bouillis pendant 7 minutes. Sauf indications détaillées dans les figures de la partie résultats (chapitre 3), 2,5µl d'échantillons ont été déposés dans les puits de gels d'acrylamide 12% contenant 0,1% de SDS. L'électrophorèse a été réalisée à 200V selon la méthodologie décrite par Laemli (1970).

Le transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose (BioRad) a ensuite été effectué à 100V pendant 1 heure dans un tampon approprié selon la procédure décrite par Sambrook et Russell (2000). À la suite du transfert, la membrane de nitrocellulose a été séchée 15 minutes à l'air ambiant puis submergée 15 autres minutes dans une solution contenant 10% de glycérol. Après une incubation de 16 heures, à 4°C, dans une solution de blocage [5% lait écrémé et 0,2% Tween-20 dans du PBS 1X constitué de 137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄ et 2mM KH₂PO₄ à pH7.4], la membrane a été incubée, pendant 3 heures à 4°C, dans la solution de blocage contenant l'anticorps

primaire dilué de façon appropriée (tableau 1). La membrane a ensuite été lavée à deux reprises, pendant 15 minutes, dans la solution de lavage [PBS, 0,2% Tween-20] à raison de 4 ml de solution de lavage par cm^2 de membrane. La membrane a été incubée pendant 1 heure dans la solution de blocage contenant une dilution appropriée de l'anticorps secondaire (tableau 1). La membrane a été lavée 4 fois pendant 15 minutes dans la solution de lavage. La trousse de révélation de chemiluminescence ECL (Amersham Biosciences) a ensuite été utilisée selon les spécifications du fabricant pour la révélation des immunoréactions. L'émission lumineuse a été capturée en exposant les membranes, insérées dans des feuilles protectrices de type Mica (Gemex), à des films Kodak Biomax (Amersham Biosciences) sur une période variant de 30 secondes à 16 heures selon l'intensité du signal produit. Le développement des films a été assuré par un appareil AFP imaging (modèle Mini-med/90) selon les spécifications du fabricant.

Anticorps primaires	Organisme d'origine	Dilution des anticorps primaire	Dilution des anticorps secondaires anti-IgG de lapin (Chemicon International).	Laboratoire producteur
anti-VPg-Pro	TuMV	1 : 2000	1 : 2000	M.G. Fortin
anti-eIF(iso)4E	<i>Arabidopsis. thaliana</i>	1 : 4000	1 : 2000	M.G. Fortin
anti-eIF4G	<i>Triticum aestivum</i>	1 : 2000	1 : 2000	K.S. Browning
anti-PABP ₂	<i>Arabidopsis. thaliana</i>	1 : 4000	1 : 2000	D. Belostotsky
anti-RdRp	TuMV	1 : 6000	1 : 6000	M.G. Fortin
anti-BiP	<i>Nicotiana tabacum</i>	1 : 2000	1 : 2000	A. Vitale
anti-β-Xylosyl	<i>Daucus carota</i>	1 : 50 000	1 : 2000	A. Sturm
anti-PM-H+-ATPase	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>	1 : 2000	1 : 2000	N. Bountry
anti-CI	TuMV	1 : 2000	1 : 8000	M.G. Fortin
anti-CP	TuMV	1 : 2000	1 : 4000	M.G. Fortin

Tableau 1 : Noms et dilutions appropriées des sérums utilisés dans les immunobuvardages.

2.5 Extraction d'ARN

L'ARN total a été extrait des feuilles de *B. perviridis* saines ou infectées au TuMV à l'aide de la trousse *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen) selon les spécifications du fabricant. L'ARN a été visualisé sur gel d'agarose 1% préparé avec le tampon TBE [89mM Tris, 89mM acide borique et 2mM EDTA à pH8.3] et 0,05µg/ml de bromure d'éthidium. Tout le matériel nécessaire à la préparation du gel ainsi que l'appareillage à électrophorèse ont été lavés à l'eau déionisée puis rincés avec une solution contenant 0,1M de NaOH et 1mM de EDTA. Les échantillons ont été dilués 1: 5 dans le tampon de chargement sans RNase [glycérol 5%, bleu de bromophénol 0,04% et xylène cyanol 0,04% dans de l'eau déionisée traitée au DEPC]. 12µl de chaque échantillon ont été chargés par puit. 1µg de standard de poids moléculaire d'ARN (0,24-9,5Kb : Invitrogen) dilué dans le tampon de chargement d'ARN a également été chargé sur le gel. L'électrophorèse a été réalisée à 50V.

2.6 Northern blot

2.6.1 Préparation de la sonde liée à l'isotope radioactif α -P³²

L'extraction du plasmide pUC19-35S-TuMV a été faite à l'aide de la trousse MidiPreps (Qiagen) selon les spécifications du fabricant. 5µg d'ADN plasmidique a ensuite été digéré grâce aux enzymes de restriction *SpeI* et *ClaI*, pendant 2 heures, à 37°C. La migration de l'ADN plasmidique a été réalisée sur gel d'agarose 1% préparé dans du tampon TAE modifié [40mM Tris-acétate, 0,1mM Na₂EDTA à pH8.0]. Une bande de 1,5kb, correspondant à la RdRp du TuMV, a été extraite du gel et le fragment plasmidique a été débarrassé de l'agarose résiduel avec la trousse *DNA Gel Extraction Kit* (Millipore) selon les instructions de la compagnie. Afin d'éliminer les sels de la précédente extraction, la suspension a ensuite été passée sur un filtre *Amicon® Microcon-PCR Centrifuged Filter Devices* (Millipore) toujours selon les spécifications de la compagnie.

100ng d'ADN correspondant à la RdRp virale ont été étiquetés par incorporation aléatoire de dCTP marqué avec l'isotope radioactif α -P³² à l'aide de la trousse *Ready-To-Go DNA Labelling Beads* (Amersham Pharmacia Biotech) en fonction des spécifications de la compagnie. Le fragment d'ADN a été dénaturé à la chaleur pendant 5min, déposé sur glace pendant 2min puis mélangé avec 50 μ Ci de α -P³²-dCTP (5 μ l à 3000Ci/mmol) (Amersham Biosciences) ainsi qu'avec les autres ingrédients fournis par la trousse. Le tout a été incubé environ 2 heures à 37°C.

2.6.2 Séparation de l'ARN total et transfert sur membrane

L'eau déionisée utilisée dans la préparation du gel d'agarose a subi un traitement au DEPC. La séparation de l'ARN et le transfert sur membrane de nylon (Amersham) ont été réalisés selon la procédure décrite par Sambrook et Russell (2000) avec certaines modifications. L'ARN extrait des fractions de sucrose a été séparé sur gel d'agarose 1% préparé dans un tampon MOPS [20mM MOPS, 5mM acétate de sodium, 2mM EDTA à pH7.0] contenant 2% de formaldéhyde. 10 μ l d'échantillons ont été dilués 1 : 2 dans le tampon de chargement d'ARN [250 μ l formamide déionisée à 100%, 83 μ l formaldéhyde à 37%, 50 μ l MOPS 10X, 50 μ l bromure d'éthidium à 1mg/ml et 67 μ l d'eau déionisée] puis chauffés à 65°C, pendant 10min. L'ARN dénaturé a ensuite été placé sur glace quelques minutes et les échantillons ont été chargés sur le gel d'agarose. L'électrophorèse s'est effectuée dans le tampon MOPS 1X contenant 2% de formaldéhyde, pendant 4 heures, à 50V.

À la fin de l'électrophorèse, le gel a été rincé brièvement dans de l'eau déionisée. Le formaldéhyde susceptible d'inhiber le transfert a été éliminé par lavage dans 10 volumes de tampon SSC 20X [3M NaCl et 300mM citrate de sodium à pH7.0] pour un volume de gel, à deux reprises, pendant 15 minutes. Le gel a ensuite été inséré dans le montage permettant le transfert d'ARN par capillarité pour une période de 16 heures. Une fois le transfert terminé, la membrane de nylon a été lavée pendant 5 minutes dans environ 30ml de tampon SSC 6X [tampon 20X SSC dilué 3,3 fois dans de l'eau déionisée

sans RNase] puis, séchée à l'air quelques minutes. L'ARN a finalement été fixée sur la membrane de nylon par exposition aux rayons UV, pendant 3 minutes.

2.6.3 Hybridation de la sonde

La membrane de nylon a été incubée à 65°C pendant 1 heure dans 10ml de tampon de pré-hybridation [5X SSC, 5X réactif Denhart's et 20µg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé à la chaleur]. La sonde radioactive a ensuite été dénaturée à 95°C pendant 5 minutes et mise sur glace quelques minutes avant d'être ajoutée à la membrane en pré-hybridation. L'incubation a duré 12 heures, à 65°C. La membrane a ensuite été lavée à deux reprises, pendant 5 minutes, à température pièce, dans un tampon de lavage [2X SSC, 0,1% SDS]. Un autre tampon de lavage [1X SSC, 0,1% SDS], chauffé à 65°C, a été utilisé pour laver la membrane à deux reprises pendant 15 minutes, à 65°C. Une fois les lavages terminés, l'émission radioactive de la sonde a été capturée en exposant les membranes sur film X-Ray (X-Omat Blue X-B1, Kodak) pendant 16 heures.

Chapitre 3

Résultats

3.1 Expression des isomères eIF4E chez *B. perviridis* après infection au TuMV

Le facteur eIF4E lie la coiffe des ARN messagers et contribue à l'initiation de la traduction chez les eucaryotes. Deux isomères de ce facteur, eIF4E et eIF(iso)4E, ont été caractérisés chez *A. thaliana* (Browning, 1996). Il a été démontré que l'interaction de la protéine VPg du TuMV avec l'isomère eIF(iso)4E était essentielle au succès de l'infection du virus (Léonard *et al.*, 2000). L'impact d'une infection au TuMV sur l'expression des isomères eIF4E a donc été étudié chez *B. perviridis*.

3.1.1 Symptômes des plantes infectées au TuMV

Des plantes de *B. perviridis* âgées de trois semaines infectées manuellement avec un inoculum du TuMV ont présenté des symptômes d'infection environ 10 à 11 jours après l'inoculation. Le succès de l'inoculation a d'ailleurs été confirmé par immunobuvardage à l'aide d'un sérum anti-CP du TuMV (résultats non illustrés). Chez *B. perviridis*, l'infection virale a induit la production de mosaïques (figure 5A), zones vert pâle en alternance avec des zones vert foncé, et des malformations foliaires, surface des feuilles ondulée et marges parfois recourbées (figure 5B). Les plantes infectées présentaient des retards de croissance par rapport aux plantes saines. Ces dernières avaient des feuilles plus grandes et une croissance vigoureuse (figure 5C).



Figure 5 : Plantes de *B. perviridis* infectées au TuMV.

A) Feuille présentant un symptôme de mosaïque B) Plante présentant des symptômes d'infection 20 jours suivant l'inoculation au TuMV C) Plante saine.

3.1.2 Expression des isomères eIF4E

Dix jours après l'inoculation, les feuilles de *B. perviridis* saines ou infectées au TuMV ont été broyées et débarrassées de leur débris grossiers puis suspendues dans un tampon d'homogénéisation. Après centrifugation, les protéines issues des surnageants ont été séparées par SDS-Page. Les immunobuvardages ont été réalisés avec un sérum de lapin anti-eIF(iso)4E produit contre la protéine recombinante eIF(iso)4E d'*A. thaliana*.

Les isomères eIF(iso)4E et eIF4E d'*A. thaliana* ont des poids moléculaires de 22,5kDa et de 26,5kDa respectivement (Rodriguez *et al.*, 1998). Malgré le fait que les poids moléculaires des isomères eIF(iso)4E et eIF4E de *B. perviridis* ne soient pas connus, il est fort probable qu'ils soient similaires à ceux présents chez *A. thaliana* car les deux végétaux sont de la même famille. Les formes recombinantes purifiées eIF(iso)4E^{T7Tag} et eIF4E^{T7Tag} d'*A. thaliana* ont été séparées par SDS-Page. Elles ont migrées selon les poids moléculaires attendus mentionnés ci-dessus (figure 6 : puits 1 et 2).

Dans les extraits de feuilles de *B. perviridis* saines et infectées au TuMV, une protéine de poids moléculaire équivalent à celui de la protéine recombinante eIF(iso)4E^{T7Tag} a été détectée par le sérum (figure 6, puits 3 et 4). Il s'agit de l'isomère eIF(iso)4E de *B. perviridis*. D'autres expériences ont montré que cet isomère possédait une affinité pour la coiffe m⁷GTP. La protéine native eIF(iso)4E de *B. perviridis* a effectivement été retenue sur résine m⁷GTP-Sépharose®4B (Pharmacia Biotech) lors d'un essai de chromatographie d'affinité (résultats non illustrés).

Dans l'extrait de feuilles de *B. perviridis* infectées au TuMV, une seconde protéine a été détectée. Il s'agit de l'isomère eIF4E : ce dernier a un poids moléculaire identique à celui de la protéine recombinante eIF4E^{T7Tag} (figure 6, puits 4). Seul l'isomère eIF4E a été détecté dans l'extrait de plantes saines tandis que les deux isomères, eIF4E et eIF(iso)4E, ont été détectés dans l'extrait de feuilles infectées au TuMV. L'infection causée par le TuMV aurait donc modifié le patron d'expression des isomères eIF4E chez *B. perviridis* en induisant l'expression du facteur eIF4E uniquement chez les plantes infectées.

Les séquences en acides aminés des isomères eIF4E et eIF(iso)4E d'*A. thaliana* sont hautement similaires, c'est-à-dire 52% d'identité (Rodriguez *et al.*, 1998). Cette similarité est suffisante pour permettre au sérum anti-eIF(iso)4E d'*A. thaliana* de détecter l'isomère eIF4E de la même espèce. La similarité entre les isomères d'*A. thaliana* et ceux de *B. perviridis* est également assez importante pour que le sérum permette leur détection chez *B. perviridis*. Une réaction croisée a aussi été observée entre un sérum de lapin dirigé contre la protéine recombinante eIF(iso)4E de blé et les deux isomères eIF4E d'*A. thaliana* (Ruud *et al.*, 1998).

Une bande de protéines de nature inconnue a par ailleurs été détectée par le sérum anti-eIF(iso)4E. Une fine bande, de poids moléculaire inférieur à celui de l'isomère eIF(iso)4E, est visible principalement dans le surnageant de feuilles infectées au TuMV (figure 6, puits 3 et 4). Sa concentration est très variable d'un extrait de feuilles à l'autre. Ses propriétés n'ont pas été étudiées davantage. Il pourrait s'agir des isomères eIF4E

dégradés ou clivés ou encore d'un nouvel isomère eIF4E. Chez *A. thaliana*, il existe un troisième isomère ayant certaines propriétés similaires à celles des isomères eIF4E. Il porte le nom de nCBP et a un poids moléculaire de 25,75kDa (Ruud *et al.*, 1998). Un immunobuvardage a montré que le sérum anti-eIF(iso)4E d' *A. thaliana* ne présentait aucune réaction croisée avec la protéine recombinante nCBP d' *A. thaliana* (résultats non illustrés). Il semble donc moins probable que la protéine de nature inconnue corresponde à un homologue de nCBP retrouvé chez *B. perviridis* (voir discussion page 101).

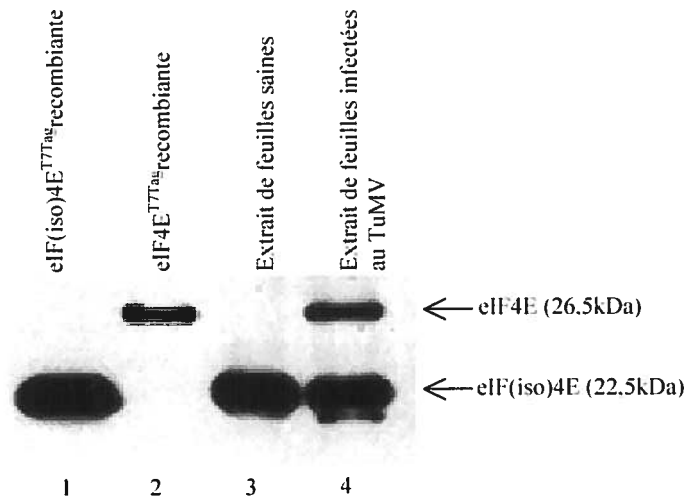


Figure 6 : Expression des isomères eIF4E après inoculation de plantes de *B. perviridis* au TuMV.

L'immunobuvardage a été fait à l'aide d'un sérum anti-eIF(iso)4E d' *A. thaliana*. La position de la migration des isoformes eIF4E et eIF(iso)4E, dont les poids moléculaires respectifs sont de 26,5kDa et de 22,5kDa, est indiquée par les flèches à droite de la figure. Puits 1 : protéine recombinante eIF(iso)4E^{T7tag} d' *A. thaliana*. Puits 2 : protéine recombinante eIF4E^{T7tag} d' *A. thaliana*. Puits 3 : 5µl d'extrait de feuilles de *B. perviridis* saines. Puits 4 : 5µl d'extrait de feuilles de *B. perviridis* infectées au TuMV.

3.2 Localisation membranaire de 6K₂-VPg-Pro/VPg-Pro et d'autres protéines virales et cellulaires

La séparation des membranes cellulaires de feuilles de *B. perviridis* infectées au TuMV sur gradient de sucrose a été entreprise afin de caractériser la ou les formes précurseurs de la VPg susceptibles d'être localisées dans les fractions membranaires contenant le facteur eIF4E. La localisation membranaire d'autres protéines susceptibles d'intervenir dans le cycle d'infection du TuMV telles que les facteurs eIF4G, la protéine PABP₂ ainsi que protéine virale la RdRp a aussi été étudiée.

3.2.1 Caractérisation des membranes séparées sur gradient de sucrose

Avant d'entreprendre la localisation membranaire de 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro et des autres protéines virales et végétales, les divers types de membranes cellulaires distribuées le long du gradient de sucrose ont été caractérisées. Les membranes cellulaires étudiées sont celles du RE, de l'appareil de Golgi et de la membrane plasmique. Des sérums de lapin produit contre des protéines marqueurs spécifiques à ces membranes ont été utilisés en immunobuvardage. Cette caractérisation a permis de vérifier le type de membranes avec lequel les protéines précurseurs de VPg pouvaient être co-localisées.

BiP : marqueur du reticulum endoplasmique

BiP, «Binding Protein», est une protéine chaperone de la famille HSP70 et est localisée dans la lumière du RE (Boston *et al.*, 1996 ; Gething, 1999). Elle a pour fonction de replier adéquatement les protéines nouvellement synthétisées (Li *et al.*, 1993). Cette protéine constitue un bon marqueur du RE (Staelin, 1997). La caractérisation des fractions membranaires susceptibles de contenir cette protéine a été réalisée par immunobuvardage à l'aide de l'anticorps anti-BiP de *Nicotiana tabacum*.

La protéine BiP de *N. tabacum* possède un poids moléculaire de 78kDa (Pedrazzini *et al.*, 1997). Une protéine de poids moléculaire équivalent a été détectée chez

B. perviridis (figure 7, A et B). Deux pics de concentration de la protéine BiP ont été obtenus après séparation des fractions membranaires sur gradient de sucrose réalisé avec 3mM de $MgCl_2$ (figure 7A). Un premier pic a été localisé dans les fractions 1 à 4 ce qui laisse supposer qu'elles renferment une plus forte concentration de membranes du RE. Le second pic a été localisé dans les fractions 11 et 12. La détection de ces deux pics a déjà été observé par d'autres laboratoires (Han et Sanfaçon, 2003 ; Schaad *et al.*, 1997a). Aucune explication n'a cependant été suggérée pour la présence de la forte concentration de BiP dans ces fractions légères. BiP est fixée à la face interne de la membrane du RE par des protéines intermédiaires (Gething, 1999). La destruction des parois cellulaires végétales et des membranes cellulaires a pu favoriser un largage de la protéine lors de la préparation des surnageants de feuilles de *B. perviridis*. Le pic de concentration des fractions 11 et 12 pourrait donc correspondre à des protéines BiP libres, c'est-à-dire sans liaison à des membranes du RE.

Les fractions membranaires ont aussi été caractérisées par l'ajout ou l'élimination de chlorure de magnésium aux tampons de préparation des feuilles et des gradients. Il a été démontré que la présence de $MgCl_2$ permettait de conserver l'intégrité de l'association des ribosomes sur le RE. Dans des études de traduction *in vitro* à partir de cellules de foie de rats, l'ajout de EDTA à la préparation a conduit à la dissociation des ribosomes des membranes du RE. L'association pouvait cependant être conservée par l'ajout d'une concentration appropriée de cations Mg^{++} (Lord *et al.*, 1973). À l'aide d'une séparation sur gradient de sucrose, il est possible de voir les changements de la distribution du RE d'une préparation cellulaire par l'ajout ou l'élimination de $MgCl_2$. L'absence de magnésium fait déplacer les fractions correspondant au RE vers une densité à l'équilibre plus faible tandis que les ribosomes, de densité plus élevée, demeurent dans les fractions lourdes (Lord *et al.*, 1973, Wienecker *et al.*, 1982). Une éventuelle modification de la distribution des fractions membranaires correspondant au RE, à l'aide de la protéine marqueur BiP, a été vérifiée à l'aide de gradients de sucrose faits en absence ou avec 3mM $MgCl_2$

En présence de 3mM de $MgCl_2$, les fractions 1 à 4 contiennent une plus forte concentration de la protéine BiP (figure 7A). Dans le cas du gradient préparé sans $MgCl_2$ (figure 7B), les fractions lourdes renfermant la plus forte concentration de la protéine BiP ont été retrouvées dans les fractions 3, 4 et 5. Le pic de concentration de la protéine a donc subi un déplacement général de deux fractions vers le haut. La comparaison des figures 7A et 7B suggère fortement que les fractions 1 à 4 du gradient de sucrose préparé en présence de 3mM de $MgCl_2$ renferment des membranes du RE en association avec les ribosomes. Dans le cas du gradient préparé sans $MgCl_2$, le déplacement du pic de la protéine BiP vers les fractions légères suggère que le RE de ces fractions se soit dissocié des ribosomes : les membranes du RE, dissociées des ribosomes, aurait donc migré selon une densité à l'équilibre plus faible. Par ailleurs, un second pic de concentration élevée de la protéine BiP été retrouvé dans les fractions 10, 11 et 12 du gradient préparé sans $MgCl_2$ (figure 7B). Son origine n'a pas été élucidée. Tel que suggéré précédemment, il pourrait s'agir de protéines BiP libres, sans liaison avec le RE.

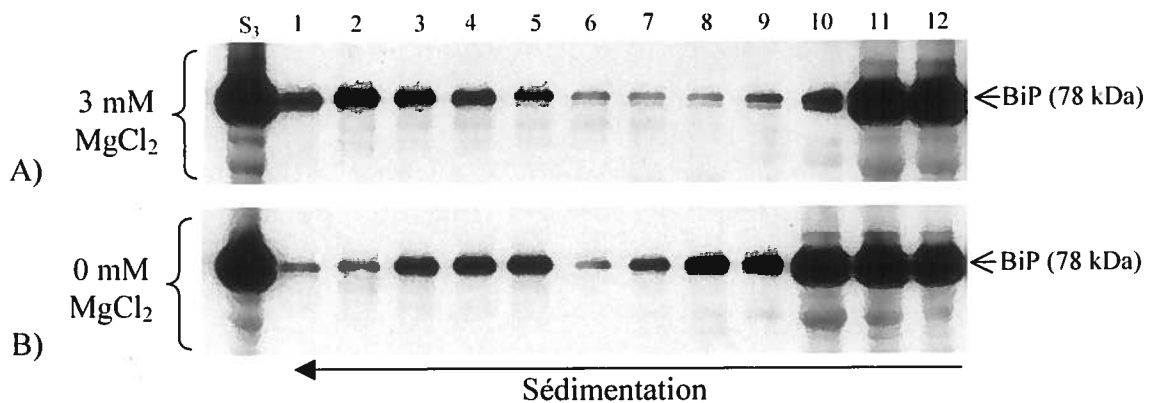


Figure 7 : Détection de la protéine BiP après séparation des membranes cellulaires par ultracentrifugation sur gradient de sucrose.

Les immunobuvardages ont été faits avec un sérum anti-BiP de *N. tabacum*. La position de la migration de la protéine BiP dont le poids moléculaire est de 78kDa est indiquée par la flèche à droite de la figure. A) Le surnageant (S₃) de feuilles de *B. perviridis* infectées au TuMV et le gradient de sucrose ont été préparés dans un tampon d'homogénéisation contenant 3mM de $MgCl_2$ ou B) 0mM de $MgCl_2$. La direction de la sédimentation est indiquée par le sens de la longue flèche.

β -xylosyl : marqueur de l'appareil de Golgi

L'appareil de Golgi des cellules végétales assure le traitement des glycoprotéines et la synthèse du complexe de polysaccharides nécessaires à la construction de la matrice de la paroi cellulaire. Les glycoprotéines acheminées vers l'appareil de Golgi sont exposées à une batterie de glycosidases et de glycotransférases. Ces enzymes transforment les chaînes latérales d'oligosaccharides de façon spécifique. Certaines glycoprotéines subissent la modification xylose β ,1 \rightarrow 2mannose. Ce patron de glycolysation est caractéristique des glycoprotéines présentes au niveau *median* et en mouvement dans le réseau *trans* de l'appareil de Golgi (Zhang et Staehelin, 1992).

La caractérisation des fractions contenant les membranes de l'appareil de Golgi a été réalisée l'aide d'un sérum dirigé contre un complexe de glycanes, plus précisément contre les glycoprotéines présentant les modifications xylose β ,1 \rightarrow 2mannose chez *Daucus carota* (Laurière *et al.*, 1989). Les diverses protéines portant les modifications xylose β ,1 \rightarrow 2mannose sont présentes dans les fractions 11 et 12 (figure 8A). Leur poids moléculaire varie entre 20 et 110kDa environ. Les fractions 11 et 12 seraient donc riches en membranes correspondant à l'appareil de Golgi *median* et *trans*. Ces fractions sont bien résolues des fractions 1 à 4 renfermant le RE rugueux (RER).

Pompe H⁺-ATPase : marqueur de la membrane plasmique

Les pompes H⁺-ATPase jouent le rôle de transporteur primaire en pompant les protons à l'extérieur de la cellule, créant ainsi une différence de pH et de potentiel électrique à travers la membrane plasmique (Michelet et Boutry, 1995). Chez les plantes, les pompes à protons à ATPase de la membrane plasmique (PMA) forment une large famille multigénique. Chez *Nicotiana plumbaginifolia*, neuf gènes *PMA* ont été isolés. Quatre de ces gènes ont été abondamment caractérisés et classifiés dans deux sous-familles de gènes en fonction de leur homologie. Ils sont exprimés dans la plupart des organes de la plante (De Kerchove d'Exaerde *et al.*, 1995).

Un sérum dirigé contre la protéine PMA2 (Plasma Membrane H⁺-ATPase 2) de *Nicotina plumbaginifolia* a été utilisé afin de caractériser les fractions contenant des membranes plasmiques. Le sérum utilisé a été préparé contre un peptide synthétique spécifique uniquement à cette isoforme (De Kerchove d'Exaerde *et al.*, 1995).

Chez *N. plumbaginifolia* le poids moléculaire de la protéine PMA2 est de 49kDa (De Kerchove d'Exaerde *et al.*, 1995). Une protéine de poids moléculaire identique a été retrouvée dans le surnageant de feuilles de *B. perviridis* (figure 8B). La protéine est principalement retrouvée dans les fractions 10, 11 et 12. Ces fractions membranaires correspondant à la membrane plasmique seraient donc bien différenciées des fractions 1 à 4 renfermant le RER.

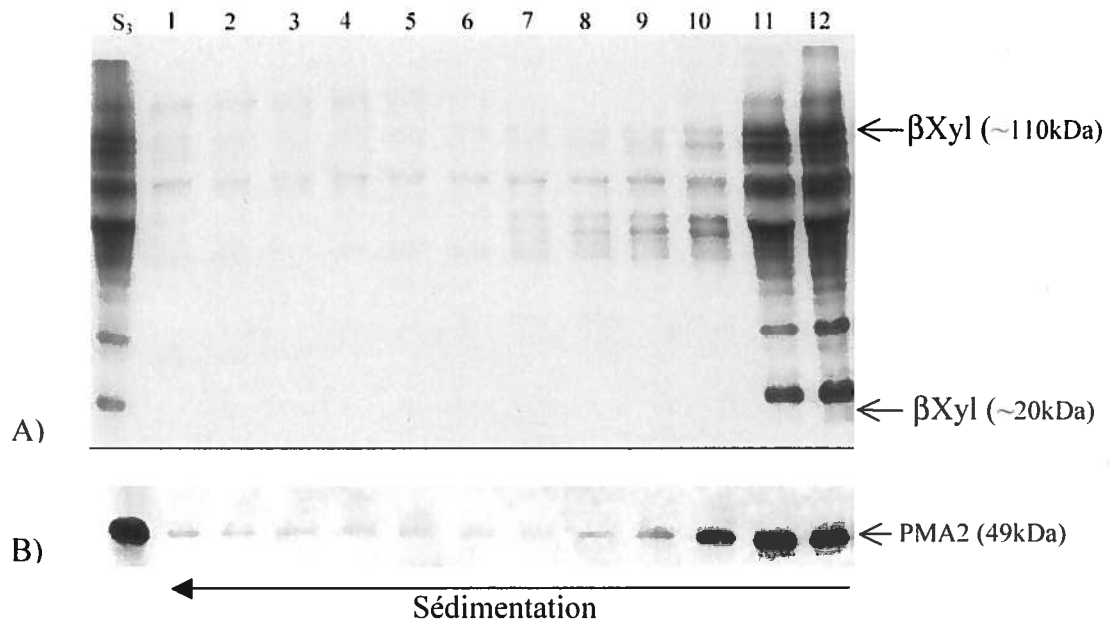


Figure 8 : Détection des protéines présentant les modifications xylose β ,1 \rightarrow 2mannose et de la protéine PMA2 après séparation des membranes cellulaires par ultracentrifugation sur gradient de sucrose.

A) L'immunobuvardage a été fait avec le sérum anti- β Xyl de *D. carota*. La position de la migration des glycoprotéines de divers poids moléculaires (de 20kDa à 110kDa) présentant les modifications xylose β ,1 \rightarrow 2mannose est indiquée par les flèches à droite des figures. B) L'immunobuvardage a été fait avec le sérum anti-PMA2 de *N. plumbaginifolia*. La position de la migration de la protéine PMA2 dont le poids moléculaire est de 49kDa est indiquée par la flèche à droite de la figure. La direction de la sédimentation est indiquée par le sens de la longue flèche.

3.2.2 Localisation membranaire de 6K₂-VPg-Pro/VPg-Pro, des isomères eIF4E et des protéines PABP₂ et RdRp.

6K₂-VPg-Pro/VPg-Pro

La séparation d'un surnageant de feuilles de *B. perviridis* infectées au TuMV sur gradient de sucrose a été faite afin de caractériser la distribution de la ou des formes précurseurs de la protéine VPg. Le sérum utilisé dans les immunobuvardages a été produit contre la protéine recombinante VPg-Pro du TuMV (Ménard *et al.*, 1995).

Dans le surnageant (S₃) obtenu à partir des feuilles infectées au TuMV, un ensemble de protéines précurseurs de VPg a été détecté par le sérum (figure 9, A et B). Ces protéines ont le poids moléculaire attendu des formes 6K₂-VPg-Pro, VPg-Pro et Pro et/ou 6K₂-VPg dont les poids moléculaires respectifs sont de 55kDa, 49kDa, 27kDa et 28kDa. Les formes recombinantes de ces protéines ont été exprimées chez *E. coli* (Ménard *et al.*, 1995). Après séparation par SDS-Page, leur poids moléculaire a été comparé à celui des protéines retrouvées dans le surnageant de feuilles infectées au TuMV. Le poids moléculaire de chaque protéine recombinante s'est avéré similaire à celui de son équivalent respectif détecté *in planta* chez *B. perviridis*. Aucune forme précurseur ou mature de la protéine VPg n'a par ailleurs été révélée dans le surnageant de feuilles de *B. perviridis* saines (résultats non illustrés).

La distribution des protéines précurseurs de VPg présentes dans le surnageant de feuilles infectées au TuMV, a été analysée après ultracentrifugation sur gradient sucrose préparé avec 3mM de MgCl₂. Les protéines 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro ont été détectées en plus forte concentration dans les fractions lourdes 1 et 2 (figure 9A). La distribution de ces protéines a aussi été analysée dans un gradient préparé sans MgCl₂. Tel que mentionné précédemment, l'absence de MgCl₂ favorise la dissociation des ribosomes du RE. En absence de MgCl₂, les formes 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro ont été détectées en plus forte concentration au niveau des fractions 3, 4 et 5 (figure 9B). Ces formes précurseurs ont donc subi un déplacement général de deux fractions vers le haut du gradient. Leur

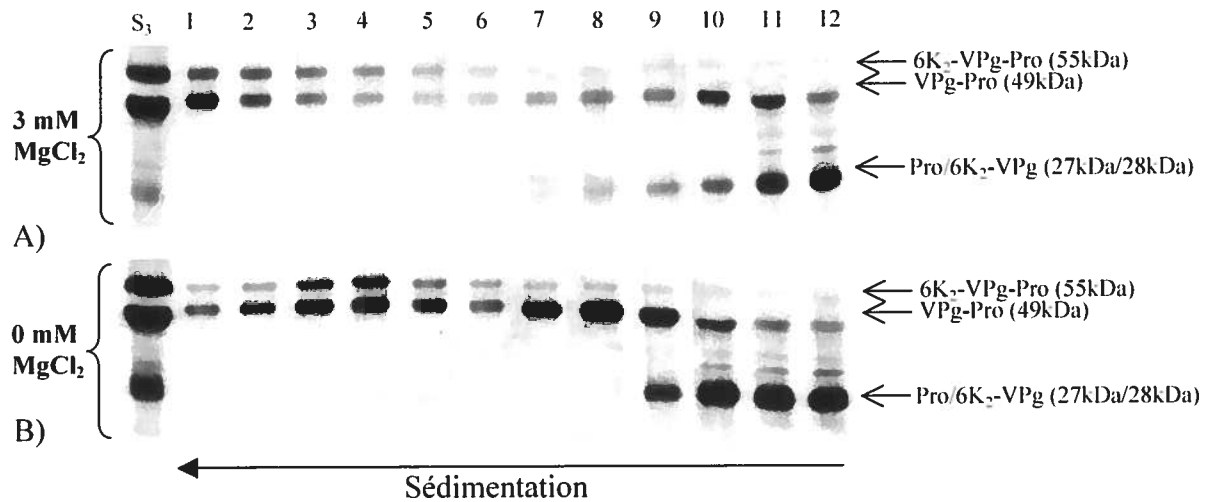


Figure 9 : Détection des formes précurseurs de VPg après séparation des membranes cellulaires par ultracentrifugation sur gradient de sucrose.

Les immunobuvardages ont été faits avec un sérum anti-VPg-Pro du TuMV. La position de la migration des formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro, VPg-Pro et Pro et/ou 6K₂-VPg dont les poids moléculaires respectifs sont de 55kDa, 49kDa, 27kDa et 28kDa sont indiquée par les flèches à droite des figures. (A) Le surnageant de feuilles de *B. perviridis* (S₃) infectées au TuMV et le gradient de sucrose ont été préparés dans un tampon d'homogénéisation contenant 3mM de MgCl₂ ou (B) dans un tampon d'homogénéisation préparé sans MgCl₂. La direction de la sédimentation est indiquée par le sens de la longue flèche.

déplacement vers les fractions légères suggère qu'elles aient été séparées des ribosomes, de densité plus élevée. Les formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro auraient plutôt migré vers une densité à l'équilibre moins élevée et possiblement dans des fractions caractérisées par la présence du RE de façon similaire à ce qui a été observé avec la protéine BiP, protéine marqueuse du RE. Les résultats obtenus supportent la possibilité que les deux formes précurseurs de VPg soient associées aux membranes du RE.

Dans les fractions 9 à 12 uniquement (figure 9, A et B), une protéine de poids moléculaire d'environ 27kDa a été détectée par le sérum anti-VPg-Pro. Il pourrait s'agir du domaine Pro de 27kDa ou encore de la protéine précurseurs 6K₂-VPg de 28kDa. Il est toutefois plus probable qu'il s'agisse de la protéine Pro car la forme précurseur 6K₂-VPg serait davantage susceptible de se retrouver dans les fractions membranaires renfermant le RE. Il est possible que ce soit aussi le cas pour le TuMV car chez le TEV notamment, il a été démontré que la protéine 6K₂ possédait un domaine de liaison à la membrane du RE (Schaad *et al.*, 1997a).

Le poids moléculaire de la protéine VPg mature est de 22kDa. Cette forme n'a cependant pas été détectée dans le surnageant de feuilles de *B. perviridis*. Il est possible que la protéine VPg soit une protéine instable et par conséquent rapidement dégradée lors de la préparation des échantillons. Il est probable aussi que cette protéine ne soit présente qu'en liaison à l'extrémité 5' de l'ARN génomique des virions matures. Dans ce cas, la séparation par électrophorèse d'un volume plus élevé de surnageant de feuilles aurait été nécessaire afin de pouvoir la détecter à l'aide de la présente méthode de chémiluminescence.

Une bande de protéines de poids moléculaire légèrement inférieur à 49kDa a été détectée dans les fractions 10, 11 et 12 (figure 9, A et B). Il s'agirait de la protéine VPg-Pro hydrolysée à son extrémité C-terminale. Chez le TuMV, il a été démontré que l'activité intrinsèque de la protéine recombinante VPg-Pro était responsable de l'hydrolyse de son extrémité C-terminale (Ménard *et al.*, 1995). Chez le TEV, la protéine

Nla-Pro présente également un processus d'autocatalyse à son extrémité C-terminale (Dougherty et Parks, 1991). La signification biologique de cette forme dégradée n'a cependant pas fait l'objet d'une étude plus poussée.

En somme, le surnageant de feuilles de *B. perviridis* contient les formes 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro de 55kDa et de 49kDa respectivement. La bande de protéines détectée selon un poids moléculaire d'environ 27kDa correspond possiblement à la protéine mature Pro et non à la forme précurseure 6K₂-VPg. La séparation du surnageant de feuilles de *B. perviridis* infectées au TuMV sur gradients de sucrose préparés sans MgCl₂ ou avec 3mM de MgCl₂ suggère que les formes 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro seraient associées aux membranes du RE. Enfin, la protéine mature VPg n'a pas été détectée par le sérum anti-VPg-Pro.

Isomères eIF4E/ eIF(iso)4E

Le fractionnement cellulaire de feuilles de *B. perviridis* sur gradient de sucrose a été fait afin de déterminer une éventuelle co-localisation des isomères eIF4E de *B. perviridis* avec les formes précurseures 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro du TuMV. Le sérum de lapin utilisé dans les immunobuvardages a été produit contre la protéine recombinante eIF(iso)4E d'*A. thaliana*.

La protéine recombinante eIF(iso)4E d'*A. thaliana* a été détectée selon le poids moléculaire attendu de 22,5kDa (figure 10A et B, puits C). Une protéine de poids moléculaire identique correspondant à l'isomère eIF(iso)4E de *B. perviridis* a été détecté dans le surnageant de feuilles de *B. perviridis* saines (figure 10A : S₃) et de feuilles infectées au TuMV (figure 10B : S₃). Cet isomère est localisé en forte concentration dans les fractions 1 à 4 des deux types de gradient (figure 10A et B). Une seconde bande de protéines a été détectée par le sérum anti-eIF(iso)4E dans le cas du gradient préparé avec un surnageant de feuilles de *B. perviridis* infectées au TuMV (figure 10B). Cette protéine correspondrait à l'isomère eIF4E car elle a été séparée sur gel d'acrylamide selon un

poids moléculaire identique à celui de la protéine recombinante eIF4E d'*A. thaliana* (voir figure 6). L'isomère eIF4E a été détecté dans les fractions 1 et 2 puis, dans un second pic, au niveau des fractions 5, 6, 7 et 8 du gradient réalisé à partir de feuilles de *B. perviridis* infectées au TuMV (figure 10B). Son expression est toutefois plus faible que celle de son homologue eIF(iso)4E.

La distribution des isomères eIF4E et eIF(iso)4E a également été étudié dans un gradient de sucrose préparé sans ajout de MgCl₂ (résultat non illustré). Aucune variation notable de la distribution des isomères n'a toutefois été observée. Il a déjà été montré que la présence de MgCl₂ préservait l'association ribosomale avec le RE. En absence de MgCl₂, les ribosomes n'étant plus associés aux membranes demeurent dans les fractions lourdes tandis que les membranes du RE, de densité moins élevée, sont déplacées vers les fractions légères (Lord *et al.*, 1973). Il a aussi déjà été démontré que le facteur eIF4E humain était associé avec le complexe ribosomal 43S (Hiremath *et al.*, 1989). Par conséquent, il est probable qu'en absence de MgCl₂, les isomères eIF4E, tout comme les ribosomes qui leurs seraient complexés, n'aient pas subi de déplacement général vers les fractions de densité légère ce qui expliquerait qu'aucune variation de leur distribution n'ait été observée. Cette absence de déplacement ainsi que la localisation des isomères eIF4E dans les gradients appuient la possibilité que les fractions 1 à 5 soient riches en ribosomes.

Enfin, une protéine de nature inconnue d'environ 28kDa a été détectée par le sérum anti-eIF(iso)4E. Étrangement, elle est présente uniquement dans les fractions légères des deux types de gradients (figure 10A et B). L'intensité du signal de cette protéine varie d'une expérience à l'autre. La fonction et la nature de cette protéine n'ont pas fait l'objet d'une étude plus détaillée.

La concentration élevée du facteur eIF(iso)4E dans les fractions 1 à 5 et du facteur eIF4E dans les fractions 1 et 2 laissent entrevoir que ces protéines puissent interagir avec la forme précurseure 6K₂-VPg-Pro retrouvées dans des fractions similaires et également avec la forme VPg-Pro, ce qui avait déjà été démontré *in vitro* (Wittmann *et al.*, 1997 ;

Léonard *et al.*, 2000). De plus, l'absence de déplacement des isomères eIF4E dans le gradient préparé sans $MgCl_2$ laisse entrevoir qu'ils sont liés aux ribosomes.

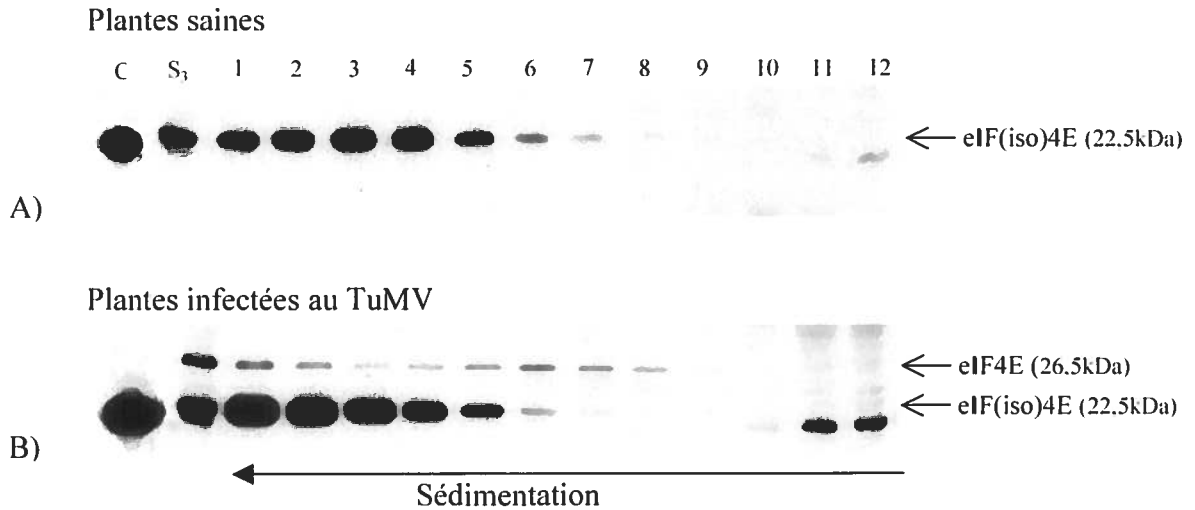


Figure 10 : Détection des isomères eIF4E et eIF(iso)4E après séparation des membranes cellulaires par ultracentrifugation sur gradient de sucrose.

Les immunobuvardages ont été faits avec un sérum anti-eIF4E d'*A. thaliana*. La position de la migration des isoformes eIF4E et eIF(iso)4E dont les poids moléculaires respectifs sont de 26,5kDa et 22,5kDa est indiquée par les flèches à droite des figures. Le puits C correspond à la protéine recombinante eIF(iso)4E^{T7Tag} d'*A. thaliana*. A) Surnageant (S₃) préparé à partir de feuilles de *B. perviridis* saines. B) Surnageant (S₃) préparé à partir de feuilles de *B. perviridis* infectées au TuMV. La direction de la sédimentation est indiquée par le sens de la longue flèche.

Isomères eIF4G/ eIF(iso)4G

Le facteur eIF4G, sous-unité du complexe eIF4F, joue un rôle important dans l'assemblage du complexe d'initiation nécessaire à la liaison des ribosomes sur l'ARNm (Sonenberg et Dever, 2003). Ce facteur est aussi la cible de certains virus à ARN tel que le PV (Gradi *et al.*, 1998). L'expression du facteur eIF4G après infection des plantes de *B. perviridis* au TuMV ainsi que sa distribution sur gradient de sucrose ont donc été étudiées.

Le sérum anti-eIF4G utilisé dans les immunobuvardages a été produit contre la protéine recombinante eIF4G de *T. aestivum* (blé). Le sérum a présenté une réaction croisée avec les deux isomères eIF4G présents chez *B. perviridis* (figure 11A et B). L'isomère eIF4G a été séparé par SDS-Page selon un poids moléculaire avoisinant 165kDa et l'isomère eIF(iso)4G, selon un poids moléculaire d'environ 86kDa.

Chez les plantes saines, l'isomère eIF4G est présent principalement dans les fractions légères, 11, 12 et 13 tandis que l'isomère eIF(iso)4G est retrouvé en plus forte concentration dans les fractions 4 à 8 (figure 11A). Leur expression est modifiée suite à l'infection des plantes avec le TuMV. Dans ce cas, l'isomère eIF(iso)4G est présent en concentration beaucoup plus élevée dans les fractions 1 à 10 et l'isomère eIF4G est faiblement exprimé dans les fractions légères 8 à 12 (figure 11B).

Ces résultats montrent d'abord que le patron d'expression de ces isomères eIF4G et eIF(iso)4G est modifié suite à l'infection des plantes de *B. perviridis* au TuMV. Les résultats obtenus permettent également d'entrevoir que l'isomère eIF(iso)4G pourrait interagir avec les formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro qui ont sédimenté dans des fractions similaires.

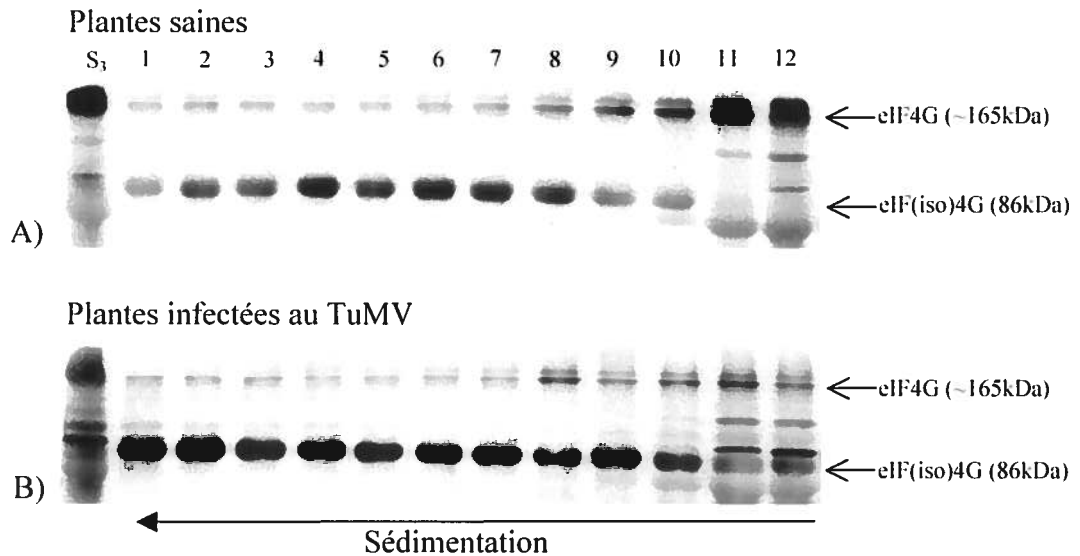


Figure 11 : Détection des isomères eIF4G et eIF(iso)4G après séparation des membranes cellulaires par ultracentrifugation sur gradient de sucrose.

Les immunobuvardages ont été faits avec un sérum anti-eIF4G de *T. aestivum* (blé). La position de la migration des isoformes eIF4G et eIF(iso)4G dont les poids moléculaires respectifs sont de 165kDa et 85kDa est indiquée par les flèches à droite des figures. A) Gradient de sucrose fait à partir d'un surnageant (S₃) préparé à partir de feuilles de *B. perviridis* saines. B) Gradient de sucrose fait à partir d'un surnageant (S₃) préparé à partir de feuilles de *B. perviridis* infectées au TuMV. La direction de la sédimentation est indiquée par le sens de la longue flèche.

PABP₂

La «poly(A) binding protein» (PABP), est la principale protéine complexée à la queue de poly(A) des ARNm des eucaryotes (Palanivelu *et al.*, 2000a). Une éventuelle colocalisation de la protéine PABP₂ de *B. perviridis* avec les formes 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro du TuMV a donc été vérifiée à l'aide d'un fractionnement cellulaire de feuilles de *B. perviridis* sur gradient de sucrose.

Contrairement à la plupart des eucaryotes étudiés et pour lesquels seulement une à trois protéines PABP sont exprimées, huit gènes *PABP* fonctionnelles sont retrouvés chez *A. thaliana* (Belostotsky, 2003). La protéine PABP₂ est une protéine qui s'exprime dans tous les tissus de cette plante (Panalivelu *et al.*, 2000b). Les codons 5 à 24 de la région N-terminale de la protéine PABP₂ d'*A. thaliana* correspondent à une région très divergente de celle des autres protéines PABP. Cette région a été choisie pour produire un peptide multi-antigénique (MAP : «Multiple Antigen Peptide»). Ce peptide a été utilisé dans la production du sérum de lapin (Palanivelu *et al.*, 2000a) employé dans les immunobuvardages destinés à détecter la protéine PABP₂.

Le poids moléculaire de la protéine PABP₂ d'*A. thaliana* est de 69kDa. Dans le surnageant (S₃) de feuilles de *B. perviridis* infectées au TuMV, diverses bandes de protéines ont été détectées par le sérum anti-PABP₂. Une de ces bandes a migré selon un poids moléculaire d'environ 50kDa. Cette bande de protéines correspondrait à la protéine PABP₂ de *B. perviridis*. La différence de poids moléculaire entre les protéines PABP₂ des deux végétaux pourrait s'expliquer par une variation spécifique à l'espèce. Les deux bandes de protéines de poids moléculaire supérieure à 50kDa sont susceptibles de correspondre à des interactions non-spécifiques détectées par le sérum anti-PABP₂ (figure 12). Il est moins probable qu'il s'agisse d'interactions croisées avec les diverses isoformes de PABP présents chez *B. perviridis* car le sérum est spécifique à une séquence divergente de la protéine PABP₂ d'*A. thaliana*. Les protéines détectées ayant poids moléculaire inférieur à 50kDa pourraient, en plus d'interactions non-spécifiques, correspondre à des formes dégradées de la protéine PABP₂ de *B. perviridis*. Enfin, dans le

surnageant (S₃) de feuilles de *B. perviridis* saines, la protéine PABP₂ a été détectée en concentration identique à celle détectée dans le surnageant de feuilles de *B. perviridis* préparé à partir de feuilles infectées au TuMV (résultats non-illustrés).

La protéine PABP₂ de 50kDa a été détectée en plus forte concentration dans les fractions 1 et 2 obtenues à partir du gradient de sucrose. Les bandes de protéines de poids moléculaire supérieur ou inférieur à 50kDa détectées par le sérum anti-PABP₂ sont présentes dans les fractions 9 à 12 uniquement. La localisation de la protéine PABP₂ dans des fractions similaires à celles dans lesquelles les formes précurseuses 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro ont été retrouvées laisse donc entrevoir la possibilité d'une interaction *in planta* entre ces protéines.

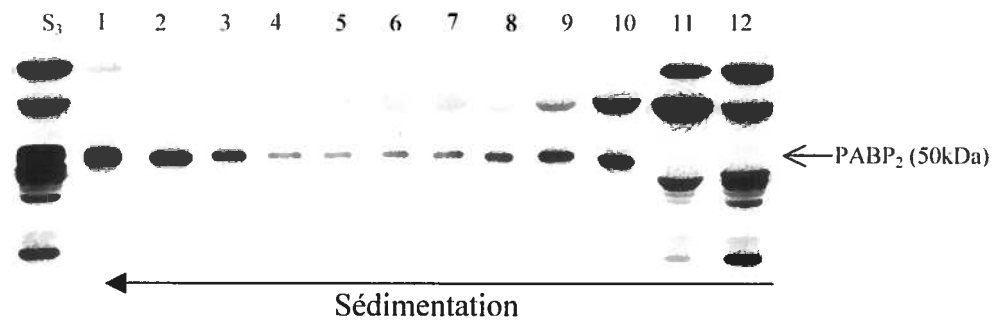


Figure 12 : Détection de la protéine PABP₂ après séparation des membranes cellulaires par ultracentrifugation sur gradient de sucrose.

L'immunobuvardage a été fait avec un sérum anti-PABP₂ d'*A. thaliana*. La position de la migration de la protéine PABP₂ de *B. perviridis* qui a été détecté selon un poids moléculaire est de 50kDa est indiquée par la flèche à droite de la figure. Le surnageant (S₃) déposé sur gradient de sucrose a été préparé à partir de feuilles de *B. perviridis* infectées au TuMV. La direction de la sédimentation est indiquée par le sens de la longue flèche.

RdRp

À l'aide du système double-hybride chez la levure, il a été démontré que la protéine N1b (RdRp) du potyvirus ZYMV interagissait avec la PABP de *Cucumis sativus* (concombre ; Wang *et al.*, 2000). Chez le TVMV, la protéine N1b interagit avec la protéine VPg (Fellers *et al.*, 1998). Par conséquent, la co-localisation de la RdRp du TuMV avec les formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro a été étudiée.

Le sérum utilisé dans les immunobuvardages a été produit contre la protéine recombinante purifiée RdRp du TuMV dont le poids moléculaire est de 59kDa. Dans le surnageant (S₃) de feuilles de *B. perviridis* infectées au TuMV, la RdRp du TuMV est détectée selon le poids moléculaire attendu de 59kDa (figure 13). La protéine n'a pas été détectée dans le surnageant de feuilles de *B. perviridis* saines (résultats non-illustrés). Dans les fractions 1 à 12 obtenues à partir du gradient de sucrose, la RdRp du TuMV a été détectée en plus forte concentration dans les fractions 1 à 4 et 9 à 12 (figure 13).

En plus de la RdRp de 59kDa, des bandes de protéines de nature inconnue ont été détectées par le sérum anti-RdRp. Celles-ci pourraient correspondre à des interactions non-spécifiques dirigées contre des protéines du système d'expression bactérien utilisé pour produire la protéine RdRp recombinante. Le sérum pourrait également présenter des interactions non-spécifiques avec des protéines végétales présentes dans le système du lapin (observations faites en laboratoire). Enfin, les protéines détectées de poids moléculaire inférieur à 59kDa sont susceptibles de correspondre à des interactions non-spécifiques ou à des formes dégradées de la protéine RdRp du TuMV. Les bandes de protéines de nature inconnue sont présentes uniquement dans les fractions 10 à 12.

Il est difficile d'expliquer la présence de la protéine RdRp dans toutes les fractions du gradient. Il se pourrait que la protéine RdRp, qui s'accumule en large quantité sous forme de corps d'inclusion, soit retrouvée en divers endroits de la cellule étant donné que ces corps d'inclusion ne sont pas spécifiquement retrouvés dans le noyau chez le TuMV.

Toutefois, même si la distribution de cette protéine n'est pas restreinte uniquement aux fractions de densité élevée, sa présence en plus forte concentration dans les fractions 1 à 4 laisse supposer qu'il est probable qu'elle puisse interagir avec les formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro du TuMV également retrouvées en concentration élevée dans ces mêmes fractions.

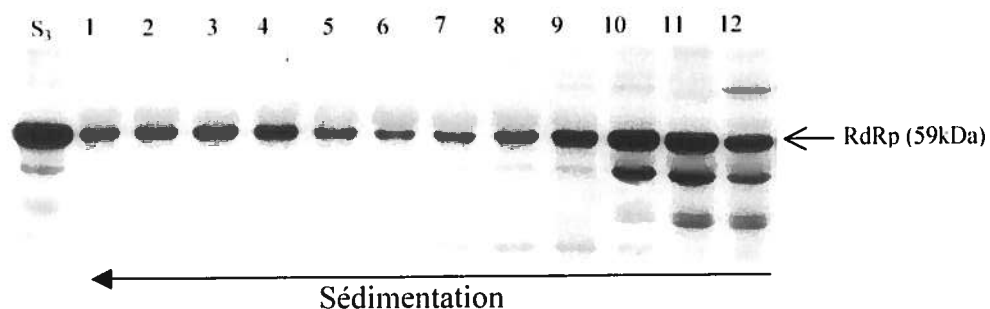


Figure 13 : Détection de la RdRp après séparation des membranes cellulaires par ultracentrifugation sur gradient de sucrose.

L'immunobuvardage a été fait avec un sérum anti-RdRp du TuMV. La position de la migration de la RdRp virale dont le poids moléculaire est de 59kDa est indiquée par la flèche à droite de la figure. Le surnageant (S₃) déposé sur gradient de sucrose a été préparé à partir de feuilles de *B. perviridis* infectées au TuMV. La direction de la sédimentation est indiquée par le sens de la longue flèche.

3.3 Purification de 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro et co-purification de protéines cellulaires et virales

3.3.1 Purification *in planta* de 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro

Les précédents résultats laissent entrevoir la possibilité que les formes précurseuses 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro puissent interagir *in planta* avec les protéines eIF4E/eIF(iso)4E, eIF4G/eIF(iso)4G, PABP₂ et RdRp. Afin de confirmer cette possibilité, une propriété intrinsèque de la VPg du TuMV a été exploitée (Ménard *et al.*, 1995). La protéine VPg-Pro native peut effectivement être purifiée sur colonne de nickel même si cette dernière ne possède pas la queue d'histidine habituellement nécessaire pour ce type de purification. Le domaine VPg serait responsable de l'interaction avec la colonne de nickel (Ménard *et al.*, 1995). Une analyse préliminaire de la séquence en acides aminés de la VPg-Pro, à l'aide de l'outil de bioinformatique «Swiss-PdbViewer» (<http://ca.expasy.org/spdbv>) permettant une visualisation en trois dimensions de la protéine, laisse entrevoir la présence de cinq histidines, relativement rapprochées, positionnées à la surface de la protéine. Ces dernières pourraient être suffisantes pour assurer la liaison de la protéine à la colonne de nickel. La séquence de la protéine VPg devra toutefois être analysée de façon plus approfondie afin de confirmer la présence de ces histidines rapprochées ou pour déterminer, par exemple, la présence d'un motif ou d'une «forme dérivée» d'un motif doigt de zinc responsable de cette interaction particulière. Néanmoins, cette propriété particulière a permis la purification des protéines 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro sous leur forme native. Les diverses étapes de la purification *in planta* ont été analysées par immunobuvardage.

Les cinq fractions possédant la plus forte concentration des formes précurseuses 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro issues d'un gradient de sucrose fait à partir des feuilles de *B. perviridis* infectées au TuMV ont été combinées entre elles (figure 14 : puits 1). Le mélange a ensuite été incubé pendant une heure avec une résine d'agarose couplée à l'acide nickel-nitrilotriacétique. La résine a été récupérée par centrifugation. Dans le surnageant, une faible quantité des protéines 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro a été détectée ce

qui signifie que le couplage de ces protéines sur les billes d'agarose a été efficace (figure 14 : puits 2). La résine a été lavée suffisamment et aucune des deux formes précurseurs de la VPg n'a été éliminée lors de cette étape (figure 14 : puits 3). L'éluat final a été effectué avec un tampon contenant 130mM d'imidazole. L'éluat a été récolté en dix fractions de 200µl. Seules les formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro ont été éluées et ce, dans les fractions 3 et 4 principalement (figure 14 : puits 4 à 13). Dans ces deux fractions, une bande de forte intensité a migré selon le poids moléculaire attendu de VPg-Pro qui est de 49kDa. Une bande de faible intensité a été détectée selon un poids moléculaire de 55kDa et correspond à la forme 6K₂-VPg-Pro. Enfin, une bande de protéines de forte intensité a migré selon un poids moléculaire de 85kDa. Il s'agirait de la ou des formes 6K₂-VPg-Pro et/ou VPg-Pro. Selon des expériences antérieures, il a été observé qu'une concentration élevée d'imidazole semblait retarder la migration de certaines protéines sur gel d'acrylamide. L'action spécifique de l'imidazole demeure toutefois à déterminer. Une procédure identique a été suivie à partir d'un gradient réalisé avec un surnageant de feuilles de *B. perviridis* saines. Aucune des formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro n'a été détectée dans les cinq premières fractions de ce gradient (figure 14 : puits 14) ou dans les étapes subséquentes de la purification.

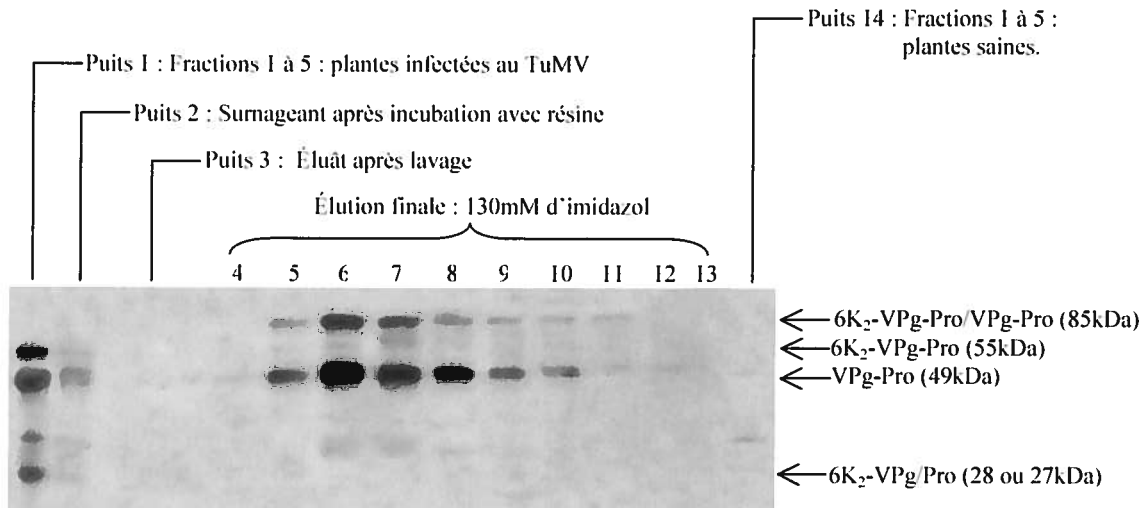


Figure 14 : Purification *in planta* de 6K₂-VPg Pro et VPg-Pro.

L'immunobuvardage a été réalisé avec un sérum anti-VPg-Pro du TuMV. Puits 1 : mélange des cinq premières fractions issues d'un gradient de sucrose préparé avec un surnageant de feuilles de *B. perviridis* infectées au TuMV. Puits 2 : mélange (fractions 1 à 5) incubé avec une résine d'agarose couplée à l'acide nickel-nitrilotriacétique. Puits 3 : résine lavée avec un tampon approprié. Puits 4 à 13 : élution faite avec 130mM d'imidazol et récupérée en dix fractions. Un échantillon de 12,5µl de chacune des fractions a été chargé sur gel. Puits 14 : fractions 1 à 5 d'un gradient préparé à partir de feuilles de *B. perviridis* saines. Les flèches à droite de la figure indiquent la position de la migration des diverses formes précurseurs de VPg selon les poids moléculaires observés.

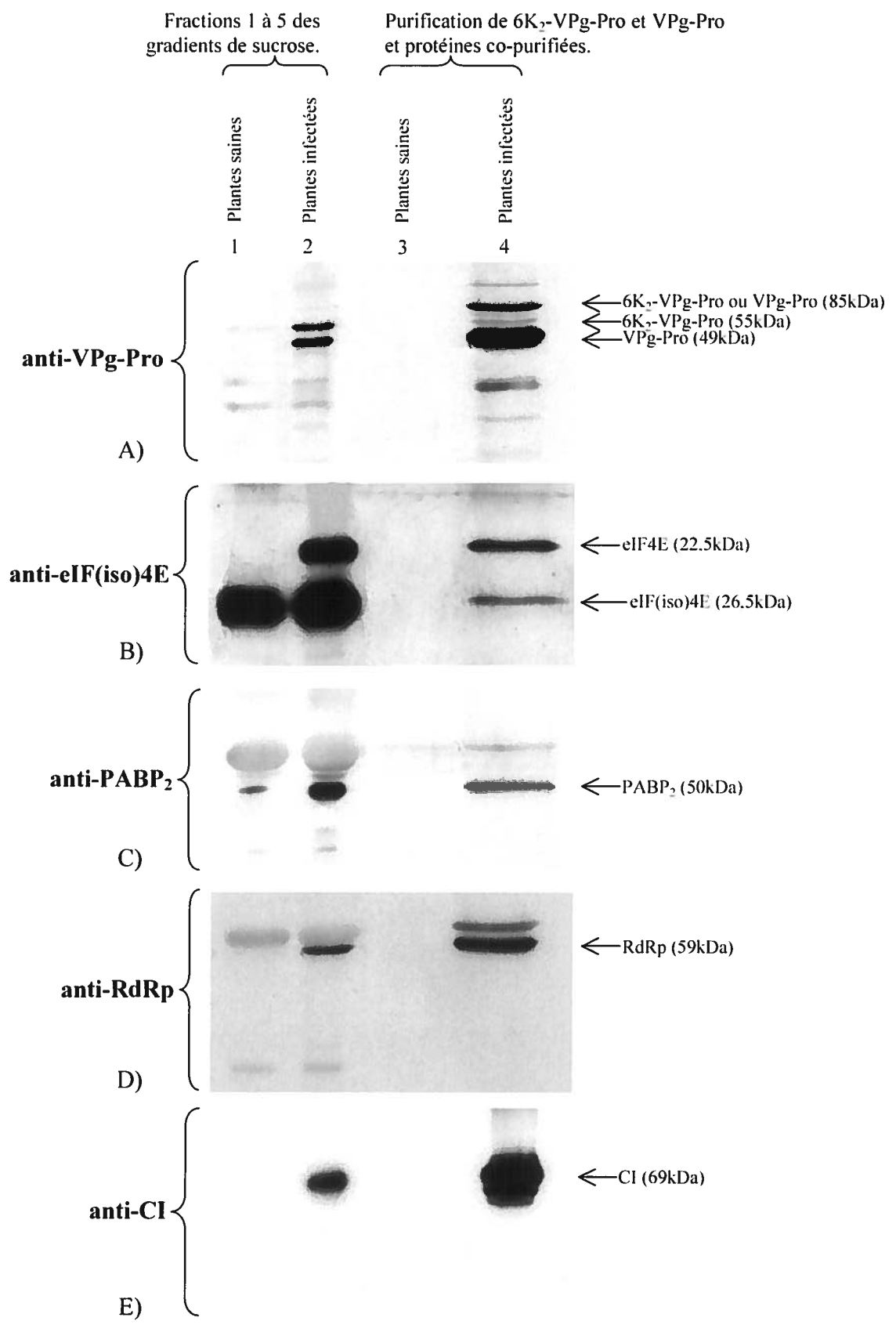
3.3.2 Co-purification *in planta* des isomères eIF4E/eIF(iso)4E, PABP₂, RdRp et CI en présence de 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro

Le contenu des fractions 3 et 4 issues de la précédente chromatographie a été analysé afin de vérifier une éventuelle co-purification de protéines végétales et virales avec les formes précurseuses 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro. Une procédure identique a été suivie pour les fractions 3 et 4 issues de la chromatographie-contrôle, c'est-à-dire la chromatographie faite à partir des cinq premières fractions d'un gradient de sucrose sur lequel a été déposé un surnageant de feuilles de *B. perviridis* saines. Les protéines natives ayant co-purifié avec les formes précurseuses de la protéine VPg ont été identifiées par immunobuvardage à l'aide de sérums de lapin appropriés.

La figure 15A constitue en quelque sorte un condensé des résultats présentés dans la précédente section 3.3.1. La détection des formes précurseuses de la protéine VPg a été faite avec le sérum anti-VPg-Pro du TuMV. Ces formes précurseuses ont été détectées dans le mélange des fractions 1 à 5 obtenues à partir du gradient fait avec le surnageant de feuilles infectées au TuMV (figure 15A : puits 1). Elles ont migré selon les poids moléculaires attendus de 55kDa et 49kDa respectivement. Elles sont absentes des fractions 1 à 5 provenant du gradient fait à partir du surnageant de feuilles saines (figure 15A : puits 2). Lors de la purification par chromatographie, aucune forme précurseuse de la VPg n'a été purifiée à partir du mélange des fractions 1 à 5 provenant du gradient de sucrose fait avec les feuilles de *B. perviridis* saines (figure 15A : puits 3). La chromatographie faite à partir du mélange des fractions 1 à 5 obtenues à partir gradient fait avec le surnageant de feuilles infectées a toutefois permis de purifier *in planta* les protéines 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro (figure 15A : puits 4) tel que décrit dans la précédente section 3.3.1. Le mélange des fractions 3 et 4 contient une forte concentration de la protéine VPg-Pro détectée selon le poids moléculaire de 49kDa. La protéine 6K₂-VPg-Pro a été détectée en faible concentration à la position de migration correspondant à son poids moléculaire de 55kDa. Une autre

Figure 15 : Co-purification *in planta* des protéines eIF4E/eIF(iso)4E, PABP₂, RdRp et CI avec les protéines virales 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro.

Un surnageant de feuilles de *B. perviridis* saines ou infectées au TuMV a été déposé sur gradient de sucrose. Les fractions 1 à 5 issues de ces gradients ont été mélangées entre elles (puits 1 et 2). Le mélange a été incubé avec une résine d'agarose couplée à l'acide nickel-nitrilotriacétique. Après un lavage approprié, les protéines 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro ont été éluées à l'aide d'un tampon contenant 130mM d'imidazole. L'éluât a ensuite été analysé par immunobuvardage avec les sérums suivants : A) anti-VPg-Pro. B) anti-eIF(iso)4E C) anti-PABP₂ D) anti-RdRp E) anti-CI. Les flèches à droite de la figure indiquent la position de la migration des diverses protéines selon leur poids moléculaire respectif. Puits 1 et 2 : 5µl d'échantillon/puits. Puits 3 et 4 : 30µl d'échantillon/puits.



bande de protéines, dont la position de migration est de 85kDa, a été détectée par le sérum et correspondrait à l'une ou l'autre des formes 6K₂-VPg-Pro et/ou VPg-Pro. La présence d'imidazole, nécessaire à l'éluion des protéines, expliquerait le fait que cette bande de protéines n'ait pas été détectée selon les poids moléculaires de 49kDa ou 55kDa.

Le sérum anti-eIF(iso)4E d'*A. thaliana* a été utilisé afin de déterminer si un ou les deux isomères eIF4E avaient été co-purifiés avec les formes précurseuses 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro. Dans les fractions 1 à 5 issues du surnageant préparé à partir de feuilles saines, seul l'isomère eIF(iso)4E a été détecté par le sérum, selon le poids moléculaire attendu de 26,5kDa (figure 15B : puits 1). Les deux isomères eIF4E et eIF(iso)4E ont toutefois été détectés dans les fractions 1 à 5 issues du surnageant préparé à partir de feuilles infectées au TuMV selon les poids moléculaires attendus de 22,5kDa et 26,5kDa respectivement (figure 15B : puits 2). Leur présence n'a pas été détectée dans l'éluat de la chromatographie-contrôle (figure 15B : puits 3). Ils ont toutefois été détectés dans l'éluat de protéines obtenues lors de la chromatographie faite à partir du gradient préparé avec un surnageant de feuilles infectées au TuMV (figure 15B : puits 4). Les isomères eIF(iso)4E et eIF4E ont donc été co-purifiés en présence des formes précurseuses 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro.

La co-purification *in planta* de la protéine eucaryotique PABP₂ a été vérifiée avec un sérum anti-PABP₂ d'*A. thaliana*. Cette protéine a été détectée dans le mélange des fractions 1 à 5 issues des deux types de gradient de sucrose et selon le poids moléculaire d'environ 50kDa (figure 15C : puits 1 et 2). La variation de la concentration de la protéine PABP₂ du regroupement des fractions 1 à 5 provenant du surnageant de feuilles saines n'a pas été observée dans d'autres expériences similaires. Le niveau d'expression de cette protéine dans les plantes saines ou infectées est habituellement identique. Aucune trace de la protéine PABP₂ n'a été détectée dans la chromatographie contrôle (figure 15C : puits 3). Une bande de poids moléculaire d'environ 50kDa a toutefois été clairement identifiée dans l'éluat de la chromatographie faite avec les fractions 1 à 5 issues du gradient réalisé avec les feuilles infectées au TuMV (figure 15C : puits 4). Dans

ce cas, il semble que la présence des protéines 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro ait été nécessaire à la co-purification de la protéine PABP₂.

La co-purification *in planta* de la polymérase virale RdRp avec les formes précurseuses de VPg a été vérifiée avec un sérum anti-RdRp du TuMV. La RdRp possède un poids moléculaire de 59kDa. Une bande de poids moléculaire correspondant à cette valeur a été détectée uniquement dans les fractions 1 à 5 issues du gradient réalisé à partir des feuilles de *B. perviridis* infectées au TuMV et non dans celles obtenues à partir de la préparation de feuilles saines (figure 15D : puits 1 et 2). La RdRp est absente dans l'éluât des fractions 3 et 4 issues de la chromatographie-contrôle (figure 15D : puits 3). Elle a cependant été détectée dans le mélange des fractions 3 et 4 obtenues à partir de la chromatographie faite avec les fractions 1 à 5 du gradient préparé avec le surnageant de feuilles infectées au TuMV (figure 15D : puits 4). La purification *in planta* des formes précurseuses 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro a donc permis de co-purifier la polymérase du TuMV.

La co-purification *in planta* de la protéine virale CI avec les formes précurseuses de la VPg a été vérifiée à l'aide d'un sérum anti-CI du TuMV. Cette protéine possède une activité ATPase dépendante de l'ARN caractéristique des hélicases et a un poids moléculaire de 69kDa. La protéine CI est absente des fractions 1 à 5 issues du gradient réalisé avec les feuilles de *B. perviridis* saines (figure 15E : puits 1). La protéine virale a été détectée, selon le poids moléculaire attendu, dans le mélange des fractions 1 à 5 du gradient de sucrose réalisé à partir des feuilles infectées au TuMV (figure 15E : puits 2). Elle n'a pas été retrouvée dans l'éluât de la chromatographie-contrôle (figure 15E : puits 3). Elle a toutefois été retrouvée dans l'éluât de la chromatographie faite à partir du mélange des fractions 1 à 5 du gradient de sucrose préparé à partir de feuilles infectées au TuMV (figure 15E : puits 4). En présence des protéines 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro, la protéine CI a donc pu être co-purifiée *in planta*.

La présence des protéines 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro est donc déterminante pour la co-purification des isomères eIF4E ainsi que des protéines PABP₂, CI et RdRp. Il n'est pas totalement exclu que les protéines virales aient pu être retenues, tout comme les formes précurseurs de VPg, sur la résine d'agarose couplée à l'acide nickel-nitrilotriacétique. Cette éventualité devra être vérifiée expérimentalement. Toutefois, l'ensemble de l'expérience suggère fortement que les formes précurseurs de VPg puissent interagir de façon directe ou indirecte, par l'intermédiaire d'autres protéines, avec les protéines qui ont été co-purifiées.

3.4 Distribution de l'ARN viral

Des facteurs susceptibles d'être impliqués dans la réplication et/ou l'initiation de la traduction du TuMV tels que les isomères eIF4E, la protéine PABP₂ et les protéines virales 6K₂-VPg-Pro, VPg-Pro et RdRp ont sédimentés dans des fractions similaires. Par conséquent, il a été entrepris de vérifier si l'ARN viral extrait des douze fractions issues d'un gradient de sucrose fait avec un surnageant de feuilles de *B. perviridis* infectées au TuMV pouvait également être co-localisé dans des fractions similaires.

10µl d'extrait d'ARN total de chaque échantillon ont été préparés dans un tampon de chargement d'ARN approprié et séparé sur gel d'agarose fait avec un tampon MOPS. Suite à l'électrotransfert sur membrane de nylon, la présence du virus a été révélée à l'aide d'une sonde marquée à l'isotope radioactif α -P³². La sonde correspond à une séquence de 1500pb de la RdRp du TuMV.

La sonde utilisée a interagit convenablement avec le témoin positif correspondant à une extraction d'ARN total provenant d'un homogénat de feuilles de *N. tabacum* transfectées par bombardement particulaire avec le clone infectieux pUC19-35S-TuMV (figure 16 : C⁺). Elle n'a présenté aucune interaction avec le témoin négatif correspondant à une extraction d'ARN total provenant d'un surnageant de feuilles de *B. perviridis* saines (figure 16 : C⁻). L'ARN viral a toutefois été clairement détecté dans le surnageant

de feuilles de *B. perviridis* infectées au TuMV (figure 16 : S₃). Dans ce surnageant, une bande d'ARN légèrement plus large correspond à l'ARN du TuMV dont la taille du génome est de 9830pb. Les extractions d'ARN total des 12 fractions issues du gradient de sucrose révèlent également la présence de l'ARN viral. Dans ces fractions, l'ARN viral a aussi été séparé à la hauteur attendue de 9,83kb. L'ARN du TuMV a été détecté en plus forte concentration dans les cinq premières fractions du gradient. Aucun inhibiteur de RNase n'a été ajouté aux tampons d'homogénéisation des feuilles de *B. perviridis* et de préparation des gradients de sucrose ce qui pourrait expliquer la présence des bandes de dégradation d'ARN viral dans chacun des échantillons.

La présence d'une plus forte concentration d'ARN viral dans les fractions lourdes suggère la présence d'un complexe de réplication viral. Ce résultat laisse entrevoir que les protéines 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro, RdRp, PABP₂ et les isomères eIF4E et eIF4G pourraient interagir entre-elles à l'intérieur du complexe de réplication.

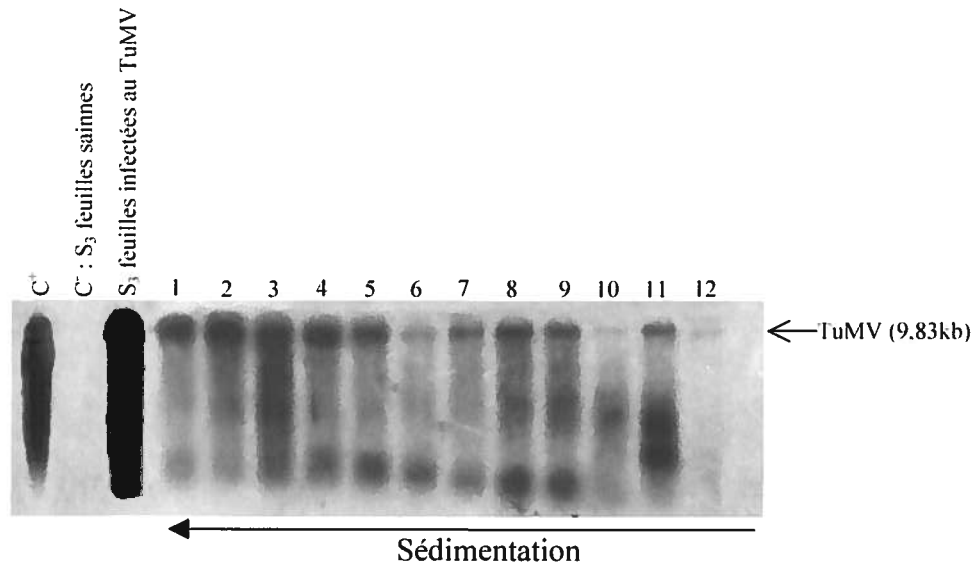


Figure 16 : Détection de l'ARN viral du TuMV après séparation des membranes cellulaires de feuilles de *B. perviridis* infectées au TuMV par ultracentrifugation sur gradient de sucre.

La détection de l'ARN viral a été faite par Northern à l'aide d'une sonde marquée à l'isotope radioactif α -P³² correspondant à la RdRp du TuMV. Un surnageant (S₃) de feuilles de *B. perviridis* infectées au TuMV a été déposé sur gradient de sucre et a été récupéré en 12 fractions. L'ARN total du surnageant (S₃) et des 12 fractions a été extrait. Pour chaque échantillon, 10 μ l d'extrait ont été séparés sur gel d'agarose. Témoin positif (C⁺) : ARN total extrait de feuilles de *N. tabacum* transfectées par bombardement particulaire avec le clone infectieux pUC19-35S-TuMV. Témoin négatif (C⁻) : ARN total extrait d'un surnageant (S₃) de feuilles de *B. perviridis* saines. La position de la migration de l'ARN viral du TuMV, dont la taille du génome est de 9830pb, est indiquée par la flèche à droite de la figure. La direction de la sédimentation est indiquée par le sens de la longue flèche.

Chapitre 4

Discussion

La découverte de l'interaction entre la protéine VPg-Pro, liée en 5' de l'ARN génomique du TuMV, et le facteur eucaryotique d'initiation de la traduction eIF(iso)4E (Wittmann *et al.*, 1997) est le point de départ de la présente étude. Cette interaction, qui s'est avérée essentielle au succès de l'infection du TuMV, constitue une piste exploratoire très importante dans la compréhension des processus de prise en charge de la cellule par les potyvirus. Par comparaison aux virus d'animaux, ces processus sont peu détaillés chez les virus végétaux (Aranda et Maule, 1998). L'étude avait donc pour but de détailler davantage le rôle potentiel de la protéine VPg-Pro au niveau de la réplication et de la traduction du TuMV. De façon plus spécifique, elle souhaitait démontrer que la protéine virale VPg-Pro pouvait servir de point d'ancrage à un complexe de protéines cellulaires et virales permettant la traduction et la réplication du TuMV selon une conformation circulaire de l'ARN viral.

4.1 Modification de l'expression des isomères eIF4E après infection au TuMV

Les plantes possèdent au moins deux isomères du complexe eucaryotique d'initiation de la traduction 4F, nommément eIF4F et eIF(iso)4F, dont fait partie le facteur eIF4E. La liaison de ce facteur avec la protéine VPg du TuMV est essentielle au succès de l'infection du potyvirus (Léonard *et al.*, 2000). Par ailleurs, certains virus tels que le PV ciblent le processus de régulation du facteur eIF4E afin de faciliter la sélection de la traduction de leur ARN (Gale *et al.*, 2000 ; Bushell et Sarnow, 2002). L'expression des isomères eIF4E a été donc évaluée suite à l'infection de plantes de *B. perviridis* par le TuMV. Chez les plantes saines, seul l'isomère eIF(iso)4E a été détecté tandis que chez les plantes infectées, les deux isomères eIF(iso)4E et eIF4E ont été détectés. L'infection au TuMV a donc modifiée l'expression des isomères eIF4E chez *B. perviridis*.

Régulation post-transcriptionnelle possible des isoformes *eIF4E* :

Chez *A. thaliana*, il a été montré que les gènes *eIF4E* et *eIF(iso)4E* étaient exprimés de façon différente dans divers organes de la plante. En effet, le gène *eIF4E* a été détecté dans tous les tissus exceptés ceux spécialisés des racines. Le gène *eIF(iso)4E* quant à lui a été détecté principalement et de façon abondante dans les organes floraux et les jeunes tissus en développement. Dans les deux cas, la plus forte concentration des ARNm correspondant aux facteurs *eIF4E* et *eIF(iso)4E* a été mesurée dans les cellules en croissance et en division rapide (Rodriguez *et al.*, 1998). La présence des ARNm correspondant aux isomères *eIF4E* et *eIF(iso)4E* a aussi été étudiée au niveau des feuilles de *B. perviridis*. Tout comme pour les résultats obtenus par Rodriguez *et al.* (1998), le niveau d'ARNm correspondant au gène *eIF4E* s'est avéré plus élevé que celui du gène *eIF(iso)4E*. De plus, ce patron d'expression s'est avéré pratiquement identique dans les feuilles de *B. perviridis* infectées par le TuMV (résultats non-illustrés).

Le patron d'expression des ARNm des facteurs *eIF4E* et *eIF(iso)4E* dans les feuilles de *B. perviridis* saines ne semble toutefois pas refléter le niveau d'expression des protéines correspondantes. En effet dans les feuilles saines, seule la protéine *eIF(iso)4E* a été détectée par immunobuvardage (figure 6-A) alors que les ARNm des facteurs *eIF4E* et *eIF(iso)4E* ont été détectés par Northern. Dans les feuilles infectées au TuMV, les deux isomères *eIF4E* ont été détectés (figure 6-B). Le niveau d'expression de l'isomère *eIF(iso)4E* s'est avéré plus élevé que celui de l'isomère *eIF4E*, ce qui est en quelque sorte l'inverse des niveaux d'expression mesurés pour les ARNm correspondants.

Il est probable que l'expression des ARNm des isomères *eIF4E* de *B. perviridis* soit sous contrôle post-transcriptionnel. Dans le cas des plantes saines, les deux facteurs *eIF4E* seraient disponibles sous forme d'ARNm, mais un seul des deux serait traduit, soit le facteur *eIF(iso)4E*. Lors d'une infection au TuMV, il y aurait induction de la traduction des ARNm correspondant au facteur *eIF4E*. Il demeure toutefois intrigant de constater que la plus forte concentration d'ARNm des deux isomères soit celle du gène *eIF4E* et que ce dernier soit le facteur le plus faiblement traduit des deux facteurs.

Des mécanismes d'expression différentielle des isomères eIF4E ont été observés chez d'autres espèces végétales. Chez le maïs par exemple, lors des premières phases de germination des embryons, il y aurait une synthèse protéique *de novo* significative de l'isomère eIF(iso)4E, et non de l'isomère eIF4E (Dinkova et Sánchez de Jiménez, 1999). Dans des extraits de germe de blé, la protéine eIF(iso)4E est également présente en plus grande concentration que la protéine eIF4E (Browning *et al.*, 1990). Un patron d'expression différentielle des protéines eIF4E et eIF(iso)4E a également été mis en évidence à des stages de développement spécifiques de la graine de blé (Gallie *et al.*, 1998). Par ailleurs, un stress cellulaire comme un choc thermique, n'a aucunement affecté le patron d'expression des isomères eIF4E lorsque celui-ci a été appliqué sur des feuilles blé. (Gallie *et al.*, 1998). Ces exemples posent plusieurs questions sur les rôles spécifiques possibles des isomères eIF4E.

Il semble que peu d'informations soient disponibles sur les mécanismes de régulation de l'activité des facteurs eIF4E et eIF(iso)4E (Bailey-Serres, 1999). Une piste a toutefois été suggérée au cours d'une étude dans laquelle des embryons de maïs ont été incubés en présence d'insuline. Chez les mammifères, cette hormone est un régulateur de la protéine 4E-BP mais elle ne possède pas d'équivalent chez les végétaux (Dinkova *et al.*, 2000). La protéine 4E-BP est phosphorylée en présence de l'insuline. Sous cette forme, la protéine 4E-BP ne se lie pas au facteur eIF4E ce qui permet la formation d'un complexe eIF4F fonctionnel (Gingras *et al.*, 1999). Chez le maïs, la présence d'insuline a eu pour résultat de stimuler la synthèse *de novo* de l'isoforme eIF(iso)4E sans toutefois stimulée celle de l'isoforme eIF4E. L'hormone a par ailleurs eu pour effet d'augmenter le recrutement spécifique des ARNm correspondant au gène *eIF(iso)4E* au niveau des polysomes. Les auteurs concluent au fonctionnement d'un mécanisme de régulation post-traductionnelle impliquant l'insuline à titre d'activateur d'un signal de transduction similaire à celui de l'activation à l'insuline chez les mammifères (Dinkova *et al.*, 2000).

L'infection au TuMV chez *B. perviridis* pourrait intervenir à une étape d'un mécanisme de régulation post-traductionnel impliquant un signal de transduction encore inconnu. Lors d'une infection au PV et au EMCV, du supergroupe des virus «*Picornalike*», il y a inhibition de la phosphorylation de la protéine 4E-BP qui demeure alors complexée au facteur eIF4E. La formation des complexes eIF4F fonctionnels est inhibée et il y a réduction du taux de traduction des ARNm cellulaires (Gale *et al.*, 2000). Une infection au TuMV, en affectant une protéine de régulation similaire à la protéine 4E-BP, pourrait aussi empêcher la formation d'un complexe eIF(iso)4F fonctionnel. Par conséquent, la plante pourrait stimuler la traduction du facteur eIF4E, via un contrôle post-traductionnel, afin de soutenir la traduction de ses ARNm cellulaires. Un contrôle post-transcriptionnel des facteurs eIF4E pourrait permettre à la cellule de s'ajuster rapidement aux changements auxquelles elle doit faire face lors d'une infection virale. Ce type de contrôle est d'ailleurs adopté lorsqu'une cellule doit répondre rapidement à une situation de stress ce qui lui évite d'avoir à gérer le transfert des ARNm du noyau vers le site de traduction (Léonard *et al.*, 2004).

Fonction distincte des isomères eIF4E :

L'expression différentielle des isomères eIF4E dans les feuilles de *B. perviridis* suite à l'infection causée par le TuMV ainsi que divers cas répertoriés dans la littérature appuient la possibilité d'une fonction cellulaire distincte des isoformes eIF4E. Il y aurait effectivement une affinité discriminatoire des deux complexes eIF4F, par l'intermédiaire du facteur eIF4E, pour la liaison à divers types de coiffe présents chez les ARNm. Des données biophysiques indiquent que l'affinité du complexe eIF4F, chez le blé, est moins élevée que celui du complexe eIF(iso)4F pour les coiffes hyperméthylées. Le complexe eIF4F serait plus sensible à la présence de structures en épingle à cheveux tandis que le complexe eIF(iso)4F préférerait les structures linéaires (Browning, 1996). Il a été démontré que seul le complexe eIF4F supportait efficacement la traduction d'ARNm dont l'extrémité 5' possède une structure secondaire organisée. De plus, le complexe eIF4F a accru la traduction d'ARNm sans coiffe de façon plus importante que le complexe eIF(iso)4F. Le complexe eIF4F aurait possiblement évolué de façon à

promouvoir la traduction des ARNm non-standards, des ARNm sans coiffe par exemple, dont l'extrémité 5' est structurée, ou renfermant plus d'un cistron. Il est possible aussi que ce complexe ait évolué afin de promouvoir la traduction des ARNm standards mais dans des conditions cellulaires sous lesquelles la traduction dépendante de la coiffe est inhibée. Le complexe eIF(iso)4F serait quant à lui plutôt limité à faciliter la traduction des ARNm standards (Gallie et Browning, 2001). Le complexe eIF4F serait donc le plus versatile des deux isoformes (Kawaguchi et Bailey-Serres, 2002). Lors d'une infection au TuMV, situation de stress pour l'hôte, il se pourrait que l'induction de la traduction du facteur *eIF4E* soit stimulée par une demande accrue de la traduction de type indépendante de la coiffe favorisée par la présence d'ARNm cellulaires non-standards.

Ajustement cellulaire face aux exigences de la réplication virale :

L'augmentation de la synthèse de protéines cellulaires observée dans d'autres infections virales affectant les végétaux appuie l'hypothèse selon laquelle les exigences de la réplication du TuMV pourraient stimuler la production de l'isomère eIF4E afin que ce dernier puisse ajuster la pression appliquée sur la machinerie traductionnelle de la cellule. Chez le PSbMV, une dégradation importante de divers ARNm cellulaires a été observée dans les cellules infectées par ce virus. Il semblerait que ce processus puisse toutefois être régulé car certains ARNm cellulaires échapperaient au processus de dégradation, seraient accumulés puis traduits. Des analyses spatiales ont montré que l'accumulation des ARNm des gènes «*Heat shock protein 70*» (*HSP70*) et *polyubiquitine* (*pub*) était croissante alors que plusieurs autres ARNm cellulaires étaient éliminés des cellules infectées (Aranda *et al.*, 1996). Des résultats similaires ont été observés lors de l'infection avec le *Cucumber mosaic virus* (CMV). Les ARNm correspondant aux gènes *HSP70* et *NADP⁺-dependent malic enzyme* (*NADP-ME*) ont été induits dans les cellules saines précédant le front d'infection du virus alors qu'il y avait régulation négative des autres ARNm étudiés (Havelda et Maule, 2000). L'induction et la suppression de gènes suivant une infection virale est un phénomène retrouvé dans un éventail de familles de virus de végétaux (Escaler *et al.*, 2000b). Les gènes échappant à la suppression codent pour des enzymes qui supportent les réactions de biosynthèse. Il est intrigant de constater

que certains gènes arrivent à échapper au «shutoff» induit par l'infection virale. Il se pourrait que des caractéristiques structurales au niveau de leur ARNm leur permettent d'échapper à cette régulation négative. Néanmoins, le mécanisme et le but de l'induction de ces gènes demeurent inconnus. Il se pourrait que l'augmentation de leur activité prépare la cellule à la demande biosynthétique de la réplication virale (Maule *et al.*, 2002) ce qui pourrait également s'appliquer au cas de l'expression du facteur eIF4E chez *B. perviridis*.

La production du facteur eIF4E observée chez *B. perviridis* pourrait constituer un ajustement de la pression exercée sur le mécanisme de synthèse protéique imposée par une infection au TuMV. Cette hypothèse est supportée par les travaux de Duprat *et al.* (2002) qui ont isolé des lignées d'*A. thaliana* dont l'expression du facteur eIF(iso)4E a été inhibée par l'insertion d'un transposon dans la séquence du gène correspondant à cette isoforme. Le phénotype de la plante s'est avéré normal. Cependant, la quantité de protéines eIF4E était accrue dans les extraits de graines et l'analyse des polysomes a montré que les ARNm codant pour le facteur *eIF4E* était traduit en plus grande quantité. Dans cet exemple, l'accroissement de la production du facteur eIF4E aurait compensé pour la perte du facteur eIF(iso)4E et aurait ainsi permis un ajustement de la pression exercée sur la machinerie traductionnelle de la plante (Duprat *et al.*, 2002).

Dans un autre type d'expérience, des graines d'*A. thaliana* ont été exposées à l'agent mutagène EMS. De ces graines, une descendance de plantes au phénotype normal a été isolée pour leur résistance à une infection au TuMV. Il s'est avéré que le locus de résistance correspondait au gène *eIF(iso)4E*. Ce dernier était non-fonctionnel étant donné la présence d'une mutation insérant un codon de terminaison prématuré dans la séquence du gène (Lellis *et al.*, 2002). Une résistance au TuMV, expliquée encore une fois par l'absence du facteur eIF(iso)4E, a également été observée par Duprat *et al.* (2002). Les travaux de Duprat *et al.* (2002) et Lellis *et al.* (2002) ainsi que la nécessité de l'interaction entre la VPg du TuMV et le facteur eIF(iso)4E (Léonard *et al.*, 2000) est compatible avec un modèle selon lequel le facteur eIF(iso)4E serait directement recruté par la protéine VPg du TuMV afin d'assurer la réplication du virus. La machinerie

traductionnelle des plantes de *B. perviridis* compenserait la perte du facteur eIF(iso)4E en synthétisant *de novo* le facteur eIF4E pour réduire la pression exercée sur la cellule.

Ségrégation des facteurs eIF4E :

Il n'est pas possible d'exclure la possibilité que le facteur eIF(iso)4E de *B. perviridis* puisse être l'objet d'une forme d'inactivation par le TuMV. Il a été démontré que la protéine VPg des potyvirus pouvait se lier aux facteurs eIF4E et eIF(iso)4E de diverses espèces (Wittmann *et al.*, 1997 ; Schaad *et al.*, 2000 ; Nicaise *et al.*, 2003). Ces études n'ont toutefois pas encore permis de déterminer si l'interaction entre les deux protéines se faisait avec une protéine VPg liée à l'ARN viral ou par une protéine VPg libre. Dans ce dernier cas, la protéine VPg libre pourrait jouer le rôle d'une protéine de régulation négative, comme le ferait la protéine 4E-BP des mammifères. Selon ce modèle, les facteurs eIF4E ou eIF(iso)4E ne seraient pas spécifiquement recrutés pour la traduction du virus mais seraient plutôt ségrévés dans la cellule par les formes précurseurs de VPg. La traduction des ARN viraux pourrait tout de même être soutenue par l'intermédiaire d'un mécanisme de traduction indépendante de la coiffe, via un IRES par exemple (Kawaguchi et Bailey-Serres, 2002). La synthèse *de novo* du facteur eIF4E chez les plantes de *B. perviridis* infectées au TuMV aurait pour but de compenser pour la perte du facteur eIF(iso)4E mobilisé par les formes précurseurs de la protéine VPg. Cependant, le facteur eIF4E nouvellement synthétisé pourrait être à son tour l'objet d'une ségrégation par les formes précurseurs de VPg. De cette façon, y aurait une diminution de la traduction des ARNm cellulaires ce qui favoriserait la réplication du TuMV. L'approche selon laquelle le facteur eIF(iso)4E serait directement recruté pour la traduction et la réplication du TuMV demeure malgré tout plus probable que celle suggérant la ségrégation des deux isomères. En effet, l'interaction entre les protéines eIF(iso)4E et VPg est essentielle au succès de l'infection du TuMV alors qu'il est beaucoup moins probable que la ségrégation du facteur eIF(iso)4E le soit.

Enfin, la régulation des deux isomères eIF4E demeure encore très intrigante chez les végétaux. Dans le cas de la présente étude, la synthèse du facteur eIF4E suite à l'infection au TuMV, pourrait faciliter la traduction d'ARNm cellulaires non-standards ou ayant une structure secondaire importante à leur extrémité 5'. L'accumulation de ces ARNm non-standards serait possiblement due au dérèglement cellulaire causé par la présence du TuMV. Le facteur eIF4E faciliterait le maintien de certains de ces ARNm nécessaires à la «survie» de la cellule. D'ailleurs chez les végétaux, et contrairement aux animaux, les cellules infectées ne sont pas lysées et demeurent vivantes même après le passage du front d'infection virale. La réplication des virus végétaux agirait comme un stress biotique de courte durée et pour lequel les cellules pourraient s'adapter et survivre (Havelda et Maule, 2000 ; Maule *et al.*, 2002). Par conséquent, la synthèse du facteur eIF4E pourrait être un ajustement de la cellule à la pression causée par la demande soutenue pour la réplication du TuMV.

4.2 Co-localisation et co-purification *in planta* des protéines cellulaires et virales avec les formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro

Dans cette section, un survol des diverses protéines ayant été co-localisées et/ou co-purifiées avec les formes précurseurs de VPg est effectué. Leur implication particulière avec les protéines 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro, dans un contexte de réplication et de traduction du TuMV, est détaillée dans la section 4.3.

Purification *in planta* des formes précurseurs de VPg :

Les essais de fractionnement membranaires et la purification *in planta* ont montré que les formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro étaient retrouvées dans les fractions lourdes des gradients de sucrose et qu'elles pouvaient également être purifiées sur colonne d'affinité au nickel. Chez un autre potyvirus, le PVA, l'expression de la polyprotéine initiale a été effectuée dans des cellules d'insectes infectées par des baculovirus recombinants. La protéine 6K₂ de ce virus a été retrouvée sous la forme précurseur CI-6K₂ plutôt que sous la forme 6K₂-VPg-Pro. D'autres formes intermédiaires ont aussi été retrouvées telles que P3-6K₁-CI-6K₂-VPg-Pro-Nib, P3-6K₁-CI-6K₂, CI-6K₂-VPg-Pro-Nib, CI-6K₂-VPg-Pro, VPg-Pro-Nib et VPg-Pro-CP (Merits *et al.*, 2002). Ces formes intermédiaires n'ont pas été détectées chez le TuMV car les conditions de migration des électrophorèses n'étaient pas optimales pour observer des protéines de cette taille. Il est possible aussi que les formes précurseurs retrouvées chez le PVA n'existent pas chez le TuMV. Aucune forme mature VPg n'a par ailleurs été détectée. Il se pourrait que la protéine VPg soit présente uniquement en association avec l'extrémité 5' de l'ARN viral. Si tel était le cas, un volume de matériel beaucoup plus important aurait dû être chargé sur gel afin de pouvoir l'observer dans les limites de détection des immunobuvardages. Il se pourrait aussi que la protéine VPg puisse être recyclée rapidement dans la cellule et ainsi être difficilement observable. Enfin, il n'est pas possible d'exclure le fait qu'il s'agisse d'un artefact.

Fractions membranaires co-localisées avec les formes précurseurs de la VPg :

Le fractionnement des membranes cellulaires sur gradient de sucrose a montré que les formes 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro avaient migré dans des fractions caractérisées par la présence du RE. Ces fractions étaient par ailleurs bien différenciées de celles renfermant d'autres membranes cellulaires telles que la membrane plasmique et les membranes de l'appareil de Golgi *median* et *trans*. De plus, les essais réalisés en absence ou en présence de 3mM de MgCl₂ laissent suggérer que les formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro seraient liées aux membranes du RE associées aux ribosomes.

L'association entre les formes précurseurs de VPg et le RE ne serait pas unique au TuMV. Plusieurs virus à ARN de polarité positive induisent une prolifération et une modification importante des membranes intracellulaires de leur hôte. Le résultat est une fréquente accumulation de vésicules membranaires (Buck, 1996 ; Teterina *et al.*, 2001) possiblement pour augmenter la surface disponible pour la réplication virale (Schaad *et al.*, 1997a). Chez le PV par exemple, la synthèse du brin d'ARN de polarité positive prend place sur des membranes du RE rugueux en association avec le complexe de réplication (Troxler *et al.*, 1992). Une des protéines impliquée dans ce processus est la protéine 3AB, un équivalent fonctionnel de la protéine précurseur 6K₂-VPg-Pro (figures 3 et 17). Par l'intermédiaire du domaine 3A, qui possède un domaine d'intégration à la membrane, la forme précurseur 3AB assure l'ancrage du complexe de réplication du PV sur le RE rugueux (Schaad *et al.*, 1996). Les ancrages membranaires des virus «*Picornalike*» sont faites à partir de la protéolyse de larges polyprotéines virales. Dans plusieurs cas, les formes précurseurs de ces protéines virales présentent une activité différente de celles des formes matures (Han et Sanfaçon, 2003) ce qui pourrait être le cas de la protéine précurseur 6K₂-VPg-Pro chez le TuMV. L'organisation génomique similaire et la présence de la protéine VPg à l'extrémité 5' du génome viral sont caractéristiques des virus «*Picornalike*» (ICTVdatabase, *Picornaviridae* : www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm). De plus, l'orientation de la protéine VPg vers la membrane du RE, par l'intermédiaire d'une association covalente avec une protéine de liaison à la

membrane, pourrait être fortement conservée chez les membres de ce groupe (Schaad *et al.*, 1997a).

L'importance de l'interaction des formes précurseurs de VPg avec le RE a également été mise en évidence chez les potyvirus. Des études réalisées chez le TEV ont montré que sa réplication avait lieu en étroite association avec des vésicules membranaires dérivées du RE (Sadowy *et al.*, 2001). Il a été démontré que cette association était assurée par la protéine 6K₂ qui possède des propriétés d'intégration à la membrane par l'intermédiaire d'une séquence riche en acides aminés hydrophobes. Il a été suggéré que la protéine 6K₂ du TEV puisse servir d'ancrage afin de stabiliser, en partie ou en totalité, l'appareil de réplication de l'ARN viral sur les sites membranaires (Schaad *et al.*, 1997a). Il se pourrait que ce rôle soit également attribuable à la protéine 6K₂ du TuMV car le pourcentage de similarité entre les séquences en acides aminés des protéines 6K₂ du TEV et du TuMV est de 45,3% (vérification effectuée par le logiciel LALIGN [http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html], Huang et Miller (1991)). Chez un autre potyvirus, le PVA, la protéine 6K₂, sous la forme précurseur CI-6K₂-VPg-Pro, servirait aussi d'ancrage au complexe répliatif du virus (Merits *et al.*, 2002). Des conclusions similaires ont été obtenues chez d'autres virus de plantes de la famille des *Comoviridae*, membre du supergroupe des virus «*Picornalike*», notamment chez le *Tomato Ringspot Virus* (ToRSV ; Han et Sanfaçon, 2003) et le *Grapevine Fanleaf Virus* (GFLV ; Ritzenthaler *et al.*, 2002). Les résultats obtenus dans la présente étude laisse entrevoir que la protéine 6K₂ du TuMV, sous la forme précurseur 6K₂-VPg-Pro, puisse se fixer à des vésicules dérivées du RE rugueux afin d'assurer la réplication virale. La preuve de l'interaction possible de la 6K₂ du TuMV aux membranes du RE de *B. perviridis* devra toutefois être démontrée de façon directe.

Co-localisation et co-purification des facteurs eIF4E avec les formes précurseures de VPg :

Chez les plantes de *B. perviridis* saines, l'isomère eIF(iso)4E a été co-localisé dans les fractions lourdes avec les formes précurseures 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro. Chez les plantes infectées, les deux isomères eIF4E ont été co-localisés dans les fractions lourdes avec les formes 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro. Un second pic de concentration de l'isomère eIF4E a été observé dans les fractions 5, 6, 7 et 8 (figure 10). La présence de ce deuxième pic de concentration est, pour le moment, encore difficilement explicable.

L'interaction entre le facteur eIF(iso)4E et le domaine VPg de la protéine VPg-Pro du TuMV a été démontré précédemment (Léonard *et al.*, 2000 ; Wittmann *et al.*, 1997). Les tests de co-localisation et de co-purification ont démontré que les formes précurseures 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro étaient impliquées *in planta* dans cette interaction. Il s'est avéré que l'isoforme eIF4E pouvait également être co-localisé et co-purifié en présence de ces mêmes formes précurseures de VPg. Il sera toutefois nécessaire de vérifier si l'interaction avec le facteur eIF4E et les formes précurseures de VPg est aussi essentielle au succès de l'infection du TuMV comme il a été démontré pour le facteur eIF(iso)4E.

Protéine de nature inconnue détectée par le sérum anti-eIF(iso)4E :

Le sérum anti-eIF(iso)4E d'*A. thaliana* a révélé la présence d'une protéine de nature inconnue d'environ 26kDa chez *B. perviridis*. Il pourrait s'agir d'isomères de eIF4E dégradés ou clivés par des protéases du TuMV. Il est par ailleurs intéressant de noter que cette protéine n'est présente que dans les fractions légères 11 et 12 des gradients de sucrose. Ce résultat pourrait signifier que la protéine n'est pas ou n'est plus activement recrutée pour la réplication ou la traduction du virus par les formes précurseures 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro.

La protéine de nature inconnue pourrait également correspondre à un nouvel isomère eIF4E. Chez *A. thaliana*, le facteur nCBP pour «novel Cap Binding Protein», possédant des propriétés de liaison à la coiffe, a été identifié. Il pourrait s'agir d'un troisième isomère eIF4E car il peut supporter la traduction *in vitro* des ARNm coiffés. Il a également pu former un complexe avec le facteur eIF(iso)4G dans des essais de double-hybride chez la levure. Cependant, sa séquence en acides aminés diffère de façon significative de celle des deux autres isoformes eIF4E. Le rôle biologique de cet isomère n'est pas encore bien défini. (Ruud *et al.*, 1998). Chez *B. perviridis*, la capacité de la protéine de nature inconnue à lier un analogue de coiffe n'a pas été déterminée. Par ailleurs, des essais ont montré que les sérums anti-eIF4E d'*A. thaliana* et anti-eIF(iso)4E de blé ne présentaient aucune réaction croisée avec la protéine recombinante purifiée nCBP d'*A. thaliana* (résultats non illustrés). De plus, aucune réaction croisée n'a été observée lorsqu'un sérum de lapin anti-nCBP d'*A. thaliana* a été mis en présence d'un éluât contenant les isomères eIF4E obtenus à partir d'une préparation de feuilles d'*A. thaliana* passée sur colonne d'affinité m⁷GTP-Sepharose. Ces résultats montrent que la protéine nCBP est possiblement une forme distante d'une protéine de liaison à la coiffe par comparaison aux deux autres isomères eIF4E (Ruud *et al.*, 1998). Des analyses plus poussées, notamment par le séquençage de la protéine de nature inconnue, permettront de déterminer si celle-ci correspond à un isomère eIF4E dégradé naturellement ou s'il s'agit d'une nouvelle forme isomérique des facteurs eIF4E.

Co-localisation des facteurs eIF4G avec les formes précurseurs de VPg :

L'isomère eIF(iso)4G a été co-localisé avec les formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro. Ce résultat est appuyé, de façon indirecte, par des essais d'interactions *in vitro* de type ELISA. Il a été démontré que le facteur eIF(iso)4G de blé interagissait avec la protéine virale VPg-Pro du TuMV par l'intermédiaire du facteur eIF(iso)4E d'*A. thaliana* (résultats non-illustrés : M.J. Fortin). En plus de la co-localisation observée, l'infection de plantes de *B. perviridis* au TuMV a induit une modification de l'expression des isomères eIF4G. Chez les plantes infectées, le facteur eIF(iso)4G est retrouvé en plus forte concentration dans les fractions lourdes alors qu'il est retrouvé principalement dans

les fractions centrales chez les plantes saines. Il y a également une variation de l'expression de l'isoforme eIF4G avant et après infection des plantes au TuMV. Cependant, la présence de cette isoforme, de poids moléculaire élevé, devra être analysée à nouveau sur gel permettant une meilleure résolution des protéines de poids moléculaire élevé. La variation du patron d'expression des isomères eIF4G n'est pas tranchée, i.e. absence/présence, comme celle des facteurs eIF4E avant et après infection des plantes de *B. perviridis*. Contrairement aux isomères eIF4E, les deux isomères eIF4G sont détectés à la fois dans les plantes saines et dans les plantes infectées. Seules leur concentration et leur position de migration sur gradient de sucrose sont modifiées suivant l'infection.

L'augmentation de l'expression du facteur eIF(iso)4G chez les plantes infectées pourrait constituer une réponse d'une demande accrue de ce facteur pour la réplication et/ou la traduction des ARN du TuMV. Cette possibilité est conséquente avec la découverte, chez le TEV, que la séquence 5'-NTR du virus renferme un IRES qui dirigerait la traduction de type coiffe indépendante. Dans ce cas, le facteur eIF4G serait spécifiquement recruté dans le mécanisme de traduction du virus (Gallie, 1997). La traduction du TuMV pourrait également nécessiter la présence obligatoire du facteur eIF(iso)4G ce qui obligerait alors la plante à accroître la production de cet isomère afin de pouvoir aussi supporter la traduction des ARNm cellulaires. Il n'est toutefois pas possible pour l'instant de conclure que le ou les facteurs eIF4G sont spécifiquement recrutés dans le cycle de réplication et/ou de traduction du TuMV. Il n'est pas possible non plus de définir l'apport particulier de chacune des isoformes eIF4G dans ce processus. Plusieurs questions demeurent également en suspend en ce qui concerne la régulation de l'expression de ces isomères. Il est intrigant de constater que leur patron d'expression suivant une infection au TuMV n'est pas similaire à celui des facteurs eIF4E, d'autant plus que les deux facteurs sont recrutés dans le même complexe, c'est-à-dire le complexe eIF4F. Il serait intéressant de vérifier si la présence de l'un ou l'autre des isomères eIF4G est essentielle au succès de l'infection du TuMV.

Co-localisation et co-purification de la protéine PABP₂ avec les formes précurseures de VPg :

La protéine PABP joue un rôle directe dans la stabilité des ARNm par l'intermédiaire de son interaction avec la queue de poly(A) (Gale *et al.*, 2000). Les isomères PABP d'*A. thaliana* font partie d'une famille multigénique comprenant 8 isoformes de la protéine (Belostotsky, 2003). L'isomère PABP₂ est hautement exprimé dans tous les organes de la plante (Palanivelu *et al.*, 2000b). Pour cette raison, l'isomère PABP₂ a été choisi afin de vérifier une éventuelle liaison avec les formes précurseures 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro. Les résultats ont démontré que la protéine PABP₂ était effectivement co-localisée et co-purifiée *in planta* en présence des formes précurseures de VPg. L'interaction mesurée *in planta* a aussi été mesurée *in vitro* par l'intermédiaire de tests d'interactions de type ELISA effectués avec la protéine recombinante PABP₂ d'*A. thaliana* et la protéine recombinante VPg-Pro du TuMV (Léonard *et al.*, 2004).

Sans être mutuellement exclusive avec la possibilité d'une implication dans la traduction et/ou la réplication du TuMV, l'interaction entre les protéines 6K₂-VPg-Pro, VPg-Pro et PABP₂ pourrait également être impliquée dans une régulation négative de la traduction générale des ARNm cellulaires de *B. perviridis*. Ce genre de régulation a été observé notamment chez le PV et le *Cosackievirus*, pour lesquels la protéase virale 2A-Pro cible la protéine PABP de leur hôte (Gale *et al.*, 2000). Aucune expérience ne permet jusqu'à présent de conclure qu'un tel mécanisme existe entre le TuMV et la protéine PABP identifiée chez *B. perviridis*. Cependant, l'accumulation des formes précurseures de VPg du TuMV et leur interaction avec la protéine PABP₂ pourraient faire en sorte de ségréger les protéines PABP₂ de *B. perviridis* et ainsi induire une régulation négative de la traduction des ARNm cellulaires.

Enfin, il n'est pas possible d'exclure la possibilité que la protéine PABP ait pu co-purifier avec la queue de poly(A) des ARN viraux et messagers présents dans la préparation des feuilles de *B. perviridis*. Cependant, cette possibilité est faible étant donné que l'interaction directe entre la protéine PABP₂ et la protéine VPg-Pro a été

démontrée *in vitro*. De plus, le contenu de tous les éluâts obtenus suite à la purification *in planta* des formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro (figure 14, section 3.3.1) ont été analysés par Northern afin de vérifier la présence d'ARN viraux. Ces derniers n'ont pas été détectés ce qui signifie fort probablement qu'aucun ARNm cellulaires n'était également conservés dans ces fractions. L'absence des ARN viraux des éluâts s'explique par les conditions très peu favorables à la conservation des ARN lors de la préparation et la manipulation des échantillons. Puisque le résultat du Northern ne peut pas totalement exclure l'absence d'ARN viral, il serait pertinent d'ajouter un volume approprié de RNase aux fractions utilisées pour la réalisation de la purification *in planta*. Cette étape supplémentaire confirmerait ou infirmerait la possibilité que la protéine PAPB₂ soit co-purifiée avec la queue de poly(A) des ARNm cellulaires.

Co-localisation et co-purification de RdRp avec les formes précurseurs de VPg :

La réplication des potyvirus est liée aux membranes du RE et la protéine 6K₂ aurait possiblement un rôle à jouer dans ce processus. La protéine 6K₂ du TEV a été retrouvée dans de larges compartiments vésiculaires dérivés du RE. Il a été suggéré que la direction de la protéine VPg ou NIa vers les sites de réplication localisés sur le RE soit assurée par le domaine 6K₂ sous l'une ou l'autre des formes précurseurs suivantes : 6K₂/NIa, 6K₂/VPg ou 6K₂/polyprotéine précurseur (Schaad *et al.*, 1997a). Il a par ailleurs été démontré que la protéine NIB interagissait directement avec la protéine NIa via le domaine VPg de la protéine NIa chez le TVMV (Fellers *et al.*, 1998) et par l'intermédiaire du domaine Pro de la protéine NIa chez le TEV (Daròs *et al.*, 1999). La polymérase virale NIB des potyvirus a donc de fortes chances d'être recrutée sur les membranes du RE, à l'intérieur d'un complexe de réplication, par l'intermédiaire de la forme 6K₂-NIa. Dans la présente étude, les tests de co-purification et de co-localisation démontrent *in planta* que les formes 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro interagissent avec la protéine RdRp. Il devient alors très probable que l'interaction avec la forme précurseur 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro serve à diriger la polymérase virale du TuMV sur les complexes de réplication localisés sur les membranes du RE.

Co-purification de la protéine CI avec les formes précurseurs de VPg :

Une explication simple du rôle de la protéine CI chez les potyvirus consiste à ce que l'activité hélicase de la protéine soit essentielle à la réplication, alors que son extrémité N-terminale, et possiblement l'activité hélicase, seraient essentielles au mouvement du TEV (Carrington *et al.*, 1998). L'interaction mesurée entre les protéines CI et les formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro du TuMV pourrait donc avoir un rôle à jouer dans le transport et la réplication du TuMV.

Chez le TEV, un modèle de transport du virus de cellule-à-cellule a été suggéré. Il implique que les ARN génomiques nouvellement synthétisés et possédant la protéine VPg à leur extrémité 5', s'associent avec les protéines de la capsid, pour former un virion ou un complexe de ribonucléoprotéines (RNP). Le virion ou le complexe RNP s'associerait à son tour à une sorte de canal formé par des projections de la protéine CI localisées aux abords des plasmodesmes de la cellule (Carrington *et al.*, 1998). Le complexe RNP ou encore les projections renfermant les protéines CI pourraient impliquer la présence de l'une ou l'autre des formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro, ce qui faciliterait le transport du virus vers d'autres cellules.

Au niveau de la réplication, la fonction de la protéine virale est peu détaillée (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001). La protéine CI possède les activités hélicase et NTPase. L'importance de l'activité hélicase de la protéine a été appuyée par une étude impliquant des clones infectieux du TEV. Tous les clones infectieux possédant une mutation dans le domaine correspondant à l'activité hélicase de la protéine se sont avérés incapables de se répliquer (Carrington *et al.*, 1998). La co-purification de la protéine CI du TuMV avec les formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro amène un nouvel élément dans le rôle potentiel de cette protéine dans la réplication virale. La protéine CI pourrait être directement recrutée dans le complexe de réplication viral, localisé sur les membranes du RE, par l'intermédiaire de son interaction avec les formes précurseurs de VPg.

L'interaction mesurée entre les protéines CI et 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro du TuMV n'a toutefois pas été démontrée chez le TEV entre les protéines NIa et CI. Fait intéressant, l'interaction entre les protéines NIB et CI a également donnée des résultats négatifs chez ce virus. L'absence d'interaction pourrait s'expliquer par le fait que les protéines NIa et NIB n'interagissent pas physiquement et directement avec la protéine CI. Le recrutement de la protéine CI sur le complexe de réplication serait susceptible d'impliquer une interaction avec l'ARN viral. En effet, la protéine CI possède deux domaines de liaison à l'ARN (Urcuqui-Inchima *et al.*, 2001) et la protéine CI du PVA peut se lier à l'ARN indépendamment de la séquence (Merits *et al.*, 1998). Le recrutement de la protéine CI sur le complexe de réplication pourrait également se faire par l'intermédiaire d'autres protéines non-identifiées ou encore, par des polyprotéines renfermant les formes NIa et NIB (Li *et al.*, 1997). Il se pourrait que la protéine CI soit recrutée sur les vésicules dérivées du RE et contenant les complexes de réplication viral par l'intermédiaire d'une polyprotéine comme la polyprotéine CI-6K₂ identifiée chez le TEV (Restrepo-Hartwig et Carrington, 1994 ; Schaad *et al.*, 1997a) ou les polyprotéines CI-6K₂-VPg-Pro-NIB et CI-6K₂-VPg-Pro observées chez le PVA (Merits *et al.*, 2002). Ce type de polyprotéines n'a pas été retrouvé chez le TuMV. Advenant la possibilité que la protéine CI soit impliquée dans le complexe de réplication du TuMV, les résultats de la co-purification *in planta* laisseraient plutôt envisager une interaction en *trans* de la protéine CI dans le complexe. Ces possibilités devront toutefois être démontrées expérimentalement. Enfin, la détermination du site d'interaction entre les protéines précurseurs 6K₂-VPg-Pro, VPg-Pro et CI ainsi que la création de clones infectieux mutants pour ce domaine d'interaction pourront permettre de déterminer si cette liaison est impliquée dans le processus de réplication et/ou dans le transport du TuMV.

4.3 Modèle de traduction et de réplication du TuMV selon une conformation circulaire de l'ARN génomique

La présente étude a démontré qu'une multitude d'interactions protéine-protéine pouvait avoir lieu avec les formes précurseurs de la protéine VPg du TuMV. Des protéines virales et cellulaires ont été co-localisées et/ou co-purifiées avec les formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro. Dans ce contexte, les formes précurseurs de la protéine VPg pourraient agir comme «protéines de recrutement» permettant l'assemblage des complexes d'initiation de la traduction et/ou de la réplication, deux processus qui semblent étroitement reliés chez le TuMV. De plus, ces interactions seraient également susceptibles de promouvoir une conformation circulaire des ARN viraux comme il a été observé pour la traduction des ARNm cellulaires et chez certains virus à ARN.

Couplage potentiel de la réplication et de la traduction chez le TuMV :

La co-localisation d'une forte concentration d'ARN viral dans les fractions membranaires caractérisées par la présence du RE et des protéines cellulaires et virales eIF4E/eIF(iso)4E, eIF4G/eIF(iso)4G, PABP, CI et RdRp vient fortement appuyer la possibilité que ces protéines soient impliquées dans un complexe de réplication et/ou de traduction du TuMV. Les protéines cellulaires ayant co-localisé et/ou co-purifié *in planta* avec les formes précurseurs de VPg sont connues pour leur implication dans l'initiation de la traduction des ARNm tandis que les protéines virales ayant co-localisé et/ou co-purifié avec ces mêmes formes précurseurs sont impliquées dans la réplication du TuMV. Ces résultats suggèrent fortement que la réplication et la traduction du TuMV soient intimement liées grâce à la présence des formes précurseurs de VPg et leurs interactions avec les protéines cellulaires et virales. Les virus ont un petit génome leur permettant la production d'une quantité limitée de protéines. Ils doivent par conséquent emprunter des protéines à l'hôte ce qui signifie également que les protéines empruntées pour la réplication virale n'ont pas forcément un rôle identique à celui qu'elles possèdent à l'origine dans la cellule (Strauss et Strauss, 1999). Cette possibilité est d'ailleurs appuyée par la présence du facteur eIF3 dans des complexes de réplication hautement purifiés du *Brome mosaic virus* (BMV ; Quadt *et al.*, 1993) et du TMV (Osman et Buck,

1997). La présence du facteur eIF3 s'est avérée essentielle à l'activité de la RdRp des deux virus. Dans le cas du TMV, des évidences *in vitro* suggèrent que le facteur interagit avec un domaine de type méthyltransférase des protéines 126kDa et 183kDa de la RdRp (Taylor et Carr, 2000). Chez le PV, la RdRp (protéine 3CD) purifiée et possédant une activité enzymatique est associée à divers facteurs cellulaires dont le facteur EF-1 α («Eukaryotic translation elongation factor-1 α »), la protéine poly(rC) (PCBP), qui régule la stabilité et l'expression de plusieurs ARNm (Herold et Andino, 2001) et la protéine PABP₁ humaine (Lai, 1998). Chez les potyvirus, la RdRp (NIb) du ZYMV interagit avec la protéine PABP₁ de *C. sativus* L. (concombre) (Wang *et al.*, 2000).

Chez certains virus à ARN de plantes et d'animaux, il a été suggéré que la réplication et la traduction du génome viral étaient couplées (Majahan *et al.*, 1996). Un problème se pose toutefois dans cette situation. En effet, alors que les ribosomes balayent l'ARN viral dans la direction 5' vers 3', la RdRp initie la réplication du même brin d'ARN à partir de l'extrémité 3' et se déplace dans la direction opposée au fur et à mesure qu'elle synthétise le brin d'ARN complémentaire. Il n'est pas encore clair si l'arrangement des ribosomes et de la polymérase sur le brin d'ARN viral permet aux deux processus d'avoir lieu simultanément ou encore, si la traduction et la réplication interfèrent l'un avec l'autre. Certaines réponses à cette question commencent à faire surface par l'étude du PV. Des éléments importants agissant *in cis* et impliqués dans la réplication du PV ont été étudiés au niveau des séquences 5' et 3'-NTR de leur ARN. Même si la majeure partie de la séquence 5'-NTR a pour rôle de diriger l'entrée interne des ribosomes, divers résultats suggèrent maintenant que les séquences correspondant aux IRES auraient également un rôle à jouer dans la réplication du virus. Il semblerait également que la fonction régulatrice de la séquence 5'-NTR soit médiée par des interactions entre les protéines virales et cellulaires, telle que la protéine PCBP. Il a été démontré que cette protéine régulait de façon positive la traduction virale alors que la liaison de la protéine 3CD (RdRp) sur la structure de l'ARN réprimait la traduction et promouvait la synthèse du brin négatif. Le chevauchement des signaux servant à l'initiation de la réplication et de la traduction à même la séquence 5'-NTR constituerait donc une stratégie afin de coordonner l'utilisation de l'ARN génomique pour la

traduction ou la réplication du PV (Garmanik et Andino, 1998). Chez le TuMV, la composition du complexe de protéines co-localisées et/ou co-purifiées qui entourent les formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro pourrait être modifiée selon la concentration de chacune des protéines en fonction des divers étapes de la traduction et de la réplication du virus. Cette régulation serait susceptible de servir «d'interrupteur» entre l'initiation de la réplication et de la traduction des ARN viraux. Ce modèle a aussi été suggéré chez le PV : la concentration de la protéine 3CD dans une subdivision donnée de la cellule déterminerait si la traduction ou la réplication est favorisée (Garmanik et Andino, 1998).

Conformation circulaire de la réplication et de la traduction du TuMV :

Chez le PV, la réplication du virus est bien détaillée (Agol *et al.*, 1999). Il a été démontré que la conformation circulaire de l'ARN viral du PV était requise afin d'initier la synthèse du brin complémentaire. Les deux extrémités de l'ARN viral interagiraient par l'intermédiaire d'un pont de protéines incluant notamment deux protéines cellulaires. La protéine PABP₁ interagirait avec la queue de poly(A) du virus et avec un complexe ribonucléoprotéique localisé à l'extrémité 5'. Une autre protéine cellulaire, la protéine PCBP interagirait avec la protéine PABP₁. La liaison de ces deux derniers facteurs, favoriserait la conformation circulaire du génome viral et permettrait à la forme précurseur 3CD (RdRp), liée à l'extrémité 5' de l'ARN, d'atteindre son site d'activation situé à l'autre extrémité, le long de la queue de poly(A) (Herold et Andino, 2001 ; description de l'initiation de la réplication du PV à la figure 17).

Certaines caractéristiques de la réplication du PV sont susceptibles d'être conservées chez les potyvirus. Il a été suggéré, par exemple, que la polymérase virale N1b du TEV puisse être recrutée sur le complexe de réplication par l'intermédiaire d'interactions protéines-protéines à l'aide du domaine Pro de la VPg-Pro. La protéine VPg-Pro pourrait à son tour être ancrée à la membrane par l'intermédiaire d'une forme précurseure renfermant la polyprotéine 6K₂-VPg-Pro (Li *et al.*, 1997) dont le domaine 6K₂ possède une séquence d'acides aminés hydrophobes permettant la liaison à la membrane (Schaad *et al.*, 1997a). La synthèse du brin complémentaire des potyvirus pourrait être initiée de façon similaire à ce qui a été démontré chez le PV (Herold et Andino, 2001). En effet, la protéine VPg pourrait servir d'amorce à la polymérase virale tel que suggéré chez le TEV (Li *et al.*, 1997). Récemment, il a été démontré, chez le PVA, que la protéine VPg pouvait servir d'amorce à la polymérase virale N1b. La protéine VPg du PVA peut effectivement être uridylylée, par l'intermédiaire de la protéine N1b, ce qui lui permettrait d'entamer la réplication du brin complémentaire (Puustinen *et al.*, 2004 ; section 1.6.7). De plus, chez un autre potyvirus le TVMV, la protéine N1a peut stimuler l'activité de la polymérase N1b du virus. L'interaction entre les protéines N1a et N1b pourrait permettre de rapprocher le domaine VPg à proximité du site d'activation de la polymérase N1b favorisant ainsi l'initiation ou tout autre événement hâtif de la synthèse des brins d'ARN complémentaires (Daros et Carrington, 1997 ; Fellers *et al.*, 1998). Ce modèle converge vers celui qui a été suggéré pour l'interaction entre la forme précurseure 3AB, équivalent fonctionnel de 6K₂-VPg, et la forme précurseure 3CD, équivalent de la RdRp associée à un domaine protéasique, chez le PV (Li *et al.*, 1997). Les virus du supergroupe des «*Picornalike*» ont une organisation génomique semblable et possèdent des stratégies communes d'expression des protéines virales nécessaires à leur réplication. Cette comparaison laisse présager que les mécanismes de réplication et de traduction de ces virus pourraient être similaires (Sadowy *et al.*, 2001). Les diverses conclusions concernant le rapprochement des protéines virales N1a et N1b au niveau du TEV seraient donc susceptibles de s'appliquer également à l'interaction mesurée entre les formes précurseures 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro et RdRp du TuMV.

La co-localisation et les interactions mesurées entre les formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro et les protéines eIF4E/eIF(iso)4E, eIF4G/eIF(iso)4G, PABP₂, RdRp et CI sont possiblement imbriquées les unes avec les autres de sorte à former un complexe stable autour de formes précurseurs de VPg. Ces interactions pourraient favoriser le rapprochement des extrémités 5' et 3' de l'ARN génomique du TuMV comme il a été démontré dans le cas de la traduction des ARNm (Wells *et al.*, 1998 ; voir section 2.2.1) et pour certains virus à ARN de mammifères comprenant le PV (Herold et Andino, 2001; Groft *et al.*, 2002). Chez les potyvirus, la protéine PABP₂ est liée à la queue de poly(A) des ARN viraux alors que la protéine VPg lie leur extrémité 5'. Ainsi, le rapprochement des deux extrémités de l'ARN génomique du TuMV pourrait être assuré par la liaison directe des protéines VPg-Pro et PABP₂ tel que démontré *in planta* (présente étude) et *in vitro* (Léonard *et al.*, 2004). Le lien entre ces deux protéines pourrait également se faire par l'intermédiaire d'un dimère eIF(iso)4E/eIF(iso)4G comme il est observé chez les ARNm (Le *et al.*, 1997a). En effet, le facteur eIF(iso)4G possède un domaine de liaison à la protéine PABP et il possède également un autre domaine d'interaction avec le facteur eIF(iso)4E (Gingras *et al.*, 1999). Les facteurs eIF4E, à leur tour lie le domaine VPg de la protéine VPg-Pro (Léonard *et al.*, 2000). De plus, dans des essais d'interaction *in vitro* le facteur eIF(iso)4G a interagi avec la protéine VPg-Pro en présence du facteur eIF(iso)4E (M.J. Fortin, résultats non-publiés). Il serait donc possible qu'un complexe VPg-Pro-eIF(iso)4E-eIF(iso)4G-PABP₂ puisse maintenir les deux extrémités de l'ARN viral du TuMV en étroite interaction. L'importance de la protéine PABP₂ dans la conformation circulaire de l'ARN viral du TuMV pourra être démontrée par une approche similaire à celle employée par Lellis *et al.* (2002) et Duprat *et al.* (2002), dans laquelle le gène *eIF(iso)4E*, inopérant dans des plantes d'*A. thaliana*, a conféré une protection contre le TEV et le TuMV. Une plante de *B. perviridis* «knockout» pour le gène *PABP₂* empêcherait possiblement la réplication du TuMV. Ce résultat viendrait appuyer l'hypothèse de conformation circulaire suggérée pour la traduction et/ou la réplication du TuMV.

Interactions intramoléculaires des complexes de traduction et de réplication virale :

Les protéines cellulaires et virales ayant été co-localisées et co-purifiées avec les formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro sont également susceptibles d'interagir entre elles pour faciliter certaines interactions intramoléculaires particulières à la réplication et/ou la traduction du TuMV. Chez le ZYMV par exemple, la polymérase virale Nib interagit avec la protéine PABP₁ de *C. sativus* L. (concombre ; Wang *et al.*, 2000). Cette interaction pourrait «solidifier» davantage la conformation circulaire des ARN viraux à traduire et à répliquer et faciliter l'accès directe de la polymérase à l'extrémité 3' de l'ARN viral. Il serait possible qu'une telle interaction existe chez le TuMV. Elle devra toutefois être démontrée expérimentalement. Des interactions intramoléculaires sont aussi susceptibles de prendre part avec la protéine CI du TuMV. Cette protéine possède une activité hélicase et NTPase nécessaire à la réplication du TEV (Carrington *et al.*, 1998). La protéine CI pourrait avoir été co-purifiée avec les formes précurseurs de VPg par l'intermédiaire d'interactions avec la protéine RdRp ou l'ARN viral à l'intérieur d'un complexe VPg-Pro-RdRp-CI-ARN. Ce complexe pourrait faciliter la réplication du virus. Enfin, l'interaction entre les facteurs eIF4E et les formes précurseurs de VPg est susceptible de stimuler d'autres interactions intramoléculaires. Les facteurs eIF4E pourraient stimuler le recrutement d'autres protéines impliquées dans l'initiation de la traduction ou encore faciliter une étape du recrutement de la polymérase sur le complexe de réplication (Schaad *et al.*, 2000a). Encore une fois, toutes ces possibilités devront être démontrées expérimentalement.

Les protéines cellulaires et leur implication dans la traduction du TuMV :

La co-localisation et la co-purification des protéines cellulaires eIF(iso)4E/eIF4E, eIF(iso)4G/eIF4G et PABP₂ avec les formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro laisse entrevoir, à prime abord, que leur rôle dans l'initiation de la traduction du TuMV est identique à celle des ARN messagers. En effet, il a été démontré que la protéine VPg-Pro mimait la fonction de la coiffe des ARNm en liant les facteurs eIF(iso)4E (Léonard *et al.*, 2000). Il serait donc possible que la liaison VPg-Pro-eIF(iso)4E soit responsable du

recrutement des autres facteurs impliqués dans l'initiation de la traduction tels que les facteurs eIF4G et la protéine PABP₂, voire d'autres facteurs non-étudiés comme les facteurs eIF4A, eIF4B et eIF3. Le recrutement des ribosomes sur l'ARN génomique du TuMV se ferait donc de façon identique à ce qui a été observé chez les ARNm cellulaires. Cependant, chez le TEV, l'ARN génomique du virus peut être traduit et ce, même en absence de la protéine NIa ou VPg liée à l'extrémité 5' de l'ARN (Carrington et Freed, 1990 ; Gallie *et al.*, 1995). Par conséquent, chez ce virus, si les facteurs eIF4E servent à faciliter l'initiation de la traduction comme chez les ARNm cellulaires, ce processus est probablement réalisé en collaboration avec d'autres protéines impliquées dans l'initiation de la traduction de type indépendante de la coiffe (Schaad *et al.*, 2000). La séquence 5'-NTR du TEV renferme effectivement un IRES et peut assurer, *in vitro*, la traduction de l'ARN viral de façon indépendante de la coiffe (Carrington et Freed, 1990). Chez ce virus, la fonction de l'IRES est stimulée par la présence de la protéine PAPB, ce qui laisse suggérer que cette protéine pourrait être impliquée dans le recrutement du facteur eIF4G sur l'IRES (Gallie, 2001). Cette possibilité est appuyée par la co-localisation et/ou la co-purification des protéines eIF(iso)4G et PABP₂ chez le TuMV. Le TuMV possède également un IRES à l'extrémité 5'-NTR de son ARN génomique (Basso *et al.*, 1994). Les protéines cellulaires même les protéines virales CI et RdRp co-localisées et co-purifiées avec les formes précurseurs de VPg pourraient contribuer à la stabilisation du processus de traduction et/ou être directement impliquées dans le recrutement des ribosomes à proximité de l'IRES en plus d'avoir un rôle potentiel dans la réplication du TuMV.

Perspectives d'avenir :

Les résultats obtenus tout au long de cette étude ont d'abord montré que le patron d'expression des isomères eIF4E était modifié suite à une infection au TuMV. Il a également été démontré que les protéines cellulaires et virales eIF4E/eIF(iso)4E, eIF4G/eIF(iso)4G, PABP₂, RdRp et CI pouvaient être co-localisées et co-purifiées en présence des formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro du TuMV. Ces divers résultats viennent supporter la possibilité que la traduction et la réplication du TuMV pourraient être effectuées selon une conformation circulaire de l'ARN viral à l'aide des formes précurseurs de VPg comme point d'ancrage assurant le recrutement des protéines nécessaires à ces deux processus.

À partir de ces résultats, il sera nécessaire de détailler davantage la ou les fonctions de ces interactions pour le TuMV. À titre d'exemple, il serait pertinent de vérifier si la protéine CI est essentielle à la réplication du virus ou plutôt à son transport de cellule-à-cellule. Il serait aussi important de mesurer l'importance de l'isoforme PABP₂ au niveau de la réplication et/ou de la traduction du virus. Et également de vérifier si d'autres isoformes PABP de *B. perviridis* sont susceptibles de prendre la relève en absence de la protéine PABP₂.

Il sera intéressant de vérifier si les protéines 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro assurent la co-purification d'autres protéines cellulaires impliquées dans l'initiation de la traduction. Ces protéines pourraient être les facteurs eIF4A, eIF2 α et eIF3 dont la fonction est connue au niveau de l'initiation de la traduction des ARNm cellulaires (Gallie, 2002) et qui sont recrutés ou ciblés chez certains autres virus à ARN (Daughenbaugh *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2001). La découverte d'interactions avec d'autres protéines cellulaires pourra éventuellement fournir des pistes d'études supplémentaires dans le domaine de la recherche médicale sur le groupe des virus «*Picornalike*» affectant les animaux et notamment l'Homme.

Enfin une connaissance plus approfondie des interactions entre les facteurs cellulaires de l'hôte et le TuMV permettra fort possiblement de créer des moyens de lutte «propres» contre les infections causées par les potyvirus. Par exemple, deux substitutions d'acides aminés dans la séquence du facteur eIF4E ont été nécessaires pour conférer une résistance récessive aux cultivars de piments étudiés par Ruffel *et al.*, (2002). Les mutations n'ont pas été introduites dans une séquence conservée du facteur eIF4E comme dans les sites de liaison avec d'autres facteurs tels que les facteurs eIF4G. Ce type de résistance pourrait être incluse pour l'ensemble des facteurs de l'hôte interagissant avec les potyvirus. Ainsi, en créant des résistances polygéniques (résistance horizontale), un cultivar donné serait plus apte à faire face à d'éventuelles adaptations des potyvirus. En effet, il existe des cas de résistance monogénique (résistance verticale) qui ont été contournées rapidement par modification et adaptation du génome du pathogène (Agrios, 1997 : 128). Il serait peu probable que ces cultivars modifiés génétiquement présentent des dangers pour l'environnement et les humains.

Conclusion

Le TuMV, membre de la famille des potyvirus, est le plus important des virus affectant la culture de plantes de la famille des brassicacées telles que le colza et les choux (Tomlison, 1987). Plusieurs études ont été réalisées au sujet de cette famille de virus. Cependant, de façon générale, les infections virales et leur impacte sur la synthèse protéique cellulaire des végétaux n'ont pas été étudiées autant que chez les animaux (Aranda et Maule, 1998). Chez les potyvirus, une avancée importante a été réalisée par la découverte de l'interaction la protéine VPg-Pro du TuMV et du facteur d'initiation de la traduction eIF(iso)4E d'*A. thaliana*. Cette interaction s'est avérée essentielle au succès de l'infection du potyvirus. Il a été suggéré que le facteur eIF(iso)4E était impliqué dans la traduction des ARN viraux et possiblement dans leur réplication (Wittmann *et al.*, 1997 ; Léonard *et al.*, 2000).

À partir de ce résultat, il a été proposé, dans le cadre de cette étude, que la protéine VPg du TuMV servait de point d'ancrage aux protéines cellulaires et virales impliquées dans l'initiation de la réplication et de la traduction du virus. Il a également été suggéré que les deux processus s'effectuaient selon une conformation circulaire de l'ARN viral. Enfin, vue l'importance du facteur eIF(iso)4E dans le succès de l'infection du TuMV, le patron d'expression des isoformes eIF4E a été étudié chez *B. perviridis*.

Au cours de l'étude, l'expression des isoformes eIF4E et eIF(iso)4E suivant une infection au TuMV a été analysée par immunobuvardages. Par la suite, la co-localisation des formes précurseuses de VPg et de protéines impliquées dans l'initiation de la traduction des ARNm cellulaires ainsi que de protéines virales a été analysée par fractionnement sur gradient de sucrose d'une préparation de feuilles *B. perviridis* saines ou infectées au TuMV. Les diverses fractions issues de ces gradients ont été analysées par immunobuvardages. Enfin, les formes précurseuses 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro ont été purifiées *in planta* par chromatographie d'affinité au nickel. La co-purification de certaines protéines cellulaires et virales avec ces formes précurseuses a une fois de plus été analysée par immunobuvardages.

Les résultats obtenus ont d'abord montré que l'expression des isomères eIF4E et eIF(iso)4E était modifiée suite à l'infection des plantes de *B. perviridis* par le TuMV. Seul l'isomère eIF(iso)4E a été détecté dans les plantes saines alors que les deux isoformes étaient présentes dans les plantes infectées. Il est possible que les deux isoformes aient des fonctions distinctes comme par exemple celle de se lier à des ARNm ayant une structure précise à leur extrémité 5'. L'expression de l'isomère eIF4E chez les plantes infectées pourrait par ailleurs correspondre à un ajustement de la cellule afin de réduire la pression exercée par la réplication du TuMV sur la traduction de ses propres ARNm.

Le fractionnement sur gradient de sucrose a permis de déterminer que les formes précurseurs 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro du TuMV étaient localisées dans des fractions membranaires caractérisées par la présence du RE. Ces mêmes formes précurseurs ont également été co-localisées avec les protéines eIF4E/eIF(iso)4E, eIF(iso)4G, PABP₂ et RdRp. La purification *in planta* des formes précurseurs de VPg a ensuite permis de co-purifier les protéines cellulaires eIF(iso)4E/eIF4E et PABP₂ ainsi que les protéines virales RdRp et CI. Ce résultat vient fortement appuyer l'hypothèse selon laquelle la protéine VPg-Pro pourrait servir de point d'ancrage à un complexe de protéines cellulaires et virales impliquées dans la traduction et la réplication du TuMV. Il est nécessaire de rajouter que la forme précurseur 6K₂-VPg-Pro semble également impliquée dans ce processus. Les résultats obtenus suggèrent aussi que le rapprochement des extrémités 5' et 3' de l'ARN viral pourrait être assuré par une interaction directe entre les protéines PABP₂ et VPg-Pro ou encore par l'intermédiaire d'un complexe VPg-Pro-eIF(iso)4E-eIF(iso)4G-PABP₂. L'une ou l'autre de ces interactions pourrait donc favoriser la traduction et la réplication du TuMV selon une conformation circulaire de son ARN génomique.

Dans l'immédiat, il sera important de caractériser davantage les interactions obtenues entre les protéines 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro et les protéines cellulaires et virales eIF4E/eIF(iso)4E, eIF4G/eIF(iso)4G, PABP₂, RdRp et CI. Un des projets actuellement en cours consiste à vérifier l'importance de l'isoforme PABP₂ dans la réplication et/ou la

traduction du TuMV. Pour y arriver, des plantes de *B. perviridis* dont le gène *PABP₂* est inopérant seront inoculées avec le TuMV. Il serait également pertinent de caractériser d'avantage la fonction et le mode d'action des isoformes eIF4E. Il est probable que de nouvelles données à ce sujet pourront tout aussi bien s'appliquer aux cellules végétales et aux cellules animales.

L'étude des interactions entre les protéines cellulaires et les potyvirus permettra éventuellement de faciliter le développement de résistances polygéniques contre les infections causées par ces virus. L'adaptation des pathogènes face à ce type de résistance est habituellement plus lente. De plus, les interactions mesurées dans le cadre de ce type d'étude fondamentale pourraient éventuellement fournir de nouvelles cibles d'intérêt pour le traitement de divers virus faisant partie du super-groupe des virus «*Picornavirus-like*».

Remerciements

Je tiens à remercier mon directeur de recherche, Jean-François Laliberté, pour l'encadrement qu'il m'a offert au cours des années que j'ai passées à l'Institut Armand-Frappier. J'ai grandement apprécié l'opportunité qu'il m'a offert d'effectuer un stage d'un mois dans les laboratoires de l'INRA, à Bordeaux en France.

Un gros merci à mes collègues, je pense particulièrement à Chantal et Christian, qui m'ont aidé de toutes les façons au laboratoire. Merci à mes amis des autres laboratoires. J'ai passé de beaux et bons moments en leur compagnie.

Je remercie les membres de l'association étudiante pour leur énergie et leur enthousiasme contagieux. Ils m'ont bien fait rire. J'ai eu un plaisir fou à organiser les activités étudiantes, à aller aux congrès de la FEUQ et à jouer au frisbee et au hockey en leur compagnie.

Merci au laboratoire d'Olivier LeGall, de l'INRA à Bordeaux, de nous avoir si gentiment reçues, Véronique et moi. J'ai appris énormément par l'intermédiaire des membres de ce laboratoire et plus particulièrement avec Thierry Michon.

Je tiens à remercier la Fondation Armand-Frappier et mon directeur de recherche pour leur appui financier grandement apprécié.

Enfin et surtout, je tiens à remercier ma famille et tout spécialement mes parents pour leur soutien et leur encouragement constants. Papa, maman, c'est assurément grâce à vous que j'ai pu finaliser ce projet. Et c'est aussi à vous deux que je dédie tout le travail que j'ai pu y consacrer.

Bibliographie

- Agol, V. I., A.V. Paul et E. Wimmer. (1999). Paradoxes of the replication of picornaviral genomes. *Virus Research*, 62, 129-147.
- Agrios, G. N.. (1997). *Plant pathology*. San Diego, Academic Press.
- Ali, I. K., L. McKendrick, S.J. Morley et R.J. Jackson. (2001a). Activity of the *Hepatitis A* virus IRES requires association between the cap-binding translation initiation factor (eIF4E) and eIF4G. *Journal of Virology*, 75, 7854-7863.
- Ali, I. K., L. McKendrick, S.J. Morley et R.J. Jackson. (2001b). Truncated initiation factor eIF4G lacking an eIF4E binding site can support capped mRNA translation. *The EMBO Journal*, 20, 4233-4242.
- Allen, M. L., A.M. Metz, R.T. Timmer, R.E. Rhoads et K.S. Browning. (1992). Isolation and sequence of cDNA encoding the subunits of the isozyme form of wheat protein synthesis initiation factor 4F. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 23232-23236.
- Andino, R., N. Bøddeker, D. Silvera et A. V. Gamarnik. (1999). Intracellular determinants of picornavirus replication. *Trends in Microbiology*, 7, 76-82.
- Aranda, M. A., M. Escaler, D. Wang et A.J. Maule. (1996). Induction of HSP70 and polyubiquitin expression associated with plant virus replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 15289-15293.
- Aranda, M. et A. Maule. (1998). Virus-induced gene shutoff in animals and plants. *Virology*, 243, 261-267.
- Aubourg, S., M. Kreis et A. Lecharny. (1999). The DEAD box RNA helicase family in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, 27, 628-636.
- Bailey-Serres, J. (1999). Selective translation of cytoplasmic mRNA in plants. *Trends in Plant Science*, 4, 142-148.
- Basso, J., P. Dallaire, P.J. Charest, Y. Devantier et J.F. Laliberté. (1994). Evidence for an internal ribosome entry site within the 5' non-translated region of *Turnip mosaic potyvirus* RNA. *Journal of General Virology*, 75, 3157-3165.
- Belostotsky, D. A. (2003). Unexpected complexity of poly(A)-binding protein gene families in flowering plants : three conserved lineage that are at least 200 million years old and possible auto- and cross-regulation. *Genetics Society of America*, 163, 311-319.
- Berkel, H. J., E.A. Turbat-Herrera, R. Shi et A. de Benedetti. (2001). Expression of the translation initiation factor eIF4E in the polyp-cancer sequence in the colon. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 10, 663-666.
- Bi, X. et D. J. Goss (2000). Wheat germ poly(A)-binding protein increases the ATPase and the RNA helicase activity of translation initiation factors eIF4A, eIF4B and eIF(iso)4F. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 17740-17746.
- Borgstrom, B. et I. E. Johansen. (2001). Mutations in *Pea seedborn mosaic virus* genome-linked protein VPg alter pathotype-specific virulence in *Pisum sativum*. *Molecular Plant Microbe Interaction.*, 14, 707-714.
- Boston, R. S., P. V. Viitnen et E. Vierling. (1996). Molecular chaperones and protein folding in plants. *Plant Molecular Biology*, 32, 191-222.

- Browning, K. S., J. Humphreys, W. Hobbs, G.B. Smith et J.M. Ravel. (1990). Determination of the amounts of the proteins synthesis initiation and elongation factors in wheat germ. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 17967-17973.
- Browning, K. S. (1996). The plant translational apparatus. *Plant Molecular Biology*, 32, 107-144.
- Browning, K. S., D.R. Gallie, J.W.B. Hershey, A.G. Hinnebusch, U. Maitra, W.C. Merrick et C. Norbury. (2001). Unified nomenclature for the subunits of eukaryotic initiation factor 3. *Trends in Biochemical Sciences*, 26, 284.
- Buck, K. W. (1996). Comparison of the replication of positive-stranded RNA viruses of plants and animals. *Advances in Virus Research*, 47 : 159-251.
- Bushell, M., W. Wood, G. Carpenter, V.M. Pain, S.J. Morley et M.J. Clemens. (2001). Disruption of the interaction of mammalian protein synthesis eukaryotic initiation factor 4B with the poly(A)-binding protein by caspase- and viral protease-mediated cleavages. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 23922-23928.
- Bushell, M. et P. Sarnow. (2002). Hijacking the translational apparatus by RNA viruses. *The Journal of Cell Biology*, 158, 395-399.
- Carrington, J. C., R. Haldeman, V.V. Dolja et M.A. Restrepo-Hartwig. (1993). Internal cleavage and *trans*-proteolytic activities of the VPg-proteinase (NIa) of *Tobacco etch potyvirus in vivo*. *Journal of Virology*, 67, 6995-7000.
- Carrington, J. C., P.E. Jensen et M.C. Schaad. (1998). Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *The Plant Journal*, 14, 393-400.
- Carrington, J. C. et D. D. Freed. (1990). Cap-independent enhancement of translational by a plant potyvirus 5' nontranslated region. *Journal of Virology*, 64, 1590-1597.
- Daròs, J. A., M.C. Schaad et J.C. Carrington. (1999). Functional analysis of the interaction between VPg-proteinase (NIa) and RNA polymerase (NIb) of *Tobacco etch potyvirus*, using conditional and suppressor mutants. *Journal of Virology*, 73, 8732-8740.
- Daròs, J. A. et J. C. Carrington. (1997). RNA binding activity of NIa proteinase of *Tobacco etch potyvirus*. *Virology*, 237, 327-336.
- Daughenbaugh, K. F., C.S. Fraser, J.W.B. Hershey et M.E. Hardy. (2003). The genome-linked protein VPg of the *Norwalk virus* binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *The EMBO Journal*, 22, 2852-2859.
- De Kerchove d'Exaerde, A., P. Supply, J.-P. Dufour, P. Bogaerts, D. Thinès, A. Goffeau et M. Boutry. (1995). Functional complementation of a null mutation of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane H⁺-ATPase by a plant H⁺-ATPase gene. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 23828-23837.
- Dever, T. E. (2002). Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell*, 108, 545-556.
- Dinkova, T. D., R. Aguilar et E. Sanchez de Jiménez. (2000). Expression of maize eukaryotic initiation factor (eIF) iso4E is regulated at the translational level. *Biochemical Journal*, 351, 825-831.
- Dinkova, T. D. et E. Sanchez de Jiménez. (1999). Differential expression and regulation of translation initiation factors-4E and -iso4E during maize germination. *Physiologia Plantarum*, 107, 419-425.

- Dougherty, W. G. et T. D. Parks. (1991). Post-translational processing of the *Tobacco etch virus* 49kDa small nuclear inclusion polyprotein : identification of an internal cleavage site and delimitation of VPg and proteinase domains. *Virology*, 183, 449-456.
- Dunoyer, P., C. Thomas, S. Harrison, F. Revers et A. Maule. (2004). A cysteine-rich plant protein potentiates potyvirus movement through an interaction with the virus genome-linked protein VPg. *Journal of Virology*, 78, 2301-2309.
- Duprat, A., C. Caranta, F. Revers, B. Menaud, K. S. Browning et C. Robaglia. (2002). The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *The Plant Journal*, 32, 927-934.
- Escaler, M., M.A. Aranda, C.L. Thomas et A.J. Maule. (2000b). Pea embryonic tissues show common responses to the replication of a wide range of viruses. *Virology*, 267, 318-325.
- Essau, K. (1977). *Anatomy of seed plants*. (Seconde édition ed.). New York: John Wiley & Sons.
- Fellers, J., J. Wan, Y. Hong, G.B. Collins et A.G. Hunt. (1998). *In vitro* interactions between a potyvirus-encoded, genome-linked protein and RNA-dependent RNA polymerase. *Journal of General Virology*, 79, 2043-2049.
- Gale, M., S.-L. Tan et M.G. Katze. (2000). Translational control of viral gene expression in eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 64, 239-280.
- Gallie, D. R., R.L. Tanguay et V. Leathers. (1995). The *Tobacco etch viral* 5' leader and poly(A) tail are functionally synergistic regulators of translation. *Genes*, 165, 233-238.
- Gallie, D.R., H. Le, C. Caldwell, R.L. Tanguay, N.X. Hoang et K.S. Browning. (1997). The phosphorylation state of translation initiation factors is regulated developmentally and following heat shock in wheat. *The Journal of Biological Chemistry*, 272, 1046-1053.
- Gallie, D. R., H. Le, R.L. Tanguay et K.S. Browning. (1998). Translation initiation factors are differently regulated in cereals during development and following heat shock. *The Plant Journal*, 14, 715-722.
- Gallie, D. R. (2001). Cap-independent translation conferred by the 5' leader of *Tobacco etch virus* is eukaryotic initiation factor 4G dependent. *Journal of Virology*, 75, 12141-12152.
- Gallie, D. R. (2002). Protein-protein interactions required during translation. *Plant Molecular Biology*, 50, 949-970.
- Gallie, D. R. e. K. S. Browning. (2001). eIF4G functionally differs from eIFiso4G in promoting internal initiation, cap-independent translation and translation of structured mRNAs. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 36951-36960.
- Gamarnik, A. V. et R. Andino. (1998). Switch from translation to RNA replication in a positive-stranded RNA virus. *Genes and Development*, 12, 2293-2304.
- Gething, M. J. (1999). Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Cell and Developmental Biology*, 10, 465-472.
- Gingras, A.-C., B. Raught et N. Soneberg. (1999). eIF4 initiation factors : effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annual Review of Biochemistry*, 68, 913-963.

- Gradi, A., Y.V. Svitkin, H. Imataka et N. Sonenberg. (1998). Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIFGII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 11089-11094.
- Groft, C. M. e. S. K. B. (2002). Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. *Molecular Cell*, 9, 1273-1283.
- Guo, D., M.-L. Rajamäki, M. Saarna et J.P.T. Valkonen. (2001). Towards a protein interaction map of potyviruses : proteine interaction matixes of two *Potyviruses* based on the yeast two-hybrid system. *Journal of General Virology*, 82, 935-939.
- Gutiérrez-Escolano, A. L., M. Vázquez-Ochoa, J. Escobar-Herrera et J. Hernández-Acosta. (2003). La, PTB, and PAB proteins bind to the 3' untranslated region of *Norwalk virus* genomic RNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 311, 759-766.
- Han, H. et H. Sanfaçon. (2003). *Tomato ringspot virus* proteins containing the nucleoside triphosphohate binding domain are transmembrane proteins that associate with the endoplasmic reticulum and cofractionate with replication complexes. *Journal of Virology*, 77, 523-534.
- Havelda, Z., et A.J. Maule. (2000). Complex spatial responses to *Cucumber mosaic virus* infection in susceptible *Cucurbita pepo* cotyledons. *The Plant Cell*, 12, 1975-1985.
- Herold, J. et R. Andino. (2001). Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Molecular Cell*, 7, 581-591.
- Hiremath, L. S., S. T. Hiremath, W. Rychlik, S. Joshi, L.L. Domier et R.E. Rhoads. (1989). *In vitro* synthesis, phosphorylation and localization on 48S initiation complexes of human protein synthesis initiation factor 4E. *The Journal of Biological Chemistry*, 264, 1132-1138.
- Hong, Y., K. Levay, J.K. Murphy, P.G. Klein, J.G. Shaw et A.G. Hunt. (1995). A potyvirus polymerase interacts with the viral coat protein and VPg in yeast cells. *Virology*, 214, 159-166.
- Hong, Y. et A. G. Hunt. (1996). RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. *Virology*, 226, 146-151.
- Huang, X. et W. Miller. (1991). A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *Advances in Applied Mathematics*, 12 : 337-357.
- Ivanov, K. I., P. Puustinen, A. Merits et K. Mäkinen. (2001). Phosphorylation down-regulates the RNA binding function of the coat protein of *Potato virus A*. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 13530-13540.
- Jenner, C. E., F. Sanchez, S.B. Nettleship, G.D. Foster, F. Ponz et J.A. Walsh. (2000). The cylindrical inclusion gene of *Turnip mosaic virus* encodes a pathogenic determinant to the Brassica resistance gene *TuRB01*. *Molecular Plant-Microbe Interactions.*, 10, 1102-1108.
- Johansen, E. I., O. S. Lund, C. K. Hjulsager et J. Laursen. (2001). Recessive resistance in *Pisum sativum* and potyvirus pathotype resolved in a gene-for-cistron correspondance between host and virus. *Journal of Virology*, 75, 6609-6614.
- Kawaguchi, R. et J. Bailey-Serres. (2002). Regulation of translational initiation in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 460-465.

- Keller, K. E., I.E. Johansen, R.R. Martin et R.O. Hampton. (1998). Potyvirus genome-linked protein (VPg) determines *Pea Seed-Borne Mosaic Virus* pathotype-specific virulence in *Pisum sativum*. *Molecular Plant Microbe Interaction.*, *11*, 124-130.
- Klein, P. G., R.R. Klein, E. Rodriguez-Cerero, A. G. Hunt et J.G. Shaw. (1994). Mutational analysis of the *Tobacco vein mottling virus* genome. *Virology*, *204*, 759-769.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680-685.
- Lai, M. M. C. (1998). Cellular factors in the transcription and replication of viral RNA genomes : a parallel to DNA-dependent RNA transcription. *Virology*, *244*, 1-12.
- Laliberté, J.-F., O. Nicolas, H. Chatel, C. Lazure et R. Morosoli. (1992). Release of a 22-kDa protein derived from the amino-terminal domain of the 49-kDa NIa of *Turnip mosaic potyvirus* in *Escherichia coli*. *Virology*, *190*, 510-514.
- Lamphear, B. J., R. Kirchweger, T. Skern, R.E. Rhoads. (1995). Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. *Journal of Biological Chemistry*, *270*, 21975-21983.
- Laurière, M., C Laurière , M.J. Chrispeels, K.D. Johnson et A. Sturm. (1989). Characterization of a xylose-specific antiserum that reacts with the complex asparagine-linked glycans of the extracellular and vacuolar glycoproteins. *Plant Physiology*, *90*, 1182-1188.
- Le, H., R.L. Tanguay, M.L. Balasta, C.-C. Wei, K.S. Browning, A.M. Metz, D.J. Goss et D.R. Gallie. (1997). Translation initiation factor eIF(iso)4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. *The Journal of Biological Chemistry*, *272*, 16247-16255.
- Le, H., K.S. Browning et D.R. Gallie. (2000). The phosphorylation state of poly(A)-binding protein specifies its binding to poly(A) RNA and its interaction with eukaryotic initiation factor (eIF) 4F, eIFiso4F, and eIF4B. *The Journal of Biological Chemistry*, *275*, 17452-17462.
- Lellis, A. D., K. D. Kasschau, S. A. Whitham, J. C. Carrington. (2002). Loss-of-Susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Current Biology*, *12*, 1046-1051.
- Léonard, S., D. Plante, S. Wittmann, N. Daigneault, M.G. Fortin et J.-F. Laliberté. (2000). Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *Journal of Virology*, *74*, 7730-7737.
- Léonard, S., C. Viel, C. Beauchemin, N. Daigneault, M.G. Fortin et J.-F. Laliberté. (2004). Interaction of VPg-Pro of *Turnip mosaic virus* with the translation initiation factor 4E and the poly(A)-binding protein *in planta*. *Journal of General Virology*, *85*, 1055-1063.
- Li, X., Y. Wu, D.-Z. Zhang, J. W. Gillikin, R. S. Boston, V. R. Franceschi et T. W. Okita. (1993). Rice prolamine protein body biogenesis : a BiP-mediated process. *Science*, *262*, 1054-1056.
- Li, X., Y. Wu, D.-Z. Zhang, J. W. Gillikin, R. S. Boston, V. R. Franceschi et T. W. Okita. (1998). The molecular chaperone calnexin associates with the vacuolar H⁺-ATPase from oat seedlings. *The Plant Cell*, *10*, 119-130.
- Li, X. H., P. Vladez, R. E. Olvera et J. C. Carrington. (1997). Functions of the *Tobacco etch virus* RNA polymerase (NIb) : subcellular transport and protein-protein interactions with VPg/proteinase (NIa). *Journal of Virology*, *71*, 1598-1607.

- Li, W., N. Ross-Smith, C.G. Proud et G.J. Belsham. (2001). Cleavage of translation initiation factor 4A1 (eIF4A1) but not eIF4AII by *Foot-and-mouth disease virus* 3C protease : identification of the eIF4A1 cleavage site. *FEBS Lett.*, 507, 1-5.
- Lord, J. M., T. Kagawa, T.S. Moore et H. Beevers. (1973). Endoplasmic reticulum as the site of lecithin formation in castor bean endosperm. *The Journal of Cell Biology*, 57, 659-667.
- Mahajan, S., V.V. Dolja et J.C. Carrington. (1996). Roles of the sequence encoding *Tobacco etch virus* capsid protein in genome amplification : requirements for the translation process and a cis-active element. *Journal of Virology*, 70, 4370-4379.
- Maia, I. G., A. Haenni et F. Bernardi. (1996). Potyviral HCPro: a multifunctional protein. *Journal of General Virology*, 77, 1335-1341.
- Maule, A., V. Leh et C. Lederer. (2002). The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Current Opinion in Plant Biology*, 5, 1-6.
- Ménard, R., H. Chatel, R. Dupras, C. Plouffe et J.-F. Laliberté. (1995). Purification of *Turnip mosaic potyvirus* viral protein genome-linked proteinase expressed in *Escherichia coli* and development of a quantitative assay for proteolytic activity. *European Journal of Biochemistry*, 229, 107-112.
- Merits, A., D. Guo et M. Saarma. (1998). VPg, coat protein and five non-structural proteins of *Potato A potyvirus* bind RNA in a sequence-unspecific manner. *Journal of General Virology*, 79, 3123-3127.
- Merits, A., M.-L. Rajamäki, P. Lindholm, P. Runenberg-Roos, T. Kekarainen, P. Puustinen, K. Mäkelaäinen, J.P.T. Valkonen et M. Saarma. (2002). Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells. *Journal of General Virology*, 83, 1211-1221.
- Michelet, B. et M. Boutry. (1995). The plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiology*, 108, 1-6.
- Murphy, J. F., W. Rychlik, R.E. Rhoads, A.G. Hunt et J.G. Shaw. (1991). A tyrosine residue in the small nuclear inclusion protein of *Tobacco vein mottling virus* links the VPg to viral RNA. *Journal of Virology*, 65, 511-513.
- Murphy, J. F., P.G. Klein, A.G. Hunt et J.G. Shaw. (1996). Replacement of the tyrosine residue that links a potyviral VPg to the viral RNA is lethal. *Virology*, 220, 535-538.
- Nicaise, V., S. German-Retana, R. Sanjuan, M.-P. Dubrana, M. Mazier, B. Maisonnneuve, T. Candresse, C. Caranta et O. Le Gall. (2003). The eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) controls lettuce susceptibility to the potyvirus *Lettuce mosaic virus*. *Plant Physiology*, 132, 1272-1282.
- Nicolas, O., S. W. Dunnington, L.F. Gotow, T. P. Pirone et G. M. Hellmann. (1997). Variations in the VPg Proteins allow a *Potyvirus* to overcome *va* gene resistance in tobacco. *Virology*, 237, 452-459.
- Nicolas, O. et J.-F. Laliberté. (1992). The complete nucleotide sequence of *Turnip mosaic potyvirus* RNA. *Journal of General Virology*, 73, 2785-2793.
- Ohshima, K., Y. Yamaguchi , R.Hirota, T. Hamamoto , K. Tomimura, Z. Tan , T. Sano, F. Azuhata, J.A. Walsh , J. Fletcher, J. Chen , A. Gera et A. Gibbs. (2002). Molecular evolution of *Turnip mosaic virus* : evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *Journal of General Virology*, 83, 1511-1521.

- Oruetxebarria, I., D. Guo, A. Merits, K. Mäkinen, M. Saarma et J.P.T. Valkonen. (2001). Identification of the genome-linked protein in virions of *Potato virus A*, with comparison to other members in genus *Potyvirus*. *Virus Research*, 73, 103-112.
- Osman, T. A. e. K. W. B. (1997). The *Tobacco mosaic virus* RNA polymerase complex contains a plant protein related to the RNA-binding subunit of yeast eIF3. *Journal of virology*, 71, 6075-6082.
- Palanivelu, R., D.A. Belostotsky and R.B. Meagher. (2000a). *Arabidopsis thaliana* poly(A) binding protein 2 (PAB₂) functions in yeast translational and mRNA decay processes. *The Plant Journal*, 22, 187-198.
- Palanivelu, R., D.A. Belostotsky and R.B. Meagher. (2000b). Conserved expression of *Arabidopsis thaliana* poly(A) binding protein 2 (PAB₂) in distinct vegetative and reproductive tissues. *The Plant Journal*, 22, 199-210.
- Paul, A. V., J.H. van Boom, D. Filippov et E. Wimmer. (1998). Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature*, 393, 280-284.
- Pedrazzini, E., G. Giovinazzo, A. Bielli, M. de Virgilio, L. Frigerio, M. Pesca, F. Faoro, R. Bollini, A. Ceriotti et A. Vitale. (1997). Protein quality control along the route to the plant vacuole. *The Plant Cell*, 9, 1869-1880.
- Poulin, F., A.C. Gingras, H. Olsen, S. Chevalier et N. Sonenberg. (1998). 4E-BP, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 14002-14007.
- Puustinen, P., M.-L. Rajamaki, K.I. Ivanov, J.P.T. Valkonen et K. Makinen. (2004). Detection of the potyviral genome-linked protein VPg in virions and its phosphorylation by host kinases. *Journal of Virology*, 76, 12703-12711.
- Quadt, R., C.C. Kao, K.S. Browning, R.P. Hershberger et P. Ahlquist. (1993). Characterization of a host protein associated with *Brome mosaic virus* RNA-dependent RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 1498-1502.
- Rajamaki, M.-L. et J. P. T. Valkonen. (2002). Viral genome-linked protein (VPg) controls accumulation and phloem-loading of a *Potyvirus* in inoculated potato leaves. *Molecular Plant-Microbe Interactions.*, 15, 138-149.
- Restrepo-Hartwig, M. A. et J. C. Carrington. (1994). The *tobacco etch potyvirus* 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. *Journal of Virology*, 68, 2388-2397.
- Revers, F., O. Le Gall, T. Candresse et A.J. Maule. (1999). New advances in understanding the molecular biology of potyvirus interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 5, 367-376.
- Riechmann, J. L., S. Lain et J.A. García. (1992). Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology*, 73, 1-16.
- Riedel, D., D.-E. Lesemann et E. Maiss. (1998). Ultrastructural localization of nonstructural and coat proteins of 19 potyviruses using antisera to bacterially expressed proteins of *Plum pox potyvirus*. *Archives of Virology*, 143, 2133-2158.
- Ritzenthaler, C., C. Laporte, F. Gaire, P. Dunoyer, C. Schmitt, S. Duval, A. Piéquet, A.M. Louds, O. Rohfritsch, C. Stussi-Garaud et P. Pfeiffer. (2002). *Grapevine fanleaf virus* replication occurs on endoplasmic reticulum-derived membranes. *Journal of Virology*, 76, 8808-8819.

- Roberts, I. M., D. Wang, K. Findlay et A.J. Maule. (1998). Ultrastructural and temporal observations of the potyvirus cylindrical inclusions (CIs) show that the CI protein acts transiently in aiding virus movement. *Virology*, 245, 173-181.
- Rodriguez, C. M., M.A. Freire, C. Camilleri et C. Robaglia. (1998). The *Arabidopsis thaliana* cDNAs coding for eIF4E and eIF(iso)4E are not functionally equivalent for yeast complementation and are differentially expressed during plant development. *The Plant Journal*, 13, 465-473.
- Rosenwald, I. B., J.-J. Chen, S. Wang, L. Savas, I.M. London et J. Pullman. (1999). Upregulation of protein synthesis initiation factor eIF-4E is an early event during colon carcinogenesis. *Oncogene*, 18, 2507-2517.
- Rousseau, D., R. Kaspar, I. Rosenwald, L. Gehrke et N. Sonenberg. (1996). Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93, 1065-1070.
- Ruffel, S., M.-H. Dussault, A. Palloix, B. Moury, A. Bendahmane, C. Robaglia et C. Caranta. (2002). A natural recessive resistance gene against *Potato virus Y* in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *The Plant Journal*, 32, 1067-1075.
- Ruud, K. A., C. Kuhlow, D.J. Goss et K.S. Browning. (1998). Identification and characterization of a novel cap-binding protein from *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, 17, 10325-10330.
- Sadowy, E., M. Milner et A.-L. Haenni. (2001). Proteins attached to viral genomes are multifunctional. *Advances in Virus Research*, 57, 185-243.
- Sambrook, J.E. et D.W. Russell. (2000). *Molecular Cloning : A Laboratory Manual* (3^{ième} Édition). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez, F., D. Martínez-Herrera, I. Aguilar et F. Ponz. (1998). Infectivity of *Turnip mosaic potyvirus* cDNA clones and transcripts on the systemic host *Arabidopsis thaliana* and local lesion hosts. *Virus Research*, 55, 207-219.
- Sánchez, F., X. Wang, C.E. Jenner, J.A. Walsh et F. Ponz. (2003). Strains of *Turnip mosaic potyvirus* as defined by the molecular analysis of the coat protein gene of the virus. *Virus Research*, 94, 33-43.
- Schaad, C. M., R. Haldeman-Cahill, S. Cronin et J. C. Carrington. (1996). Analysis of the VPg-Proteinase (NIa) encoded by *Tobacco etch potyvirus* : effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *Journal of Virology*, 70, 7039-7048.
- Schaad, M. C., P.E. Jensen et J.C. Carrington. (1997a). Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes : role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *The EMBO Journal*, 16, 4049-4059.
- Schaad, M. C., A.D. Lellis et J.C. Carrington. (1997b). VPg of *Tobacco etch potyvirus* is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *Journal of Virology*, 71, 8624-8631.
- Schaad, M. C., R.J. Anderberg et J.C. Carrington. (2000). Strain-specific interaction of the *Tobacco Etch Virus* NIa protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. *Virology*, 273, 300-306.
- Sonenberg, N., et T. Dever. (2003). Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Current Opinion in Structural Biology*, 13, 56-63.

- Sonenberg, N. et A. C. Gingras. (1998). The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. *Current Opinion in Cell Biology*, 10, 268-275.
- Staehelein, L. A. (1997). The plant ER : a dynamic organelle composed of large number of discrete functional domains. *The Plant Journal*, 11, 1151-1165.
- Strauss, J. H. et E. G. Strauss. (1999). With a little help from the host. *Science*, 283, 802-804.
- Taylor, D. N. et J. P. Cars. (2000). The GCD10 subunit of yeast eIF3 binds the methyltransferase-like domain of the 126 and 183kDa replicase proteins of *Tobacco mosaic virus* in the yeast two-hybrid system. *Journal of General Virology*, 81, 1587-1591.
- Teterina, N. L., D. Egger, K. Bienz, D.M. Brown, B.L. Semler et E. Ehrenfeld. (2001). Requirement for assembly of poliovirus replication complexes and negative-strand RNA synthesis. *Journal of Virology*, 75, 3841-3850.
- Thompson, J. R., G. Leone, J.L. Lindner, W. Jelmann et C.D. Schoen. (2002). Characterization and complete nucleotide sequence of *Strawberry mottle virus* : a tentative member of a new family of bipartite plant *Picornia-like* viruses. *Journal of General Virology*, 83, 229-239.
- Tomlison, J.A.. (1987). *Annals of Applied Biology*, 110, 661-681.
- Troxler, M., D. Egger, T. Pfister et K. Bienz. (1992). Intracellular localization of poliovirus RNA by *in situ* hybridization at the ultrastructural level using single-stranded riboprobes. *Virology*, 191, 687-697.
- Urcuqui-Inchima, S., A.L. Haenni, F. Bernardi. (2001). Potyvirus proteins : a wealth of functions. *Virus Research*, 74, 157-175.
- Verchot, J. et J.C.Carrington. (1995) Debilitation of plant potyvirus infectivity by P1 proteinase-inactivating mutations and restoration by second-site modifications. *Journal of Virology*, 69 : 1582-1590.
- Wang, X., Z. Ullah et R. Grumet. (2000). Interaction between *Zucchini Yellow Mosaic Potyvirus* RNA-Dependent RNA polymerase and host poly-(A) binding protein. *Virology*, 275, 433-443.
- Wells, S. E., P.E. Hillner, R.D. Vale et A.B. Sachs. (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Molecular Cell*, 2, 135-140.
- Wienecker, K., R. Glas et D.G. Robinson. (1982). Organelles involved in the synthesis and transport of hydroxyproline-containing glycoproteins in carrots root discs. *Planta*, 155, 58-63.
- Wittmann, S. (1997). *Étude moléculaire du mécanisme de répllication du virus de la mosaïque du navet.*, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval.
- Wittmann, S., H. Chatel, M.G. Fortin et J.-F. Laliberté. (1997). Interaction of the viral protein genome linked of *Turnip mosaic potyvirus* with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology*, 234, 84-92.
- Yambao, M.L.M., C. Masuta, K. Nakhara et I. Uyeda. (2003). The central and C-terminal domains of VPg of *Clover yellow vein virus* are important for VPg-HCPro and VPg-VPg interactions. *Journal of General Virology*, 84, 2861-2869.
- Zhang, G.F. et L.A. Staehelin. (1992). Functional compartmentation of the Golgi apparatus of plant cells. *Plant Physiology*, 99, 1070-1083.

