Université du Québec
INRS-Institut Armand Frappier

Interactions entre les protéines de l'initiation de la traduction et la protéine liée au génome du virus de la mosaïque du navet

Par
Nathalie Boutet

Mémoire présenté
Pour l'obtention
Du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
En virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Président du jury	Dr. Angela Pearson
Examinateur externe	Dr. Laurent Poliquin
Examinateur interne	Dr. Angela Pearson
Directeur de recherche	Dr. Jean-François Laliberté

© droits réservés de Nathalie Boutet, 2006

Résumé

Le virus de la mosaïque du navet fait partie du genre des potyvirus. Son génome est composé d'une seule molécule d'ARN de polarité positive d'environ 10kb. Le génome code pour une longue polyprotéine qui est clivée en dix protéines matures par trois protéinases virales. L'ARN génomique est lié de façon covalente à son extrémité 5' par une protéine virale, la VPg, et son extrémité 3' est polyadénylée. La VPg et ses précurseurs seraient impliqués dans la traduction, puisqu'ils interagissent avec le facteur d'initiation de traduction eucaryote (iso)4E [eIF(iso)4E]. Cette protéine reconnaît la coiffe des ARNm cellulaires et elle est une protéine clé dans la synthèse protéique.

Notre première hypothèse de travail propose que l'interaction entre eIFiso4E et VPg se produit au réticulum endoplasmique et que cette interaction est possible avec les deux précurseurs de VPg, soit VPgPro et 6KVPgPro.

Pour étudier la localisation cellulaire de cette interaction, eIF(iso)4E a été exprimée en fusion avec la GFP dans *Nicotiana benthamiana*, en même temps que la 6K-VPg-Pro fusionnée cette fois avec DsRed. La visualisation au microscope confocal a révélé que ces deux molécules étaient co-localisées à la membrane du réticulum endoplasmique. eIF4E et VPgPro ont aussi été étudiées en microscopie confocale, en fusion respective avec GFP et DsRed. Dans ce cas-ci, une localisation distincte a été observée.

Notre deuxième hypothèse de travail propose la présence de plusieurs interactions protéiques impliquant les précurseurs de VPg. Ces interactions permettraient la mise en place d'un complexe impliqué dans la traduction de l'ARN viral et, possiblement aussi, dans sa réplication.

Les précurseurs de VPg associés aux membranes ont été purifiés de feuilles infectées de *Brassica perviridis* par chromatographie par chélation métallique pour déterminer quelles autres protéines pourraient interagir avec ces précurseurs. Des

analyses en immunobuvardage ont montré que la polymérase virale (RdRp), la CI et la protéine de la capside (CP) ainsi que la protéine de liaison à la queue de poly(A) (PABP) étaient co-purifiées, alors que eIF3 et eIFiso4G étaient présentes en plus grande quantité chez les plantes infectées. Des analyses de spectrométrie de masse ont confirmé la présence de la CI suite à la purification en plus de démontrer la présence de HCPro et de la phospholipase D.

Finalement, la présence d'ARN suite à la purification des précurseurs de VPg a été évaluée par amplification par PCR du gène VPgPro. L'ARN viral semble être purifié dans son ensemble avec les précurseurs associés aux membranes, ce qui démontre que les précurseurs peuvent aussi être liés de façon covalente au génome viral. Cette observation pose la question à savoir si les protéines identifiées dans le complexe sont présentes dû à leur interaction avec la VPg ou avec l'ARN viral.

Nathalie Boutet

Nathalie Boutet

Jean-François Laliberté

Jean-François Laliberté
Directeur de recherche

Table des matières

RÉSUMÉ ..... **I**

TABLE DES MATIÈRES ..... **III**

TABLE DES FIGURES ..... **VI**

LISTE DES TABLEAUX ..... **VII**

CHAPITRE 1 ..... **1**

REVUE DE LITTÉRATURE **1**

1 LES POTYVIRUS **1**

1.1 GÉNÉRALITÉS 1
1.2 CYCLE VIRAL 2
1.3 ORGANISATION GÉNOMIQUE ET STRATÉGIE D'EXPRESSION 5
1.4 FONCTIONS DES PROTÉINES VIRALES 7
1.4.1 P1 ..... *8*
1.4.2 HCPro *8*
1.4.3 P3 et 6K1 ..... *10*
1.4.4 CI ou Hélicase *11*
1.4.5 6K2 et VPgPro (Nla) *11*
1.4.6 Nlb ou polymérase *17*
1.4.7 CP *18*

2 INITIATION DE LA TRADUCTION **19**

3 LES VIRUS ET LA TRADUCTION **21**

3.1 VIRUS ANIMAUX ET INHIBITION DE LA TRADUCTION 21
3.1.1 Les rotavirus *21*
3.1.2 Les Adénovirus *22*
3.1.3 Les Picornavirus *23*
3.2 PEA SEED BORNE MOSAIC VIRUS ET INHIBITION DE L'EXPRESSION 26
3.3 POTYVIRUS, VPG ET EIF4E 28
3.3.1 eIF4E et ses isomères *28*
3.3.2 eIF4E et l'infection aux potyvirus *30*
3.3.2.1 eIF4E et la susceptibilité au LMV, TEV, PVY, CMV et ClYVV 30
3.3.2.2 eIFiso4E et la résistance au TuMV 30
3.3.2.3 Interaction eIFiso4E et VPg 32

4 HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS DE TRAVAIL **36**

4.1 LOCALISATION DE L'INTERACTION ENTRE EIFISO4E ET VPGPRO 36
4.2 COPURIFICATION DES COMPLEXES PROTÉIQUES IMPLIQUANT VPGPRO 36

CHAPITRE 2 ..... **37**

MATÉRIEL ET MÉTHODES **37**

1 SOUCHES 37
2 MILIEUX DE CROISSANCE 37
3 VECTEURS 38
3.1 pBIN-mgfp5-ER *38*
3.2 Système de vecteurs binaires (pGreenII 0029 / pSoup) *40*
3.3 pGreen-35S-M *42*
3.4 pGreen-35S-M-2μTrp *42*

3.5 pO *42*
4 CLONAGE 45
4.1 PCR *45*
4.2 Clonage par recombinaison In vitro *45*
4.3 Clonage traditionnel *48*
4.3.1 Digestion enzymatique 48
4.3.2 Déphosphorylation 48
4.3.3 Ligation 48
4.4 Recombinaison dans la levure *48*
4.5 Transformation par choc thermique *49*
4.5.1 Préparation des bactéries 49
4.5.2 Choc thermique 49
4.6 Électroporation *50*
4.6.1 Préparation des bactéries 50
4.6.2 Électroporation 50
4.7 Extraction d'ADN *51*
4.7.1 Lyse alcaline avec SDS 51
4.7.2 Minipréparation Sigma 51
4.7.3 Extraction d'ADN de levures 51
5 EXPRESSION TRANSITOIRE DANS LES FEUILLES DE *NICOTIANA BENTHAMIANA* 52
5.1 Préparation des plantes *52*
5.2 Préparation des cultures d'A. tumefaciens *52*
5.3 Agroinfiltration *52*
6 OBSERVATION DE L'EXPRESSION DES PROTÉINES 54
6.1 Microscopie confocale *54*
7 PURIFICATION ET ANALYSE DES PROTÉINES 54
7.1 Infection de B. perviridis *54*
7.2 Purification *55*
7.2.1 Séparation des fractions solubles et membranaires 55
7.2.2 Chromatographie sur colonne de nickel-NTA agarose 55
7.2.3 Buvardage de type Western 56
7.2.3.1 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide et transfert sur membrane de nitrocellulose 56
7.2.3.2 Immunorévélation 56
7.2.4 Spectrométrie de masse 58
8 DÉTECTION DE L'ARN VIRALE 59
8.1 Extraction de l'ARN *59*
8.2 Détection de l'ARN viral par RT-PCR *59*

CHAPITRE 3 ..... **60**

RÉSULTATS **60**

1 CONSTRUCTION DES PLASMIDES 60
1.1 Construction des plasmides de base *60*
1.1.1 pGreen-GFP 60
1.1.2 pGreen-DsRed 61
1.2 Construction des plasmides des protéines de fusion *63*
1.2.1 pGreen-eIFiso4E-GFP 63
1.2.2 pGreen-eIF4E-GFP 64
1.2.3 pGreen-6KVPgPro-DsRed 65
1.2.4 pGreen-VPgPro-DsRed 66
2 EXPRESSION TRANSITOIRE DANS *NICOTIANA BENTHAMIANA* 67
2.1 Agroinfiltration *67*
2.1.1 Observation des protéines de fluorescence 67
2.1.2 Observation des protéines de fusion 71
3 CO-EXPRESSION DE PROTÉINES DE FUSION 74
3.1 Observations *74*
4 CO-PURIFICATION DES COMPLEXES PROTÉIQUES ASSOCIÉS À VPG 79
4.1 Chromatographie sur colonne de nickel-NTA *79*
4.2 Analyse des échantillons *79*

4.2.1 Buvardages de type Western 80
4.2.2 Spectrométrie de masse 86
4.2.3 Présence d'ARN viral suite à la chromatographie d'affinité 86

CHAPITRE 4 88

***DISCUSSION* 88**

1 LOCALISATION 88
1.1 GFP et DsRed / considérations générales 88
1.2 6KVPgPro et VPgPro 91
1.3 eIF4E et eIFiso4E 93
1.4 Colocalisation 94
1.4.1 GFP / DsRed 95
1.4.2 eIFiso4E / 6KVPgPro 96
1.4.3 eIF4E / 6KVPgPro 96
1.4.4 eIFiso4E / VPgPro 97
1.4.5 eIF4E / VPgPro 98
2 COPURIFICATION DE COMPLEXES PROTÉIQUES IMPLIQUANT LES PRÉCURSEURS DE LA VPG DU TUMV 99
3 PERSPECTIVES D'AVENIR 107

CHAPITRE 5 109

***CONCLUSION* 109**

BIBLIOGRAPHIE 113

Table des figures

FIGURE 1 SYMPTÔMES DE L'INFECTION AU TUMV 2
FIGURE 2 CYCLE VIRAL DES POTYVIRUS 4
FIGURE 3 ORGANISATION GÉNOMIQUE ET STRATÉGIE D'EXPRESSION CHEZ LES POTYVIRUS 6
FIGURE 4 REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES FONCTIONS DE LA PROTÉINE HCPRO 9
FIGURE 5 REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES FONCTIONS DE LA PROTÉINE VPGPRO 12
FIGURE 6 ALIGNEMENT DES SÉQUENCES DES VPG DE DIVERS POTYVIRUS 14
FIGURE 7 STRUCTURE EN TROIS DIMENSIONS DE LA VPG DU PPV 16
FIGURE 8 REPRÉSENTATION SCHÉMATIQUE DES FONCTIONS DE LA PROTÉINE DE LA CAPSIDE 18
FIGURE 9 COMPLEXE D'INITIATION DE LA TRADUCTION 20
FIGURE 10 EFFET DE LA PROTÉINE NSP3 DES ROTAVIRUS SUR LA TRADUCTION 22
FIGURE 11 EFFET DE LA PROTÉINE 100K DES ADÉNOVIRUS SUR LA TRADUCTION 23
FIGURE 12 EFFET DE LA PROTÉINASE 2A-PRO DES PICORNAVIRUS SUR LA TRADUCTION 25
FIGURE 13 EFFET DE L'INFECTION AU POTYVIRUS SUR LES ARNM CELLULAIRES CHEZ LES EMBRYONS DE POIS 27
FIGURE 14 STRUCTURE EN TROIS DIMENSIONS DE LA EIF4E DE LA LAITUE 29
FIGURE 15 IDENTIFICATION DU GÈNE DE RÉSISTANCE AU TUMV 31
FIGURE 16 EIF4E ET EIFISO4E CHEZ LA PLANTE INFECTÉE AU TUMV 32
FIGURE 17 ELISA D'INTERACTION ENTRE VPGPRO DU TUMV ET EIFISO4E 33
FIGURE 18 COURBE DE LIAISON DE VPGPRO À EIFISO4E AVEC OU SANS M^7GTP 33
FIGURE 19 PROTÉINES COPURIFIÉES AVEC VPGPRO SUITE À UNE SÉPARATION SUR GRADIENT DE SUCROSE 35
FIGURE 20 LE VECTEUR PBIN-MGFP5-ER 39
FIGURE 21 LES VECTEURS PGREEN-0029 (A) ET PSOUP (B) 41
FIGURE 22 LE VECTEUR PGREEN-35S-M 43
FIGURE 23 LE VECTEUR PGREEN-35S-M-2MTRP 44
FIGURE 24 PROCÉDURE DE RECOMBINAISON *IN VITRO* À L'AIDE DE LA TROUSSE IN-FUSION CLONING DE CLONTECH 47
FIGURE 25 MÉTHODE D'EXPRESSION TRANSITOIRE DANS LA PLANTE PAR AGROINFILTRATION 53
FIGURE 26 CARTES DES VECTEURS PGREEN-GFP (A) ET PGREEN-DSRED (B) 62
FIGURE 27 CARTE DE LA CASSETTE 35S DU VECTEUR PGREEN-EIFISO4E-GFP 64
FIGURE 28 CARTE DE LA CASSETTE 35S DU VECTEUR PGREEN-EIF4E-GFP 64
FIGURE 29 CARTE DE LA CASSETTE 35S DU VECTEUR PGREEN-6KVPGPRO-DSRED 65
FIGURE 30 CARTE DE LA CASSETTE 35S DU VECTEUR PGREEN-VPGPRO-DSRED 66
FIGURE 31 STRUCTURE DE LA CELLULE VÉGÉTALE 69
FIGURE 32 LOCALISATION DE PROTÉINES FLUORESCENTES DANS *N. BENTHAMIANA* 70
FIGURE 33 LOCALISATION DES PROTÉINES DE FUSION DANS *N. BENTHAMIANA* 73
FIGURE 34 COLOCALISATION DE DSRED ET GFP ET LOCALISATION DES PROTÉINES DE FUSION DSRED DANS *N. BENTHAMIANA* 75
FIGURE 35 COLOCALISATION DES PROTÉINES DE FUSION DANS *N. BENTHAMIANA* 78
FIGURE 36 DÉTECTION DE PRO ET DES PRÉCURSEURS DE VPG PURIFIÉS SUR NICKEL. 81
FIGURE 37 DÉTECTION DE PROTÉINES VIRALES PURIFIÉES SUR NICKEL 83
FIGURE 38 DÉTECTION DE PROTÉINES CELLULAIRES PURIFIÉES SUR NICKEL 85
FIGURE 39 DÉTECTION DE L'ARN VIRAL 87
FIGURE 40 MODÈLE D'INTERACTIONS IMPLIQUANT LA 6KVPGPRO DU TUMV 110

Liste des tableaux

TABLEAU 1 PROPRIÉTÉS PRINCIPALES DES PROTÉINES DES POTYVIRUS 7
TABLEAU 2 INTERACTION EN DOUBLE HYBRIDE DE MUTANTS DE VPG DU TUMV AVEC EIFISO4E 34
TABLEAU 3 LISTE DES AMORCES ET MATRICES UTILISÉES 46
TABLEAU 4 LISTE DES ANTICORPS UTILISÉS ET DILUTIONS 57
TABLEAU 5 LOCALISATION DES PROTÉINES DE FLUORESCENCE ET DE FUSION 72
TABLEAU 6 COLOCALISATION DES PROTÉINES DE FUSION 77
TABLEAU 7 ANALYSE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE 86

Chapitre 1

Revue de littérature

1 Les Potyvirus

1.1 Généralités

Les Potyvirus représentent le plus important genre dans la famille des *Potyviridae* avec environs 180 membres et composent environs 30 % de tous les phytovirus. Les potyvirus infectent une importante variété de plantes, autant monocotylédones que dicotylédones. Ils se retrouvent dans toutes les régions du monde, bien qu'ils soient plus abondants dans les régions tropicales et subtropicales. Ce sont des virus transmissibles de manière non persistante par les aphides et peuvent causer des dommages sévères à des plantations d'une grande importance économique (Ward et Shukla, 1991). Le genre des Potyvirus contient des membres tels le Potato virus Y (PVY), le Tobacco Etch virus (TEV), le Tobacco Vein Mottling virus (TVMV), le Plum Pox virus (PPV) et le Turnip Mosaic virus (TuMV). Tous ces Potyvirus causent une grande variété de symptômes sévères, de la mosaïque à la chlorose, d'une décoloration des fleurs, fruits, feuilles et tiges à d'importants retards de croissance ainsi qu'une réduction de rendement des cultures atteintes.

Le TuMV ou virus de la mosaïque du navet infecte approximativement 318 sortes de plantes, incluant le navet, le chou-fleur, le chou, la laitue et les pétunias. Il représente l'un des virus les plus dévastateurs chez les cultures commerciales à travers le monde. Il cause une déformation des feuilles, de la nécrose, de la chlorose et des retards de croissance (Figure 1) (Jenner et al. 2003).

Infectée Saine

Figure 1 Symptômes de l'infection au TuMV

De gauche à droite : déformation, chlorose, nécrose et retard de croissance

1.2 Cycle viral

Les potyvirus sont transmis de façon mécanique par la partie buccale des aphides. Les insectes entrent en contact avec les virions lorsqu'ils se nourrissent à même une plante infectée. Les particules virales peuvent demeurer environs une heure dans le stylet d'un aphide avant de perdre leur infectivité. Par contre, certains potyvirus peuvent survivre pendant près de 40 heures à l'extérieur de leur hôte. Dû à la durée de vie restreinte de la majorité des potyvirus chez les aphides, il est rare qu'un insecte puisse propager un virus sur une grande distance. Certaines conditions météorologiques tels de forts vents peuvent toutefois permettre la dissémination des virus. Il est proposé que l'infection d'une nouvelle plante par un aphide porteur d'un potyvirus se produit de la façon suivante : lorsque l'insecte se nourrit sur une plante infectée, le virus pénètre et adhère au système digestif supérieur et est par la suite régurgité lorsque l'insecte se nourrit à nouveau. Le virus se retrouve donc en contact avec des cellules d'une plante saine et grâce à l'incision effectuée par l'aphide, peut pénétrer dans la cellule. Ce contact représente la première étape de l'infection (Figure 2), soit l'entrée du virus dans la cellule

hôte. Suite à l'entrée du virion dans la cellule végétale, les protéines de la capside sont retirées de l'ARN viral. Cette étape de décapsidation permet le relâchement dans le cytoplasme de l'ARN lié de façon covalente à la protéine virale VPg. Le génome viral étant composé d'ARN simple brin de polarité positive, il est ensuite utilisé directement par la machinerie de traduction cellulaire pour produire la polyprotéine virale. Cette polyprotéine est ensuite clivée durant et suite à sa traduction pour donner les protéines virales matures. De ces protéines, la RdRp (RNA dependant RNA polymerase) permet la synthèse du brin négatif complémentaire à l'ARN viral qui est ensuite utilisé par la RdRp comme matrice afin de synthétiser de nouveaux génomes viraux. Ces nouveaux génomes sont utilisés soit dans la formation de nouvelles particules virales grâce à la protéine CP qui se lie à l'ARN viral ou encore comme ARN messager afin de traduire plus de protéines virales. Les protéines de mouvement permettent le transfert des nouveaux virions de la cellule infectée vers les cellules voisines en passant par les plasmodesmes. Les particules virales produites peuvent aussi se déplacer vers les feuilles supérieures de la plante et causer une infection systémique. De plus, ces virions peuvent être ingurgités par un aphide et transportés vers une autre plante qu'ils pourront infecter.

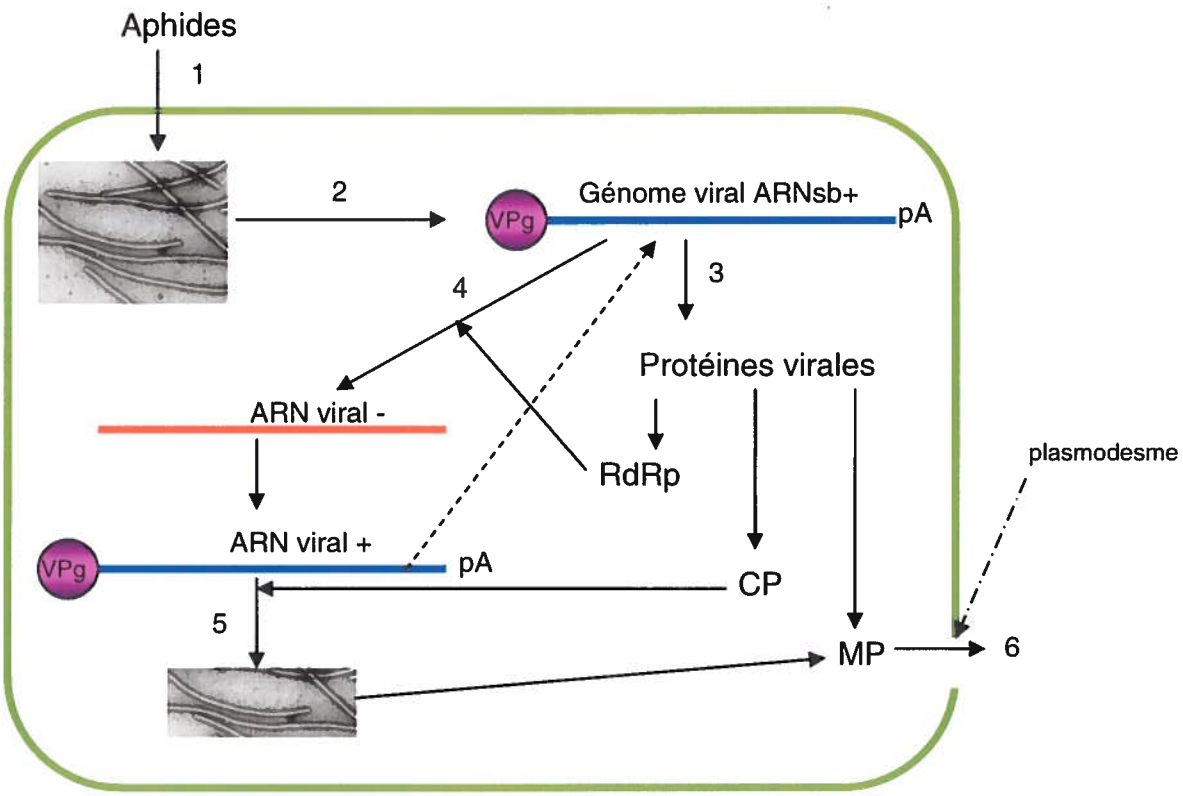


Figure 2 Cycle viral des potyvirus

Les étapes de l'infection avec un potyvirus :

1- entrée du virus dans la cellule végétale par inoculation mécanique causée par un aphide

2- démantellement de la capside virale et sortie du génome dans le cytoplasme de la cellule

3- traduction de l'ARN viral et clivage de la polyprotéine en 10 protéines virales matures

4- réplication de l'ARN viral en ARN de polarité négative et production du brin positif avec la RdRp virale

5- encapsidation de l'ARN viral de polarité positive ou utilisation de l'ARN positif nouvellement synthétisé pour la traduction (étape 3) ou la réplication (étape 4)

6- transport vers les cellules adjacentes via les plasmodesmes à l'aide des protéines de mouvement, infection systémique, tranport vers d'autres plantes via ingestion par un aphide

1.3 Organisation génomique et stratégie d'expression

Les virions des potyvirus sont composés d'une molécule d'ARN monocaténaire de polarité positive d'environs 10 kb entourée de 2000 copies de la protéine de la capside. Ces virions ont une conformation filamenteuse et sont flexibles. L'extrémité 5' du génome des potyvirus est liée de façon covalente à une protéine virale : la VPg. L'extrémité 3' du génome, quant à elle, est polyadénylée (Riechmann et al. 1992). Le génome des potyvirus, tout comme celui des picornavirus qui font partie du même supergroupe des Picorna-like, ne contient qu'un seul cadre de lecture ouvert et permet la production d'une polyprotéine virale d'un poids moléculaire d'environs 350 kDa (Figure 3). Cette polyprotéine est hydrolysée durant et après sa traduction par les trois protéinases virales présentes dans la polyprotéine pour former 10 protéines matures et fonctionnelles (Dougherty et al. 1988). Les protéines virales se retrouvent aussi sous forme de précurseurs de clivage qui forment aussi des protéines fonctionnelles et dont les fonctions semblent être distinctes de celles des protéines matures. Les gènes des 10 protéines virales sont présents dans l'ordre suivant dans le génome des potyvirus : la première protéine (P1), la protéine HCPro (helper-component/protéinase), la troisième protéine (P3), le premier peptide de 6 kDa (6K1), la protéine d'inclusion cylindrique (CI ou hélicase), le deuxième peptide de 6 kDa (6K2), la protéine d'inclusion nucléaire a (NIa ou VPgPro), la protéine d'inclusion nucléaire b (NIb ou RdRp pour ARN polymérase ARN dépendante) et finalement la protéine de la capside (CP).

L'ARN viral contient des régions non traduites en 5' (5' UTR) et en 3' (3' UTR). Les 5' UTR sont riches en adénines, pauvres en guanines et sont de longueur variable (129 nucléotides chez le TuMV). Il est proposé que les 5' UTR jouent un rôle dans l'encapsidation ou la réplication de l'ARN viral (Riechmann et al 1992). Les 3' UTR quant à elles ne présentent pas d'homologies de séquences entre les divers potyvirus et sont de longueurs différentes avec des structures secondaires diverses. Leurs séquences sont par contre riches en AU (Turpen 1989). Les queues de poly A que l'on retrouve à l'extrémité 3' des génomes de potyvirus sont de tailles diverses.

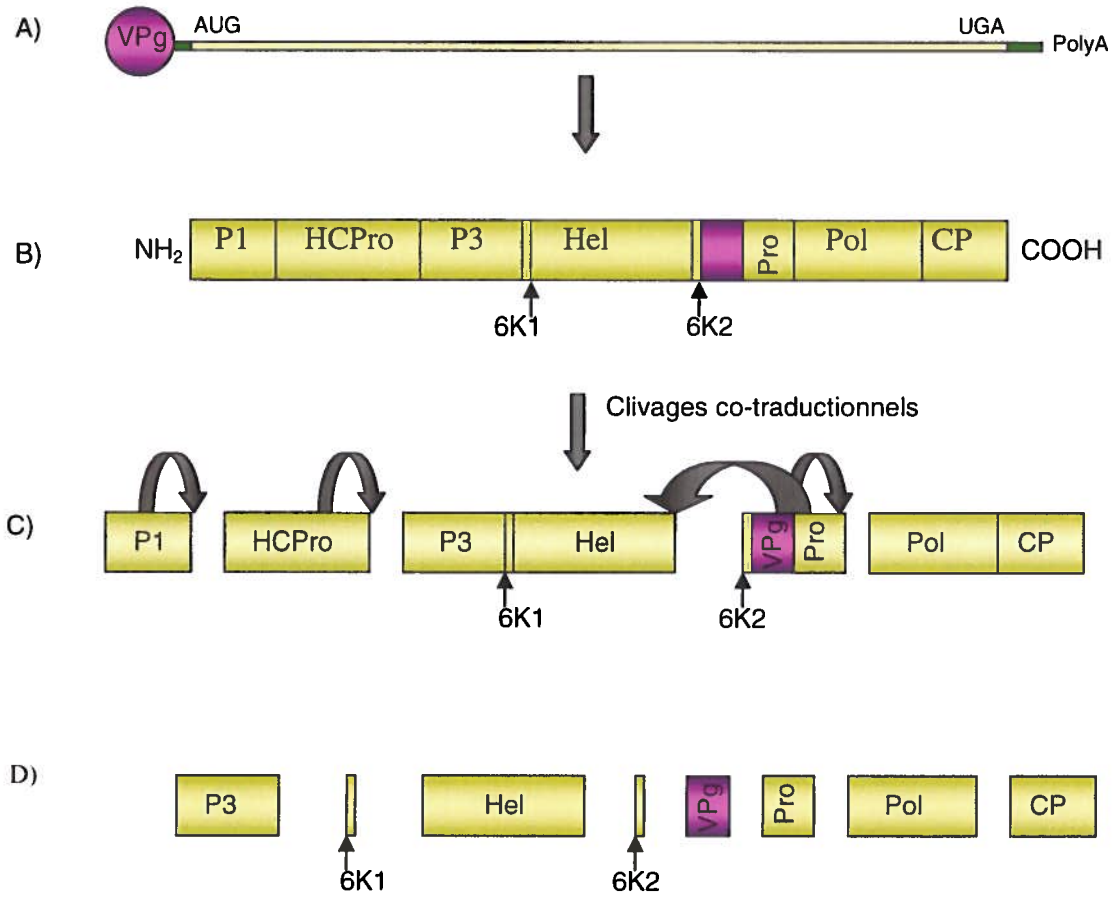


Figure 3 Organisation génomique et stratégie d'expression chez les potyvirus

L'ARN viral (A) est traduit en une polyprotéine (B). La polyprotéine est clivée durant la traduction (C) par les protéinases P1, HCPro et VPgPro et après la traduction (D) par VPgPro

1.4 Fonctions des protéines virales

Le tableau 1 présente les propriétés principales des protéines produites par les potyvirus

Protéines	Propriétés
P1 (32-64 kDa)	Sérine protéinase de type trypsine Implication dans la production des symptômes Auto-clivage en C-terminal
HCPro (56-58 kDa)	Cystine protéinase de type papaïne Auto-clivage en C-terminal Homodimérisation Implication dans la transmission par aphides, le mouvement systémique, la suppression du gene-silencing, la synergie, et le développement des symptômes
P3 (37 kDa)	Implication dans la pathogénicité
6K1 (6 kDa)	Normalement liée à P3
CI (70 kDa)	ATPase et hélicase Implication dans le mouvement intercellulaire
6K2 (6 kDa)	Ancrage des complexes de réplication aux membranes
VPgPro (49 kDa)	Sérine protéinase de type trypsine Agit en *cis* et en *trans* Implication dans la réplication du génome (domaine VPg) et la localisation cellulaire
NIb (58 kDa)	ARN polymérase ARN dépendante Implication dans la réplication du génome
CP (28-40 kDa)	Implication dans la transmission par aphides, le mouvement intercellulaire et l'assemblage des particules virales.

Tableau 1 Propriétés principales des protéines des potyvirus

Les poids moléculaires de chaque protéine sont indiqués en kDa entre parenthèses.

Toutes les protéines virales sont impliquées dans l'amplification du génome et toutes, à l'exception de P3, 6K1 et 6K2, peuvent lier l'ARN. On retrouve en amino-terminal de la polyprotéine potyvirale les protéines impliquées dans le mouvement des particules virales alors que les protéines qui forment le complexe de réplication sont plutôt localisées dans la partie carboxy-terminale de la polyprotéine (Urcuqui-Inchima et al. 2001)

1.4.1 P1

La première protéine correspond à l'extrémité N-terminale de la polyprotéine. P1 est une sérine protéinase procédant à son auto-clivage de la polyprotéine durant la traduction (Riechmann et al. 1992). Elle représente, avec P3, la protéine la moins conservée entre les membres du groupe des potyvirus. Seulement quelques acides aminés retrouvés en C-terminal de P1 sont identiques entre les potyvirus. Ces acides aminés correspondent au site actif de la protéinase contenant le résidu sérine catalytique permettant le clivage après une tyrosine ou une phénylalanine. P1 est impliquée directement dans la sévérité des symptômes chez le PVY et le ZYMV (Tordo et al. 1995, Wisler et al. 1995). D'autres études ont démontré que P1 n'est pas requise pour l'infection, mais qu'elle permet l'augmentation de l'amplification du génome et du mouvement (Klein et al. 1994, Verchot et Carrington. 1995a,b). Il semble toutefois que le clivage entre P1 et HCPro est essentiel à la viabilité du virus (Klein et al. 1994). Finalement, Pruss et al. ont démontré que le précurseur P1-HCPro possède la capacité de supprimer les défenses de l'hôte et le gene-silencing posttraductionnel (Pruss et al. 1997).

1.4.2 HCPro

La protéine HCPro possède plusieurs fonctions (Figure 4). La partie N-terminale possède une séquence conservée KITC permettant la liaison au stylet des aphides et donc la transmission des virions d'une plante infectée à une plante saine (Blanc et al, 1998).

Afin que les virions soient maintenus dans le stylet des insectes, la HCPro se lie aussi via un site PTK dans sa portion centrale à la protéine de la capside (Peng et al. 1998). La HCPro sert donc de pont entre le système digestif de l'insecte et les virions des potyvirus afin de permettre la propagation.

La HCPro est aussi capable d'interagir avec elle-même. La formation de cette interaction requiert la présence de deux domaines dans la protéine HCPro soit un domaine de 24 acides aminés présent dans la portion N-terminale de la protéine ainsi que le domaine C-terminal en entier (Guo et al. 1999).

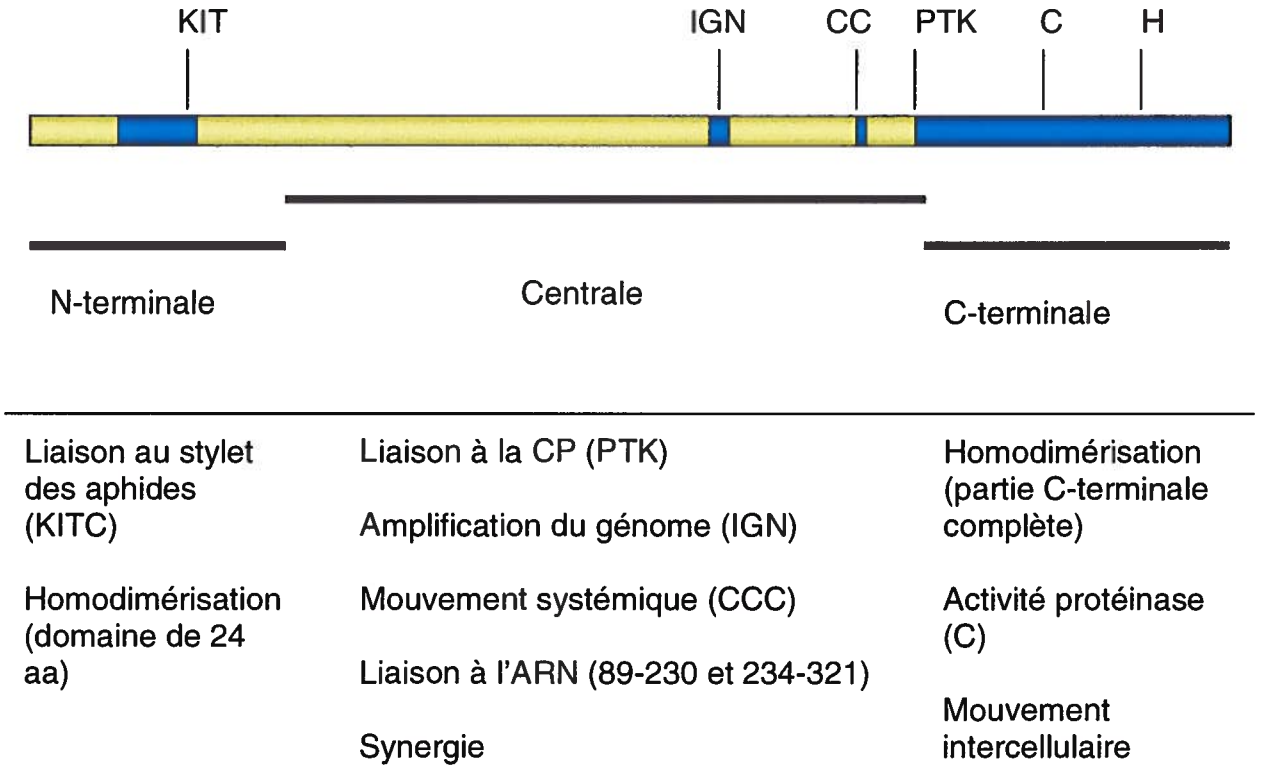


Figure 4 Représentation schématique des fonctions de la protéine HCPro

Les trois parties de la protéine sont indiquées sous le schéma représentant la protéine. Les zones importantes pour les diverses fonctions sont indiquées en bleu et les résidus conservés importants sont inscrit au dessus du schéma.

La protéine HCPro est aussi impliquée dans l'amplification du génome et dans le mouvement systémique du virus. Ces fonctions requièrent la présence de résidus hautement conservés dans les protéines HCPro des potyvirus soit IGN et CCC dans la partie centrale de la protéine (Cronin et al. 1995).

Il a été démontré que la protéine HCPro permet l'inhibition du gene-silencing posttransciptionnel chez les plantes infectées avec un potyvirus (Anandalakshimi et al. 1998, Brigneti et al. 1998, Kasschau et Carrington. 1998). La portion précise de la protéine impliquée dans l'inhibition du silencing n'est pas déterminée.

Finalement, la partie centrale de la protéine HCPro est impliquée dans le développement de symptômes et la synergie (Shi et al. 1997). La synergie s'observe lorsque deux potyvirus infectent la même plante et que leurs symptômes sont amplifiés par la présence de l'autre virus, tels qu'il est le cas lors d'une infection avec PVX et PVY (Pruss et al. 1997, Vance et al. 1995) ou CMV et TMV (Pruss et al. 1997).

La partie C-terminale de la HCPro quant à elle contient la caractéristique principale de la protéine soit son activité cystine protéase (Maia et al. 1996).

1.4.3 P3 et 6K1

La troisième protéine des potyvirus, à laquelle on retrouve habituellement lié le peptide 6K1, est la moins bien caractérisée. Elle est la moins conservée des protéines potyvirales. Chez le TVMV, la P3 est localisée dans le cytoplasme et y est associée à la protéine CI lors des premières étapes de l'infection (Rodriguez-Cerezo et al. 1993), alors que chez le TEV, la P3 se retrouve plutôt dans le noyau en association avec NIa (Langenberg et Zhang. 1997). Dans les deux cas, cette association permet de proposer un rôle de la P3 dans l'amplification du génome viral. La protéine P3 semble jouer aussi un rôle dans la pathogénicité puisque la délétion du site de clivage entre 6K1 et P3 chez le PPV permet l'infection mais les symptômes sont absents (Riechmann et al. 1995). La

partie de la protéine P3-6K1 déterminant la pathogénicité est localisée dans la région C-terminale (Saenz et al. 2000).

1.4.4 CI ou Hélicase

La protéine CI possède une activité ATPase ainsi que la capacité de dérouler les duplexes d'ARN. La CI contient sept segments hautement conservés tous dans la partie N-terminale de la protéine (Kadaré et Haenni. 1997). Le segment VI, riche en acides aminés basiques, particulièrement en arginine, est suffisant, mais non nécessaire dans certaines conditions, à la liaison de CI à l'ARN (Fernandez et al. 1995, Fernandez et garcia. 1996). Le segment conservé I quant à lui est impliqué dans la liaison aux NTP (Fernandez et Garcia. 1996). Le motif V, pour sa part, est impliqué dans l'activité NTPase de la protéine CI, activité nécessaire au processus de déroulement de l'ARN, bien que le domaine V ne lie pas l'ARN directement (Fernandez et al. 1995).

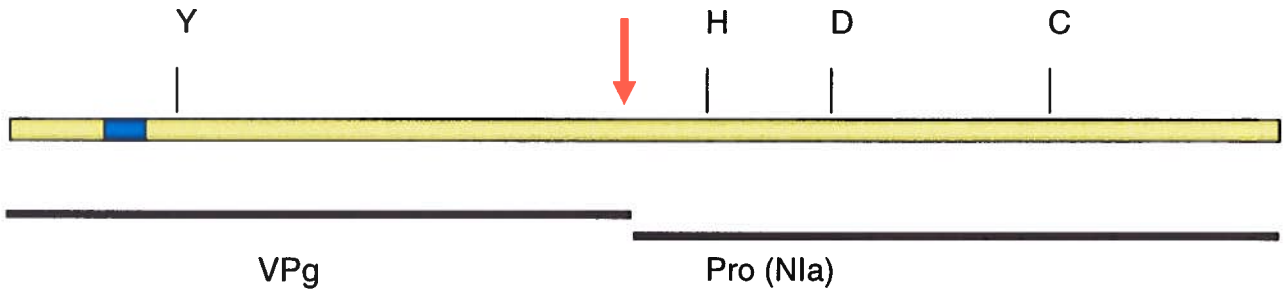
Il est aussi proposé que la protéine CI joue un rôle dans le mouvement des particules virales entre les cellules. Chez le TVMV, CI est localisée près des plasmodesmes et forme des structures coniques qui traversent fréquemment la paroi intercellulaire pour se rendre jusqu'à la cellule voisine (Rodriguez-Cerezo et al. 1997, Rojas et al. 1997). De plus récentes études proposent que la protéine CI interagit directement avec les plasmodesmes et favorise le mouvement intercellulaire des complexes ARN viral et protéines (Carrington et al. 1998).

1.4.5 6K2 et VPgPro (NIa)

Le peptide 6K2 ne possède pas de fonction enzymatique déterminée. Par contre, lorsqu'il est fusionné à la protéine GUS et exprimé chez des plantes de tabac, il est suffisant pour permettre la relocalisation de la protéine du cytoplasme au réticulum endoplasmique (Restrepo-Hartwig et Carrington. 1994). Des études de mutation du

peptide 6K2 ont permis de déterminer que le domaine hydrophobe central du peptide est responsable de son association aux membranes (Schaad et al 1997).

La protéine VPgPro (49 kDa) est composée de deux domaines, le domaine VPg en N-terminal et le domaine Pro en C-terminal (Figure 5). La VPgPro est aussi appelée NIa pour nuclear inclusion body A dû à sa localisation dans le noyau. Par contre, il a été établi que la localisation de NIa varie entre les potyvirus (Riedel et al. 1998), c'est pourquoi il est préférable de la nommer VPgPro. La portion N-terminale de VPgPro contient un signal de localisation nucléaire. Chez le TEV, ce signal riche en acides aminés basiques est situé entre les résidus 40 et 49 de la VPgPro (Schaad et al. 1996).



Liaison covalente en 5' du génome viral (Y)	Activité sérine protéinase (HDC = triade catalytique)
Liaison à NIb (semble impliquer Y)	Liaison à PABP
Liaison à eIF4E/eIFiso4E	
Liaison à HCPro	

Fonction impliquant toutes les parties : liaison à l'ARN

Figure 5 Représentation schématique des fonctions de la protéine VPgPro

Les deux parties de la protéine sont indiquées sous le schéma représentant la protéine. Le signal de localisation nucléaire est indiqué en bleu. Les résidus conservés importants sont inscrit au dessus du schéma et le site de clivage entre VPg et Pro est indiqué par une flèche.

La VPg sous toutes ses formes soit VPg, VPgPro ou 6KVPgPro a la capacité de lier l'ARN indépendamment de la séquence et de façon coopérative (Daros et Carrington. 1997, Merits et al. 1998). La liaison d'une VPg ou d'un précurseur à une molécule d'ARN permet la liaison d'une deuxième protéine de façon plus efficace. La présence de deux copies de VPg ou d'un précurseur sur un même ARN facilite ensuite la liaison d'une troisième protéine et ainsi de suite.

Le domaine Pro possède l'activité catalytique sérine protéinase et représente la plus importante des trois protéinases virales. Elle agit en *cis* et en *trans* pour produire 8 des 10 protéines matures des potyvirus (P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, Pro, NIb et CP). Le domaine Pro peut se séparer du domaine VPg suite au clivage via un site reconnu de façon sub-optimale par la protéinase (Riechmann et al. 1992). Une mutation abolissant ce site de clivage chez le TEV ne permet pas la réplication du virus (Carrington et al. 1993). Par contre, la substitution d'un site de clivage plus optimal pause aussi des problèmes lors de l'amplification. L'hydrolyse lente semble donc jouer un rôle régulateur dans le cycle viral (Schaad et al. 1996).

Le domaine Pro lie la protéine cellulaire PABP, tel que démontré en ELISA (Beauchemin, communication personnelle). La PABP, ou poly(A) binding protein, lie la queue de poly(A) en 3' des ARN messagers et de certains ARN viraux tel celui des potyvirus, augmentant ainsi leur stabilité et leur niveau de traduction.

Le domaine VPg (22-24 kDa) est formé de 188 acides aminés chez le PVY. La séquence en acides aminés de la VPg chez les potyvirus est conservée à 19%, alors qu'un 38% additionnel présente des résidus dont le caractère hydrophobe/hydrophile est invariable (Figure 6) (Plochocka et al. 1996).

```
PVY15    GKNKSKRIQALKFRHARDKRAGFEIDNNDDTIEEFPGSAYRKKGKGKG..
PPVD     .GFNRRQRQKLKFRQARDNRMAREVYGDDSTMEDYPGSAYSKKGKSKG..
TUMV     ...GKKQRQKLKFRNARDNKMGREVYGDDDTIEHFPGDAYTKKGKSKG..
PRV      .GFSARQRQKLRFKSAANAKLGREVYGDDGTIEHYPGEAYTKKGNKKG..
TVMV     ....GKSRRRLQFRKARDDKMGYIMHGEGDTIEHFPGAAYTKKGKSKG..
SBMV     ..GKKRQIQKLKFRDAFDRKVGREVYADDYTMEHTPGEAYTKKGKQKGST
PEMV     GRSKTKRIQALKFRKARDKRAGFEIDNNEDTIEEYPGSAYTKKGKGKG..
TEV      ..GKKNQKHKLKMREARGARGQYEVAAEPEALEHYPGSAYNNKGKRKG..
OMV      ..................................................
PSBMV    ...GKSKAKTLRFRQARDNNAKYEVPADEDTKRHYPGEAYTKKGKKSG..

PVY15    TTVGMGKSSRRPINMYGFDPTEYSFIQFVDPLTGAQIEENVYADIRDIQE
PPVD     KTRGMGTKTRKPVNMYGYDPTDYNFVRFVDPLTGHTLDEDPLMDINLVQE
TUMV     RTRGIGHKNRKPINMYGFDPEDFSAVRFVDPLTGATLDDNFFTDITLVQK
PRV      KMHGMGVKTRKPVATYGFKPEDYSYVRYLDPLTGETLDESPQTDISMVQD
TVMV     KTHGAGTKAHKPVNMYGVSPDEYSYVRYLDPVTGATLDESPMTDLNIVQE
SBMV     RTKGMGRKSRNPIHIYGVEPENYSMIRVVDPLTGHTMDEHPRVDIRMVQQ
PEMV     TTVGMGRTNRRPINMYGFEPGQFSYIKFVDPLTGAQMEENVYADIVDVQE
TEV      TTRGMGAKSRKPINMYGFDPTDFSYIRFVDPLTGHTIDESTNAPIDLVQH
OMV      ...................EYTIVRYVDPLTGATQDENPLMAIDLVQE
PSBMV    KARGMGVKTKKPVNVYGFDPCEYSLVRFVDPLTGLTYDRHPMEHMMDVQE

PVY15    RFSEVRKKMVENDDIEMQALGSNTTIHAYFRKDWSDKALKIDLMPHNPLK
PPVD     HFSQIRNDYIGDDKITMQHIMSNPGIVAYYIKDATQKALKVDLTPHNPLR
TUMV     HFGDIRMDLLGEDELDSNEIRMNKTIQAYYMNNKTGKALKVDLTPHIPLK
PRV      HFSDIRRKYMDSDSFDRQALIANNTIKAYYVRNSAKAALEVDLTPHNPLK
TVMV     HFGEIRREAILADAMSPQQ..RNKGIQAYFVRNSTMPILKVDLTPHIPLK
SBMV     EFEEIRKDMIGEGELDRQRVYHNPGLQAYFIGKNTEEALKVDLTPHRPTL
PEMV     KFGDIRRQMILDDELDRRQTDVHNTIHAYLIKDWSNKALKVDLTPHNPLR
TEV      EFGKVRTRMLIDDEIEPQSLSTHTTIHAYLVNSGTKKVLKVDLTPHSSLR
OMV      YPAKIRSQLVSEEKLETQNIIANPGIQAYYMKNRGDAALKVDLTPHNPLL
PSBMV    TIGDDRREAMWNDELDKQLFVTRPTIEAYYIKDKTTPALKIDLNPHNPMR

PVY15    VCDKTNGIAKPPERELELRQTGPAVEVDVKDIPAQEVEHE.........
PPVD     VCDKTATIAGPPERFFLRQTGHPIFVEPNAIPKINEEGDEEVDHE...
TUMV     VCDLHATIAGPPERNELRQTGKAQPINIDEVPRANNE.LVPVDHESNS
PRV      VCDNKLTIAGPPDRRARLRQTGPPRTTQVDQVPPPSK....SVHHE...
TVMV     VCESN.NIAGPPERGELRRTGPTETLPFDALPPEKQEVAFE.......
SBMV     LCQNSNAIAGPPERDDLRQTGLPQVVSKSDVPRAKERVEME.......
PEMV     VSDKASAIMKPPERGELRQTGQAVEVDVCDIPKEVVKH..........
TEV      ASEKSTAIMGPPERNELRQTGMAVPVAYDQLPPKNEDLTFE.......
OMV      V.TKTGTIAGPPENFILRQTGKAVNVKMSEVPVENELEEVEHEG....
PSBMV    VCDKAETIAGPPERFFLRQSGSATLVPYSEVPVQNEKQEFDEEHWRTE
```

Figure 6 Alignement des séquences des VPg de divers potyvirus

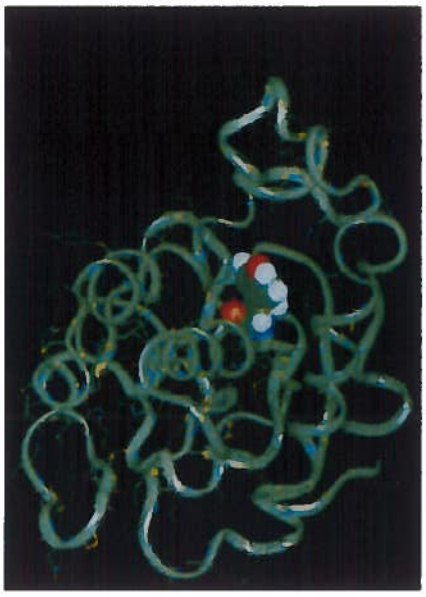
Les résidus conservés sont indiqués en gras et la tyrosine liant l'ARN est encadrée en rouge. PVY15, potato virus Y isolat anglais, PPVD, plum poxvirus souche D, TuMV, Turnip mosaic virus, PRV, papaya ringspot virus, TVMV, tobacco vein mottling virus, SBMV, soybean mosaic virus, PEMV, pepper mottle virus, TEV tobacco etch virus, OMV, ornithogalum mosaic virus, PSBMV, pea seed-borne mosaic virus

La VPg possède une fonction essentielle à la réplication du génome viral. La VPg se lie de façon covalente en 5' du génome viral via un résidu tyrosine très hautement conservé, situé en position 64 pour le TuMV et le PVY (Riechmann et al. 1992, Plochocka et al. 1996). La liaison implique le groupe hydroxyle exposé de la tyrosine et le troisième phosphate du résidu A présent en 5' de l'ARN viral (Plochocka et al. 1996). La structure en trois dimensions de la VPg du PVY a été déterminée par homologie de distribution des résidus hydrophobes/hydrophiles entre la VPg et la malate déshydrogénase (Figure 7A) (Plochocka et al. 1996). Cette structure permet d'observer que les 20 premières bases conservées dans le 5'UTR du PVY (Tordo et al. 1995) peuvent interagir, via des liens hydrogène, avec des résidus exposés à la surface de la VPg. Les résidus permettant les liens hydrogène avec l'ARN viral sont 5 lysines (6, 12, 45, 138 et 148), une glycine (48) et une histidine (144) (Figure 7B)

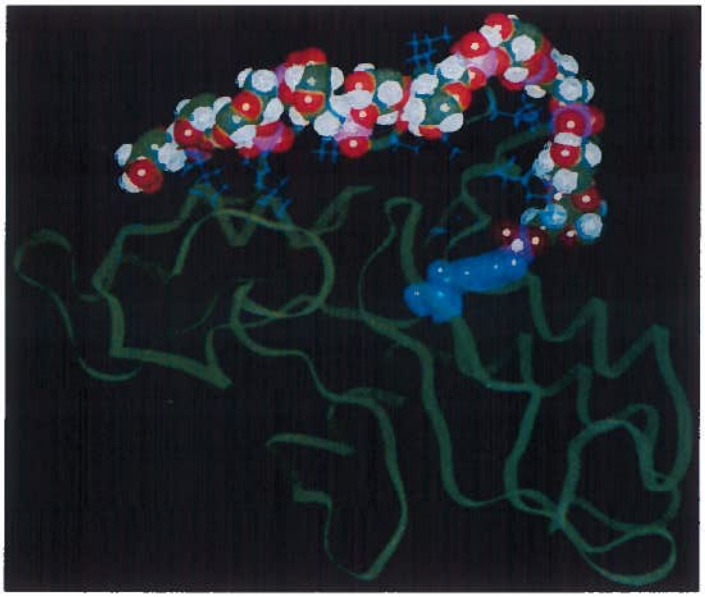
La VPg du TVMV interagit avec la NIb tel que démontré en double-hybride chez la levure (Hong et al. 1995) ainsi qu'*in vitro* (Fellers et al. 1998). Cette interaction laisse présager une implication de la VPgPro dans la réplication du génome viral. Une telle fonction pour la VPg des potyvirus est proposée particulièrement par analogie avec la VPg des Picornavirus qui elle est utilisée, liée à un résidu U, comme amorce de la réplication de l'ARN viral.

La VPg du Clover yellow vein virus (ClYVV) interagit avec la HCPro de ce potyvirus en double hybride chez la levure et par far western blot (Yambao et al. 2003). Une série de 19 acides aminés se retrouvant au centre de la VPg est essentielle à cette interaction.

A)



B)



Plochocka et al. 1996

Figure 7 Structure en trois dimensions de la VPg du PPV

Modèle hypothétique de la structure en trois dimensions de la VPg du PPV (A). La tyrosine 64 permettant la liaison covalente à l'ARN est indiquée en billes. Illustration de l'interaction via des liens hydrogènes entre l'ARN viral et la VPg du PPV (B). Les résidus impliqués sont en bleu, la tyrosine 64 et l'ARN schématisées avec des billes.

Il a aussi été démontré que la VPg du TEV interagit avec eIF4A (Schaad et al. 2000). D'autres virus possédant une VPg, tels les Birnaviridae, présentent une interaction entre la protéine liée en 5' de leur génome et le facteur eIF4A (Tacken et al. 2004). L'observation de telles interactions laissent présager un rôle important de la VPg dans l'initiation préférentielle de la traduction de l'ARN viral.

Quatre interactions protéine-protéine impliquant la VPg du TuMV ont été observées en double-hybride avec une banque d'ADNc d'*Arabidopsis thaliana* (Wittmann et al. 1997). Des quatre interactions observées, l'une implique le facteur d'initiation de la traduction eIFiso4E qui possède la capacité de lier la coiffe des ARN messagers. La VPg des potyvirus n'est pas seule dans sa capacité à interagir avec eIFiso4E, le Tomato Ringspot virus (ToRSV), du genre des népovirus, possède aussi une VPg interagissant avec eIFiso4E (Léonard et al. 2002). Une telle conservation de fonction à travers les groupes de phytovirus démontre l'importance de cette interaction dans la traduction des ARN viraux.

1.4.6 NIb ou polymérase

La protéine NIb est la polymérase des potyvirus. Sa fonction principale est de répliquer le génome. Elle possède d'ailleurs un motif conservé GDD typique des ARN polymérases ARN dépendantes et qui leur confère leur activité de réplication (Hong and Hunt. 1996). Il a été démontré que la NIb interagit avec la VPgPro (Hong et al. 1995, Fellers et al. 1998, Li et al. 1997, Daros et al. 1999) ainsi qu'avec la protéine cellulaire de liaison à la queue de polyA des ARN messagers, PABP (Wang et al. 2000).

Bien que la réplication des potyvirus ait lieu dans le cytoplasme des cellules infectées, la NIb possède deux signaux de localisation nucléaire (Li et al. 1997) et se retrouve dans des corps d'inclusion nucléaire en association avec NIa chez plusieurs potyvirus. La raison de la présence de la NIb dans le noyau demeure inconnue.

1.4.7 CP

La protéine de la capside forme l'extrémité C-terminale de la polyprotéine des potyvirus et est clivée par VPgPro suite à la traduction (Figure 8). Les domaines N- et C-terminal de CP sont variables et se retrouvent exposés à la surface des virions assemblés. Le domaine central, quant à lui, se retrouve à l'intérieur des particules virales.

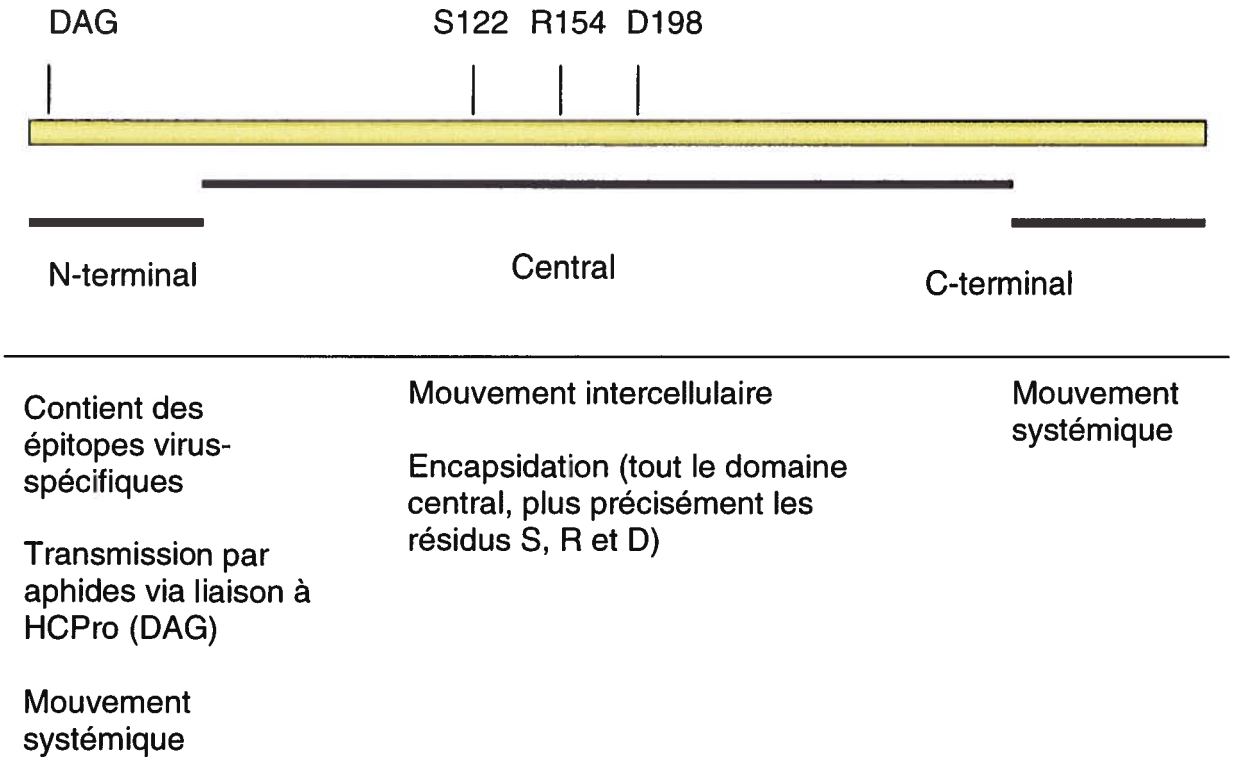


Figure 8 Représentation schématique des fonctions de la protéine de la capside

Les trois parties de la protéine sont indiquées sous le schéma représentant la protéine. Les résidus conservés importants sont inscrit au dessus du schéma.

Le domaine N terminal contient une séquence de trois acides aminés hautement conservés DAG qui sont essentiels à la transmission par les aphides des potyvirus (Atreya et al. 1995, Gal-On et al. 1992) bien que cette seule séquence ne soit pas suffisante (Lopez-Moya et al. 1999). Le domaine N-terminal contient aussi des épitopes qui sont spécifiques aux divers types de potyvirus (Urcuqui-Inchima et al. 2001). Les domaines N- et C-terminal sont essentiels au mouvement systémique (Dolja et al. 1995).

Le domaine central de la protéine de la capside remplit la fonction principale de cette protéine : l'encapsidation de l'ARN viral de polarité positive. Le domaine central seul est suffisant pour encapsider l'ARN et former des particules virales (Varrelmann et Maiss. 2000). Trois acides aminés conservés dans le domaine central sont essentiels à l'encapsidation du TEV : une sérine en position 122 (S122), une arginine en position 154 (R154) et un acide aspartique en position 198 (D198) (Dolja et al. 1994-1995). Le domaine central est aussi essentiel et suffisant au mouvement de complexes ARN-protéines entre les cellules via soit une interaction protéine-protéine ou protéine-ARN (Fedorkin et al. 2000).

2 Initiation de la traduction

Pour produire des protéines, les plantes tout comme les cellules animales procèdent à la traduction des ARN messager. L'initiation de la traduction procède de façon similaire chez les cellules animales et végétales bien que quelques facteurs diffèrent légèrement.

Le facteur d'initiation (eIF) de la traduction 4E s'associe à la coiffe de l'ARN messager et constitue la première étape de la liaison du complexe d'initiation à l'ARN messager. La protéine eIF4G se lie ensuite à eIF4E pour former le complexe eIF4F. Chez la plante, il existe deux isomères de eIF4G : eIF4G et eIFiso4G. L'isomère eIF4G interagit avec eIF4E pour former le complexe eIF4F alors que l'isomère eIFiso4G lie

eIFiso4E et forme le complexe eIFiso4F. Les complexes eIF4F/eIFiso4F contiennent aussi eIF4A et recrutent eIF4B, ce qui permet la liaison du complexe de 43S (Merrick et Hershey. 1996), complexe comprenant la sous-unité ribosomale de 40S, eIF1A, eIF3 et l'ARN de transfert initiateur (Met-tRNA) lié à eIF2-GTP (Trachsel 1996) (Figure 9).

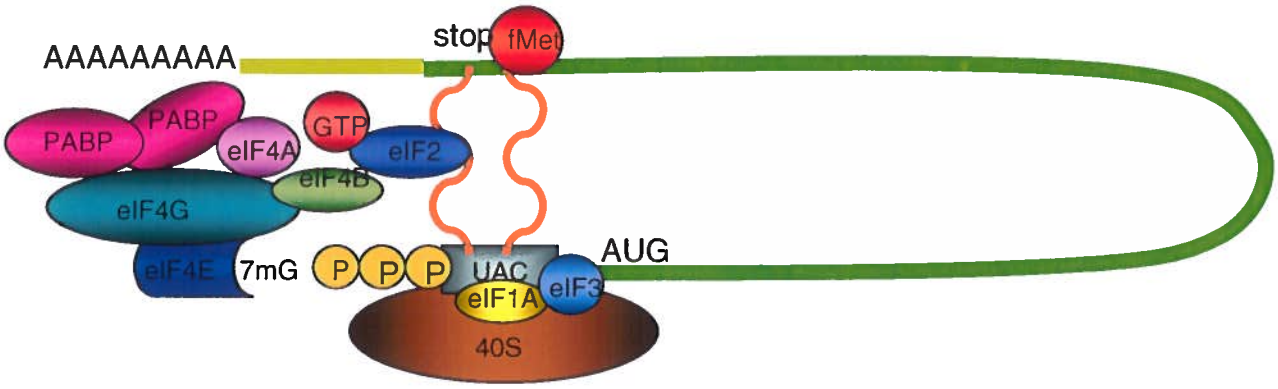


Figure 9 Complexe d'initiation de la traduction

Chez les cellules autant animales que végétales, l'ARN messager est présent sous forme circularisée via l'interaction entre eIF4G (ou eIFiso4G chez la plante) et PABP (Jacobson. 1996). Puisque eIF4G se retrouve liée à la coiffe via eIF4E et que PABP est liée à la queue de polyA, la coiffe et la queue de l'ARN messager se retrouvent donc à proximité l'une de l'autre. Cette circularisation permet une réutilisation plus efficace des sous-unités ribosomales qui, lorsqu'elles se dissocient de l'ARN messager suite à la terminaison de la traduction, sont relâchées à proximité de la coiffe et peuvent donc réintégrer le processus d'initiation de la traduction.

3 Les virus et la traduction

3.1 Virus animaux et inhibition de la traduction

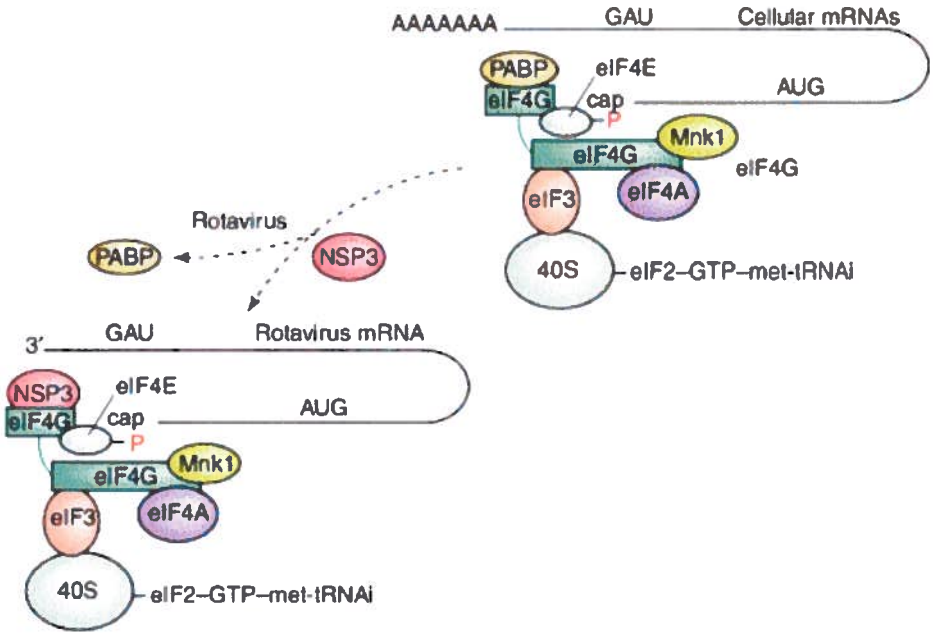
La majorité des virus utilisent le mécanisme de traduction de leur cellule hôte afin de produire leurs protéines. Cette utilisation de la cellule cause une diminution de la traduction des ARNm cellulaires en faveur des ARN viraux. Plusieurs virus animaux ont développé divers mécanismes leur permettant de contrôler le système de traduction cellulaire en modifiant ou en utilisant de façon préférentielle certaines protéines impliquées dans la traduction. Toutes les étapes du processus de traduction peuvent être la cible de virus. Lors de l'initiation, les protéines cellulaires eIF4E, eIF4G et 4E-BP peuvent être modifiées afin de favoriser la traduction des ARN viraux (Gale et al. 2000).

La recherche du codon initiateur peut être modifiée par la présence d'IRES (internal ribosome entry sites) permettant la liaison de la sous-unité ribosomale 40S à l'ARN en absence du complexe d'initiation eIF4F (Jang et al. 1988, Pelletier et Sonenberg. 1988). Les IRES sont utilisés entre autre par les picornavirus (Jang et al. 1988), les Pestivirus et les Hepacivirus (Jackson et Kaminski. 1995) Les IRES permettent donc aux virus les possédant d'être indépendant de la liaison du complexe eIF4F, via eIF4E, à l'extrémité 5' de leur ARN.

3.1.1 Les rotavirus

La circularisation de l'ARN messager par les protéines PABP et eIF4G (ou eIFiso4G chez les plantes) permet d'augmenter considérablement le niveau de traduction des ARN messagers cellulaires. Les rotavirus produisent une protéine, la protéine NSP3, qui peut lier la eIF4G et par le fait même déplacer la PABP (Figure 10). L'ARN des rotavirus ne possède pas de queue de polyA et ne peut donc par conséquent pas lier la PABP. Par contre, des séquences présentes dans la région 3' non-traduite de l'ARN viral

se lient à la protéine NSP3. La liaison de NSP3 à eIF4G et à l'extrémité 3' de l'ARN viral permet donc de circulariser l'ARN, ce qui augmente le taux de traduction des protéines virales.



Schneider et Mohr, 2003

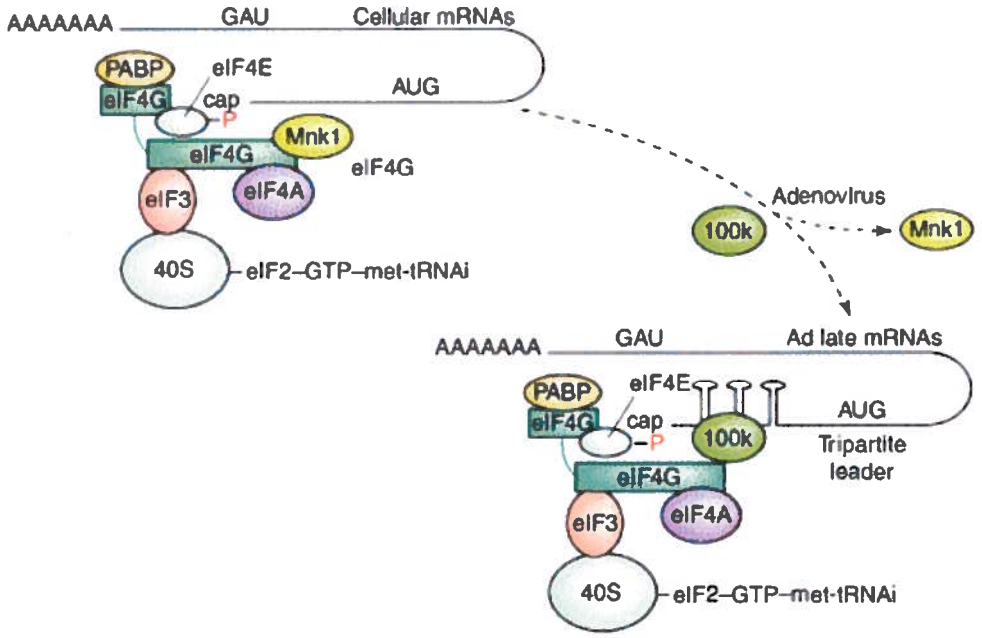
Figure 10 Effet de la protéine NSP3 des rotavirus sur la traduction

La PABP est remplacée par la NSP3 en interaction avec eIF4G. NSP3 lie l'extrémité 3' non-polyadénylée de l'ARN des rotavirus Le modèle de traduction des ARNm cellulaires est présenté en haut à droite.

3.1.2 Les Adénovirus

La traduction d'ARN messagers contenant une longue séquence non-traduite en 5' est défavorisée par le système utilisé par les cellules eucaryotes. Par contre, les ARNm cellulaires présentant de telles séquences peuvent être traduit grâce à la phosphorylation de la sérine 209 de eIF4E (Sonenberg. 1996). Cette phosphorylation est effectuée par la kinase Mnk1 (Waskiewicz et al. 1997). Afin de diminuer le niveau de traduction des

ARNm cellulaires et d'augmenter par le fait même la traduction des ARN viraux, les Adénovirus produisent une protéine (la 100k) qui prévient l'action de la Mnk1 sur la eIF4E et permet de recruter les quelques eIF4E phosphorylées à l'ARN viral (Figure 11) (Zhang et al. 1994).



Schneider et Mohr, 2003

Figure 11 Effet de la protéine 100k des Adénovirus sur la traduction

L'action de la kinase Mnk1 est inhibée par la présence de 100k. Le complexe d'initiation est recruté préférentiellement aux ARN viraux. Le modèle de traduction des ARNm cellulaires est présenté en haut à gauche.

3.1.3 Les Picornavirus

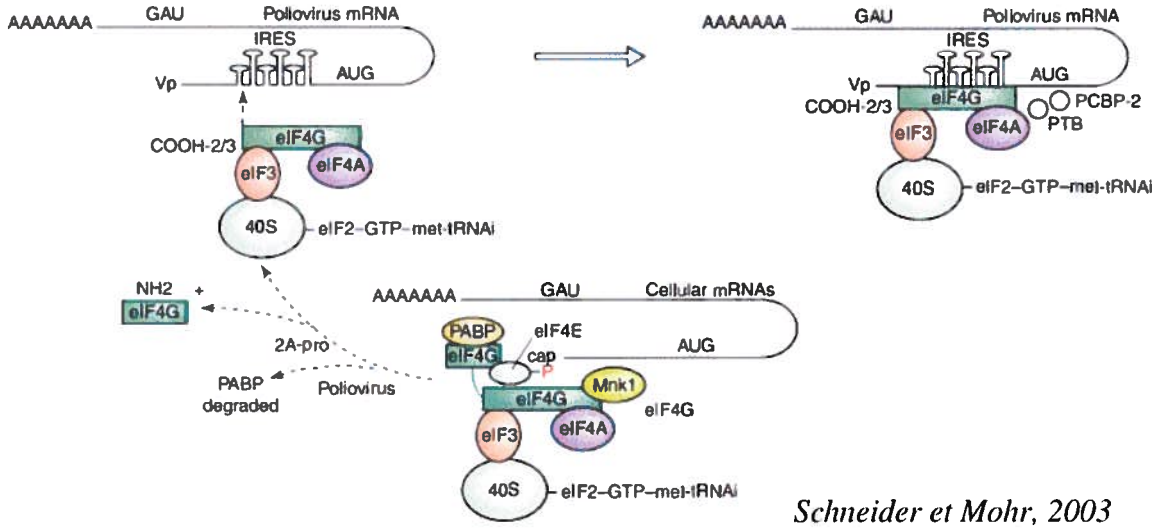
Le facteur eIF4G comprend 4 sites de liaison protéine-protéine. Le site de liaison à eIF4E se retrouve le plus près de la partie N-terminale de la protéine, suivi du site de liaison à eIF3 et eIF4A et d'un autre site de liaison à eIF4A. L'extrémité C-terminale

quant à elle contient le site de liaison à Mnk1 (Figure 12A) (Gingras et al. 1999). Tous ces sites sont nécessaires à l'initiation de la traduction coiffe-dépendante des ARNm cellulaires.

Les Picornavirus possèdent un génome d'ARN simple brin de polarité positive auquel est lié de façon covalente une protéine (la VPg) en 5'. Ces virus ne possèdent donc pas de coiffe à leur ARN et par le fait même ne requièrent pas la présence de eIF4E. Les Picornavirus ont développé une protéinase (la protéine 2A-Pro) qui peut cliver la eIF4G et retirer la portion N-terminale, contenant le site de liaison à eIF4E, de la portion C-terminale, contenant les autres sites de liaison (Keiper et al. 1999). La portion C-terminale de la eIF4G peut lier les facteurs d'initiation eIF4A et eIF3, ce qui permet la traduction des ARN viraux via la reconnaissance de leur IRES (Figure 12B) (Ohlmann et al. 1996). La 2A-Pro clive aussi la PABP, inhibant drastiquement la traduction cellulaire (Kerekatte et al. 1999). Cette inhibition est peut-être due à l'instabilité des ARNm non-circularisés, à une diminution du recyclage des ribosomes ou à l'absence de formation des complexes eIF4F.

A) eIF4G

B)



Schneider et Mohr, 2003

Figure 12 Effet de la protéinase 2A-Pro des Picornavirus sur la traduction

A) Représentation schématique des domaines de liaison de eIF4G (indiqués sous le schéma) et du site de clivage par 2A-Pro (indiqué par une flèche).

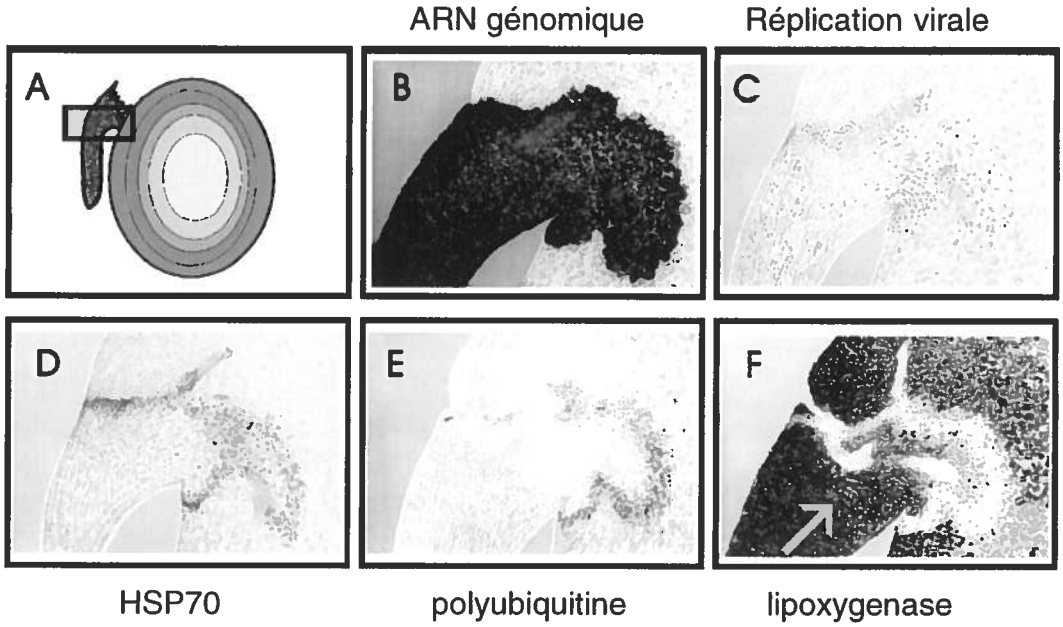
B) La 2A-Pro dégrade la PABP et clive la eIF4G.

Le modèle de traduction des ARNm cellulaires est présenté en bas.

Plusieurs virus ont donc évolué afin de pouvoir modifier la machinerie d'initiation de la traduction de leur cellule hôte. Les virus présentant une VPg liée en 5' de leur génome semblent particulièrement adaptés à interagir avec la machinerie d'initiation de la traduction. C'est entre autre le cas du virus de Norwalk, un Calicivirus, dont la VPg interagit avec le facteur eIF3 (Daughenbaugh et al. 2003). Puisque le facteur eIF4E est essentiel à la traduction des ARNm cellulaires, certains virus modifient ce facteur afin de diminuer le niveau de traduction des protéines de l'hôte et par le fait même, augmenter la traduction des protéines virales qui tire avantage de la modification apportée à eIF4E.

3.2 Pea Seed borne mosaic virus et inhibition de l'expression

Afin d'augmenter le niveau de production des protéines virales par la cellule hôte, certains virus n'interfèrent pas avec la traduction, mais plutôt inhibent la production d'ARNm. Une diminution du niveau des ARNm cellulaires permet de concentrer la traduction sur les ARN viraux. C'est une méthode utilisée, entre autre, par le Pea Seed-borne mosaic virus (PSbMV). Il a été démontré par hybridation *in situ* chez des embryons de pois infectés avec le PSbMV, un potyvirus, que la transcription de la majorité des gènes de l'hôte est inhibée au front d'infection, c'est-à-dire dans les cellules qui produisent de façon active des protéines virales (Figure 13). Par contre, d'autres gènes cellulaires sont exprimés en plus grande quantité au front d'infection (Maule et Aranda. 1998). Les gènes dont la transcription est inhibée sont ceux qui ne jouent aucun rôle dans l'infection virale, alors que ceux dont le niveau d'expression demeure constant sont impliqués dans le cycle viral. Les gènes qui sont surexprimés quant à eux sont ceux qui permettent la réponse anti-virale. Il semble donc que les potyvirus puissent modifier la production d'ARNm cellulaire à leur avantage en éliminant ceux permettant la production de protéines qui leurs sont inutiles. Des protéines telles l'actine et la tubuline ne voient pas la quantité de leur ARNm modifiée par l'infection, probablement dû à l'importance de ces protéines dans le mouvement intercellulaire des potyvirus (Maule et al. 2002). L'impact de l'infection sur les ARNm de l'hôte provient probablement de la compétition entre VPg et la coiffe pour eIF4E. Sans liaison de complexe d'initiation, les ARNm ne sont pas traduits. Il deviennent donc instables et sont dégradés.



Maule et Aranda 1998

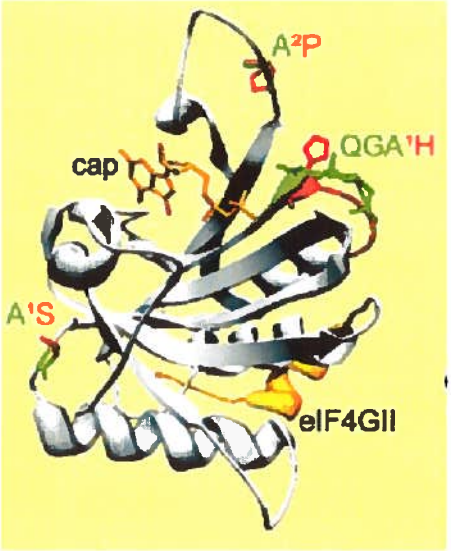
Figure 13 Effet de l'infection au potyvirus sur les ARNm cellulaires chez les embryons de pois

Schéma de l'embryon de pois (A). La zone observée lors de l'hybridation *in situ* est encadrée. Les cellules infectées sont identifiées par la présence d'ARN génomique (B). Le front d'infection est identifié par la réplication virale (C). Les protéines cellulaires HSP70 (D) et polyubiquitine (E) sont surexprimées au front d'infection. La traduction de la lypoxygénase (F) est inhibée au front d'infection.

3.3 Potyvirus, VPg et eIF4E

3.3.1 eIF4E et ses isomères

La eIF4E et eIFiso4E lient la coiffe des ARNm cellulaires afin de permettre l'assemblage du complexe d'initiation de la traduction et la liaison des ribosomes à l'ARNm. Chez la cellule animale, on retrouve seulement eIF4E alors que chez la cellule végétale, ce facteur est présent sous la forme de deux isomères : eIF4E et eIFiso4E. eIFiso4E fait partie du complexe eIFiso4F, complexe qui permet la traduction d'ARNm présentant une extrémité 5' non-traduite de faible structure secondaire (Gallie et Browning 2001). De son côté, l'isomère eIF4E s'intègre au complexe eIF4F, supportant ainsi la traduction d'ARNm comprenant des structures complexes en 5'. eIF4E permet la traduction dans des conditions cellulaires inhibant la traduction coiffe-dépendante, tel une infection virale (Gallie 201). Chez *A. thaliana*, eIF4E et eIFiso4E présentent 52% d'homologie de séquence d'acides aminés et sont exprimées différentiellement, bien que les deux isomères soient fortement exprimés chez les jeunes tissus (Rodriguez et al. 1998). Dans les cellules des feuilles d'*A. thaliana*, seul eIFiso4E est exprimée et eIF4E est absente suite à un blocage traductionnel (Dinkova et *al.* 2000). La structure en trois dimensions de la eIF4E de la laitue a été obtenue en comparant les structures 3D des eIF4E humaines et murines (Nicaise et al. 2003). Cette structure permet d'identifier la localisation des sites de liaison à la coiffe et à eIF4G (Figure 14). Ce modèle permet aussi de proposer la localisation des résidus impliqués dans la liaison avec VPg puisque la VPg et la coiffe compétitionnent dans leur liaison à eIF4E.



Nicaise et al. 2003

Figure 14 Structure en trois dimensions de la eIF4E de la laitue

Modèle basé sur la comparaison avec les eIF4E humaine et murine. La coiffe de l'ARNm est présentée en jaune et identifiée CAP. La portion de eIF4G interagissant avec eIF4E est présentée en jaune et identifiée eIF4GII. Les résidus présentés en rouge et en vert font partie de deux homologues de eIF4E ne permettant pas l'infection au LMV.

Le facteur eIF4E peut être phosphorylé ce qui permet de varier son affinité pour la coiffe et donc de contrôler le niveau de traduction (Joshi et al. 1995, Makkinje et al. 1995, Sonenberg et Gingras. 1998). Chez les cellules animales, on retrouve une protéine de liaison à eIF4E, la 4E-BP qui, lorsque liée à eIF4E inhibe la liaison du facteur à la coiffe (Pause et al. 1994, Sonenberg et Gingras. 1998). Aucun homologue de cette protéine n'a été identifié chez la cellule végétale.

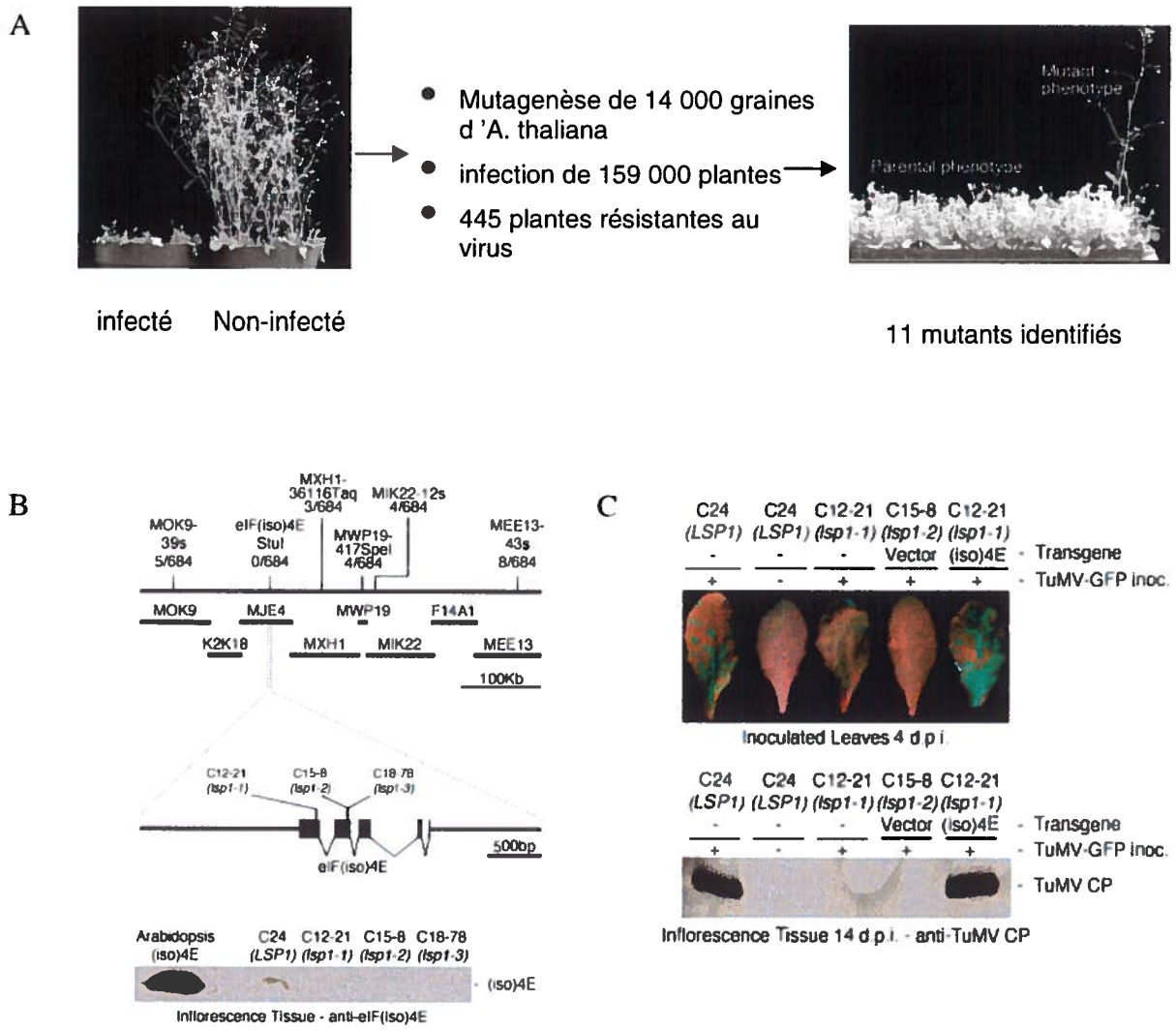
3.3.2 eIF4E et l'infection aux potyvirus

3.3.2.1 eIF4E et la susceptibilité au LMV, TEV, PVY, CMV et ClYVV

Des plantes résistantes à l'infection avec plusieurs potyvirus ont été observées. La caractérisation de ces mutants a permis d'observer la présence de loci conférant la résistance à l'infection. Ces loci ont été analysés et le locus pvr1 (potyvirus resistance locus 1) conférant la résistance de *Capsicum* au TEV contient le gène de eIF4E (Kang et al. 2005). Le locus pvr2 du piment quant à lui possède aussi le gène de eIF4E et permet la résistance au PVY (Ruffel et al. 2002). Le même gène est associé à la résistance au LMV chez la laitue (Nicaise et al. 2003). Le gène de résistance cum1 observé chez *A. thaliana* code pour la eIF4E et permet la résistance à l'infection au CMV, un Cucumovirus (Yoshii et al. 2004). Le ClYVV lui aussi requiert l'expression de eIF4E afin d'infecter sa plante hôte (Sato et al. 2005). Un grand nombre de potyvirus et même d'autres phytovirus semblent donc utiliser seulement la eIF4E pour la traduction de leur ARN lors de l'infection et ne peuvent compenser l'absence de ce facteur en utilisant eIFiso4E. Dans tous les cas, le facteur de virulence de ces virus a été identifié comme étant la VPg.

3.3.2.2 eIFiso4E et la résistance au TuMV

Des études de mutagenèse effectuées chez des plantes d'*Arabidopsis thaliana* ont démontré que la résistance à l'infection au TuMV est directement reliée à l'absence de production de la protéine eIFiso4E. Les mutants produits lors de cette analyse présentent tous des mutations dans le gène de eIFiso4E qui préviennent son expression. De plus, la susceptibilité de ces plantes résistantes peut être retrouvée par l'expression transitoire de eIFiso4E (Figure 15) (Lellis et al. 2002). La même observation a aussi été faite par Duprat et al. en 2002.



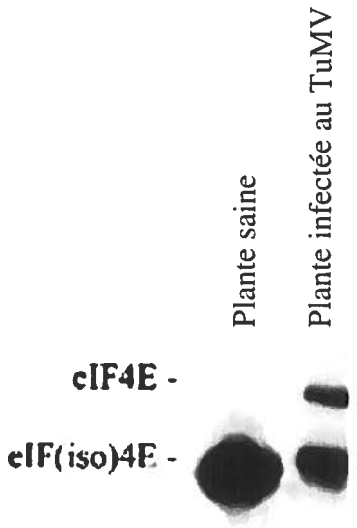
Lellis et al. 2002

Figure 15 Identification du gène de résistance au TuMV

Infection des plantes suite à la mutagenèse des graines (A). Identification des mutations observées chez les plantes résistantes (B). Restauration du phénotype de susceptibilité chez les plantes résistantes au TuMV par l'expression de eIFiso4E (C)

3.3.2.3 Interaction eIFiso4E et VPg

Étant donné l'importance de eIFiso4E dans l'infection au TuMV et puisque la plante lorsqu'infectée au TuMV diminue sa production de eIFiso4E pour la remplacer par eIF4E (Figure 16), les interactions avec les protéines de l'hôte impliquant la VPg ont été évaluées.



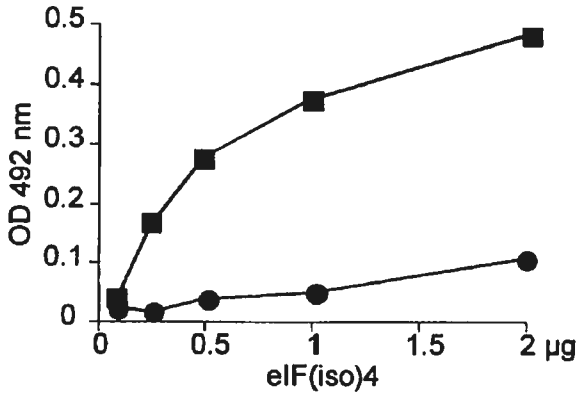
Léonard et al. 2004

Figure 16 eIF4E et eIFiso4E chez la plante infectée au TuMV

Induction de l'expression de eIF4E chez les plantes infectées au TuMV.

D'abord, le système de double-hybride chez la levure a permis l'identification de eIFiso4E comme partenaire d'interaction avec la VPg du TuMV (Wittmann et al. 1997). L'interaction entre les deux protéines a ensuite été évaluée *in vitro* par test ELISA, ce qui a permis de démontré que la VPgPro du TuMV se lie à eIFiso4E alors que lorsque le domaine VPg de VPgPro est délété, aucune interaction n'est observée (Figure 17) (Léonard et al. 2000). La capacité de eIFiso4E de lier la coiffe et la VPg simultanément a

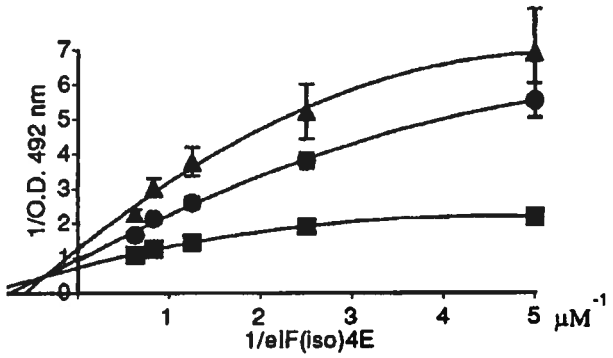
été évaluée en partie, et ces observations ont démontré que la VPg du TuMV compétitionne avec le M^7GTP afin de lier la eIFiso4E (Figure 18). Il semble donc que les deux éléments partagent partiellement le même site de liaison à eIFiso4E ou encore que la présence de l'un masque le site de liaison de l'autre. Cette compétition joue possiblement un rôle dans l'inhibition de la traduction des ARNm de l'hôte.



Léonard et al. 2000

Figure 17 ELISA d'interaction entre VPgPro du TuMV et eIFiso4E

Détection de l'interaction entre VPgPro (■) du TuMV et eIFiso4E. La courbe de VPgPro représente l'interaction entre 1 µg de VPgPro et une quantité variable de eIFiso4E. Aucune interaction n'est observée entre VpgΔPro (●) et eIFiso4E. VpgΔPro = VPgPro sans le domaine VPg.



Léonard et al. 2000

Figure 18 Courbe de liaison de VPgPro à eIFiso4E avec ou sans M^7GTP

Graphique de Lineweaver-Burk démontrant la diminution de la liaison de VPgPro du TuMV à eIFiso4E. ■ = 0 µg M^7GTP ● = 0.5 µg M^7GTP, ▲ = 1 µg M^7GTP

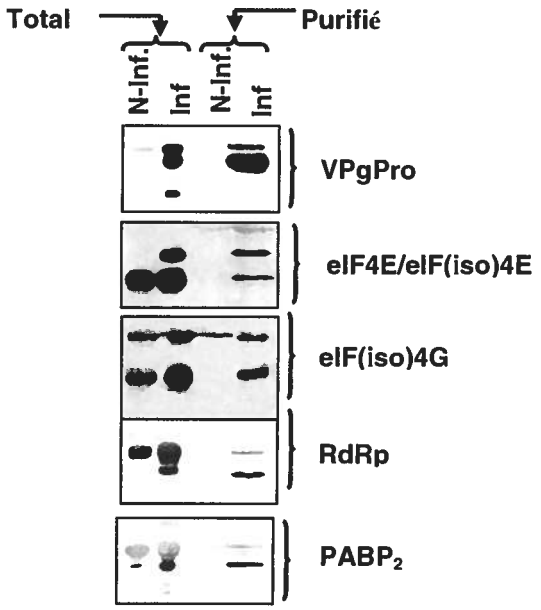
Diverses délétions dans la VPg du TuMV ont permis, à l'aide du double hybride, de déterminer que les acides aminés entre les positions 59 et 93 sont essentiels à l'interaction avec eIFiso4E. Des mutations effectuées par la même équipe ont par la suite permis d'identifier un des résidus responsable de l'interaction entre VPg et eIFiso4E, l'acide aspartique présent en position 77 chez la VPg du TuMV (Tableau 2) (Léonard et al. 2000).

VPg	Interacteur	Unités de β-galactosidase
Type sauvage	Aucun	0
	eIFiso4E	178
F59A	Aucun	0
	eIFiso4E	125
Y63A	Aucun	0
	eIFiso4E	198
D77A	Aucun	0
	eIFiso4E	0
D77E	Aucun	0
	eIFiso4E	0
D77N	Aucun	0
	eIFiso4E	0

Tableau 2 Interaction en double hybride de mutants de VPg du TuMV avec eIFiso4E

Activité β-galactosidase obtenue en exprimant la eIFiso4E d' *A. thaliana* en fusion avec le domaine d'activation B42 et divers mutants de VPg fusionnés au domaine de liaison à Gal4. Les noms des mutants représentent les acides aminés substitués (F59A = phénylalanine 59 modifiée en alanine, Y63A = tyrosine 63→ alanine, D77A = acide aspartique 77→ alanine, D77E = acide aspartique 77→ glutamate, D77N = acide aspartique 77→ asparagine)

Finalement, l'interaction entre eIFiso4E et VPgPro a été évaluée *in planta* par sédimentation sur gradient de sucrose. Cette procédure a permis d'identifier la eIFiso4E et la VPgPro en association avec les membranes du réticulum endoplasmique. Les protéines ont ensuite été purifiées par chélation métallique sur nickel afin d'isoler la VPgPro et de recueillir les protéines liées à celle-ci. Ce travail a permis d'observer que eIFiso4E est co-purifiée avec VPgPro tout comme d'autres protéines cellulaires impliquées dans la traduction (Figure 19) (Léonard et al. 2004). eIFiso4E joue donc un rôle important dans l'infection au TuMV, sensiblement via son interaction avec VPg. Les interactions impliquant la VPg se doivent d'être investiguées plus en profondeur afin de permettre une meilleure compréhension de l'infection au TuMV.



Viel, non-publié

Figure 19 Protéines copurifiées avec VPgPro suite à une séparation sur gradient de sucrose

N-Inf = non infectée, Inf = Infectée au TuMV

4 Hypothèses et objectifs de travail

4.1 Localisation de l'interaction entre eIFiso4E et VPgPro

Étant donné l'importance du facteur eIFiso4E dans l'infection au TuMV, son interaction *in vitro* avec VPgPro et les données de fractionnement sur gradient de sucrose qui proposent une colocalisation de ces deux protéines au réticulum endoplasmique, nous proposons d'évaluer, en premier lieu, la localisation de ces protéines dans la cellule végétale intacte.

Afin d'évaluer cette hypothèse, des vecteurs permettant l'expression de protéines de fusion entre eIFiso4E et GFP ainsi qu'entre VPgPro et DsRed ont été produit afin d'évaluer la localisation de chaque protéine séparément ainsi que leur colocalisation dans la cellule végétale. Les protéines eIF4E et 6KVPgPro ont aussi été étudiées en fusion avec GFP et DsRed respectivement. Afin de localiser précisément VPgPro et 6KVPgPro, les deux protéines de fusion ont été exprimées conjointement avec une GFP ciblée au réticulum. Une colocalisation de la DsRed liée à 6KVPgPro avec la GFP a permis de déterminer clairement l'association de cette protéine virale avec le réticulum endoplasmique.

4.2 Copurification des complexes protéiques impliquant VPgPro

Des études de copurification et d'interaction *in vitro* ont permis d'élaborer un modèle d'interactions impliquant VPg. Nous proposons donc ce modèle comme point d'ancrage des interactions entre l'hôte et le virus du TuMV.

Afin d'évaluer l'interaction d'autres protéines, les complexes impliquant les précurseurs de VPg associés aux membranes ont été purifiés par chromatographie d'affinité sur nickel. Les protéines ainsi purifiées, grâce à la liaison naturelle des précurseurs de VPg au nickel, ont été analysées par buvardage de type Western et par spectrométrie de masse afin de déterminer leur identité.

Chapitre 2

Matériel et méthodes

1 Souches

Escherichia coli

DH5α : F^- Φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 / recA1/ endA1 / hsdR17 (r_k^-, m_k^-) / phoA / supE44 / λ^- / thi-1 / gyrA96 / relA1

Top 10 : F^- mcrA / Δ(mrr-hsdRMS-mrcBC) Φ80dlacZΔM15 / ΔlacX74 / recA1 / araΔ139 / Δ(rar-leu)7697 / galU / galK / rpsL / (Str^R) / endA1 / nupG

K-12 : endA1 / hsdR17 (r_{k12}^-, m_{k12}^+) / supE44 / thi-1 / recA1 / gyrA96 / relA1 / lacF' [$proA^+B^+$, $lacI^qZ\Delta M15$: $Tn10(tet^R)$]

Saccharomyces cerevisiae

Y187 : MATα / ura3-52 / his3-200 / ade2-101 / trp1-901 / leu2-3, 112 / met^- / gal4Δ / gal80Δ / URA3::$GAL1_{UAS}$-$GAL1_{TATA}$-lacZ

Agrobacterium tumefaciens

AGL1 : Amp^R / pTiBo542

2 Milieux de croissance

Les souches de *E. coli* et d'*Agrobacterium tumefaciens* ont été cultivées dans un milieu Luria-Bertani (LB) (1% de NaCl, 0,5% d'extrait de levure et 1% de tryptone).

Pour permettre l'utilisation de ce milieu sous forme solide, 1,5% d'agar a été ajouté. Les antibiotiques appropriés pour la sélection ont été ajoutés au milieu de culture selon les concentrations suivantes : 50 µg/ml kanamicine, 5 µg/ml tétracycline et 100 µg/ml ampicilline

Les souches de *E coli* ont été incubées à 37°C pendant 16 heures, alors que celles d'*A. tumefaciens* ont été cultivées à 30°C pendant 2 à 3 jours.

Les cellules d'*Agrobacterium tumefaciens* servant à la production de cellules électrocompétentes ont été cultivées dans du milieu LBroth (1% de tryptone, 0,5% d'extrait de levure, 0,5% de NaCl et 0,1% de glucose) pendant 16 heures à 30°C.

Les levures ont été cultivées dans le milieu YPD (1% d'extrait de levure, 2% de peptone et 2% de dextrose). Afin de solidifier ce milieu de culture, 2% d'agar y a été ajouté.

La sélection des levures transformées a été faite sur milieu standard moins tryptophane (SD-Trp). Ce milieu est composé de 0,67% de Yeast nitrogen base sans acide aminé, 2% de dextrose et 0,192% de Drop-out sans tryptophane (le Drop-out contient tous les acides aminés sauf, dans ce cas précis, le tryptophane). La solidification de ce milieu requiert l'ajout de 2,1% d'agar.

Les levures ont été cultivées à 30°C pendant 2 à 3 jours.

3 Vecteurs

3.1 pBIN-mgfp5-ER

Ce vecteur, gracieuseté du Dr. Armand Séguin du Centre de foresterie des Laurentides, est dérivé du vecteur pBI121 (Jefferson et *al.*, 1987) (figure 20). Le gène de la GFP utilisé provient du gène de la méduse *Aquarea victoria* qui a subi les

modifications suivantes : retrait d'un intron cryptique d'*Arabidopsis* et substitution de quelques nucléotides permettant une meilleure expression dans la cellule végétale, ajout d'un signal de compartimentalisation et d'un signal de rétention (HDEL) au réticulum endoplasmique. En amont de ce gène modifié de la protéine de fluorescence verte se trouve un promoteur constitutif fort, le promoteur 35S du CaMV. Le vecteur résultant est un vecteur binaire réplicatif basé sur pBIN19 conférant une résistance à la kanamicine et permettant le transfert d'une zone de T-DNA contenant le gène mgfp5-ER dans les cellules végétales.

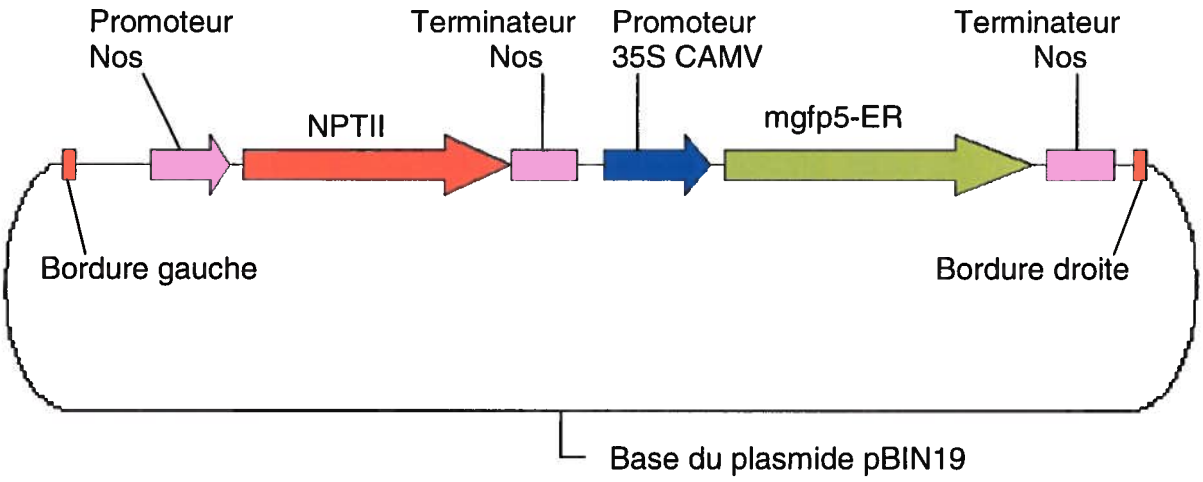


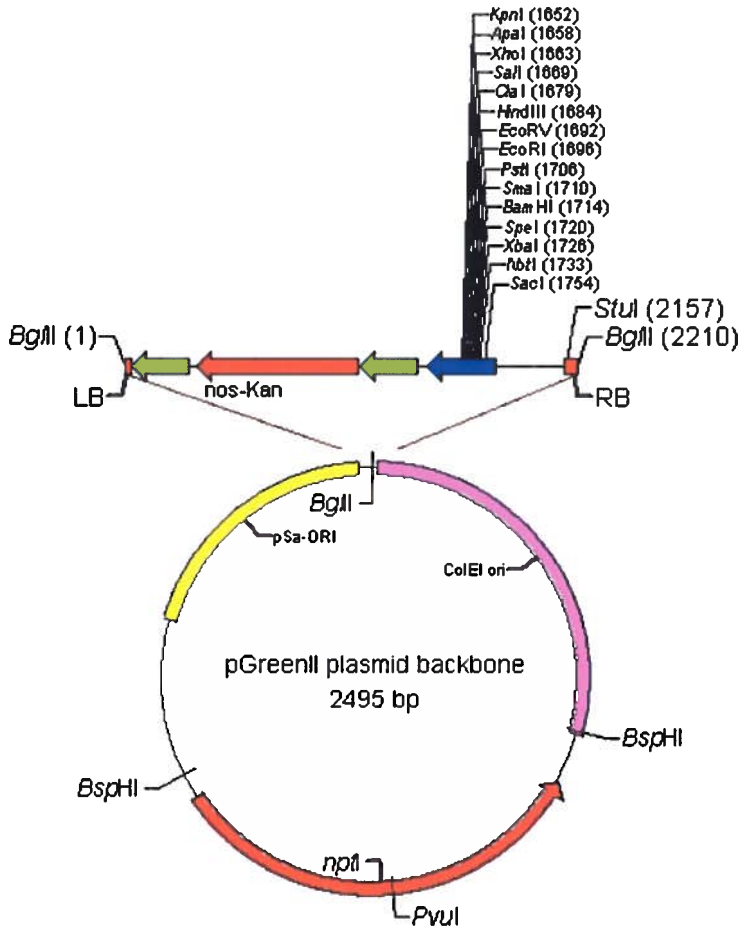
Figure 20 Le vecteur pBIN-mgfp5-ER

NPTII = gène de résistance à la kanamicine pour les plantes, mgfp5-ER = gène de la GFP modifiée

3.2 Système de vecteurs binaires (pGreenII 0029 / pSoup)

Le vecteur pGreen 0029 (figure 21A) est un vecteur Ti binaire possédant un site de multiclonage provenant du vecteur pBlueScript. Le clonage dans ce site permet la sélection bleu/blanc par complémentation de lacZ. pGreen 0029 contient les bordures gauche et droite du T-DNA nécessaires au transfert de cette zone de la bactérie à la cellule végétale. L'origine de réplication pour *Agrobacterium* (ori-pSa) provient du plasmide pGV1122 et doit être complémentée en trans par le gène de la réplicase (*RepA*) située sur le vecteur pSoup (figure 21B). Ce vecteur «aidant» contient aussi des gènes de virulence essentiels au transfert de la zone de T-DNA et confère une résistance à la tétracycline permettant la sélection dans *E. coli* et *A. tumefaciens*. Le vecteur pGreen pour sa part confère une résistance à la kanamicine.

A



B

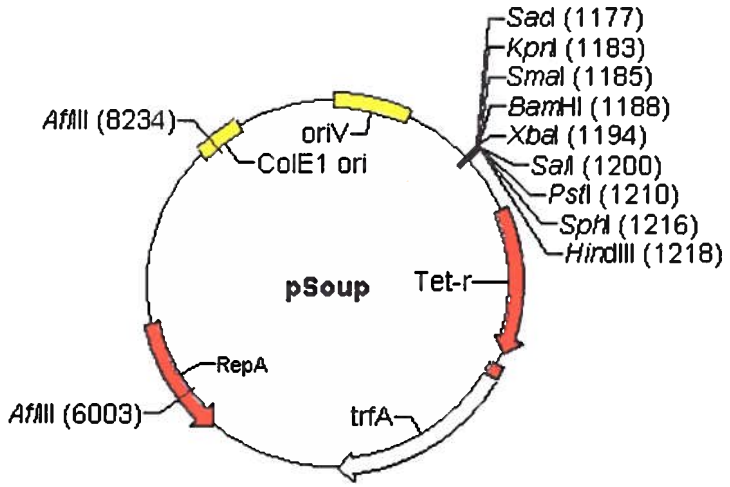


Figure 21 Les vecteurs pGreen-0029 (A) et pSoup (B)

pSA-ORI=origine de réplication dans *A. tumefaciens*, ColE1 ori=origine de réplication dans *E. coli*, nptI=gène de résistance à la kanamicine dans la bactérie, OriV=origine de réplication dans *A. tumefaciens*, RepA=gène de la réplicase A, Tet-r=gène de résistance à la tétracycline, trfA=gènes de virulences

3.3 pGreen-35S-M

Le vecteur pGreen-35S-M (figure 22) provient du vecteur pGreen-0029 modifié de la façon suivante : le site de multiclonage a été retiré par digestion avec *KpnI* et *NotI*, remplissage des extrémités et ligation. La casette d'expression 35S a ensuite été insérée dans le site *StuI* du vecteur résultant. La cassette d'expression 35S contient le promoteur fort constitutif 35S du CaMV, un site de multiclonage et le terminateur du CaMV.

3.4 pGreen-35S-M-2μTrp

Le vecteur pGreen-35S-M-2μTrp (figure 23) résulte de l'insertion de l'origine de réplication de la levure (2μ) et du gène permettant la synthèse de l'acide aminé tryptophane (Trp) dans le vecteur pGreen-35S-M. La présence de ces deux éléments permet la réplication du vecteur dans la levure et la sélection des levures transformées sur un milieu SD-Trp.

3.5 pO

Le vecteur pO, gracieuseté du Dr. O. LeGall de l'INRA de Bordeaux, code pour un inhibiteur de «silencing». Cet inhibiteur provient du Beet western yellows virus (BYWV) et permet d'augmenter le niveau d'expression des gènes transférés lors de l'agroinfiltration.

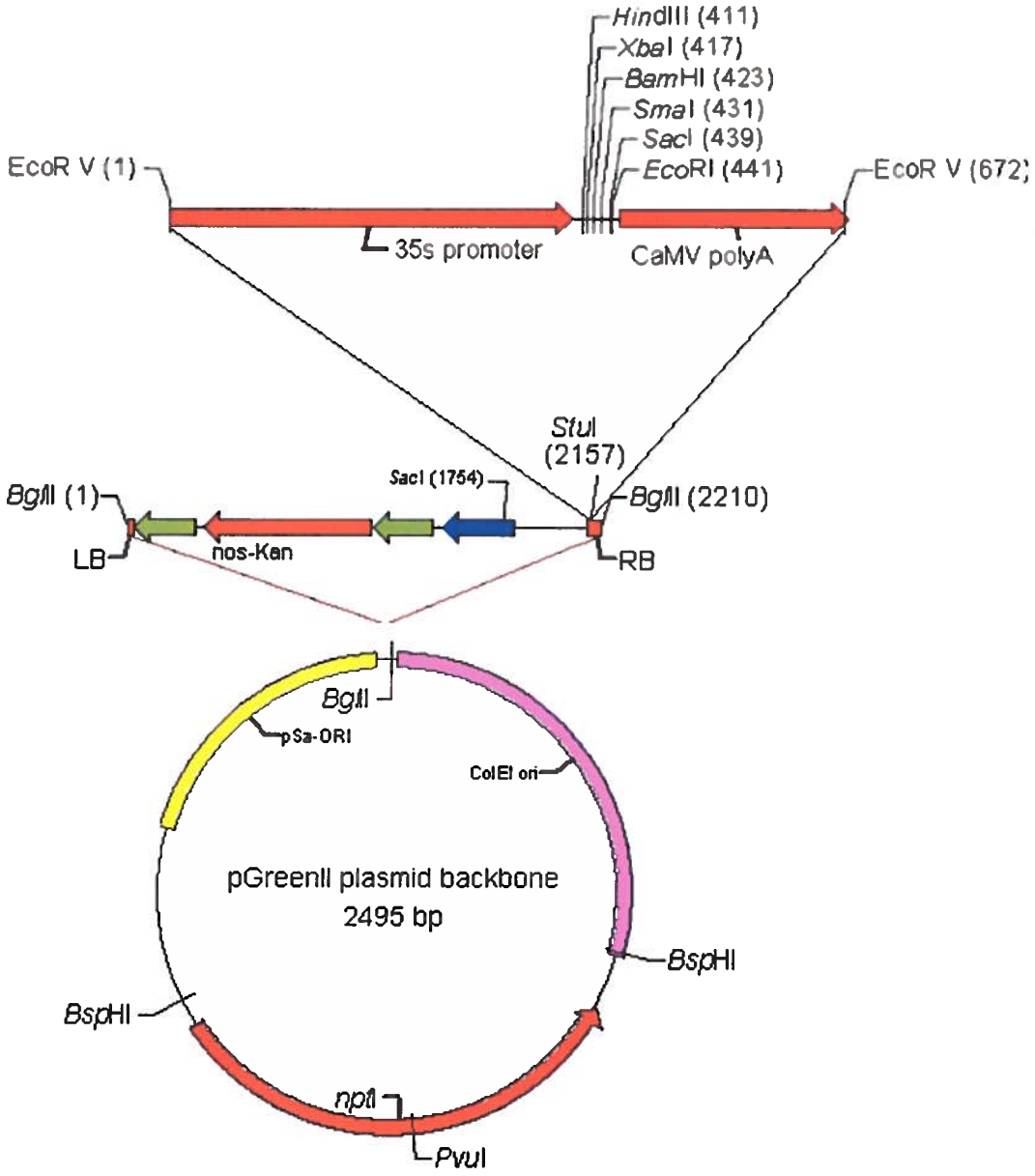


Figure 22 Le vecteur pGreen-35S-M

pSa-Ori=origine de réplication dans *A. tumefaciens*, ColE1 ori=origine de réplication dans *E. coli*, nptI=gène de résistance à la kanamicine dans la bactérie

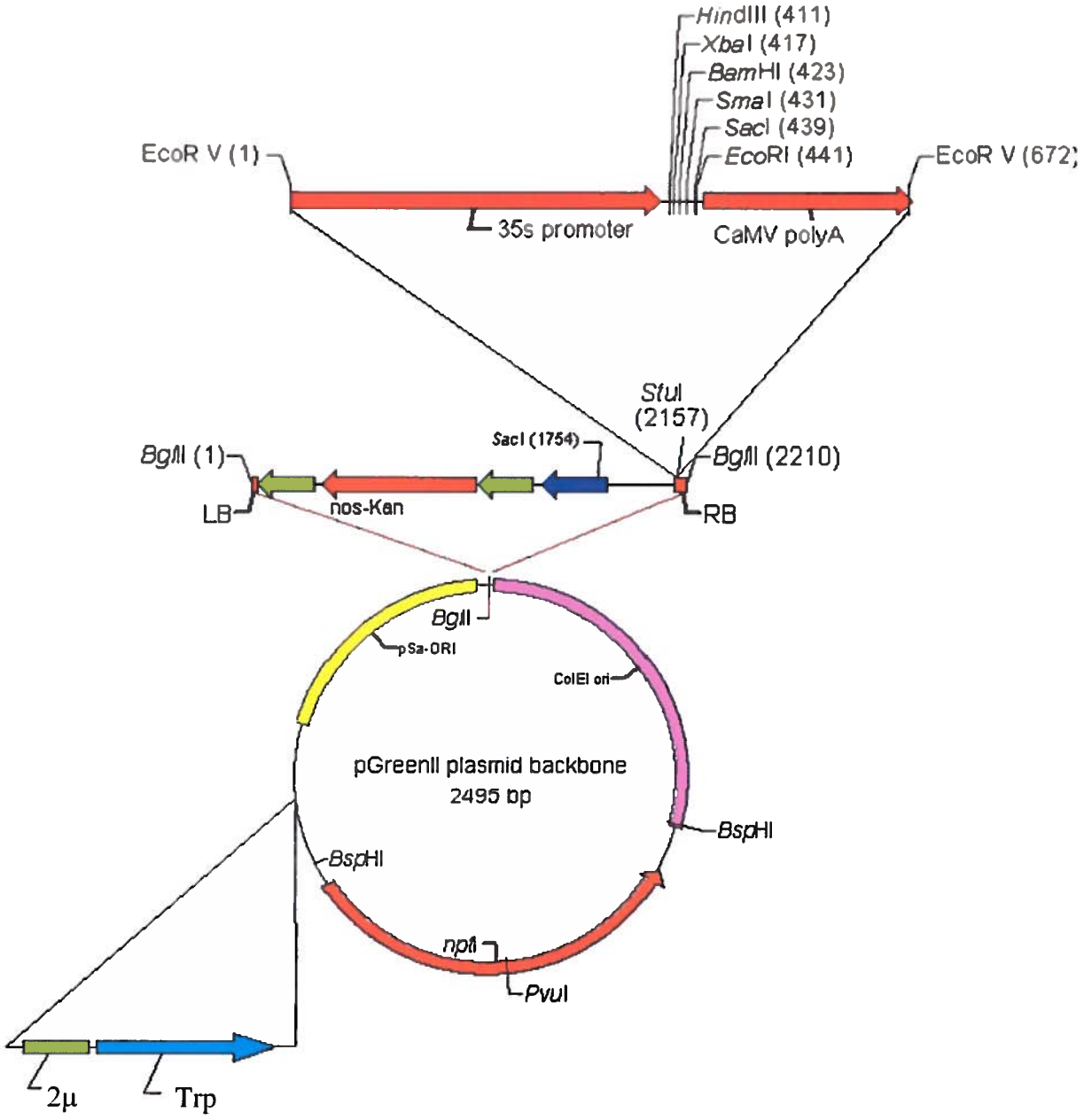


Figure 23 Le vecteur pGreen-35S-M-2μTrp

pSa-Ori=origine de réplication dans *A. tumefaciens*, ColE1 ori=origine de réplication dans *E. coli*, nptI=gène de résistance à la kanamicine dans la bactérie

4 Clonage

4.1 PCR

Chaque réaction de PCR a été faite dans un volume total de 50 µl en présence de 50-100 ng de matrice, 100 pmol de chacune des amorces, 0,2 mM de dNTP, 4% de DMSO ou 20% de glycérol, 5 µl de tampon Pfu 10X [200 mM Tris-HCl pH 8.8, 20 mM $MgSO_4$, 100 mM KCl, 100 mM $(NH_4)_2SO_4$, 1% Triton et 1 mg/ml BSA sans nucléase] et 2,5 unités de Pfu polymérase (Stratagene). Les conditions d'amplification ont été les suivantes : 1 minute à 94°C pour la dénaturation de l'ADN, 30 secondes à température variable (voir tableau 3) pour permettre la liaison des amorces sur l'ADN à amplifier et 1 minute par kb à 72°C pour l'élongation. Le cycle a été répété 30 fois, suivi d'une élongation finale de 10 minutes à 72°C. L'amplification a ensuite été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose. Les gels ont été faits avec 1% d'agarose dans un tampon TAE 1X (40 mM Tris-Acétate pH 8.0 et 1 mM EDTA) et additionnés de 50 µl/L de bromure d'éthidium. La migration a été effectuée en présence de tampon TAE 1X. Avant leur dépôt sur gel, les échantillons ont été additionnés de tampon de charge (glycérol 70% et 0,05% bleu de bromophénol).

L'analyse des extraits de levure a été faite par PCR selon la méthode décrite en 4.1. La Taq polymérase a été utilisée avec son tampon 1X (75 mMTris-HCl pH 8.8, 20 mM $(NH_4)_2SO_4$ et 0.01% v/v tween 20) et 100 mM $MgCl_2$. Les amorces choisies ont permis la visualisation des inserts par électrophorèse sur gel d'agarose.

4.2 Clonage par recombinaison *In vitro*

Dans certains cas, les produits de PCR ont été insérés dans leur vecteur respectif par recombinaison homologue à l'aide de la trousse 'In-fusion Cloning' de Clontech (numéro de catalogue 639602). L'utilisation de cette trousse requiert l'ajout, lors de la réaction de PCR, de séquences homologues aux extrémités du vecteur utilisé à chaque bout du produit de PCR (voir figure 24). Chaque réaction de recombinaison a été effectuée en

ajoutant 10 ng de vecteur linéarisé et 50 ng de produit de PCR dans un volume de 10 µl à chaque tube de réaction contenant la recombinase lyophilisée et les éléments requis à l'activité enzymatique. La réaction a ensuite été effectuée 30 minutes à température de la pièce avant d'être déposée sur glace.

Gène amplifié	Nom de l'amorce	Matrice utilisée	Séquence (5'-3')	T° de liaison
GFP	GFP-FP	pEGFP (Clontech)	GAATTCGAGCTCCCCCTTG TACAGCTCGTCCAT	55°C
	GFP-RP		TCTAGAGGATCCCCCATGG TGAGCAAGGGCGAG	
DsRed	DsRed-FP	pDsRed (Clontech)	GAATTCGAGCTCCCCCAGG AACAGGTGGTGGCG	55°C
	DsRed-RP		TCTAGAGGATCCCCCATGG CCTCCTCCGAGAAC	
eIFiso4E	ISO-FP	ADNc *Arabidopsis*	GCTTTCTAGAGGATCGAGT AATTTAGCTCAACT	57°C
	ISO-RP		TCACCATGGGGGATCCGAC AGTGAACCGGCTTCT	
eIF4E	4E-FP	ADNc *Arabidopsis*	ATTTGGAGAGGACAGCCCA AGCTTTCTAGAGGAGTAAT TTAGGCAGTTC	60°C
	4E-RP		CTCGCCCTTGCTCSCCSTGG GGGSTCCSGCGGTGTSSGCG TTCTT	
6KVPgPro	6KVPgPro-FP	pET11d-6KVPgPro	GCTTTCTAGAGGATCCATG AGCACCAACGAAATGAGC	57°C
	6KVPgPro-RP		AGGCCATGGGGGATCCTTG TGCGTAGACTGCCGT	
VPgPro	VPgPro-FP	pET11d-6KVPgPro	ATTTGGAGAGGACAGCCCA AGCTTTCTAGAGATGGCAA AAGGCAAGAAGCAA	60°C
	VPgPro-RP		GTTCTCGGAGGAGGCCATG GGGGATCTTTGTGCGTAGA CTGCCGT	

Tableau 3 Liste des amorces et matrices utilisées

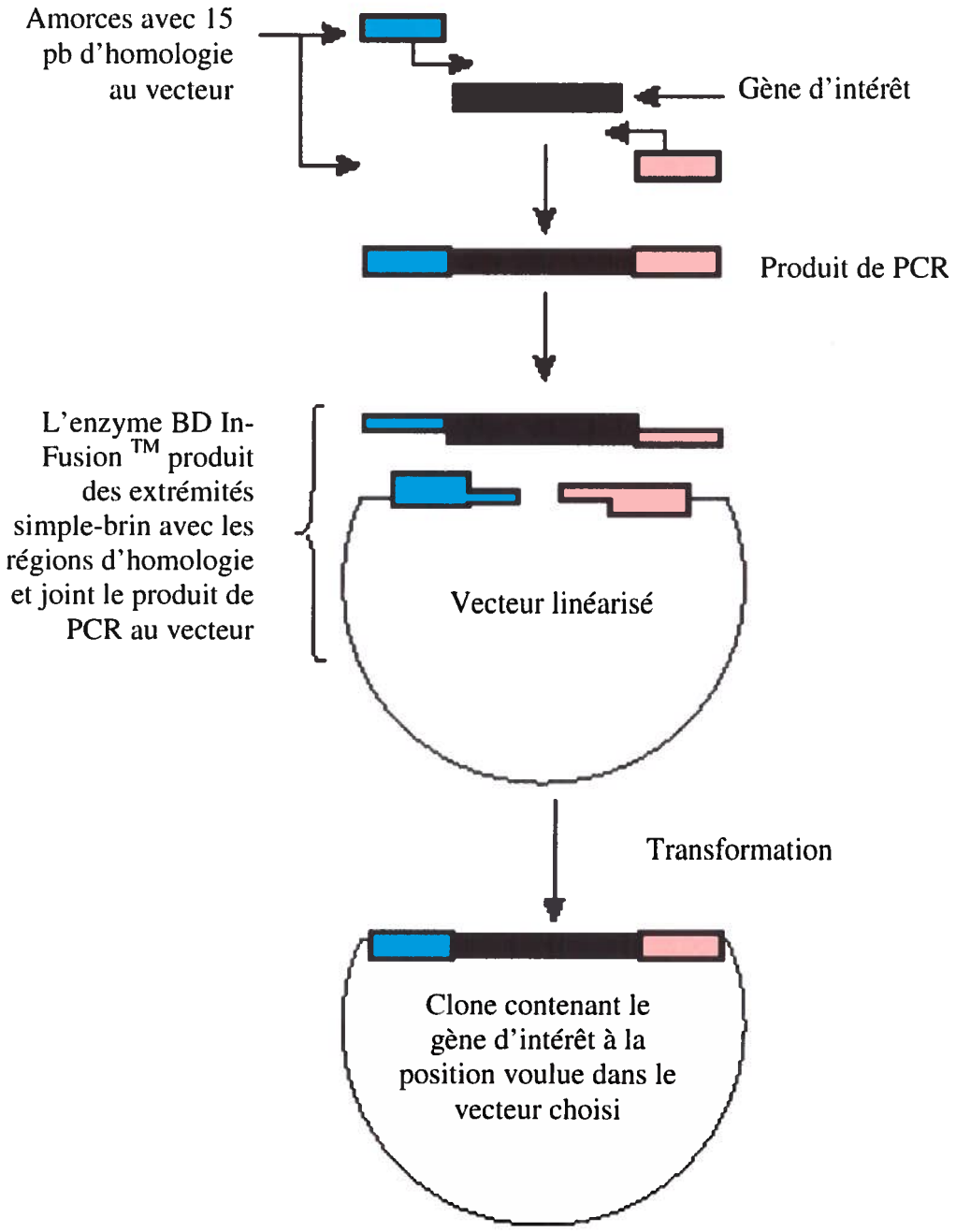


Figure 24 Procédure de recombinaison *In vitro* à l'aide de la trousse In-Fusion cloning de Clontech

4.3 Clonage traditionnel

4.3.1 Digestion enzymatique

Chaque digestion a été effectuée sur 500 ng d'ADN avec 2-3 unités d'enzyme de restriction appropriée dans un volume final de 20 µl. Toutes les digestions ont été effectuées pendant 2-4 heures à 37°C, sauf indications contraires. Suite à la digestion, les enzymes utilisées ont été inactivées à 65°C pendant 20 minutes, sauf indications contraires.

4.3.2 Déphosphorylation

Le vecteur linéarisé a été déphosphorylé avec 2 unités de phosphatase alcaline de crevette à 37°C pendant 15 minutes. L'enzyme a ensuite été inactivée à 65°C pendant 20 minutes.

4.3.3 Ligation

Le vecteur et le produit de PCR digérés ont été combinés en quantité équimolaire dans un tampon de ligation 1X (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$, 10 mM DTT, 1 mM ATP et 25 µg/ml BSA) et avec 20 unités de T4 DNA Ligase dans un volume final de 50 µl. La réaction a été incubée 16 heures à 16°C.

4.4 Recombinaison dans la levure

Une culture de *S. cerevisiae* de 1,5 ml dans le milieu YDP a été culottée 30 secondes à 13 000 rpm. Le surnageant a été décanté et le culot resuspendu dans le liquide résiduel. Environs 250 ng de vecteur linéarisé ont été ajoutés aux levures avec au moins 500 ng de produit de PCR comportant des séquences de 50 nucléotides homologues aux extrémités du vecteur. Deux µl d'ADN de sperme de saumon hautement fractionné ont

été ajouté à la réaction avant de vortexer. L'ADN de sperme de saumon hautement fractionné a été bouilli 10 minutes et refroidi sur glace 5 minutes avant l'utilisation. Par la suite, 500 µl de solution d'étalement (40% PEG-3400, 0.1 M acétate de lithium, 100 mM Tris-HCl pH 7.6 et 10 mM EDTA pH 8.0) ont été ajoutés à la réaction avant de vortexer à nouveau. Vingt µl de DTT 1 M ont été ajoutés avant un vortex final. La réaction a par la suite été conservée à température pièce sans agitation pendant 6-16 heures. Toujours sans agitation, les cellules ont été incubées 10 minutes à 42°C. Deux-cent µl ont été prélevés et étalés sur milieu SD-Trp solide. Les pétris ont été incubés 2-3 jours à 30°C et les colonies observées ont été analysées selon la méthode décrite en 4.7.3 et 4.1.

4.5 Transformation par choc thermique

4.5.1 Préparation des bactéries

Une culture de 100 ml de *E. coli* dans le milieu LB a été incubée à 37°C avec agitation (250 rpm) jusqu'à l'obtention d'une densité optique (DO_{600nm}) de 0.3-0.4. La culture a ensuite été sédimentée à 4°C à 3000 rpm pendant 10 minutes. Le surnageant a été retiré et le culot remis en suspension dans 30 ml de tampon $MgCl_2$-$CaCl_2$ froid ($MgCl_2$ 80 mM et $CaCl_2$ 20 mM). La solution a été culotée à 4°C pendant 10 minutes à 3000 rpm, le surnageant retiré et le culot resuspendu dans 2 ml de $CaCl_2$ 100 mM froid. Les bactéries ont été conservées ainsi à 4°C pendant 16 heures avant d'être utilisées pour la transformation ou congelées à -80°C, après l'ajout de 50% glycérol.

4.5.2 Choc thermique

Les réactions de ligations ou les produits de recombinaison *in vitro* ont été insérés dans *E. coli* par choc thermique. Dix µl de réaction ou un µl de produit de recombinaison ont été ajoutés à 200 µl de cellules compétentes et le tout a été incubé sur glace 30 minutes. Les cellules ont ensuite été soumises à un choc thermique à 42°C d'une durée de 90 secondes. Un ml de milieu LB a été ajouté aux cellules qui ont par la suite

été incubées avec agitation (250 rpm) à 37°C pendant 60 minutes. Les bactéries ont été étalées sur milieu LB solide contenant l'antibiotique approprié et incubées à 37°C pendant 16 heures. Les colonies obtenues ont été analysées selon la méthode décrite en 4.7.1 et 4.1.

4.6 Électroporation

4.6.1 Préparation des bactéries

Une culture de 100 ml d'*A. tumefaciens* AGL1 contenant le plasmide pSoup dans du milieu LBroth supplémenté avec de l'ampicilline et de la tétracycline a été centrifugée à 4°C à 5000 rpm 5 minutes lorsque la culture a atteint une DO_{600nm} de 0.6. Le culot a été lavé trois fois avec 50 ml de glycérol 10% froid filtré sur filtre Millipore de 45 µm. Suite à ces trois lavages, le surnageant a été retiré et le culot resuspendu dans 1 ml de glycérol 10% froid. Les cellules ont été utilisées immédiatement ou congelées à -80°C.

4.6.2 Électroporation

Une cuve à électrodes espacées de 0.2 cm froide a été utilisée pour effectuer les transformations. Chaque électroporation a été effectuée avec 50 µl de cellules électrocompétentes et 200 ng d'ADN plasmidique purifié à l'aide de la trousse commerciale 'GenElute™ Plasmid Miniprep Kit' de Sigma (numéro de catalogue PLN_350) et resuspendu dans de l'eau. La cuve a été placée dans la chambre de l'électroporateur Pulse Controler (BioRad) et soumise à une capacitance de 25 µF, une résistance de 400 Ω et un courant de 2.5 kV. Un ml de milieu LB a été ajouté à la cuve pour retirer les cellules. La solution a ensuite été déposée dans un eppendorf et incubée 2-3 heures avec agitation à 30°C. Les bactéries ont été étalées sur milieu LB solide contenant les antibiotiques appropriés et incubées 2-3 jours à 30°C. Les colonies obtenues ont été utilisées pour l'agroinfiltration décrite en 5.

4.7 Extraction d'ADN

4.7.1 Lyse alcaline avec SDS

Chaque clone potentiellement positif dans *E. coli* a été ensemencé dans 2 ml de milieu LB contenant l'antibiotique approprié et incubé 16 heures à 37°C. La culture a été sédimentée 30 secondes à 13 000 rpm et le culot a été resuspendu dans 200 µl de solution TEG (25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA et 50 mM glucose) par vortex. La solution a été conservée 5 minutes avant l'addition de 200 µl de solution de lyse (0.2 N NaOH et 1% SDS). La solution a été mélangée par inversion, incubée 5 minutes et supplémentée de 200 µl de solution neutralisante (potassium 3 M et acétate 5 M). Le mélange a été centrifugé 10 minutes à vitesse maximale pour permettre la sédimentation des débris cellulaires et de l'ADN génomique. L'ADN plasmidique a été récupéré du surnageant par une précipitation à l'éthanol 95% et resuspendu dans un volume final de 50 µl d'eau contenant 20 µg/ml de Rnase A.

4.7.2 Minipréparation Sigma

Les clones positifs ont été purifiés à l'aide de la trousse 'GenElute™ Plasmid Miniprep Kit' de Sigma selon les spécifications du fabricant.

4.7.3 Extraction d'ADN de levures

L'ADN total des levures potentiellement positives a été extrait à l'aide de la trousse 'MasterPure™ Yeast DNA Purification Kit' de la compagnie Epicentre (numéro de catalogue MPY80200) selon les spécifications du fabricant.

5 Expression transitoire dans les feuilles de *Nicotiana benthamiana*

5.1 Préparation des plantes

Des graines de *Nicotiana benthamiana* ont été semées dans un pot contenant de la terre humide. Le pot a été recouvert de plastique afin de conserver l'humidité et déposé dans la salle de croissance dans les conditions suivantes : luminosité d'environs 5000 lux, photopériode de 16 heures et température de 20°C. Les jeunes pousses de 1-2 semaines ont été transplantées dans des pots individuels et conservées sous plastique pendant 5 jours. Le recouvrement a ensuite été retiré et les plantes ont été conservées dans les mêmes conditions de croissance jusqu'à leur utilisation.

5.2 Préparation des cultures d'*A. tumefaciens*

Les cultures d'*A. tumefaciens* transformées tel que décrit en 4.6.2 avec les plasmides d'intérêt ont été conservées à -80°C. Avant chaque agroinfiltration, la souche congelée a été reprise sur milieu LB solide contenant les antibiotiques appropriés. La souche a été incubée 3 jours à 30°C. Une pré-culture de 5 ml de la souche a été préparée à partir du milieu solide et incubée 16 heures à 30°C avec agitation. Une culture de 20 ml a été effectuée à partir de la pré-culture avec une dilution de 1 :100 et incubée 16 heures à 30°C.

5.3 Agroinfiltration

La culture de 20 ml a été sédimentée par centrifugation à 5500 rpm et 4°C pendant 15 minutes. Le culot a été resuspendu dans 20 ml de solution d'agroinfiltration (150 µM acétosyringone et 10 mM $MgCl_2$) et conservé à température pièce pendant 3 à 16 heures. Chaque solution bactérienne à agroinfiltrer a été mélangée à volume équivalent avec une préparation de pO avant l'agroinfiltration. Des plantes de 3-4 semaines ont été utilisées. À l'aide d'une seringue de 3 ml (sans aiguille), la suspension bactérienne a été injectée en effectuant une légère pression sur la surface inférieure de la feuille (figure 25). Les

plantes ont ensuite été déposées dans la salle de croissance pendant 72 heures avant l'observation.

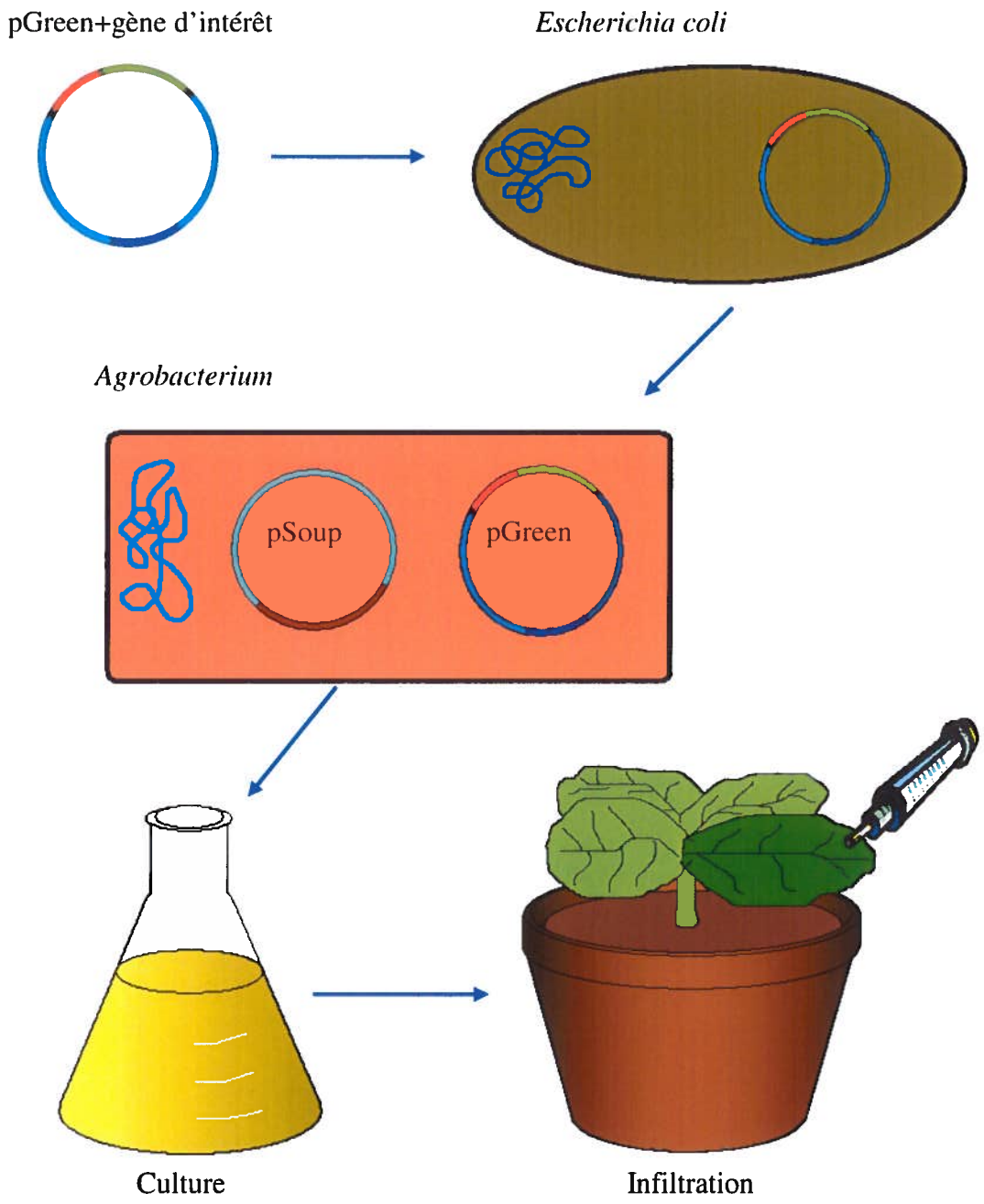


Figure 25 Méthode d'expression transitoire dans la plante par agroinfiltration

6 Observation de l'expression des protéines

6.1 Microscopie confocale

Pour monter les feuilles sur les lames de microscope, une goutte d'huile à immersion a été déposée au centre d'une lamelle. Un morceau de feuille agroinfiltrée d'environs 5 mm par 5 mm a été déposé sur la goutte d'huile et une légère pression a été effectuée afin de bien coller la feuille à la lamelle. Une goutte d'huile à immersion a ensuite été déposée à chaque coin de la lamelle. Une lame de microscope contenant une dépression circulaire a été utilisée. La lamelle a été inversée sur la lame en s'assurant que la feuille se retrouve au dessus de la dépression dans la lame. La feuille a été observée à l'aide d'un objectif à l'huile de 40X sur un microscope confocal (magnification totale, objectif et oculaire = 400X). Le microscope utilisé est un Radiance 2000 de BioRad. La tête de ce microscope confocal est montée sur un microscope optique de marque Nikon. Les lasers utilisés sont un laser Argon-Krypton (488 nm et 568 nm) et une diode (638 nm). Les images ont été obtenues à l'aide d'une caméra CCD et du logiciel LaserSharp de BioRad. Les images ont ensuite été traitées à l'aide du logiciel Photoshop d'Adobe afin de mettre en valeur les structures d'intérêt.

7 Purification et analyse des protéines

7.1 Infection de *B. perviridis*

Les plantes de *B. perviridis* ont été semées selon la méthode décrite en 5.1. L'infection a été effectuée par inoculation mécanique en déposant 10 µl d'extrait de plante infectée au TuMV isolat Québec sur une feuille et en frottant cette dernière avec du carborundum. Les feuilles ont ensuite été rincées avec de l'eau avant que les plantes ne soient redéposées dans la salle de croissance. Les feuilles infectées ont été récoltées le douzième jour suivant l'inoculation selon la présence de symptômes et conservées à -80°C.

7.2 Purification

7.2.1 Séparation des fractions solubles et membranaires

Les feuilles de plantes infectées et témoin ont été broyées à l'azote liquide dans un mortier à l'aide d'un pilon. 0.5 g de la poudre résultante ont été pesées pour chaque échantillon. Ces 0.5 grammes ont été placées dans un Dounce homogenizer contenant 1 ml de tampon d'homogénéisation (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM KCl, 10 mM $MgCl_2$, 20% glycérol, 0.1% β-mercaptoéthanol et une tablette d'inhibiteur de protéase de Roche par 10 ml de tampon). Les parois des cellules végétales ont été brisées par l'homogénéisateur. La solution résultante a été transférée dans un tube et complétée à 3 ml. Les débris ont été éliminés par deux centrifugations subséquentes de 10 minutes à 3700 g et 4 °C. Le surnageant a été centrifugé 20 minutes à 30 000g et 4 °C. Le surnageant a été conservé pour analyse et le culot résultant a été resuspendu dans 4 ml de tampon d'homogénéisation avec KCl 300 mM et octyl-B-D-glucopyranoside (OG) 40 mM. Un aliquot a été récupéré pour analyse ultérieure. La solution contenant les membranes resuspendues a été centrifugée 20 minutes à 30 000 g et 4 °C. Le surnageant (fraction membranaire solubilisée) a été conservé pour purification sur nickel.

7.2.2 Chromatographie sur colonne de nickel-NTA agarose

200 µl de résine tassée de Ni^{2+}-NTA Agarose (Quiagen) ont été lavé avec 15 ml d'eau distillée et centrifugé à 1000 rpm 30 secondes. Les billes ont ensuite été pré-conditionnées avec 10 ml de tampon A (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM KCl, 40 mM OG et 10 mM β-mercaptoéthanol). Avec une centrifugation de 30 secondes à 1000 rpm, le tampon A a été retiré des billes et remplacé par la fraction membranaire extraite selon la méthode décrite en 7.2.1. Les billes ont été incubées pendant 1 heure avec légère agitation à 4°C pour ensuite être centrifugées 30 secondes à 1000 rpm. Le surnageant a été retiré et conservé pour analyse. Les billes ont été resuspendues dans 1 ml de tampon A et déposées sur une colonne de chromatographie pour y être lavées avec 4 ml de tampon A. L'éluat a été récupéré pour analyse. Les billes ont ensuite été nettoyées avec

5 ml de tampon d'élution contenant 10 mM imidazole (50 mM $NaH_2PO_4*H_2O$, 300 mM KCl, 10% glycérol, 10 mM β-mercaptoéthanol et 40 mM OG, pH 6.0) et l'éluat a été conservé pour analyse. Les protéines demeurant sur la colonne ont été éluées avec 2 ml de tampon d'élution contenant 150 mM d'imidazole. L'éluat a été collecté en 4 fractions de 500 µl et conservé pour analyse.

7.2.3 Buvardage de type Western

7.2.3.1 Électrophorèse sur gel de polyacrylamide et transfert sur membrane de nitrocellulose

Les aliquots récoltés au cours de la purification sur nickel ainsi que les solutions des étapes précédant la chromatographie ont été analysés par électrophorèse en condition dénaturante sur gel de polyacrylamide. De 20 à 40 µl de chacun des échantillons a été déposé sur gel tel que décrit par Laemmli (Laemmli 1970). Avant d'être déposées sur gel, les protéines ont été dénaturées par l'addition de 5-10 µl de tampon de charge 5X (250 mM Tris-HCl pH 6.8, 10% SDS, 0.5% bleu de bromophénol, 50% glycérol et 500 mM β-mercaptoéthanol) et chauffées pendant 3 minutes avant d'être déposées sur glace. L'électrophorèse a été effectuée sur un gel de polyacrylamide (29.2 acrylamide : 0.8 bis-acrylamide) de 10% contenant 0.1% SDS dans un tampon de migration (25 mM Tris-HCl pH 6.8, 240 mM glycine et 0.1% SDS) à 100 volts. Le transfert des protéines du gel à une membrane de nitrocellulose a ensuite été effectué à 100 volts durant 1 heure dans un tampon de transfert (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine et 20% méthanol).

7.2.3.2 Immunorévélation

Suite au transfert, la membrane de nitrocellulose a été bien séchée et trempée ensuite dans du glycérol 10% pendant 10 minutes. La membrane a par la suite été trempée dans une solution de blocage PBS-lait-Tween20 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4, 5% lait, 0.2% Tween-20) pendant une heure à température pièce avant d'y ajouter l'anticorps primaire (voir tableau 4) et de le laisser

incuber 16 heures à 4°C. Deux lavages de 5 minutes ont été effectués avec du PBS-Tween20 avant de débuter l'incubation avec l'anticorps secondaire (voir tableau 4) conjugué à la phosphatase alcaline dans une solution de PBS-lait-Tween20. Quatres lavages de 10 minutes avec du PBS-Tween20 ont été réalisés avant la détection par chémiluminescence. Le protocole de la trousse ECL de Pharmacia (numéro de catalogue RPN2106) a été utilisé pour la détection avec le substrat Luminol. Les membranes ainsi révélées ont été placées sous un film Kodak et exposées entre 1 et 30 minutes.

	Anticorps (provenance)	Dilution
Primaires	Anti-VPgPro TuMV de lapin (Fortin, MG ; McGill)	1 :2500
	Anti-NIb TuMV de lapin (Fortin, MG ; McGill)	1 :2500
	Anti-capside TuMV de lapin (Fortin, MG ; McGill)	1 :2500
	Anti-CI TuMV de lapin (Fortin, MG ; McGill)	1 :100
	Anti-eIF3 blé de lapin (Browning, KS)	1 :2000
	Anti-eIFiso4E *A. thaliana* de lapin (Fortin, MG ; McGill)	1:2500
	Anti-PABP *A. thaliana* de lapin (Laliberté, JF)	1 :2500
Secondaires	Anti-IgG lapin de mouton (Chemicon International, numéro de catalogue AP304P)	1 :2500

Tableau 4 Liste des anticorps utilisés et dilutions

7.2.4 Spectrométrie de masse

Les protéines issues de la fraction membranaire de plantes infectées ont été séparées par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (1,5 mm d'épaisseur). Le gel a été coloré au bleu de Coomassie et les bandes visibles ont été découpées. Un morceau du gel équivalent pour les protéines issues de la fraction membranaire de plantes saines a aussi été prélevé. Les échantillons ont été lavés avec 500 µl de NH_4HCO_3 100mM pendant 10 minutes afin d'en éliminer le bleu de Coomassie. Cinq cents µl d'acétonitrile 100% ont ensuite été ajouté et la solution a été incubée pendant 15 minutes. Le liquide a ensuite été retiré et remplacé par 50 µl d'acétonitrile 100%. Le gel a ensuite reposé 15 minutes. Le liquide a été retiré et le gel asséché à l'aide d'un évaporateur rotatif pendant 10 minutes. 150ul de NH_4HCO_3 100mM et 10ul de DTT 45mM on été ajouté au gel et le tout a été « vortexé » et centrifugé 10 sec à 3000 rpm avant d'être déposé dans un incubateur à 60^0C pendant 30 minutes. L'échantillon a été équilibré à température pièce avant l'ajout de 10 µl d'iodoacétamide 100mM. La solution contenant le gel a été incubée 30 minutes à température pièce à l'abri de la lumière. Le liquide a ensuite été retiré et remplacé par 500 µl de NH_4HCO_3 100mM incubé pendant 10 minutes avec agitation et suppléé de 500 µl d'acétonitrile 100% avant une seconde incubation de 15 minutes. Le liquide a ensuite été retiré et remplacé par 50 µl d'acétonitrile 100%. La solution a reposé pendant 15 minutes avant d'être retiré. Le gel a été asséché une deuxième fois à l'aide d'un évaporateur rotatif. Un volume de tampon de digestion à la trypsine (NH_4HCO_3 25mM) équivalent au volume du gel et 0.2 µg de trypsine (dans une solution d'acide acétique 50 mM à une concentration de 0.1 µg/µl) ont été ajoutés. L'échantillon a été incubé 16 heures à 37^0C. Le surnageant a été récupéré et déposé dans un eppendorf propre. 50 µl d'une solution d'acétonitrile 60% et d'acide trifluoro acétique (TFA) 0.1% a été ajouté et le tout a été incubé30 minutes à 37^0C avant d'être sonifié 5 minutes. Le liquide a été récupéré et ajouté au surnageant. La solution obtenu a été centrifugée afin d'en éliminer les débris avant d'être asséché avec un évaporateur rotatif pendant 30 minutes. Les peptides extraits du gel ont ensuite été resuspendus dans 20 µl de TFA 1%. L'analyse par spectrométrie de masse a été effectuée au laboratoire du docteur François Lépine à l'aide d'un appareil triple quadrupole Quattro II de Micromass.

8 Détection de l'ARN virale

8.1 Extraction de l'ARN

Des extraits de plantes infectées totales, membranaires et purifiées par chélation métallique ont été utilisés pour extraire de l'ARN viral. Chaque extrait a été soumis à une extraction au phénol-chloroforme et la phase aqueuse a été précipitée à l'éthanol. Les acides nucléiques ont été précipités à l'éthanol par centrifugation et resuspendus dans 30 µl d'eau.

8.2 Détection de l'ARN viral par RT-PCR

Cinq µl de chaque extrait d'acide nucléique ont été utilisés dans une réaction de RT utilisant une amorce oligo-dT. L'ARN et les amorces ont été chauffés, dans un volume de 6 µl à 65°C pendant 5 minutes avant d'être refroidis 10 minutes à température pièce. A été ajouté par la suite 3 µl de solution de RT (tampon de RT 3X, dNTP 1 mM, inhibiteur de RNase et RT polymérase). La réaction d'élongation a été effectuée pendant 1 heure 30 minutes à 42°C et inactivée pendant 5 minutes à 90°C. Un PCR a ensuite été effectué à partir de 1 µl de la réaction de RT selon la méthode décrite en 4.1 avec des amorces permettant la détection de l'ARN viral par l'amplification du gène VPgPro (voir tableau 3). L'amplification a été vérifiée par électrophorèse sur gel d'agarose.

Chapitre 3

Résultats

1 Construction des plasmides

Il existe plusieurs méthodes pour déterminer la localisation d'une protéine à l'intérieur d'une cellule : la séparation des diverses organelles par centrifugation et leur analyse subséquente par diverses méthodes de détection des protéines, le marquage avec des anticorps couplés à des billes d'or observées en microscopie électronique ou l'ajout d'une protéine de fluorescence à la protéine d'intérêt suivi de son expression et observation de la cellule en microscopie de fluorescence ou confocale. Dans notre étude nous avons utilisé la protéine de fluorescence verte (GFP) et la protéine de fluorescence rouge (DsRed). La GFP et la DsRed ont été utilisées parce que leurs spectres d'excitation et d'émission respectifs sont aisément différenciables. Il était donc possible de déterminer la localisation de chacune indépendamment.

1.1 Construction des plasmides de base

Toutes les constructions ont été analysées par digestion enzymatique et par PCR afin de vérifier la présence d'un insert de taille équivalente au gène d'intérêt à l'endroit voulu. Les clones sélectionnés ont ensuite été vérifiés par séquençage afin de confirmer l'insertion des gènes.

1.1.1 pGreen-GFP

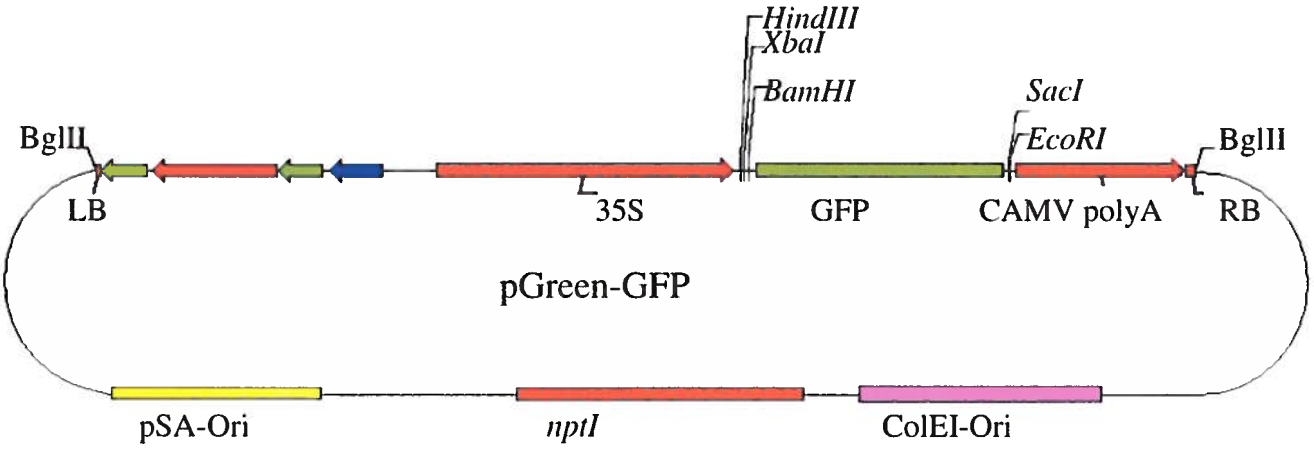
Le vecteur de départ pGreen-35S-M a été linéarisé par digestion avec l'enzyme *SmaI* pour laquelle on retrouve un site unique de digestion dans le site de multiclonage du vecteur. Le gène de la GFP a été amplifié par PCR à partir de la matrice pEGFP (Clontech) afin d'obtenir un produit contenant la séquence codante complète de la GFP

additionnée de séquences de 18 nucléotides à chaque extrémité, séquences homologues aux extrémités du vecteur pGreen-35S-M linéarisé avec *SmaI*. Le produit de PCR a ensuite été inséré dans le vecteur à l'aide de la trousse In-fusion cloning de Clontech (figure 26A). Le gène de la GFP est ainsi présent sous le contrôle du promoteur constitutif 35S et du terminateur du CaMV, ce qui permet son expression dans la plante suite à l'agroinfiltration. Ce vecteur permet aussi la fusion en N-terminal d'autres protéines.

1.1.2 pGreen-DsRed

La construction de pGreen-DsRed a été faite selon la même méthode que pGreen-GFP. Le même vecteur linéarisé avec *SmaI* a été utilisé et les mêmes régions d'homologie ont été ajoutées aux extrémités du gène de la DsRed (figure 26B). La même trousse en provenance de la compagnie Clontech a été utilisée. Le gène de la DsRed est ainsi présent sous le contrôle du promoteur 35S et du terminateur du CaMV et peut être exprimé dans la cellule végétale par agroinfiltration. Ce vecteur permet aussi le clonage d'autres protéines en fusion avec la DsRed en N-terminal.

A)



B)

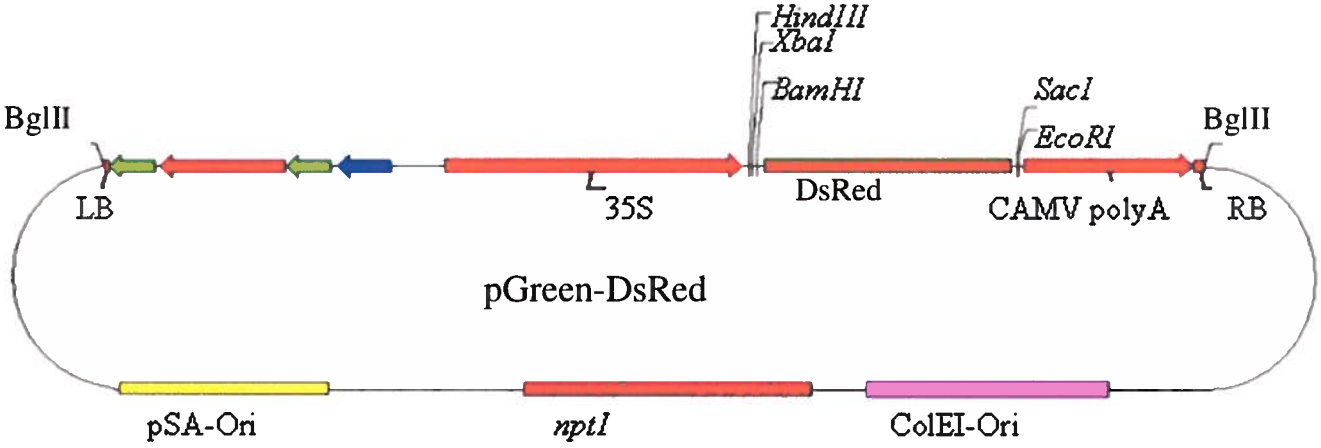


Figure 26 Cartes des vecteurs pGreen-GFP (A) et pGreen-DsRed (B)

Les sites de restriction uniques sont indiqués en italique. nptI : gène de résistance à la kanamycine dans la bactérie, ColEI-Ori : origine de réplication dans *E. coli*, pSA-Ori : origine de réplication dans *A. tumefaciens*, LB et RB : bordures gauche et droite du T-DNA

1.2 Construction des plasmides des protéines de fusion

Les gènes cellulaires codant pour les deux isoformes du facteur d'initiation de la traduction eIF4E, soit eIFiso4E et eIF4E d'*Arabidopsis thaliana*, ainsi que les gènes viraux permettant la production des protéines 6KVPgPro et VPgPro ont été insérés dans les vecteurs pGreen-GFP et pGreen-DsRed respectivement de façon à ce que les cadres de lecture des gènes d'intérêt soient en phase avec ceux des protéines de fluorescence. La VPgPro a été utilisée parce que l'interaction de ce précurseur avec eIFiso4E a été évaluée (Léonard et *al.* 2000) alors que la 6KVPgPro a été sélectionnée parce que la présence de plusieurs acides aminés hydrophobe dans la séquence du peptide 6K2 permet à ce précurseur de s'ancrer à la membrane du réticulum endoplasmique. Ce sont également les formes de VPg qui sont observées dans les feuilles infectées.

Toutes les constructions ont été analysées par digestion enzymatique et par PCR afin de vérifier la présence d'un insert de taille équivalente au gène d'intérêt à l'endroit voulu. Les clones sélectionnés ont ensuite été vérifiés par séquençage afin de confirmer l'insertion des gènes et de vérifier la compatibilité de phase des cadres de lecture.

1.2.1 pGreen-eIFiso4E-GFP

Le plasmide pGreen-eIFiso4E-GFP (figure 27) a été construit à partir du vecteur pGreen-GFP linéarisé avec les deux enzymes de digestion *BamHI* et *XbaI* dont les sites de restriction se retrouvent en une seule copie dans le vecteur et sont situées dans le site de multiclonage. Le gène de eIFiso4E a été amplifié par RT-PCR à partir de l'ADNc d'*Arabidopsis thaliana* et des sites de digestion par *BamHI* et *XbaI* ont été ajoutés en aval et en amont du gène respectivement. Le produit de PCR a été digéré par ces deux enzymes et lié au vecteur linéarisé dans une réaction de ligation. Le vecteur résultant contient le gène de eIFiso4E fusionné en N-terminal au gène de GFP sous le contrôle du promoteur 35S et du terminateur du CaMV.

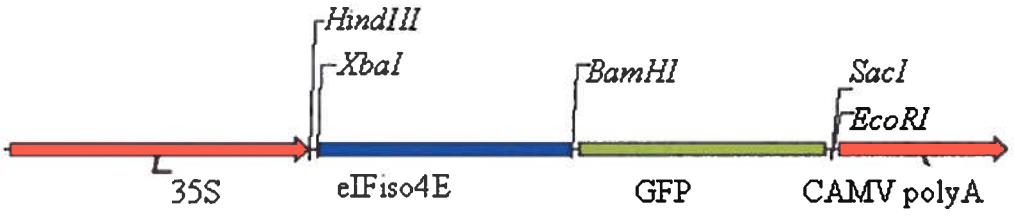


Figure 27 Carte de la cassette 35S du vecteur pGreen-eIFiso4E-GFP

Le gène de eIFiso4E est fusionné en N-terminal au gène de la GFP. Le tout est contrôlé par le promoteur 35S et le terminateur du CaMV permettant l'expression dans la cellule végétale. Les sites de restriction uniques sont indiqués en italique.

1.2.2 pGreen-eIF4E-GFP

Le vecteur pGreen-eIF4E-GFP (figure 28) a été construit à partir du vecteur pGreen-2μTrp-GFP linéarisé avec l'enzyme de restriction *HindIII*. Le gène de eIF4E a été amplifié par RT et PCR à partir de l'ADNc d'*Arabidopsis thaliana*. L'amplification par PCR a permis l'ajout de séquences de 50 nucléotides homologues aux extrémités du vecteur. La présence de ces séquences homologues à chaque extrémité du produit de PCR a permis son insertion dans le vecteur pGreen-2μTrp -GFP digéré avec *HindIII* par recombinaison dans la levure. Le vecteur ainsi produit permet l'expression, grâce au promoteur 35S et au terminateur du CaMV, de la protéine eIF4E en fusion en N-terminal avec la GFP

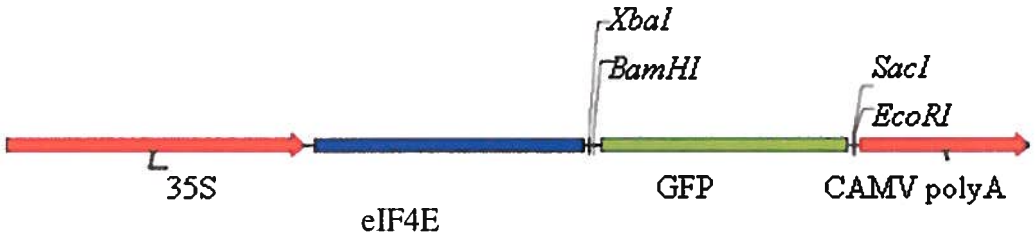


Figure 28 Carte de la cassette 35S du vecteur pGreen-eIF4E-GFP

Le gène de eIF4E est fusionné en N-terminal au gène de la GFP. Le tout est contrôlé par le promoteur 35S et le terminateur du CaMV permettant l'expression dans la cellule végétale. Les sites de restriction uniques sont indiqués en italique.

1.2.3 pGreen-6KVPgPro-DsRed

Le plasmide pGreen-6KVPgPro-DsRed (figure 29) a été construit à partir du vecteur pGreen-DsRed linéarisé avec l'enzyme de restriction *BamHI*. Le gène de 6KVPgPro a été amplifié à partir du plasmide pET11d/6KVPgPro (Laliberté et *al.*, 1992), plasmide comportant le gène de la protéine virale 6KVPgPro modifié afin d'éliminer les sites d'autoclivage par le domaine Pro. Les amorces utilisées pour l'amplification du gène ont permis l'addition de 18 nucléotides homologues aux extrémités du vecteur pGreen-DsRed linéarisé avec *BamHI*. La présence de ces séquences homologues aux extrémités du produit de PCR a permis son insertion dans le vecteur à l'aide de la trousse In-fusion Cloning de la compagnie Clontech. Le vecteur résultant de cette recombinaison *In vitro* comprend, sous le contrôle du promoteur 35S, le gène de 6KVPgPro fusionné en N-terminal au gène de DsRed.

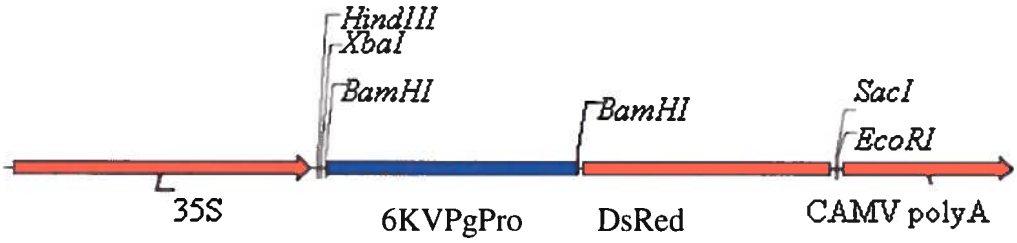


Figure 29 Carte de la cassette 35S du vecteur pGreen-6KVPgPro-DsRed

Le gène de 6KVPgPro est fusionné en N-terminal au gène de la DsRed. Le tout est contrôlé par le promoteur 35S et le terminateur du CaMV permettant l'expression dans la cellule végétale. Les sites de restriction uniques sont indiqués en italique.

1.2.4 pGreen-VPgPro-DsRed

Le vecteur pGreen-VPgPro-DsRed (figure 30) a été construit à partir du vecteur pGreen-DsRed linéarisé avec les deux enzymes de restriction *HindIII* et *NcoI*. Le gène de VPgPro a été amplifié à l'aide de la matrice pET11d/6KVPgPro par PCR. L'amplification par PCR a permis l'ajout de sites permettant le clivage par les enzymes de restriction *HindIII* et *NcoI* en amont et en aval du gène respectivement. Le produit de PCR digéré a été inséré dans le vecteur pGreen-DsRed linéarisé par ligation. Cette ligation a permis l'obtention d'un vecteur permettant l'expression dans la cellule végétale, grâce au promoteur 35S, de la protéine VPgPro fusionnée en N-terminal avec DsRed.

Figure 30 Carte de la cassette 35S du vecteur pGreen-VPgPro-DsRed

Le gène de VPgPro est fusionné en N-terminal au gène de la DsRed. Le tout est contrôlé par le promoteur 35S et le terminateur du CaMV permettant l'expression dans la cellule végétale. Les sites de restriction uniques sont indiqués en italique.

2 Expression transitoire dans *Nicotiana benthamiana*

2.1 Agroinfiltration

Chaque construction a été introduite dans la souche AGL1/pSoup d'*Agrobacterium tumefaciens* pour permettre l'agroinfiltration dans *Nicotiana benthamiana*. Trois plantes ont été utilisées pour l'agroinfiltration de chacune des constructions et trois autres plantes ont été agroinfiltrées avec une suspension bactérienne contenant le vecteur pGreen-35S-M vide. L'utilisation de ce vecteur permet l'évaluation de l'état de fluorescence d'une plante suite à l'application du protocole d'agroinfiltration. Ce témoin négatif permet aussi d'évaluer la possible auto-fluorescence des bactéries utilisées. Certains organismes vivants contiennent des éléments ayant des propriétés fluorescentes, tels la chlorophylle chez la plante. La présence de tels éléments chez *Agrobacterium* doit donc être évaluée. Trois plantes supplémentaires par expérimentation ont été utilisées pour l'agroinfiltration du vecteur pBIN-mgfp5-ER, vecteur jouant le rôle de témoin positif de la méthode d'agroinfiltration. Toutes les constructions ont été agroinfiltrées conjointement avec une suspension bactérienne contenant le vecteur pO, vecteur permettant l'expression d'un inhibiteur de silencing augmentant le niveau d'expression des gènes agroinfiltrés. Aucune construction n'a permis l'observation de symptômes ou autres effets néfastes sur la plante pouvant laisser présager une certaine toxicité.

2.1.1 Observation des protéines de fluorescence

Les feuilles agroinfiltrées avec les constructions pGreen-35S-M, pBIN-mgfp5-ER, pGreen-GFP et pGreen-DsRed ont été observées au microscope confocal 3 jours après leur traitement. La localisation de la GFP et de la DsRed non-fusionnées a été évaluée afin de permettre de déterminer si la localisation des protéines de fusion est due à la présence en C-terminal de l'une ou l'autre de ces protéines de fluorescence. La présence de protéines de fusion dans le noyau pourrait être due à la présence de signaux de localisation au noyau sur les protéines fluorescentes et non à la localisation habituelle des

protéines fusionnées en N-terminal. En comparant la localisation de la GFP et de la DsRed avec celle des protéines de fusion, nous pourrons estimer l'impact de la présence de la GFP/DsRed sur la localisation observée.

Les feuilles agroinfiltrées avec pGreen-35S-M n'ont démontré aucune fluorescence détectable à 488 nm, seul l'auto-fluorescence, détectable à partir de 700 nm, de la chlorophylle a été observée (figure 32A). Dans le cas des autres constructions, cette auto-fluorescence a été soustraite des images récoltées, permettant l'observation des protéines GFP ou DsRed uniquement.

L'expression de la GFP modifiée exprimée à partir du vecteur pBIN-mgfp5-ER a été observée (figure 32B). La GFP produite à l'aide de ce vecteur se retrouve au réticulum endoplasmique (RE) (figure 31) grâce à la présence d'un signal de transport et d'un signal de rétention. Le RE d'une cellule végétale forme un réseau inter-connecté de tubules se retrouvant dispersés dans le cytoplasme de la cellule. Il entoure le noyau de la cellule et s'étale ensuite en un réseau jusqu'à atteindre la membrane plasmique. Toutes ces structures ont été observées lorsque la GFP ciblée au réticulum endoplasmique a été exprimée.

La GFP exprimée à partir du vecteur pGreen-GFP (figure 32C) se retrouve dans le cytoplasme ainsi que dans le noyau, tout en étant absente du nucléole. Le cytoplasme est présent près de la membrane plasmique alors que le noyau (voir quatrième image de la Figure 31C, agrandissement de 3.6X du carré de la troisième image) forme une masse circulaire adjacente à la membrane plasmique à l'intérieur de laquelle se retrouve un cercle, centré ou non, le nucléole.

L'agroinfiltration avec le vecteur pGreen-DsRed a permis de démontrer la localisation de DsRed au cytoplasme ainsi que dans le noyau et son absence du nucléole (figure 32D). La DsRed forme des agrégats dans le cytoplasme et dans le noyau qui sont observés sous forme de petites régions présentant une forte fluorescence. De tels agrégats sont fréquemment observés avec la DsRed (Baird et *al.*, 2000).

L'expression transitoire par agroinfiltration nous a permis d'observer une localisation de GFP, DsRed et mgfp5-ER conforme aux attentes et d'établir nos bases d'observation pour l'expression de nos protéines de fusion.

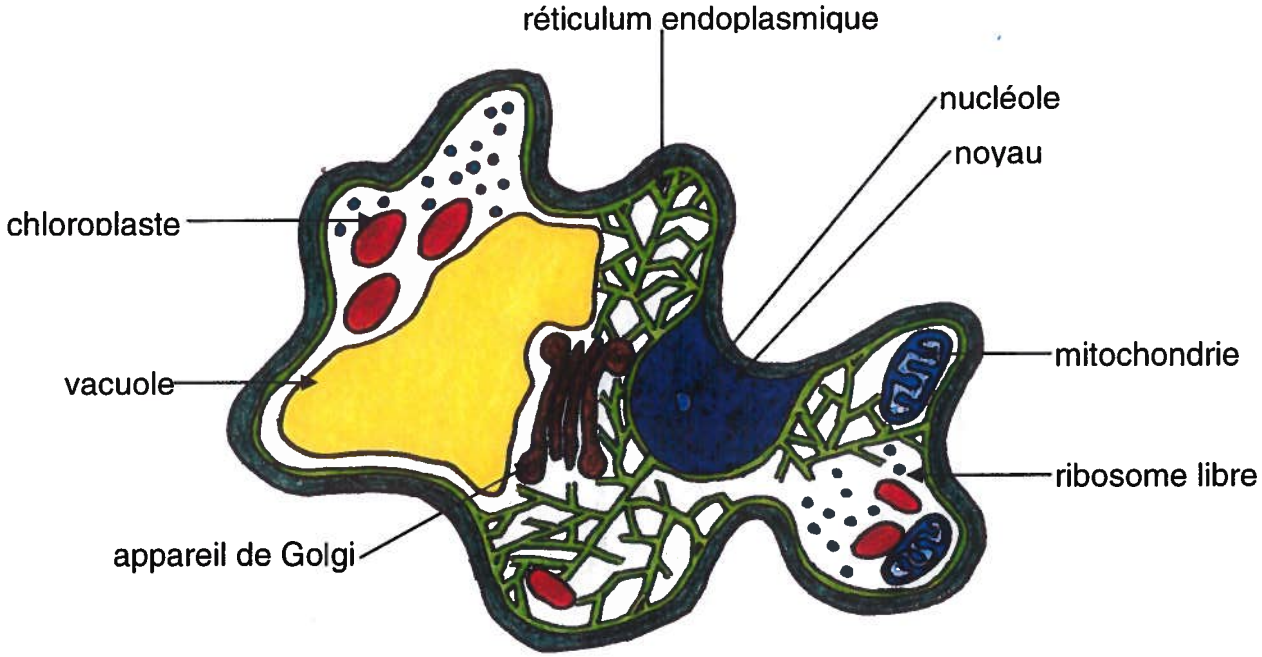


Figure 31 Structure de la cellule végétale

Image démontrant l'organisation des organites de la cellule épithéliale de *Nicotiana benthamiana*. À noter, l'étendue du réticulum endoplasmique et son association avec la membrane plasmique ansi que la présence d'une ou plusieurs larges vacuoles.

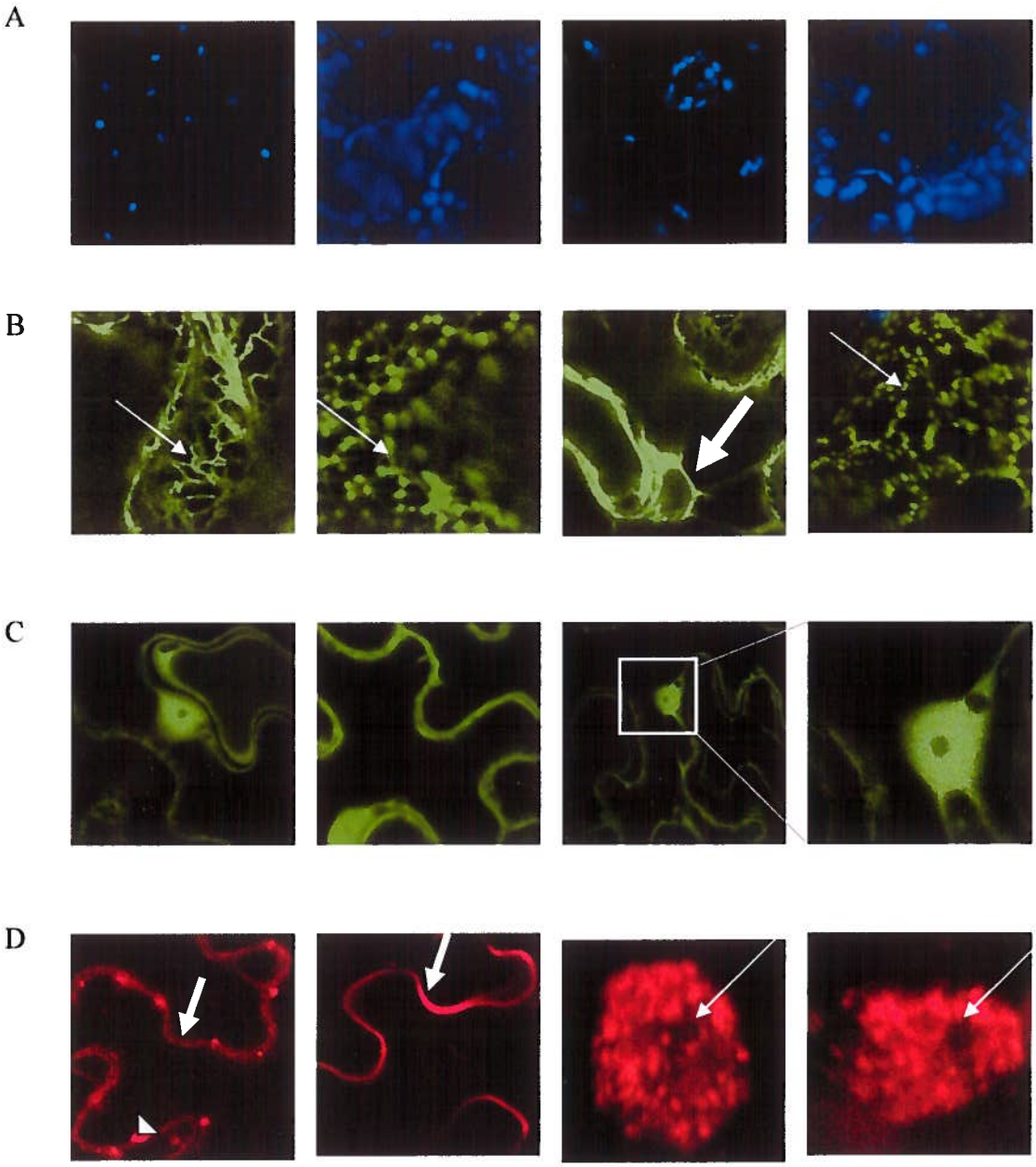


Figure 1 Localisation de protéines fluorescentes dans *N. benthamiana*

Observation des plantes au microscope confocal trois jours post-agroinfiltration avec les bactéries contenant le gène d'intérêt dans un plasmide Ti et l'inhibiteur de silencing p0.

Témoin sans gène d'intérêt (A), mgfp5-ER (B), GFP (C) et DsRed (D). Agrandissement :400X

En B, les flèches fines indiquent les réseaux de filaments de RE et la flèche grasse, le noyau. En C, l'image de droite est un agrandissement du carré de la troisième image. En D, la tête de flèche indique un amas de DsRed, les flèches grasses le cytoplasme et les flèches fines le nucléole.

2.1.2 Observation des protéines de fusion

L'expression des protéines de fusion eIFiso4E-GFP, eIF4E-GFP, 6KVPgPro-DsRed et VPgPro-DsRed a été observée 3 jours après l'agroinfiltration à l'aide d'un microscope confocal. L'autofluorescence due à la présence de chlorophylle a été soustraite des images obtenues.

La protéine de fusion eIFiso4E-GFP (figure 33A) a été observée en association avec des structures filamenteuses et en réseau semblables à celles observées avec la GFP modifiée ciblée au réticulum endoplasmique. La protéine n'a pas été observée au noyau. Il semble que la localisation observée soit imputable à la présence de eIFiso4E et non à celle, en C-terminal, de la GFP puisque la protéine de fusion n'adopte pas la localisation nucléaire de la GFP.

La protéine de fusion eIF4E-GFP (figure 33B) a été retrouvée associée à des structures morphologiquement similaires au réticulum endoplasmique et était absente du noyau. Tout comme dans le cas de eIFiso4E-GFP, l'absence de fluorescence dans le noyau indique que la localisation observée est probablement celle de eIF4E. Le facteur eucaryote d'initiation de la traduction 4E se retrouve donc, tout comme son isoforme eIFiso4E, en association avec le réticulum endoplasmique, ou plus précisément avec les ribosomes associés au RE.

La protéine de fusion 6KVPgPro-DsRed (figure 33C) a été observée à la surface du noyau et en association avec des structures semblables au réticulum endoplasmique. La protéine a aussi été retrouvée près de la membrane plasmique, sans toute fois être présente dans le noyau. L'absence de fluorescence rouge dans cette structure indique que la localisation observée est probablement due à la présence en N-terminal de 6KVPgPro et non à celle de la DsRed en C-terminal.

La protéine de fusion VPgPro-DsRed (figure 33D) a été observée dans le cytoplasme des cellules agroinfiltrées. La protéine n'a pas été trouvée dans le noyau ni en association avec les membranes du réticulum endoplasmique, la localisation observée représente donc apparemment la localisation de VPgPro.

Toutes les protéines de fusion exprimées dans les plantes de *N. benthamiana* ont aussi parfois été observées à l'intérieur de structures identifiées comme des chloroplastes par la présence d'autofluorescence associée à la chlorophylle. Cette localisation des protéines de fusion dans les chloroplastes demeure sans explication.

La eIF4E-GFP, la eIFiso4E-GFP et la 6KVPgPro-DsRed sont localisées dans des structures filamenteuses interconnectées dans l'espace intracellulaire qui s'étendent de la membrane nucléaire à la membrane plasmique, structures typiques du RE. La VPgPro-DsRed, quant à elle, est localisée dans le cytoplasme. Le tableau 5 résume les données de localisation des protéines de fluorescence et des protéines de fusion.

Protéine	Localisation
GFP	Noyau et cytoplasme
DsRed	Noyau et cytoplasme
mgfp5-ER	Réticulum endoplasmique
eIF4E-GFP	Réticulum endoplasmique
eIFiso4E-GFP	Réticulum endoplasmique
6KVPgPro-DsRed	Réticulum endoplasmique
VPgPro-DsRed	Cytoplasme

Tableau 5 Localisation des protéines de fluorescence et de fusion

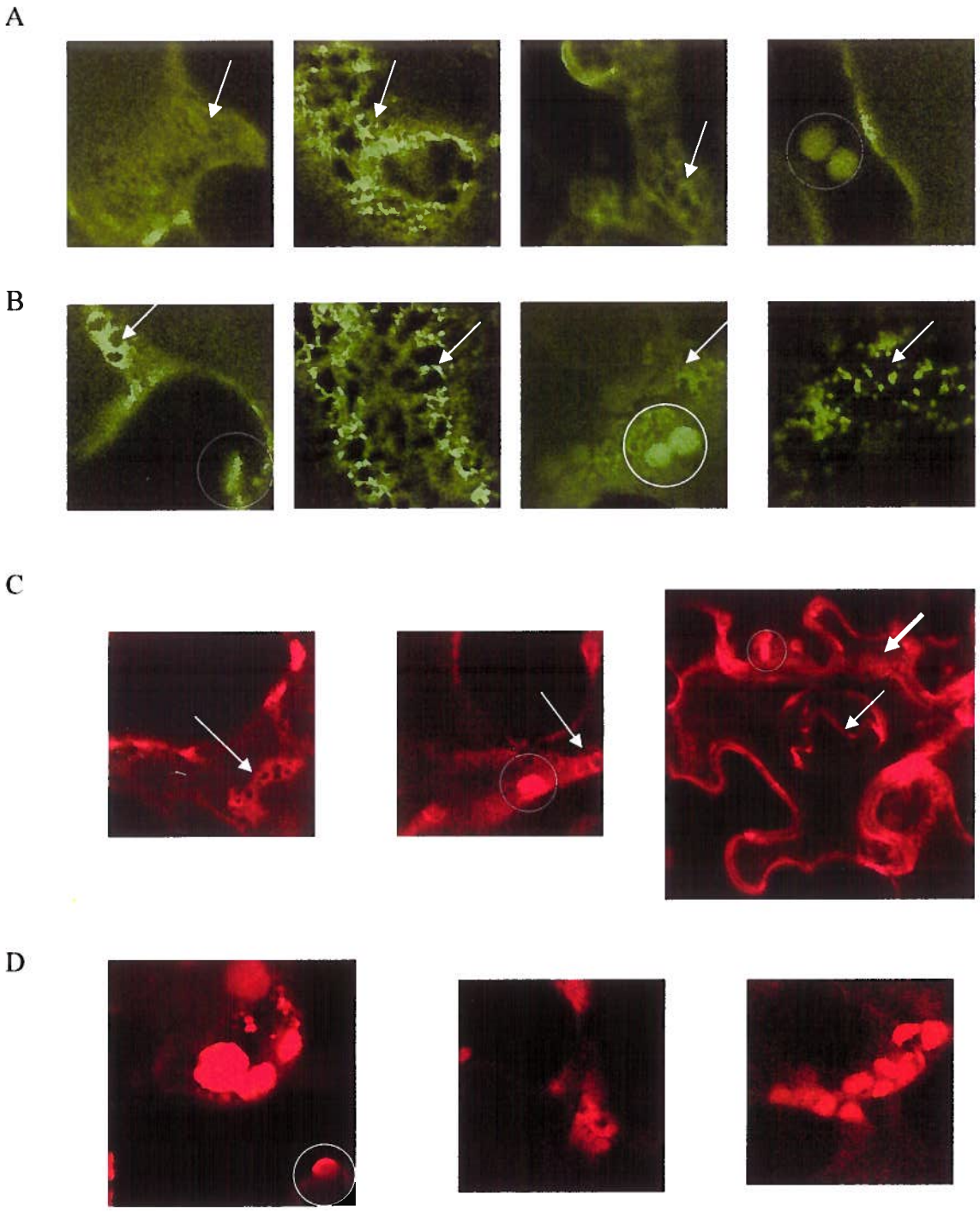


Figure 1 Localisation des protéines de fusion dans *N. benthamiana*

Observation des plantes au microscope confocal trois jours post-agroinfiltration avec les bactéries contenant le gène d'intérêt dans un plasmide Ti et l'inhibiteur de silencing p0.

eIFiso4E-GFP (A), eIF4E-GFP (B), 6KVPgPro-DsRed (C) et VPgPro-DsRed (D).

Agrandissement :400X Les flèches indiquent les structures filamenteuses associées au RE et les cercles, des chloroplastes dans lesquels on retrouve les protéines de fusion.

3 Co-expression de protéines de fusion

Les protéines de fluorescence GFP et DsRed ainsi que les protéines de fusion eIFiso4E-GFP, eIF4E-GFP, 6KVPgPro-DsRed et VPgPro-DsRed ont été exprimées en paire contenant une protéine fusionnée à GFP et une à DsRed afin de déterminer une colocalisation possible des deux protéines d'intérêt. La GFP et la DsRed seules ont été exprimées ensemble. Les protéines fusionnées à DsRed, soit 6KVPgPro et VPgPro, ont aussi été coexprimées avec la GFP modifiée du vecteur pBIN-mgfp5-ER en utilisant cette GFP comme marqueur du réticulum endoplasmique. Chaque solution d'agroinfiltration a été préparée en combinant 1/3 d'*A. tumefaciens* contenant le gène fusionné à GFP, 1/3 d'*A. tumefaciens* contenant le gène fusionné à DsRed et 1/3 d'*A. tumefaciens* contenant le vecteur pO. En moyenne, les cellules exprimant les deux gènes de fusion représentaient 10 à 15% des cellules totales.

3.1 Observations

Afin de déterminer l'impact sur la localisation de l'expression conjointe de deux protéines fluorescentes et la possibilité d'identifier séparément deux de ces protéines dans la même cellule, une coexpression de la GFP et de la DsRed (figure 34A) a été observée dans certaines cellules des plantes agroinfiltrées. La localisation des deux protéines a été cytoplasmique et nucléaire. Cette observation démontre que la présence d'une protéine fluorescente n'a pas d'effet sur la localisation d'une autre. Les deux protéines de fluorescence n'ont pas été observées à l'intérieur du nucléole, ce qui implique que chaque protéine conserve sa localisation propre.

L'expression conjointe de la GFP modifiée ciblée au réticulum et de 6KVPgPro-DsRed (figure 34B) a été observée en association avec les mêmes structures intracellulaires, bien que la fluorescence associée à mgfp5-ER soit beaucoup plus abondante que celle provenant de la 6KVPgPro-DsRed. Les deux protéines ont été identifiées aux mêmes endroits, ce qui démontre que la 6KVPgPro-DsRed se retrouve effectivement en association avec le réticulum endoplasmique.

La coexpression de la protéine de fusion VPgPro-DsRed et de la GFP modifiée ciblée au réticulum endoplasmique (figure 34C) a été observée en association avec des structures distinctes. Alors que la GFP a été identifiée sur des structures filamenteuses, la VPgPro-DsRed a plutôt été observée en amas dans le cytoplasme des cellules. Aucune des deux protéines n'a été identifiée dans le noyau. La VPgPro-DsRed n'est donc pas associée au RE. Cette observation démontre aussi que la colocalisation au réticulum de 6KVPgPro-DsRed avec mgfp5-ER n'est pas due à une interaction entre la partie VPgPro-DsRed de la protéine de fusion et la GFP.

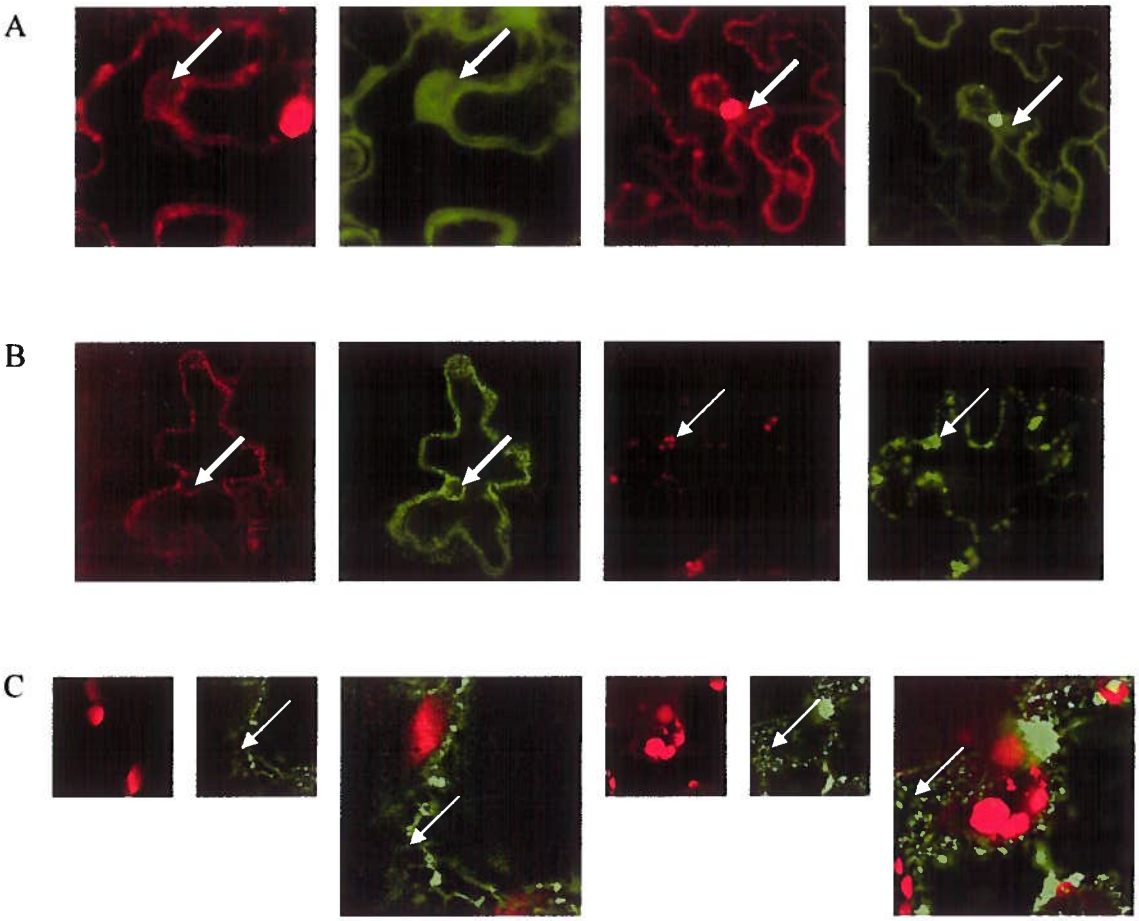


Figure 1 Colocalisation de DsRed et GFP et localisation des protéines de fusion DsRed dans *N. benthamiana*

Observation des plantes au microscope confocal trois jours post-agroinfiltration avec les bactéries contenant les gènes d'intérêt dans un plasmide Ti et l'inhibiteur de silencing p0.

GFP et DsRed (A), 6KVPgPro-DsRed et mgfp5-ER (B) et VPgPro-DsRed et mgfp5-ER (C)

Les flèches grasses indiquent le noyau, les flèches fines, le RE. Agrandissement : 400X

Les protéines eIF4E-GFP et 6KVPgPro-DsRed, lorsqu'exprimées simultanément dans la cellule végétale (figure 35A), ont été observées dans des structures conjointes, mais aussi dans des localisations distinctes. La eIF4E-GFP a été identifiée tout le long de la membrane plasmique ainsi que dans certains amas intracellulaires, amas non observés lorsque la eIF4E-GFP est exprimée seule. La 6KVPgPro-DsRed a été observées à certains endroits près de la membrane plasmique et dans les mêmes amas intracellulaires que la eIF4E-GFP. Il semble donc que les deux protéines soient localisées dans les mêmes structures, bien que la présence de l'une ne soit pas essentielle à la présence de l'autre.

La coexpression de eIF4E-GFP et de VPgPro-DsRed (figure 35B) a été observée en des endroits distincts de la cellule végétale. La fluorescence verte associée à eIF4E-GFP a été détectée près de la membrane plasmique et à certains endroits dans le cytoplasme, localisation non observée lorsque la eIF4E-GFP est exprimée seule. La fluorescence rouge associée à la VPgPro-DsRed a été identifiée en amas dans le cytoplasme de la même cellule à des localisations distincte de la GFP. Les deux protéines sont donc associées à des structures distinctes et il est clair que la présence de GFP et DsRed ne provoque pas de colocalisation. Les autres observations démontrant une colocalisation de deux protéines ne sont donc pas dues à la présence des protéines de fluorescence en C-terminal, mais bien à la fusion des protéines d'intérêt en N-terminal.

Les protéines eIFiso4E-GFP et 6KVPgPro-DsRed lorsque toutes deux exprimées dans la même cellule végétale (figure 35C) ont été identifiées en association avec des structures tubulaires se retrouvant dans le cytoplasme, semblables au réticulum endoplasmique. Un amas important des deux protéines a aussi été observé près du noyau, sans toutefois détecter de fluorescence à l'intérieur du noyau. Dans tous les cas, lorsque de la fluorescence verte a été observée, de la fluorescence rouge a aussi été identifiée, la eIFiso4E-GFP et la 6KVPgPro-DsRed colocalisent vraisemblablement au réticulum endoplasmique.

L'expression conjointe des protéines de fusion eIFiso4E-GFP et VPgPro-DsRed a été observée (figure 35D). Les deux protéines ont été identifiées en amas à l'intérieur de la cellule. Certains de ces amas présentent de la fluorescence verte ainsi que de la fluorescence rouge alors que d'autres qui se retrouvent dans le cytoplasme ne contiennent que de la fluorescence rouge. Des structures tubulaires contenant de la fluorescence verte ont été identifiées. Aucune fluorescence n'a été observée dans le noyau. La localisation des deux protéines permet donc de déterminer que la eIFiso4E-GFP colocalise partiellement avec la VPgPro-DsRed.

La 6KVPgPro-DsRed et eIFiso4E-GFP semblent colocaliser totalement dans la cellule végétale alors que la 6KVPgPro-DsRed et eIF4E-GFP ainsi que la VPgPro-DsRed et la eIFiso4E-GFP semblent plutôt colocaliser partiellement. Le couple VPgPro-DsRed et eIF4E-GFP quant à lui, ne permet pas d'observer de colocalisation entre les deux protéines. Les observations de colocalisation des protéines de fusion sont résumées dans le tableau 6.

	eIF4E-GFP	eIFiso4E-GFP
6KVPgPro-DsRed	Colocalisation partielle	Colocalisation totale
VPgPro-DsRed	Localisation distincte	Colocalisation partielle

Tableau 6 Colocalisation des protéines de fusion

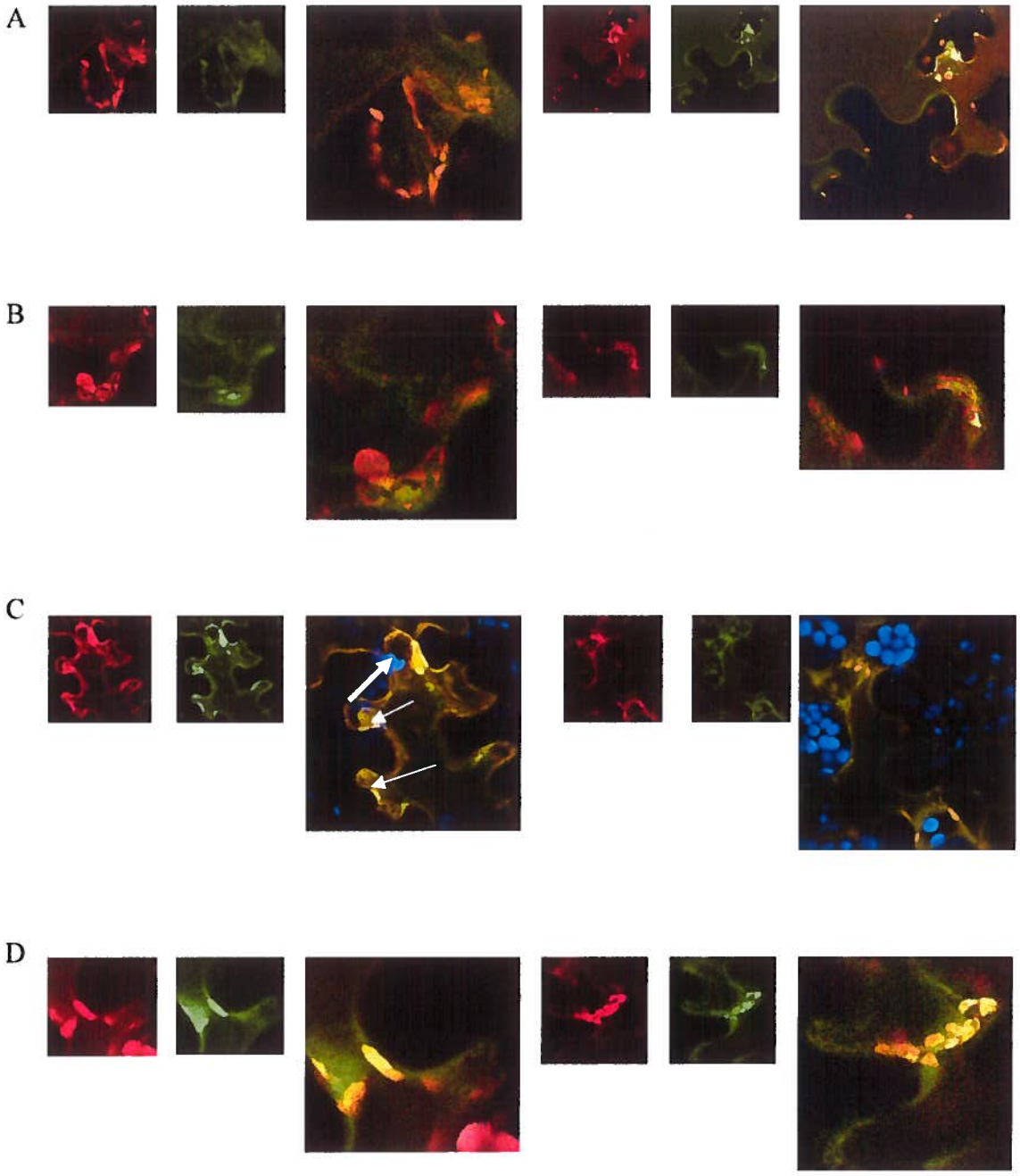


Figure 1 Colocalisation des protéines de fusion dans *N. benthamiana*

6KVPgPro-DsRed et eIF4E-GFP (A), VPgPro-DsRed et eIF4E-GFP(B), 6KVPgPro-DsRed et eIFiso4E-GFP (C) et VPgPro-DsRed et eIFiso4E-GFP (D).

Les flèches fines identifient le RE, les grasses, le noyau

Agrandissement : 400X

4 Co-purification des complexes protéiques associés à VPg

Suite à l'observation de la localisation des précurseurs de VPg et des isomères de eIF4E dans la cellule végétale, nous avons voulu observer quelles protéines interagissent avec les précurseurs de VPg dans la cellule infectée. Les précurseurs de la protéine VPg semblent en effet être au centre de plusieurs interactions protéiques (Léonard et *al.* 2004). Elles ont donc été purifiées par chromatographie d'affinité sur nickel à partir de plantes de *Brassica perviridis* infectés avec le TuMV isolat Québec afin d'évaluer quelles protéines se retrouvent dans les complexes purifiés. La VPg du TuMV isolat Québec possède la capacité de lier le nickel en absence de queue d'histidine (Ménard et *al.*, 1995).

4.1 Chromatographie sur colonne de nickel-NTA

Les plantes ont été infectées par inoculation mécanique et les feuilles infectées récoltées 12 jours après l'infection pour assurer une infection active (réplication du génome viral et production des protéines virales) des cellules des feuilles prélevées. Seules les feuilles présentant des symptômes d'infection (chlorose et difformités) ont été récoltées. Les extraits de plantes infectées et de plantes ayant reçu le même traitement mécanique en absence de virus ont été séparés en deux fractions par centrifugation. Ces deux fractions contiennent respectivement les protéines solubles (cytoplasmiques) et les protéines membranaires. La dissolution des membranes a été effectuée avec trois détergents : le Tween-20, le PTE et l'OG. Des trois détergents, l'OG est le plus approprié à la dissolution, tel qu'indiqué par Rivas et *al.* en 2002. La fraction membranaire a été utilisée en chromatographie d'affinité. Les précurseurs de VPg ont été purifiés par cette méthode.

4.2 Analyse des échantillons

Les extraits totaux et membranaires de plantes saines et infectées au TuMV ainsi que les échantillons purifiés par chélation métallique ont été analysés pour détecter la

présence de protéines virales et cellulaires ainsi que la présence d'ARN viral par buvardage de type Western et par RT-PCR respectivement.

4.2.1 Buvardages de type Western

Les échantillons récoltés ont été analysés par buvardage de type Western à l'aide d'anticorps anti-VPgPro (Figure 36). Les bandes obtenues correspondent à la taille de Pro (~30 kDa), VPgPro (~49 kDa) et 6KVPgPro (~53 kDa). La 6KVPgPro est présente dans la fraction membranaire alors que la Pro n'est observée que dans la fraction cytoplasmique. La VPgPro quant à elle, est présente dans les deux fractions (Figure 36A). La Pro ne se retrouve pas dans l'éluat d'une chromatographie par chélation métallique effectuée à partir des membranes isolées. La chélation métallique permet donc de purifier les précurseurs de VPg à partir d'une feuille de *B. perviridis* infectée au TuMV (Figure 36B).

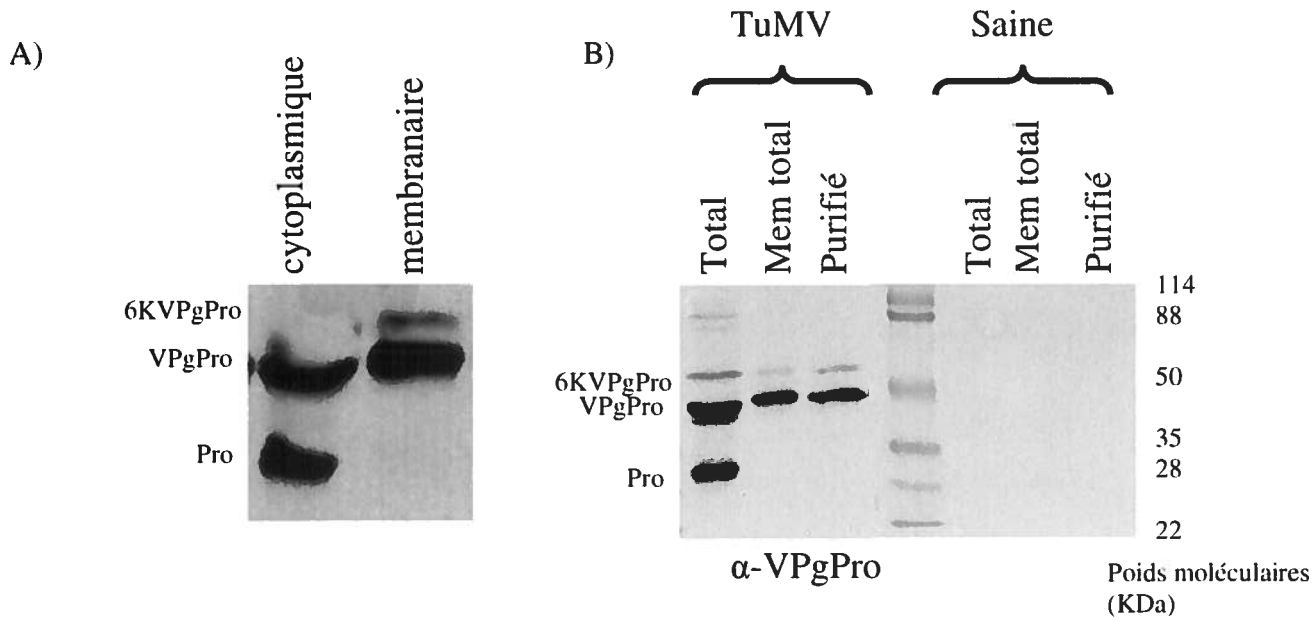


Figure 36 Détection de Pro et des précurseurs de VPg purifiés sur nickel.

Protéines extraites de plantes de *B. perviridis* infectées au TuMV et purifiées sur Ni^{++}-NTA
Différence entre les extraits cytoplasmiques et membranaires infectés (A) et purification (B)
Détection de Pro (bande inférieure dans le total) et de ses précurseurs VPgPro (bande médiane dans le total et inférieure dans le membranaire total et dans le purifié) et 6KVPgPro (bande supérieure).

La présence d'autres protéines virales et cellulaires a aussi été évaluée par buvardage de type Western. Les fractions pré-chromatographie, soit un échantillon d'extrait total avant séparation des fractions cytoplasmiques et membranaires ainsi qu'un échantillon de la fraction membranaire avant chromatographie, ont aussi été analysées afin de déterminer l'expression dans la plante entière ainsi que la co-purification avec les précurseurs de VPg. Les protéines CP, CI et polymérase provenant du virus (Figure 37 A-C) et les protéines cellulaires PABP, eIF3 et eIF4E-eIFiso4E (Figure 38A-C) ont été évaluées.

La protéine de la capside (CP, +/- 36 kDa) du TuMV a été détectée dans l'extrait total et l'extrait membranaire ainsi que dans l'éluat de la chromatographie effectuée sur la fraction membranaire de feuilles infectées. La protéine virale n'a pas été détectée dans les extraits provenant de feuilles non infectées, bien que des bandes non spécifiques soient dévoilées.

La protéine CI du TuMV (+/-70 kDa) a été observée dans les extraits total et membranaire ainsi que suite à la chromatographie sur les plantes infectées. Aucune protéine n'a été observée lorsque des plantes saines ont été utilisées.

La polymérase virale (+/- 55 kDa) a été identifiée grâce à l'anticorps anti-Pol dans les extraits provenant de plantes infectées ainsi que dans l'éluat de la chromatographie par chélation métallique. Une bande est aussi apparue avec l'extrait total de plantes non infectées. Cette bande de poids moléculaire inférieur à la polymérase virale est aussi présente dans l'extrait total de feuilles infectées et représente une liaison non-spécifique de l'anticorps à une protéine cellulaire.

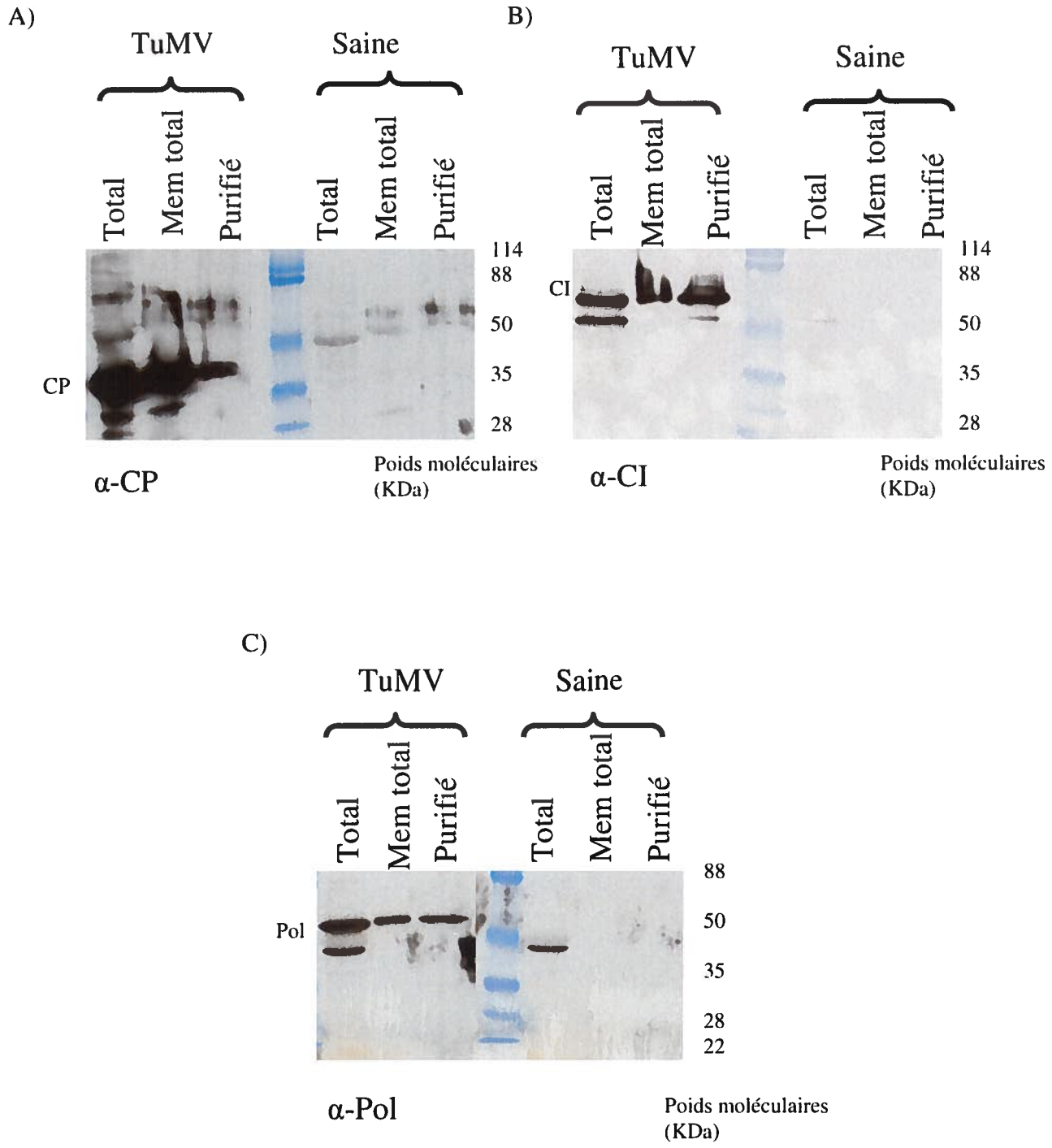


Figure 37 Détection de protéines virales purifiées sur nickel

Protéines extraites de plantes de *B. perviridis* infectées au TuMV et purifiées sur Ni^{++}-NTA

Protéine de la capside du TuMV (A), protéine CI (B) et polymérase (C).

La protéine cellulaire PABP est présente sous plusieurs isoformes qui sont identifiables dans les extraits totaux de plantes infectées et saines. Seulement un de ces isoformes (+/- 65 kDa) est détecté dans les extraits membranaires par l'utilisation d'un anticorps dirigé contre l'isoforme 2 de la PABP (cet anticorps ne reconnaît pas spécifiquement l'isoforme 2). Cette PABP associée aux membranes est présente en plus grande quantité chez les plantes infectées que chez les plantes saines. Suite à la chromatographie, la PABP n'est trouvée que chez les plantes infectées et l'on peut observer une bande supplémentaire légèrement inférieure à la PABP observée dans la fraction membranaire. Cette bande peut représenter un isoforme induit par l'infection ou un clivage de la PABP supérieure par la VPgPro. Aucune PABP n'est révélée dans l'éluat de la chromatographie faite à partir de plantes non infectées.

Le facteur eucaryote d'initiation de la traduction 3 est composé de 13 sous-unités chez *A. thaliana* (Burks et *al.* 2001). La majorité des sous-unités sont identifiées dans les extraits totaux provenant de plantes infectées ou non alors qu'une seule sous-unité peut être identifiée dans les extraits membranaires. Lorsque ces extraits sont purifiés par chélation métallique, 3 sous-unités sont présentes dans l'éluat provenant de feuilles saines et 4 dans l'éluat provenant de feuilles infectées. De plus, la quantité de ces sous-unitées présentes dans l'éluat est supérieure chez les plantes infectées au TuMV malgré l'observation que les sous-unités sont présentes en quantité équivalente dans les extraits totaux. Cette différence entre les plantes saines et infectées a été observée lors de chaque purification.

L'anticorps anti-eIFiso4E a permis d'observer l'induction de l'expression de l'isomère 4E (+/-35 kDa) chez les plantes infectées dans les extraits total et membranaire. Cet isomère est absent chez les plantes saines. On observe la eIFiso4E (+/-29 kDa) en quantité équivalente chez les plantes saines et les plantes infectées, autant dans l'extrait total que dans l'extrait membranaire. Plusieurs bandes représentant une liaison non spécifique de l'anticorps à des protéines cellulaires sont observées dans les extraits totaux, par contre, ces bandes sont éliminées dans les extraits membranaires. Les deux isomères de eIF4E ne sont pas observés suite à la chromatographie, qu'elle soit faite à

partir d'extraits membranaires de feuilles saines ou infectées, malgré les nombreuses observations *in vitro* d'interaction entre la VPgPro du TuMV et eIFiso4E.

En conclusion, la PABP semble être copurifiée sur Ni^{++}-NTA lorsque la purification est faite à partir de plantes infectées. La eIF3 semble être retenue plus efficacement sur la colonne de nickel lorsque des plantes infectées sont utilisées. La eIFiso4E ne semble pas être retenue sur nickel, qu'elle provienne de plantes saines ou infectées.

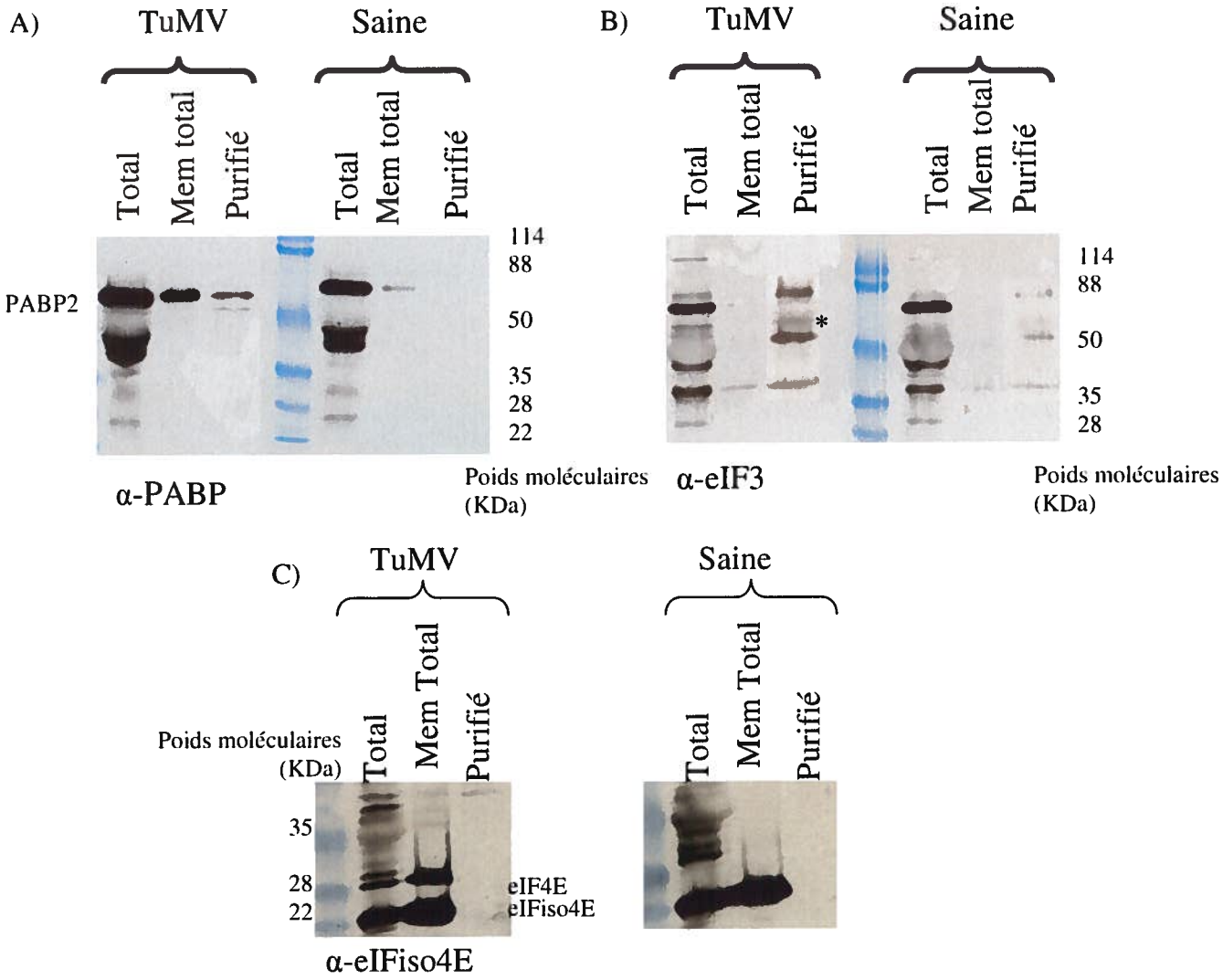


Figure 38 Détection de protéines cellulaires purifiées sur nickel

Protéines extraites de plantes de *B. perviridis* infectées au TuMV et purifiées sur Ni^{++}-NTA PABPs (A), eIF3 (B) et eIF4E/eIFiso4E (C). *= sous-unité de eIF3 purifiée seulement avec le TuMV

4.2.2 Spectrométrie de masse

Les bandes observées en coloratoin au bleu de Coomassie sur les fractions membranaires de plantes infectées et saines ont été analysées en spectrométrie de masse. Les protéines isolées avec VPgPro par chromatographie d'affinité sont présentées dans le tableau 7.

Protéines copurifiées avec VPgPro identifiées par spectrométrie de masse
HCPro
CI
Phospholipase D

Tableau 7 Analyse par spectrométrie de masse

Protéines copurifiées par chélation métalique avec VPgPro à partir de feuilles de *Nicotiana benthamiana* infectées au TuMV. Identification faite par spectrométrie de masse.

4.2.3 Présence d'ARN viral suite à la chromatographie d'affinité

La présence d'ARN viral en association avec les complexes purifiés a été analysée par purification des acides nucléiques suivi d'un RT-PCR. Une telle présence pourrait permettre la purification de protéines liant l'ARN et non le nickel ou la VPg. Une amorce oligo-dT a été utilisée pour la production de l'ADN complémentaire. Un PCR a ensuite été effectué afin d'amplifier le gène du précurseur VPgPro (Figure 39). La même

procédure a aussi été effectuée sur un extrait total de plante infectée ainsi que sur une fraction membranaire séparée. L'amplification sur l'extrait total a produit plusieurs bandes de taille ne correspondant pas à la VPgPro alors que l'amplification sur les fractions membranaires séparées a produit une bande de taille équivalente à la VPgPro. La présence de plusieurs produits d'amplification avec l'extrait total est probablement causée par la grande quantité d'ARN messagers et ribosomaux présents dans l'extrait. Un grand nombre d'ADNc peut causer une amplification non spécifique lors du PCR. Les amorces se lient alors à plusieurs matrices différentes, produisant un grand nombre de produits de PCR ne provenant pas du gène ciblé. Une amplification sur les extraits membranaires total et purifié a produit une bande de taille équivalente à VPgPro, ce qui démontre la présence d'ARN viral dans ces extraits. L'ARN viral entier semble donc être purifié avec les précurseurs de VPg et les autres protéines observées par chromatographie d'affinité.

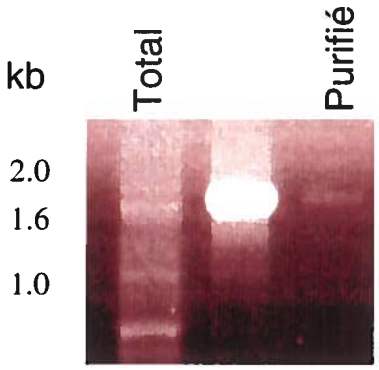


Figure 39 Détection de l'ARN viral

Gel d'agarose présentant les produits d'amplification du gène VPgPro à partir de l'ADNc produit à l'aide d'amorces oligodT sur des extraits de *B. perviridis* infecté au TuMV.

Chapitre 4

Discussion

Plusieurs études ont démontré l'importance de eIF4E et de son isomère eIFiso4E dans l'infection par les potyvirus (Duprat et *al.*, 2002; Kang et *al.*, 2005; Léonard et *al.*, 2000; Sato et *al.*, 2005; Ruffel et al. 2002; Nicaise et al. 2003; Yoshii et al. 2004; Lellis et al. 2002). Certaines de ces études ont démontré, soit par absence d'infection en absence du facteur de traduction (Lellis et *al.*, 2002) ou par interaction *in vitro* et *in planta* (Léonard et *al.*, 2000 et 2004) l'importance de eIFiso4E dans l'infection au TuMV. Une question demeure quant à la localisation intracellulaire de l'interaction de VPg avec eIFiso4E. Quels précurseurs de VPg en sont responsables? Avec quels isomères de eIF4E interagissent-ils? Notre projet vise donc à faire la démonstration dans la cellule intacte de la localisation, commune ou distincte, de eIF4E / eIFiso4E et des précurseurs de la VPg du TuMV.

Certaines études ont aussi démontré l'importance de la protéine VPg au centre de plusieurs interactions protéiques par copurification et tests *in vitro* (Léonard et *al.*, 2004). Suite à ces études, un modèle d'interaction autour de VPg a été proposé. La deuxième partie de notre projet tente de confirmer ce modèle et d'y identifier de nouvelles interactions.

1 Localisation

1.1 GFP et DsRed / considérations générales

Les protéines fluorescentes peuvent être utilisées pour marquer une protéine d'intérêt. Lorsqu'une protéine fluorescente est exprimée en fusion avec une autre protéine, elle conserve habituellement sa capacité à produire de la lumière, mais sa localisation dans la cellule est généralement déterminée par la localisation habituelle de la

protéine fusionnée. La fusion d'une protéine avec la GFP ou la DsRed permet donc de localiser facilement les protéines à l'étude dans la cellule végétale vivante et intacte (Mirabella et *al.*, 2004; Van Damme et al., 2004; Wang et *al.*, 2004). Nous avons utilisé cette technique pour identifier l'endroit exact dans la cellule où se trouvent eIF4E et eIFiso4E ainsi que 6KVPgPro et VPgPro. Lors de notre étude, toutes les fusions ont été effectuées en ajoutant la protéine fluorescente en C-terminal des protéines à étudier.

Dans un premier temps, les gènes de la protéine de fluorescence verte (GFP) et de la protéine de fluorescence rouge (DsRed) ont été insérés dans des vecteurs binaires d'*Agrobactérium tumefaciens* permettant le transfert de ces gènes dans la cellule végétale par agroinfiltration. Ces deux protéines fluorescentes peuvent être excitées une à la fois à l'aide d'un laser argon-krypton produisant un faisceau soit de 488 nm (excitation de la GFP) ou de 568 nm (excitation de la DsRed) de longueur d'onde. La GFP et la DsRed peuvent être observées séparément à l'aide de filtres permettant la séparation de la lumière émise selon des longueurs d'onde précises (de 500 à 530 nm pour la GFP et de 565 à 590 nm pour la DsRed) (Goodin et *al.* 2002).

Malgré l'existence de filtres permettant la séparation des diverses longueurs d'onde, un problème demeure lors de la détection conjointe de la GFP et de la DsRed. La DsRed requiert une période de maturation afin d'atteindre sa capacité à émettre de la lumière dans le rouge (Garcia-Parajo et *al.*, 2001). Ainsi, une protéine nouvellement synthétisée ne produit pas de lumière de longueur d'onde de 583 nm, mais plutôt de 504 nm. C'est donc dire que la DsRed, avant maturation complète, émet de la lumière de longueur d'onde équivalente à la GFP et est donc captée par le filtre utilisé pour cette protéine. Lors de notre étude, la fluorescence verte de la DsRed a été éliminée en ajustant la sensibilité de détection par la photocathode associée au filtre vert. Ainsi, le niveau de détection de la fluorescence verte était moins élevé, mais les données récoltées représentaient uniquement une fluorescence provenant de la GFP. Afin de ne pas devoir diminuer la sensibilité de la photocathode d'une façon trop élevée, le laser permettant l'excitation de la DsRed (laser krypton à 568 nm) a été gardé à une intensité minimale permettant la détection de la DsRed. Avec un laser plus faible, la lumière émise était de

moindre intensité, dans le rouge autant que dans le vert. En plus de permettre l'élimination de la fluorescence verte de la DsRed nouvellement synthétisée, cette diminution d'intensité du laser a permis aussi la détection de structures plus fines puisque les pixels de la photocathode n'étaient pas saturés (Desrosiers, communication personnelle).

Les gènes que nous avons utilisés pour l'expression de ces deux protéines fluorescentes sont optimisés pour l'expression dans les cellules de mammifères. Leur niveau d'expression dans les cellules végétales est ainsi plus faible dû à la présence d'un intron cryptique, pour la GFP, et à une séquence n'optimisant pas l'usage des codons pour la plante, autant pour la GFP que la DsRed. La séquence de la GFP peut être modifiée (mgfp) pour permettre une meilleure expression dans les cellules végétales (Haseloff et *al.* 1997) en enlevant l'intron cryptique et en modifiant la séquence d'acide nucléique pour favoriser la traduction. Nous avons utilisé cette GFP modifiée comme marqueur.

Certaines protéines de fluorescence ont été élaborées pour servir de marqueur pour les compartiments de la cellule (Brandizzi et *al.*, 2004; Zheng et *al.*, 2004). Nous avons utilisé la mgfp5-ER comme marqueur du réticulum endoplasmique. Le réticulum de la cellule végétale forme un réseau de filaments interconnectés dans le cytoplasme de la cellule. Le RE recouvre aussi le noyau et s'étend jusqu'à la membrane plasmique (Boevink et *al.*, 1998; Dunoyer et *al.*, 2002; Haseloff et *al.*, 1997; Reichel et Beachy, 1998; Ridge et *al.*, 1999). Cette organisation particulière permet d'identifier facilement le réticulum. Nous avons opté pour un marqueur du RE puisque plusieurs études ont démontré l'association de la réplication des potyvirus en association avec des membranes dérivées du réticulum (Ritzenthaler et *al.*, 2002; Turner et *al.*, 2003). Les études de notre laboratoire ont par ailleurs démontré la présence de 6KVPgPro avec les membranes du réticulum (Léonard et *al.* 2004). Le peptide 6K permet probablement l'ancrage de ce précurseur de VPg au réticulum puisqu'il est suffisant à la relocalisation de GUS, une protéine cytoplasmique, au RE (Schaad et *al.* 1997). La mgfp5-ER nous a donc permis d'identifier le réticulum et de déterminer la localisation de 6KVPgPro et VPgPro par rapport à cette organite.

L'expression de protéines exprimées de façon transitoire dans la plante est parfois faible, résultant du gene silencing effectué par la plante (Kusaba, 2004). Le silencing est un moyen pour la plante de se protéger des infections virales. Certains virus parviennent à contourner ce mécanisme de défense en produisant une protéine permettant l'inhibition du silencing (Voinnet et *al.*, 2003; Zhao et *al.*, 2005). C'est le cas entre autre du Beet Western Yellow Virus (BWYV) dont le génome contient le gène de la protéine PO. Dans notre étude nous avons utilisé cette protéine conjointement avec nos protéines fluorescentes, ce qui nous a permis d'augmenter leur niveau d'expression.

Dans notre étude, le taux de transformation des cellules végétales par *A. tumefaciens* diffère entre les protéines de fluorescence et les protéines de fusion (~20% des cellules sont positives pour les protéines de fusion par rapport à ~70% lors de l'expression de GFP / DsRed seule). Le taux de transformation était supérieur lorsque la souche AGL1 d'*A. tumefaciens* était utilisée. Les taux chutaient d'environs la moitié lorsque la souche C58C1 était utilisée. Cette baisse de transformation est probablement due à la perte du vecteur aidant pSoup par C58C1. Avec AGL1, le vecteur pSoup est essentiel à la réplication du vecteur pGreen et est donc conservé par la bactérie à cette fin.

1.2 6KVPgPro et VPgPro

Puisque les protéines du TuMV se retrouvent sous forme de précurseurs actifs, nous avons décidé d'évaluer la localisation de deux des précurseurs de VPg soit VPgPro et 6KVPgPro. Nous avons choisi d'étudier la localisation intracellulaire de VPgPro et de 6KVPgPro parce qu'il a été démontré que ces deux précurseurs de VPg se retrouvent en association avec les membranes du réticulum endoplasmique chez les cellules infectées au TuMV (Léonard et *al.* 2004), bien que VPgPro soit aussi présente dans le cytoplasme. Puisque notre intérêt se porte vers les membranes auxquelles sont associées la réplication et la traduction virale, nous avons opté pour l'étude des précurseurs de VPg semblant s'y trouver. De plus, VPgPro a été utilisée à maintes reprises lors de tests d'interaction *in*

vitro, il est donc logique d'en évaluer la localisation intracellulaire et la colocalisation avec eIF4E / eIFiso4E.

Nous avons observé la présence de 6KVPgPro-DsRed au réticulum endoplasmique et de VPgPro-DsRed dans le cytoplasme. La localisation de 6KVPgPro au réticulum serait due au peptide 6K. Cette séquence contient un domaine hydrophobe de 19 acides aminés. La capacité du peptide 6K à s'ancrer au RE a été évaluée en fusionnant 6K à la protéine GUS. Cette protéine est habituellement retrouvée dans le cytoplasme. Lorsque GUS était fusionnée à 6K, sa localisation intracellulaire était modifiée et on la retrouvait plutôt au réticulum (Schaad et *al.*, 1997). Des études de fragmentation de cellules infectées au TuMV ont par la suite permis de démontrer que la 6KVPgPro était présente dans les mêmes fractions que les protéines du réticulum (Léonard et *al.* 2004).

La capacité de 6K à cibler des protéines normalement cytoplasmiques au réticulum endoplasmique et l'observation de l'association de la réplication avec des membranes dérivées du RE nous a permis de proposer une localisation de 6KVPgPro à la membrane du réticulum endoplasmique, localisation que nous avons démontré clairement à l'aide de protéines de fusion à DsRed. La colocalisation parfaite de 6KVPgPro-DsRed et de mgfp5-ER démontre hors de tout doute que la 6KVPgPro-DsRed localise au réticulum. Il est aussi évident que cette localisation ne dépend pas de la présence de la DsRed puisque la localisation habituelle de la DsRed seule est au noyau alors que la 6KVPgPro-DsRed en est absente. De plus, puisque nos méthodes permettent l'expression de 6KVPgPro-DsRed en absence d'autres protéines virales, nous pouvons affirmer que la 6KVPgPro ne requiert aucune autre protéine virale afin de se localiser au réticulum endoplasmique.

Le précurseur VPgPro ne contient pas de domaine permettant l'intégration à la membrane. Des études de fractionnement cellulaire ont permis de déterminer la présence de VPgPro au réticulum endoplasmique de cellules infectées au TuMV (Léonard et *al.* 2004). Nos études ont confirmé, par sédimentation des membranes, que la VPgPro du

TuMV s'associe bien aux membranes lors de l'infection au TuMV. Par contre, nous avons aussi observé la présence de VPgPro avec les protéines cytoplasmiques lors de ces mêmes travaux de sédimentation. Ces études ont d'ailleurs démontré que la 6KVPgPro ne se retrouve qu'en association avec les membranes. C'est donc dire que la VPgPro dans les cellules infectées au TuMV se retrouve à la fois au réticulum endoplasmique et dans le cytoplasme. Chez plusieurs potyvirus, la VPgPro (ou NIa) se retrouve dans le noyau des cellules infectées (Riedel et *al.* 1998; Hajimorad et *al.* 1996). Nos travaux démontrent que la VPgPro-DsRed localise au cytoplasme, mais qu'aucune fluorescence n'est observée au réticulum endoplasmique ni au noyau. La localisation de VPgPro-DsRed au cytoplasme a été confirmée par la localisation distincte de VPgPro-DsRed et de mgfp5-ER. L'absence d'association de VPgPro-DsRed avec les membranes du RE est probablement attribuable à l'absence d'autres protéines virales. En effet, VPg peut interagir avec elle-même, seule ou à l'intérieur de précurseurs. Nous proposons donc que la présence de VPgPro en association avec les membranes chez les cellules infectées soit imputable à son interaction avec 6KVPgPro ou une autre protéine virale localisée au RE. Quant à son absence du noyau, elle concorde avec des observations précédentes démontrant que la VPgPro du TuMV ne se retrouve pas dans le noyau.

Nos résultats confirment donc la localisation présumée par fractionnement des membranes et par analyse de la séquence du peptide 6K de 6KVPgPro au réticulum endoplasmique. VPgPro quant à elle, ne semble pas, du moins lorsqu'exprimée en fusion avec DsRed chez *N. benthamiana*, se retrouver en association avec le réticulum endoplasmique. Son association au RE en conditions infectieuses se ferait donc par l'entremise d'une autre protéine virale, vraisemblablement 6KVPgPro.

1.3 eIF4E et eIFiso4E

eIF4E se lie à la coiffe des ARN messagers cellulaires pour permettre l'assemblage du complexe d'initiation de la traduction et le recrutement des ribosomes. Puisque la majorité de la traduction cellulaire se produit en association avec le réticulum endoplasmique rugueux (Nicchitta, 2002), il est logique d'y retrouver une grande majorité

des ribosomes et toutes les protéines nécessaires à la traduction. La fonction de eIF4E permet donc de déduire sa localisation cellulaire. La présence de eIF4E au réticulum endoplasmique n'a pas été démontrée expérimentalement chez la cellule végétale. Chez la plante, la localisation des deux isomères de eIF4E est présumée être similaire puisqu'ils partagent la même fonction, bien que l'un soit principalement associé à la traduction des ARN messagers non-coiffés (eIF4E) et l'autre à la traduction des ARNm coiffés (eIFiso4E) (Gallie et Browning, 2001).

L'expression transitoire de ces deux isomères a permis de démontrer la localisation de ces protéines au réticulum endoplasmique. Les filaments fluorescents observés dans les cellules suite à l'expression des protéines de fusion sont typiques du réticulum. Une partie des protéines devraient se retrouver dans le cytoplasme puisqu'on y retrouve les ribosomes libres (Gallie et Browning, 2001). Les observations effectuées lors de nos travaux n'ont pas permis de déterminer avec exactitude la présence de eIF4E-GFP et eIFiso4E-GFP dans le cytoplasme, mais une telle localisation demeure possible puisque le cytoplasme est difficilement identifiable dans la cellule végétale. Afin d'évaluer la présence de eIF4E/eIFiso4E dans le cytoplasme, une coexpression de ces protéines de fusion avec une DsRed ciblée au RE (Sansfaçon H, correspondance privée) pourrait être effectuée.

1.4 Colocalisation

Plusieurs études ont utilisé les protéines de fluorescence GFP et DsRed en fusion avec des protéines d'intérêt afin d'évaluer leur colocalisation (Bevis et Glick, 2002; Gage, 2002; Kawasaki et *al.*, 2004; Pan et *al.*, 2003; Zamyatnin et *al.*, 2002). Nous avons donc utilisé nos protéines de fusion afin d'évaluer la localisation relative de chaque isomère de eIF4E par rapport à chaque précurseur de VPg. Les deux isomères ont été étudiés pour leurs rôles contraires dans l'infection au TuMV. Des études chez des plantes knock out ont démontré que la eIFiso4E est essentielle à l'infection par le TuMV (Duprat et *al.*, 2002) et que la eIF4E ne peut pas palier au manque de eIFiso4E. Ces deux isomères de eIF4E ont l'effet contraire sur l'infection au LMV et au PVY. Ces deux potyvirus

requièrent absolument la présence de eIF4E pour se répliquer (Nicaise et *al.*, 2003; Ruffel et *al.*, 2002). L'intérêt est donc grand de déterminer la localisation de ces deux facteurs essentiels à la réplication des potyvirus.

1.4.1 GFP / DsRed

La première paire observée a été celle composée de GFP et de DsRed. En observant cette paire, on peut confirmer que lorsque deux protéines coexprimées localisent au même endroit dans une cellule végétale, les images acquises par les photocathodes des filtres GFP et DsRed se superposent parfaitement. Chez les cellules observées, l'intensité de la GFP était supérieure à celle de la DsRed. Cette observation concorde avec les ajustements utilisés afin d'éliminer la fluorescence verte de la DsRed et aussi avec les observations d'autres chercheurs (Sansfaçon H., correspondance privée). Nous avons constaté que la localisation intracellulaire de chaque protéine n'est pas modifiée par la présence de l'autre, tel que décrit par Jakobs et *al.* en 2000. De plus, en observant les amas de DsRed dans le cytoplasme et le noyau, on peut affirmer que la GFP n'interagit pas, directement du moins et dans les conditions utilisées, avec la DsRed. Si les deux protéines avaient la capacité de se lier l'une à l'autre, la GFP s'accumulerait aux endroits où il y a agglomération de DsRed. De telles accumulations de GFP ne sont pas présentes, ce qui permet d'affirmer que, dans des conditions d'expression transitoire chez *N. benthamiana,* il y a absence d'interaction entre GFP et DsRed. L'absence d'interaction entre les deux protéines fluorescentes est primordiale à une étude de colocalisation de protéines de fusion.

Puisque la GFP et la DsRed ne se lient pas l'une à l'autre dans nos conditions expérimentales, nous pouvons assumer que l'expression des deux protéines en fusion avec deux protéines d'intérêt ne modifiera pas la localisation habituelle des protéines à étudier. Les colocalisations observées dans ces conditions seront donc dues à la présence en N-terminal des protéines à l'étude.

1.4.2 eIFiso4E / 6KVPgPro

La 6KVPgPro-DsRed a été exprimée simultanément avec la eIFiso4E-GFP. Les cellules observées ont permis d'identifier un réseau de filaments dans le cytoplasme sur lesquels on identifie de la fluorescence rouge et de la fluorescence verte. Ce réseau est similaire à ce qui est observé lorsque les deux protéines sont exprimées seules et est aussi semblable aux filaments interconnectés observés avec mgfp5-ER. La coexpression de 6KVPgPro-DsRed et de eIFiso4E-GFP a aussi permis d'observer des amas de protéines fluorescentes, autant GFP que DsRed, autour du noyau. Ces amas peuvent être dus à l'oligomérisation de la DsRed (Baird et *al.*, 2000). Malgré l'existence de ces accumulations importantes, aucune fluorescence, verte ou rouge, n'est présente dans le noyau. Les deux protéines de fusion sont aussi présentes près de la membrane plasmique, localisation caractéristique des protéines du réticulum. Nous avons aussi observé que la fluorescence rouge dans ces cellules est toujours accompagnée de fluorescence verte et vice versa. Nous concluons donc que la protéine eIFiso4E-GFP colocalise totalement avec la 6KVPgPro-DsRed dans les conditions utilisées.

1.4.3 eIF4E / 6KVPgPro

Les images obtenues de la coexpression de eIF4E et 6KVPgPro ne nous ont pas permis d'identifier clairement des structures semblables au réticulum endoplasmique. Par contre, il a été établi précédemment que la 6KVPgPro-DsRed se retrouve au RE uniquement et nous pouvons donc affirmer que cette protéine de fusion représente un marqueur fiable du réticulum. La eIF4E-GFP est observée tout le long de la membrane plasmique alors que la 6KVPgPro-DsRed n'y est retrouvée qu'en points spécifiques. La eIF4E se retrouve aussi dans certains amas intracellulaires. À l'intérieur de ces amas, la eIF4E-GFP est exprimée conjointement avec la 6KVPgPro-DsRed. Il semble que les endroits où l'on peut observer de la 6KVPgPro-DsRed contiennent aussi de la eIF4E-GFP, mais que les endroits présentant de la fluorescence verte ne contiennent pas toujours de la fluorescence rouge. Il semble donc que la 6KVPgPro ne soit pas présente dans l'ensemble du réseau du réticulum endoplasmique, mais plutôt en des endroits

spécifiques. Les complexes de réplication des potyvirus se forment dans des membranes dérivées du RE (Schaad et *al.*, 1997) et non directement dans le RE. La 6KVPgPro doit donc se diriger vers ces zones du RE afin de former ces membranes et non dans le RE en entier afin de participer à la réplication. Ces observations permettent de conclure que, bien que la 6KVPgPro-DsRed et la eIF4E-GFP semblent être localisées dans des structures similaires dans la cellule végétale, dans nos condition d'expression la eIF4E-GFP ne colocalise que partiellement avec la 6KVPgPro-DsRed.

1.4.4 eIFiso4E / VPgPro

La coexpression de ces deux protéines n'a pas permis l'identification de structures filamenteuses indicatrices du réticulum endoplasmique, tel qu'observées lors de l'expression seule de eIFiso4E-GFP. Il est probable que le faible niveau d'expression des protéines de fusion ne permette pas l'observation de structures fines telles le RE. Par contre, de la fluorescence verte est présente près de la membrane plasmique, signe d'une association probable au réticulum. La eIFiso4E-GFP est aussi observée en quelques amas intenses près de la membrane. Ces amas contiennent aussi de la VPgPro-DsRed. En plus d'être détectée dans ces amas, la VPgPro-DsRed est aussi identifiée dans le cytoplasme. La présence de eIFiso4E-GFP au réticulum est directement liée à la fonction de cette protéine, alors que la même localisation observée chez VPgPro-DsRed dépend probablement de l'attraction de cette protéine par un ou plusieurs partenaires d'interaction situés au réticulum. Il est probable que la présence de VPgPro-DsRed au réticulum (localisation non-observée lorsqu'exprimée seule) soit dû à l'interaction de celle-ci avec eIFiso4E-GFP. L'identification de VPgPro-DsRed dans le cytoplasme indique probablement que toutes les molécules de VPgPro-DsRed ne se lient pas à eIFiso4E-GFP. L'expression conjointe de eIFiso4E-GFP et VPgPro-DsRed nous permet donc de conclure premièrement que la localisation intracellulaire de VPgPro-DsRed est modifiée partiellement par la présence de eIFiso4E-GFP. Nous concluons aussi que la VPgPro-DsRed colocalise partiellement avec la eIFiso4E-GFP, dans nos conditions expérimentales, dans des structures qui font probablement partie du réticulum endoplasmique. Une interaction entre VPgPro et eIFiso4E pourrait permettre de

relocaliser une partie de la VPgPro du cytoplasme au réticulum, là où l'on retrouve la majorité de la eIFiso4E.

1.4.5 eIF4E / VPgPro

Encore ici, la eIF4E-GFP ne permet pas la détection de structures spécifiques au réticulum endoplasmique, mais son accumulation près de la membrane plasmique est conséquente avec une telle association. La fluorescence verte de la eIF4E est détectée aussi à certains endroits qui semblent faire partie du cytoplasme. Il est possible que le faible niveau d'expression de cette protéine de fusion ne permette simplement pas la résolution nécessaire à l'identification formelle des structures filamenteuses du réticulum. Il est aussi possible que nous observions une certaine localisation cytoplasmique de eIF4E puisqu'une partie de la traduction cellulaire est effectuée par les ribosomes libres qui se retrouvent dans le cytoplasme (Gallie et Browning, 2001). Pour sa part, la VPgPro-DsRed est présente en amas dans le cytoplasme de la cellule, amas situés en des endroits distincts de la fluorescence verte. Puisqu'il a été démontré que la VPgPro-DsRed ne s'associe pas avec le réticulum endoplasmique et que les données suggèrent que la eIF4E-GFP s'y retrouve majoritairement, il est logique d'avancer que ces deux protéines ne sont pas localisées au même endroit dans la cellule végétale. Les images obtenues nous permettent donc de conclure que la eIF4E-GFP et la VPgPro-DsRed ne colocalisent pas dans nos conditions expérimentales.

Nos études ont démontré que l'interaction documentée entre la VPg et eIFiso4E s'effectue probablement au réticulum endoplasmique. Quant aux précurseurs de VPg qui sont impliqués dans cette interaction, nos études proposent que la VPgPro et la 6KVPgPro peuvent toutes deux interagir avec eIFiso4E puisque lorsqu'exprimées conjointement, la VPgPro colocalise partiellement avec eIFiso4E et elle est relocalisée en partie au réticulum endoplasmique alors que la 6KVPgPro colocalise totalement avec eIFiso4E. Finalement, nos études de colocalisation démontrent que l'isoforme eIFiso4E est probablement le seul impliqué dans l'interaction *in planta* avec VPg puisque eIF4E ne colocalise pas avec VPgPro et qu'elle ne colocalise que partiellement avec la 6KVPgPro.

2 Copurification de complexes protéiques impliquant les précurseurs de la VPg du TuMV

Suite à la localisation intracellulaire des précurseurs de VPg et des isomères de eIF4E, nous avons tenté de déterminer quelles autres protéines font partie du complexe incluant la VPg. Pour ce faire, nous avons opté pour la méthode de copurification par chélation métallique. La copurification par chromatographie d'affinité est une méthode grandement utilisées dans la détermination d'interactions protéiques (Jones et *al.*, 2004; Langland et *al.*, 1997; McCleland et *al.*, 2004; Moorhead et *al.*, 1994; Quadt et *al.*, 1993) Dans la majorité des cas, une étiquette moléculaire, comme le His-tag ou le T7-tag, doit être ajoutée à la protéine principale de l'interaction afin de permettre la copurification. La protéine virale VPg et son précurseur VPgPro, lorsqu'exprimées sous forme de protéines recombinantes dans *E. coli*, peuvent être purifiées par chromatographie d'affinité sur nickel-NTA sans queue d'histidine ajoutée (Ménard et *al.*, 1995). Les mêmes protéines produites par une plante de *B. perviridis* peuvent aussi être retenues sur une colonne de nickel (Léonard et *al.* 2004). Le site de liaison au nickel de la VPg du TuMV n'a pas encore été identifié, mais il semble par contre que les VPg des divers isolats du TuMV n'aient pas toutes la même affinité pour le nickel. Ainsi, la VPg de l'isolat Québec est purifiée de façon plus efficace lorsqu'exprimée dans *E. coli* que celle de l'isolat Canada1 (Beauchemin, C, communication personnelle). L'isolat Québec a été utilisé dans la réalisation de nos travaux.

Des études ont permis d'observer l'importance des protéines liées aux génomes viraux comme point d'ancrage des protéines de l'initiation de la traduction. C'est entre autre le cas du virus de Norwalk, un Calicivirus (Daughenbaugh et *al.* 2003). Ce virus, tout comme le TuMV, possède une VPg liée de façon covalente au génome viral. Cette étude présente tout d'abord des résultats d'interactions en double hybride chez la levure qui démontrent que la VPg lie la sous-unité D du facteur eIF3. Suite à cette observation, des études d'attraction utilisant la VPg liée à la GST ont confirmé la liaison avec eIF3 en plus de démontrer que, lorsque mise en contact avec un lisat cellulaire, la VPg du virus de Norwalk permet la formation d'un complexe protéique comprenant la eIF3, la eIF4GI, la

eIF2α, la eIF4E et S6, une protéine de la sous-unité ribosomale 40S. L'importance de la VPg dans la formation de ces complexes versus l'implication de eIF3 n'a par contre pas été évaluée.

L'étude s'est ensuite tournée vers l'effet de la présence de VPg sur la traduction. Des études de traduction *in vitro* ont permis de démontré que la présence de VPg inhibe la traduction des ARN coiffés ainsi que de ceux contenant un IRES. Il semble donc que la VPg du virus de Norwalk séquestre les facteurs permettant l'initiation de la traduction, diminuant ainsi la traduction des ARN messagers coiffés et non-coiffés. Il est à noter que l'absence seule de eIF3 ne permet pas d'expliquer l'inhibition observée lors de la traduction des ARN contenant un IRES du cricket paralysis virus. Cet IRES ne requiert aucun facteur d'initiation afin de former le ribosome de 80S. Il semble donc que la formation d'un complexe comprenant plusieurs facteurs d'initiation et la sous-unité ribosomale de 40S soit nécessaire à l'inhibition de la traduction.

Bien que la VPg du virus de Norwalk soit différente de celle des potyvirus, il demeure que les deux protéines semblent partager des fonctions similaires dans l'initiation de la traduction de l'ARN viral et dans la réplication du génome. Nous pouvons donc nous baser sur de telles études afin de déterminer les interactions potentielles de la VPg du TuMV lors de l'infection. Ces interactions pourraient avoir un impact sur l'inhibition de la traduction des ARNm de l'hôte et de favoriser la traduction de l'ARN viral.

Chez le TuMV, il a été démontré en double hybride chez la levure et *in vitro* que la VPg interagit directement avec la eIFiso4E (Léonard et *al.* 2000, 2004). Cette interaction permet de proposer la formation d'un complexe, semblable à celui observé chez le virus de Norwalk, servant de point d'ancrage aux protéines impliquées dans l'initiation de la traduction.

De plus, l'interaction observée *in vitro* entre la PABP et le domaine Pro de la VPgPro (Léonard et *al.* 2004) permet de renforcer la possibilité de la présence d'un tel

complexe puisque la PABP joue un rôle important dans la réinitiation de la traduction. Il est donc possible que la VPg du TuMV, tout comme il a été démontré avec celle du virus de Norwalk, soit au centre de la formation d'un complexe d'initiation de la traduction.

Ces observations d'interaction entre la VPg du TuMV et les protéines cellulaires eIFiso4E et PABP ont été faites *in vitro* (Léonard et *al.* 2000) et aussi *in planta* (Léonard et *al.* 2004). Nos travaux confirment *in planta* que la PABP fait partie du complexe de protéines copurifiées avec les précurseurs de VPg. Cette interaction est donc présente chez les plantes infectées et joue probablement un rôle important dans le cycle viral.

Pour ce qui est de l'interaction avec eIFiso4E, malgré l'observation de l'induction de la production de eIF4E par l'infection, nos travaux ne nous ont pas permis de copurifier le facteur d'initiation iso4E avec la VPg.

Nous avons par contre observé une augmentation de la quantité de eIF3 suite à la purification sur nickel d'un extrait de plante infectée. Tout comme chez le virus de Norwalk, il semble donc que la eIF3 fasse partie d'un complexe protéique permettant l'initiation de la traduction de l'ARN viral chez le TuMV.

L'interaction de la VPg des potyvirus avec les autres protéines virales a aussi été étudiée par plusieurs équipes. Tout d'abord, en accord avec les hypothèses proposant un rôle de la VPg dans la réplication de l'ARN viral, des études ont démontré une interaction entre la VPg du Tobbaco vein mottling virus (TVMV) et la polymérase du même virus. Ces études ont été effectuées en double hybride chez la levure (Hong et *al.* 1995). La même interacton a été observée chez le Tobbaco etch virus (TEV) (Li et *al.* 1997), le Potato virus A (PVA) et le Pea seed-borne mosaic virus (PSbMV) (Guo et *al.* 2001), le tout en double hybride chez la levure.

L'interaction chez le TVMV a par la suite été étudiée plus en profondeur *in vitro* (Fellers et *al.* 1998). Ces études ont démontré que la VPg lie la polymérase et que cette interaction permet de stimuler l'activité polymérase. Cette stimulation de la polymérase

par VPg ne semble pas dépendre de la liaison de la VPg à l'ARN viral puisque la mutation de la tyrosine permettant cette liaison n'affecte pas le niveau de stimulation. Il semble donc que la VPg de plusieurs potyvirus puisse lier la polymérase. Par contre, toutes ces études démontrent la liaison entre la VPg et la polymérase *in vitro* et non en condition d'infection chez la plante. Nous avons démontré par copurification que la polymérase du TuMV est présente dans un complexe protéique incluant la VPg sous forme de précurseurs. Nos travaux ont donc permis de prouver que les interactions observées *in vitro* entre la VPg et la polymérase sont aussi présentes *in planta*.

Le groupe de Guo a étudié en double hybride chez la levure les interactions possible entre toutes les protéines de deux potyvirus, le PVA et le PSbMV (Guo et *al.* 2001). En plus de relever une interaction entre VPg et la polymérase, ils ont aussi observé des interactions entre la VPg et la P1 (pour le PVA seulement) la P3 et la HCPro. L'interaction entre la VPg et la HCPro a aussi été évaluée par double hybride et buvardage de type far-Western chez le Clover yellow vein virus (ClYVV) (Yambao et *al.* 2003). Le groupe de Guo a aussi démontré la capacité d'homodimérisation de la VPg, seule ou sous forme de précurseurs chez le PVA et le PSbMV alors que le groupe de Yambao a démontré cette même activité chez le ClYVV.

Lors de notre recherche, nous n'avons pas observé la présence de P1 ou de P3 suite à la copurification. Il est possible que ces deux protéines virales soient copurifiées avec VPg, mais nous ne possédons pas les anticorps appropriés à leur détection.

Pour ce qui est de l'interaction avec la HCPro observée en double hybride, nous avons observé lors de nos travaux la copurification de cette protéine avec les précurseurs de VPg. Cette observation a été faite par spectrométrie de masse sur les bandes observées en bleu de Coomassie suite à la purification par chélation métallique.

Nous avons aussi observé la copurification de deux protéines virales pour lesquelles aucune interaction avec la VPg n'a été documentée : la CP et la CI. En double hybride chez la levure, ces deux protéines interagissent respectivement avec CI et CP et

P1, HCPro et CP (Guo et *al.* 2001). Puisque les deux protéines ont la capacité de former des oligomères (Guo et *al.* 1999), il est possible qu'elles soient copurifiées en grande quantité via l'interaction de CI avec HCPro qui elle lie la VPg. Nous avons donc démontré *in planta* que les protéines virales HCPro, CP et CI sont copurifiées avec la VPg dans un complexe protéique. Évidemment, la copurification de ces protéines virales n'implique pas une interaction directe avec VPg, mais plutôt leur participation dans la formation d'un complexe formé autour des interactions de VPg.

Nos travaux nous ont permis d'observer la présence d'une nouvelle protéine copurifiée avec le complexe incluant VPg, protéine dont l'interaction avec VPg n'a pas été évaluée directement. La phospholipase D est une protéine cellulaire induite en condition de stress chez la plante. Une infection virale entre autre permet l'induction de cette protéine. Son rôle dans la réponse à l'infection demeure inconnu, mais il semble que la phospholipase D fasse partie du complexe de protéines copurifiées avec VPg chez les plantes infectées au TuMV.

L'approche expérimentale de copurification des complexes à partir de plantes infectées au TuMV pause certains problèmes. Tout d'abord, il est impossible d'affirmer hors de tout doute que les protéines observées suite à la purification sur nickel sont présentes via leur implication dans un complexe contenant la VPg. Nous pouvons vérifier la purification des protéines cellulaires observées à partir de plantes saines et ainsi déterminer la capacité de lier le nickel de ces protéines ou encore leur liaison à d'autres protéines cellulaires liant le nickel.

Par contre, les protéines virales copurifiées peuvent l'être via leur liaison au nickel ou via une liaison à d'autres protéines liant le nickel. Ainsi, il est difficile de mettre en place les témoins appropriés afin de confirmer la formation de complexes comprenant les protéines identifiées chez les plantes infectées. Afin de produire ces témoins, il faudrait exprimer de façon transitoire chacune des protéines virales dans une plante de *B. perviridis* et observer quelles protéines cellulaires sont purifiées sur nickel ainsi que vérifier la présence de la protéine virale exprimées suite à la chromatographie. Il serait

aussi possible de vérifier la capacité de liaison au nickel de chaque protéine virale en produisant des protéines recombinantes de chacune d'entre elles dans *E. coli* et en vérifiant leur purification sur nickel en présence et en absence d'une queue d'histidine.

Ensuite, il est clair que les conditions utilisées ne sont pas optimales à la conservation de toutes les interactions impliquant VPg puisque la eIFiso4E n'est pas copurifiée alors qu'il a clairement été démontré par plusieurs groupes que cette interaction est essentielle à l'infectivité du TuMV. Les conditions de purification devraient donc être modifiées afin de conserver cette interaction. Il est en effet possible que d'autres interactions soient perdues en même temps que celle de eIFiso4E.

Troisièmement, la méthode de copurification utilisée ne tient pas compte de la présence de l'ARN viral. Ainsi, il est possible que certaines protéines copurifiées soient présentes via une association directe ou indirecte avec l'ARN viral et non via leur présence dans un complexe comprenant VPg. Afin de déterminer quelles protéines font partie d'un complexe comprenant la VPg, les interactions impliquant l'ARN devraient être soustraites en traitant les extraits de plantes infectées avec de la RNase avant la chromatographie.

Quatrièmement, la quantité de protéines copurifiées doit être optimisée afin d'obtenir une quantité de protéines suffisante à d'autres études en spectrométrie de masse qui pourraient nous permettre d'observer des protéines copurifiées pour lesquelles nous ne possédons pas d'anticorps. Les protéines identifiées par spectrométrie de masse jusqu'à maintenant sont la HCPro, la CI et la phospholipase D. La méthode de copurification est basée sur la liaison de VPg au nickel, liaison qui permet ensuite de recueillir les protéines liées à VPg. Il est donc logique de prévoir que les deux bandes les plus intenses observées en bleu de Coomassie représentent les précurseurs VPgPro et 6KVPgPro. Hors, les bandes les plus intenses observées en bleu de Coomassie suite à la purification sur nickel sont composées des trois protéines nommées précédemment. Pourquoi alors les deux protéines liant directement le nickel ne sont-elles pas les plus abondantes suite à la chromatographie? Deux explications sont possibles.

Premièrement, il se peut que la HCPro et la CI aient la même capacité de liaison au nickel que la VPg. Dans de telles conditions, il serait possible que les deux protéines virales soient purifiées plus efficacement que les précurseurs de VPg. Dans cet ordre d'idée, des travaux prétendent que la HCPro a la capacité de lier le nickel (Kadouri et *al.* 1998). Cette étude a été effectuée à partir de plantes infectées seulement et les investigateurs n'ont pas procédé à la production de HCPro recombinante afin de vérifier la liaison directe de cette protéine au nickel. Il est possible que la HCPro lie directement le nickel, mais les travaux effectués n'évaluent pas la présence d'autres protéines, virales ou cellulaires, suite à la chromatographie. Ainsi, il est aussi possible que les observations rapportées démontrent la copurification de HCPro via sa liaison à VPg.

Deuxièmement, il est aussi possible que la quantité de HCPro et de CI observée suite à la purification sur nickel représente la capacité de ces deux protéines à former des oligomères. En effet, la CI et la HCPro ont la capacité de se lier entre elles et de former des aggrégats contenant plusieurs copies de la protéine (Guo et *al.* 1999). Ainsi, il est possible que la présence de ces deux protéines en quantité supérieure à celle de la VPg suite à la purification soit due à la liaison d'oligomères de chacune de ces protéines à une copie de VPg. Dans une telle situation, la HCPro et la CI seraient plus abondantes que la VPg à laquelle elles se lient.

La méthode de complémentation bimoléculaire de fluorescence (BiFC) (Walter et *al.*, 2004, Bracha-Drori et *al.*, 2004) pourrait être utilisée afin de déterminer *In vivo* la présence de ces interactions et palier aux problèmes causés par la technique de copurification. Cette technique permet de visualiser des interactions à l'aide d'une protéine de fluorescence scindée en deux et fusionnée à deux protéines ayant un potentiel d'interaction. Cette méthode permet aussi la localisation intracellulaire des interactions étudiées. Cette procédure est déjà en cours dans notre laboratoire. Des vecteurs permettant l'utilisation de la mgfp5 pour cette technique ont été produits au cours de ce projet et seront utilisés par Chantal Beauchemin afin d'observer, entre autre, les

interactions entre eIFiso4E et VPg (et ses précurseurs) ainsi que PABP et VPg (et précurseurs).

Nous concluons donc, sous toute réserve, que la VPg du TuMV représente le point d'ancrage à la formation d'un complexe protéique incluant les protéines virales Pol, CP, CI et HCPro ainsi que les protéines cellulaires PABP, eIF3 et phospholipase D. Nous n'excluons pas que certaines protéines identifiées soient purifiées autrement que via une liaison dans un complexe incluant la VPg, soit via une liaison à l'ARN viral ou encore via une liaison à d'autres protéines liant le nickel ou via leur propre liaison au nickel.

3 Perspectives d'avenir

Nos travaux de colocalisation ont permis de déterminer à quel endroit dans la cellule saine se retrouvent les précurseurs de VPg et les isomères de eIF4E. Par contre, la colocalisation ne confirme pas l'interaction. En ce sens, il serait intéressant de produire des protéines de fusion entre les gènes d'intérêt et les parties N-terminale et C-terminale de la mgfp afin de procéder à la localisation de l'interaction entre VPg et eIFiso4E par complémentation bimoléculaire de fluorescence.

Nos travaux de copurification ont permis d'identifier plusieurs protéines faisant partie d'un complexe comprenant la VPg. Les protéines cellulaires présentes dans ce complexe pourraient représenter des cibles potentielles de gènes de résistance à l'infection au TuMV. Il serait donc intéressant d'évaluer cette question en produisant des plantes knock out pour ensuite observer leur susceptibilité à l'infection au TuMV ainsi qu'à d'autres potyvirus.

La nature des interactions impliquées dans la formation de ces complexes demeure aussi à évaluer. Les protéines identifiées interagissent-elles directement avec VPg? Se lient-elles plutôt à une autre protéine qui elle lie la VPg? Les interactions observées pourraient être évaluées en ELISA afin de déterminer la séquence de liaison observée dans la formation des complexes. De telles études pourraient permettre aussi d'évaluer les sites de liaison à la VPg des différentes protéines observées. Les précurseurs de VPg pourraient aussi être exprimés de façon transitoire et purifiés afin d'observer si les mêmes protéines cellulaires sont copurifiées en absence d'autres protéines virales et d'ARN viral.

Finalement, nous avons étudié la formation de complexes protéiques impliquant les précurseurs de VPg associés aux membranes, mais il serait aussi intéressant d'évaluer quelles protéines interagissent avec la VPgPro qui se retrouve dans le cytoplasme. Ces protéines sont-elles les mêmes que celles retrouvées en association avec les membranes?

Si non, quelles sont les protéines qui diffèrent? Ces différences nous permettent-elles de proposer une fonction différente à la VPgPro qui se retrouve dans le cytoplasme? Afin de procéder à ces études, il suffit d'utiliser la fraction cytoplasmique lors de la chromatographie sur nickel en remplacement de la fraction membranaire et d'ajuster le protocole à la présence d'une quantité plus importante de protéines totales.

Chapitre 5

Conclusion

Des interactions impliquant VPg ont été documentées et semblent être essentielles au cycle viral du TuMV et d'autres potyvirus. Ainsi, l'absence d'interaction entre VPg et eIFiso4E ne permet pas l'infection avec le TuMV. Il est donc clair que les interactions impliquant VPg doivent être étudiées de près afin de déterminer en détail le fonctionnement du cycle d'infection au TuMV. Pour ce faire, nous avons opté pour une méthode permettant l'évaluation des interactions existantes autour de la VPg ainsi que la localisation de certaines de ces interactions à l'intérieur de la cellule végétale.

L'utilisation des protéines fluorescentes GFP et DsRed nous a permis d'identifier l'endroit dans la cellule où se produit l'interaction entre les précurseurs de VPg et eIFiso4E. Tel que proposé, nous avons démontré que cette interaction se produit en association avec le réticulum endoplasmique. La localisation présumée de 6KVPgPro au réticulum a été démontrée ainsi que la localisation de 2 isomères du facteur eucaryote d'initiation de la traduction 4E, aussi au réticulum. La colocalisation de 6KVPgPro avec ces deux facteurs n'est cependant pas signe direct d'une interaction. Par contre, le déplacement d'une partie de la VPgPro du cytoplasme vers le réticulum observé lorsque la VPgPro est exprimée avec la eIFiso4E, et non avec la eIF4E, démontre une possible interaction de VPgPro avec eIFiso4E.

La VPg et ses précurseurs ont la capacité de lier le nickel en absence de queue d'histidine. Cette caractéristique permet la purification de ces protéines qu'elles soient produites dans *E. coli* ou qu'elles proviennent de plantes infectées au TuMV. Nous avons donc utilisé cette caractéristique de VPg afin de tenter de purifier le complexe protéique impliquant les précurseurs de VPg associés aux membranes. En utilisant la purification par chélation métallique dans des conditions ne perturbant pas la majorité des interactions entre les protéines, nous avons démontré que les protéines virales CP, CI, HCPro et Pol

ainsi que les protéines cellulaires PABP et phospholipase D interagissent avec VPg. Nous avons aussi démontré que la protéines eIF3 est retenue par chromatographie sur nickel en plus grande quantité en présence de VPg. La chélation métallique ne nous a pas permis de démontrer l'interaction entre VPg et eIFiso4E.

Les résultats obtenus en étude de colocalisation et de copurification nous permettent de proposer un modèle d'interaction présentant VPg en tant que point d'ancrage. Selon ce modèle, le précurseur 6KVPgPro permet le recrutement des protéines impliquées dans la traduction ainsi que celles permettant la réplication du génome viral aux membranes. Ces interactions semblent toutes essentielles au bon fonctionnement du cycle viral.

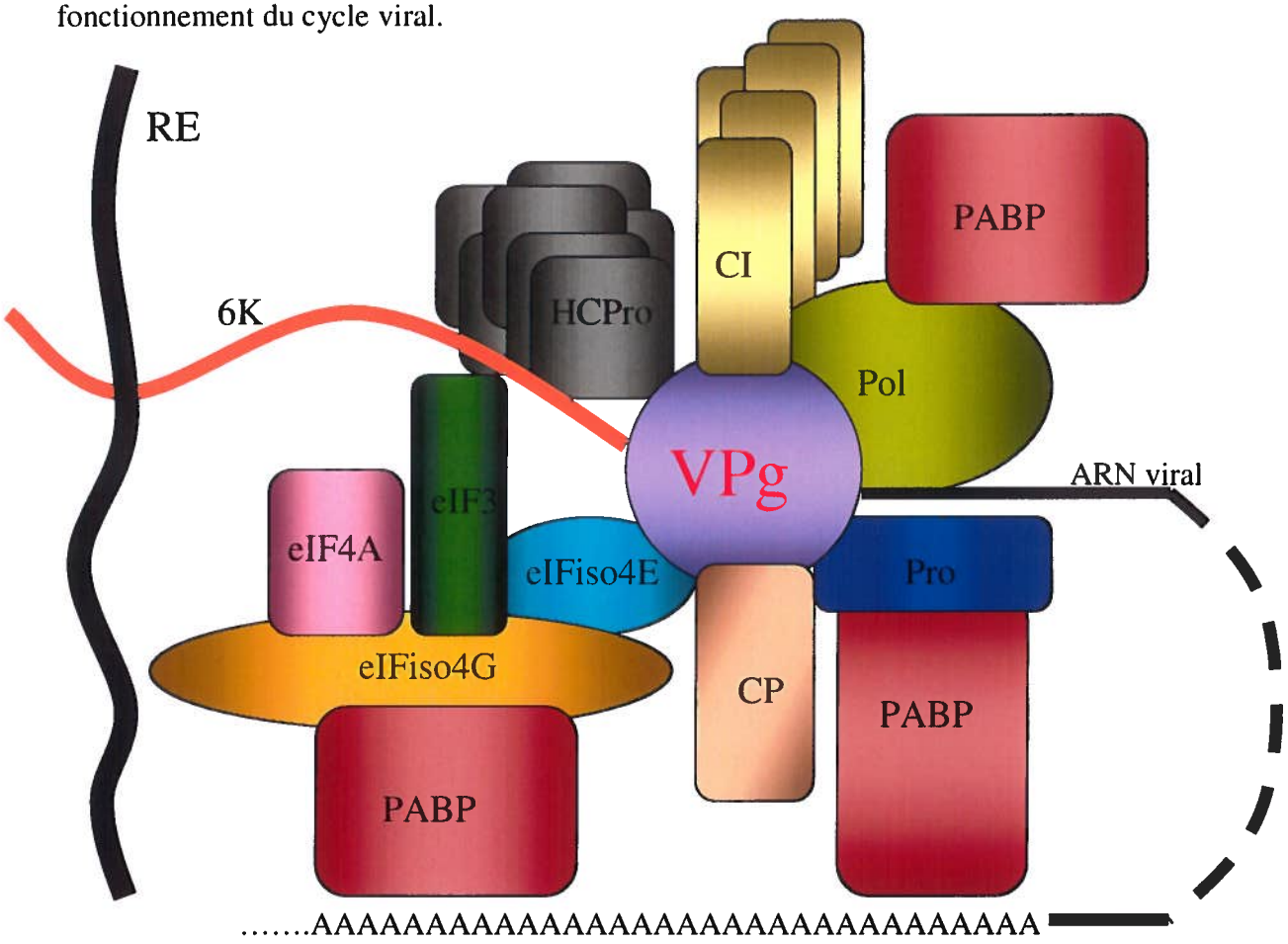


Figure 40 Modèle d'interactions impliquant la 6KVPgPro du TuMV

Les résultats obtenus permettent de présenter ce modèle d'interaction. Par contre, le modèle pourrait être démontré de façon encore plus convaincante par l'utilisation de la complémentation de fluorescence. Cette technique pourrait confirmer les interactions présentées, en plus de démontrer leur localisation intracellulaire.

Le modèle proposé représente une image statique alors de dans la cellule infectée, ces interactions sont plutôt dynamiques et varient fort probablement de façon temporelle durant l'infection. Ainsi, certaines protéines identifiées peuvent former un complexe plus restreint que celui présenté en modèle qui serait présent et actif lors de la traduction de l'ARN viral alors que d'autres protéines du modèle pourraient faire partie d'un autre complexe impliqué dans la réplication.

La démonstration des interactions impliquant la VPg du TuMV vont permettre de mieux comprendre son cycle viral et ainsi de mettre en place des procédés limitant la propagation du virus. Des plantes résistantes à l'infection au TuMV sont déjà identifiées et la connaissance des interactions avec VPg pourrait permettre le développement d'autres espèces résistantes. La détermination de ces interactions pourrait aussi être à la base du développement de moyen limitant l'infection chez les plantes susceptibles. Finalement, les interactions démontrées chez le TuMV pourront être utilisées afin de cibler des interactions potentielles chez d'autres potyvirus et même d'autres virus de plante ou de mammifères tel les Calicivirus qui eux aussi possède une VPg bien que différente de celle du TuMV.

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier sincèrement mon directeur de recherche le Dr. Jean-François Laliberté pour tout son support ainsi que pour toutes les connaissances qu'il m'a permis d'acquérir lors de mes études de deuxième cycle. Il m'a beaucoup appris, particulièrement sur les plantes, domaine de la biologie qui m'était plutôt inconnu lors de mon arrivée au laboratoire.

Je tiens aussi à remercier tous mes collègues de travail pour leur soutient et leur aide lors de l'exécution de certaines techniques. Merci à Chantal pour son implication dans la copurification, à Vida pour avoir partagé ses connaissances sur *Agrobactérium* et à Guylaine pour le système de recombinaison dans la levure. Merci à Louisette et Arianne pour leur support technique et moral.

Je voudrais remercier en plus les gens du laboratoire du Dr. Marc Fortin de l'université McGill pour leur apport de nouvelles idées lors de nos réunions inter-labo.

Finalement, je dois remercier ceux qui m'ont soutenu moralement dans les moments plus difficiles et qui sont toujours là pour moi, mes parents Normand et Marie-France et mon conjoint Cédrik.

Bibliographie

Anandalakshimi R, Pruss GJ, Ge X, Marathe R, Malory AC, Smith TH, Vance VB (1998) A viral suppressor of gene silencing in plants. Proceedings of the National Academy of Science USA, 95, 13079-13084

Atreya PL, Lopez-Moya JJ, Chu M, Atreya CD, Pirone TP (1995) Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyviral transmission by aphids. Journal of General Virology, 76, 265-270

Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY (2000) Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 97(22), 11984-11989.

Blanc S, Ammar ED, Garcia-Lampasona S, Dolja VV, Llave C, Baker J, Pirone TP (1998) Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interaction with virions and aphid stylets. Journal of General Virology, 79, 3119-3122

Brevis BJ, Glick BS (2002), Rapidly maturing variants of the *Discosoma* red fluorescent protein (DsRed). Nature biotechnology, 20. 83-87

Brigneti G, Voinnet O, Li WX, Ji LH, Ding SW, Baulcombe DC (1998) Viral pathogenicity determinants and suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. EMBO, 17, 6739-6746

Boevink P, Oparka K, Santa Cruz S, Martin B, Betteridege A, Hawes C (1998) Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus trafics on an actin/ER network. The Plant Journal, 15(3), 441-447

Bracha-Drori K, Shichrur K, Katz A, Oliva M, Angelovici R, Yalovsky S, Ohad N (2004) Detection of protein-protein interactions in plants using bimolecular fluorescence complementation. Plant Journal, 40(3):419-427

Brandizzi F, Irons SL, Johansen J, Kotzer A, Neumann U (2004) GFP is the way to glow: bioimaging of the plant endomembrane system. Journal of Microscopy, 214(2), 138-158

Burks EA, Bezerr PP, Le H, Gallie DR, Browning KS (2001) Plant initiation factor 3 subunit composition resembles mammalian initiation factor 3 and has a novel subunit. The Journal of Biological Chemistry, 276(3), 2122-2131

Carrington JC, Haldeman R, Dolja VV, Restrepo-Hartwig MA (1993) Internal cleavage and trans-proteolitic activities of the VPg-proteinase (NIa) of tobacco etch potyvirus in vivo. Journal of Virology, 67, 6995-7000

Carrington JC, Jensen PE, Schaad MC (1998) Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. Plant Journal, 14, 393-400

Cronin S, Verchot J, Haldeman-Cahill R, Schaad MC, Carrington JC (1995) Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. Plant Cell, 7, 549-559

Daros JA, Carrington JC (1997) RNA binding activity of NIa proteinase of tobacco etch potyvirus. Virology, 237, 327-336

Daros JA, Schaad MC, Carrington JC (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

Daughenbaugh KF, Fraser CS, Hershey JW, Hardy ME (2003) The genome-linked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. EMBO Journal, 22(11), 2852-2859

Dinkova TD, Aguilar R, Sanchez de Jimenez E (2000) Expression of maize eukaryotic initiation factor (eIF) iso4E is regulated at the translational level. Biochemistry Journal, 351, 825-831

Dolja VV, Haldeman R, Robertson NL, Dougherty WG, Carrington JC (1994) Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. EMBO Journal, 13, 1482-1491

Dolja VV, Haldeman-Cahill R, Montgomery AE, Vandenbosch KA, Carrington JC (1995) Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long-distance movement of tobacco etch potyvirus. Virology, 206, 1007-1016

Dougherty WG, Carrington JC, Cary SM, Parks TD (1988) Biochemical and mutational analysis of a plant virus protein cleavage site. EMBO Journal, 7, 1281-1287

Dunoyer P, Ritzenthaler C, Hemmer O, Michler P, Fritsch C (2002) Intracellular localization of the *Peanut clump virus* replication complex in tobacco BY-2 protoplasts containing green fluorescent protein-labelled endoplasmic reticulum or Golgi apparatus. Journal of Virology, 76, 865-874

Duprat A, Carantas C, Revers F, Menand B, Browning KS, Robaglia C (2002) The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. Tha Plant Journal, 32, 927-934

Fedorkin ON, Merits A, Lucchesi J, Solovyev AG, Saarma M, Morozov SY, Makinen K (2000) Complementation of the movement-deficient mutations in potato virus X: potyvirus coat protein mediates cell-to-cell trafficking of C-terminal truncation but not deletion mutant of potexvirus coat protein. Virology, 270, 31-42

Fellers J, Wan J, Hong Y, Collins GB, Hunt AG (1998) In vitro interactions between a potyvirus-encoded, genome-linked protein and RNA-dependant RNA polymerase. Journal of General Virology, 79, 2043-2049

Fernandez A, Lain S, Garcia JA (1995) RNA helicase activity of the plum pox potyvirus CI protein expressed in *Escherichia coli*. Mapping of an RNA binding domain. Nucleic Acids Research, 23, 1327-1332

Fernandez A, Garcia JA (1996) The RNA helicase CI from plum pox potyvirus has two regions involved in binding RNA. Federation of European Biochemical Societies letters, 388, 206-210

Fivas S, Romeis T, Jones JDG (2002) The Cf-9 disease resistance protein is present in an ~420-kilodalton heteromultimeric membrane-associated comlex at one molecule per complex. The Plant Cell, 14, 689-702

Gage DJ (2002) Analysis of infection thread development using GFP- and DsRed-expressing *Sinorhizobium meliloti*. Journal of Bacteriology, 184(24), 7042-7046

Gale M Jr, Tan SL, Katze MG (2000) Translational control of viral gene expression in eukaryotes. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 64(2), 234-280

Gallie DR (2001) cap-independanttranslation conferred by the 5' leader of tobacco etch virus is eukaryotic initiation factor 4G dependant. Journal of Virology, 75, 12141-12152

Gallie DR, Browning KS (2001) eIF4G functionally differs from eIFiso4G in promoting internal initiation, cap-independent translation and translation of structured mRNA. Journal of Biological Chemistry, 276, 36951-36960

Gal-On A, Antignus Y, Rosner A, Raccah B (1992) A zucchini yellow mosaic virus coat protein gene mutation restores aphid transmissibility but has no effect on multiplication. Journal of General Virology, 73, 2183-2187

Garcia-Parajo MF, Koopman M, Van Dijk EMHP, Subramaniam V, Van Hulst NF (2001) The nature of fluorescence emmision in the red fluorescent protein DsRed, revealed by single-molecule detection. Proceeding of the National Academy of Science, 98(25) 14392-14397

Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (1999) eIF4 initation factors: effectors of mRNA recruitement to ribosomes and regulators of translation. Annual Reviews in Biochemistry, 68, 963

Goodin MM, Dietzgen RG, Schichnes D, Ruzin S, Jackson AO (2002) pGD vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves. The Plant Journal, 31(3), 375-383

Guo D, Merits A, Saarma M (1999) Self-association and mapping of interaction domains of helper component proteinase of potato A potyvirus. Journal of General Virology, 80, 1127-1131

Guo D, Rajamaki ML, Saarma M, Valkonen JPT (2001) Towards a protein interaction map of potyviruses: protein interaction matrixes of two potyviruses based on the yeast two-hybrid system. Journal of General Virology, 82, 935-939

Hajimorad MR, Ding XS, Flasinski S, Mahajan S, Graff E, Haldman-Cahill R, Carrington JC, Cassidy BG (1996) Nla and Nlb of peanut stripe potyvirus are present in the nucleus of infected cells, but do not form inclusions. Virology, 224(2), 368-379

Haseloff J, Simering KR, Prasher DC, Hodge S (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. Proceedings of the National Academy of Science, USA, 94, 2122-2127

Hong Y, Levay K, Murphy JF, Klein PG, Shaw JG, Hunt AG (1995) A potyvirus polymerase interacts with the viral coat protein and VPg in the yeast cells. Virology, 214, 159-166

Hong Y, Hunt AG (1996) RNA polymerase activity catalayzed by a potyvirus-encoded RNA-dependant RNA-polymerase. Virology, 226, 146-155

Jackson RJ, Kaminski A (1995) Internal initiation of translation in eukaryotes: the picornavirus paradigm and beyond. RNA, 1, 985-1000

Jacobson A (1996) Poly(A) metabolism and translation: the closed-loop model. Translational control, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, 451-480

Jakobs S, Subramaniam V, Schönle A, Jovin TM, Hell SW (2000) EGFP and DsRed expressing cultures of *Escherichia coli* imaged by confocal two-photon and fluorescence lifetime microscopy. Federation of European Biochemical Societies letters, 479, 131-135

Jang SK, Krausslich HG, Nicklin MJH, Duke AC, Palmenberg AC, Wimmer E (1988) A segement of the 5' nontranslated region of the encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. Journal of Virology, 62, 2636-2643

Jedd G, Chua NH (2002) Visualization of peroxisomes in living plant cells reveals acto-myosi-dependent cytoplasmic streaming and peroxisome budding. Plant cell physiology, 43(4), 384-392

Jefferson RA, Kavanagh TA et Bevan MW (1987). 'GUS fusions : β-glucoronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants'. EMBO Journal, 6(13) : 3901-3907

Jenner CE, Wang X, Tomimura K, Ohshima K, Ponz F, Walsh JA (2003) The dual role of the potyvirus P3 protein of Tunip mosaic virus as a symptom and virulence determinant in brassicas. Molecular Plant Microbe Interactions, 16(9) 777-784

Jones AK, Lenz O, Strack A, Buhrke T, Friedrich B (2004) NiFe hydrogenase active site biosynthesis: identification of Hyp protein complexes in *Ralstonia eutropha*. Biochemistry, 43(42), 13467-13477

Joshi B, Cai AL, Keiper BD, Minich WB, Mendez R, Beach M, Stepinski J, Stolarski R, Darzynkiewicz E, Rhoads RE (1995) Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E at ser-209. Journal of Biological Chemistry, 270, 14597-14603

Kadaré G, Haenni AL (1997) Virus-encoded RNA helicases. Journal of Virology, 71, 2583-2590

Kadouri D, Peng Y, Wang Y, Singer S, Huet H, Raccah B, Gal-On A (1998) Affinity purification of HCPro of potyviruses with Ni2+-NTA resin. Journal of Virological methods, 76(1-2), 19-29

Kang BC, Yeam I, Frantz JD, Murphy JF, Jahn MM (2005) The pvr1 locus in *Capiscum* encodes a translation initiation factor eIF4E that interacts with *Tobacco etch virus* VPg. The Plant Journal, 42, 392-405

Kasschau KD, Carrington JC (1998) A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. Cell, 95, 461-470

Kawasaki Y, Matsumoto S, Nagamine T (2004) Analysis of baculovirus Ie1 in living cells: dynamics and spacial relationships to viral structural proteins. Journal of General Virology, 85, 3575-3583

Keiper BD, Gan W, Rhoads RE (1999) Protein synthesis initiation factor 4G. International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 31, 37-48

Kerekatte V, Keiper BD, Badorff C, Cai AL, Knowlton KU, Rhoads RE (1999) Cleavage of poly(A)-binding protein by coxsackievirus 2A protease in vitro and in vivo: another mechanism for host protein synthesis shotoff? Journal of Virology, 73, 709-717

Klein PG, Klein RR, Rodrigez-Cerezo E, Hunt AG, Shaw JG (1994) Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. Virology, 204, 759-769

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685

Laliberté JF, Nicolas O, Chatel H, Lazure C, Morosoli R (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(1), 510-514

Langland JO, Langland L, Zeman C, Saha D, Roth DA (1997) Developmental regulation of a plant encoded inhibitor of eukaryotic initaion factor 2 alpha phosphorylation. Plant Journal, 12(2), 393-400

Langenberg WG, Zhang L (1997) Immunocytology shows the presence of tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusions. Journal of Structural Biology, 118, 243-247

Lellis AD, Kasschau KD, Witham SA, Carrington JC (2002) Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveals an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. Current Biology, 12, 1046-1051

Léonard S, Plante D, Wittmann S, Daigneault N, Fortin MG, Laliberté JF (2000) Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. Journal of Virology, 74(17), 7730-7737

Léonard S, Chrisholm J, Laliberté JF, Sanfacon H (2002) Interaction between the proteinase of Tomato ringspot virus (genus Nepovirus) and the eukaryotic translation initiation factor iso4E from Arabidopsis thaliana. Journal of General Virology, 83(8) 2085-2089

Léonard S, Viel C, Beauchemin C, Daigneault N, Fortin MG, Laliberté JF (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 XH, Valdez P, Olvera RE, Carrington JC (1997) Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (NIb): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (NIa). Journal of Virology, 71, 1598-1607

Lopez-Moya JJ, Wang RY, Pirone TP (1999) Contexte of the coat protein DAG motif affects potyvirus transmissibility by aphids. Journal of General Virology, 80, 3281-3288

Maia IG, Haenni AL, Bernardi F (1996) Potyviral HCPro: a multifunctional protein. Journal of General Virology, 77, 1335-1341

Makkinje A, Xiong H, Li M, Damuni Z (1995) Phosphorylation of eukaryotic protein synthesis initiation factor 4E by insuline-mediated protamine kinase. Journal of Biological Chemistry, 270, 14824-14826

Maule A, Leh V, Lederer C (2002) The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. Current Opinion in Plant Biology, 5, 1-6

McCleland ML, Kallio MJ, Barrett-Wilt GA, Kestner CA, Shabanowitz J, Hunt DF, Gorbsky GJ, Stukenberg PT (2004) The vertebrate Ndc80 complex contains Spc24 and Spc25 homologs, which are required to establish and maintain kinetochore-microtubule attachment. Current Biology, 14(2), 131-137

Ménard R, Chatel H, Dupras R, Plouffe C, Laliberté JF (1995) Purification of turnip mosaic potyvirusviral protein genome-linked proteinase expressed in *Escherichia coli* and development of a quantative assay for proteolitic activity. European Journal of Biochemistry, 229, 107-112

Merits A, Guo D, Saarma M (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

Merrick WC, Hershey JWB (1996) The pathway and mechanism of eukaryotic protein synthesis. Translational control, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, 31-70

Mirabella R, Franken C, Van Der Krogt GNM, Bisseling T, Geurts R (2004) Use of the fluorescent timer DsRed-E5 as reporter to monitor dynamics of gene activity in plants. Plant Physiology, 135, 18-79-1887

Moorhead GB, Hodgson RJ, Plaxton WC (1994) Copurification of cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase and cytosolic aldolase from endosperm of germinating castor oil seeds. Archives of Biochemistry and Biophysiology, 312(2), 326-335

Nicaise V, German-Retana S, Sanjuan R, Dubrana MP, Mazier M, Maisonneuve B, Candresse T, Caranta C, LeGall O (2003) The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus *Lettuce mosaic virus*. Plant Physiology, 132, 1272-1282

Nicchitta CV (2002) A platform for compartmentalized protein synthesis: protein translation and translocation in the ER. Current Opinions in Cell Biology, 14(4), 412-416

Ohmann T, Rau M, Pain VM, Mortley SJ (1996) The C-terminal domain of eukaryotic protein synthesis initiation factor (eIF) 4Gis sufficient to support cap-independent translation in the absence of eIF4E. EMBO Journal, 15, 1371-1382

Pan HY, Zhang YJ, Wang XP, Deng JH, Zhou FC, Gao SJ (2003) Identification of a novel cellular transcriptional repressor interacting with the latent nuclear antigen of Kaposi's sarcoma-associated Herpesvirus. Journal of Virology, 77(18), 9758-9768

Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donzé O, Lin TA, Lawrence JC, Sonenberg N (1994) Insulin-dependant stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cop function. Nature, 371, 762-767

Pelletier J, Sonenberg N (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. Nature, 334, 320-325

Peng YH, Kadoury D, Gal-On A, Huet H, Wang Y, Raccah B (1998) Mutations in the HCPro gene of zucchini yellow mosaic potyvirus: effects on aphid transmission and binding to purified virions. Journal of General Virology, 79, 897-904

Plochocka D, Welnicki M, Zielenkiewicz P, Ostoja-Zagorski W (1996) Three-dimensional model of the potyviral genome-linked protein. Proceedings of the National Academy of Science USA, 93, 12150-12154

Pruss G, Ge X, Shi XM, Carrington JC, Vance VB (1997) Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. Plant Cell, 9, 859-868

Quadt R, Kao CC, Browning KS, Hershberger RP, Ahlquist P (1993) Characterization of a host protein associated with brome mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Science, USA, 90, 1498-1502

Reichel C, Beachy RN (1998) *Tobacco mosaic virus* infection induces severe morphological changes of endoplasmic reticulum. Proceedings of the National Academy of Science, USA, 95, 11169-11174

Restrepo-Hartwig MA, Carrington JC (1994) The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. Journal of Virology, 68, 2388-2397

Ridge R, Uozumi Y, Plazinski J, Hurley UA, Williamson RE (1999) Developmental transitions and dynamics of the cortical ER of *Arabidopsis* cells seen with green fluorescent protein. Plant Cell Physiology, 40, 1253-1261

Riechmann JL, Lain S, Garcia JA (1992) Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. Journal of General Virology, 73(1), 1-16

Riechmann JL, Cervera MT, Garcia JA (1995) Processing of the plum pox virus polyprotein at the P3-6K1 junction is not required for virus viability. Journal of General Virology, 76, 951-956

Riedel D, Lesemann DE, Maiss E (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, Laporte C, Gaire F, Dunoyer P, Schmitt C, Duval S, Piéquet A, Lourdes AM, Rohfritsch O, Stussi-Garaud C, Pfeiffe P (2002) Grapevine fanleaf virus replication occurs on endoplasmic reticulum-derived membranes. Journal of Virology, 76(17), 8808-8819

Schneider R, Mohr I (2003) Translation initiation and viral tricks. Trends in Biochemical Sciences, 28(3), 130-136

Rodriguez CM, Freire MA, Camilleri C, Robaglia C (1998) The Arabidopsis thaliana cDNA coding for eIF4E and eIF(iso)4E are not functionnally equivalent for yeast complementation and are differentially expressed during plant development. Plant Journal, 13, 465-473

Rodriguez-Cerezo E, Amma ED, Pirone TP, Shaw JG (1993) Association of the nonstructural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. Journal of General Virology, 74, 1945-1949

Rodriguez-Cerezo E, Findlay K, Shaw JG, Lomonossoff GP, Qiu SG, Linstead P, Shanks M, Risco C (1997) The coat and cylindrical inclusion proteins of potyvirus are associated with connections between plant cells. Virolgy, 236, 293-306

Rojas MR, Murillo-Zerbini FM, Allison RF, Gilbertson RL, Lucas WJ (1997) Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. Virology, 237, 283-295

Ruffel S, Dussault MH, Palloix A, Moury B, Bendahmane A, Robaglia C, Caranta DC (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

Saenz P, Cervera MT, Dallot S, Quiot L, Quiot JB, Riechmann JL, Garcia JA (2000) Identification of a pathogenicity determinant of plum pox virus in the sequence encoding the C-terminal region of protein P3+6K1. Journal of General Virology, 81, 557-566

Sato M, Nakahara K, Yoshii M, Ishikawa M, Uyeda I (2005) Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by potyviruses. Federation of European Biochemical Societies letters, 579, 1167-1171

Schaad MC, Haldemann-Cahill R, Cronin S, carrington JC (1996) Analysis of the VPg-proteinase (NIa) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellualr transport, proteolytic processing and genome amplification. Journal of Virology, 70, 7039-7048

Schaad MC, Jensen PE, Carrington JC (1997) Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. EMBO Journal, 16(13), 4049-4059

Schaad MC, Anderberg RJ, Carrington JC (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

Shi XM, Miller H, Verchot J, Carrington JC, Vance VB (1997) Mutations in the region encoding the central domain of helper component-proteinase (HCPro) eliminate potato virus X/potyviral synergism. Virology, 231, 35-42

Sonenberg N (1996) mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. Translational control, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, 245-270

Sonenberg N, Gingras AC (1998) The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. Current Opinions in Cell Biology, 10, 268-275

Tacken MGL, Thomas AAM, Peeters BPH, Rottier PJM, Boot HJ (2004) VP1, the RNA-dependant RNA polymerase and genome linked protein of infectious bursal disease virus, interacts with the carboxy-terminal domain of translational eukaryotic initiation factor 4AII. Archives of Virology, 149(11), 2245-2260

Tordo VMJ, ChachulskaAM, Fakhfakh H, Le Romancer M, Robaglia C, Astier-Magnifacier S (1995) Sequence polymorphism in the 5' NTR and in the P1 coding region of potato virus Y genomic RNA. Journal of General Virology, 76, 939-949

Trachsel H (1996) Binding of initiator methionyl-tRNA to ribosomes. Translational control, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY, 113-138

Turner KA, Sit TL, Callaway AS, Allen NS, Lommel SA (2004) Red clover necrotic mosaic virus replication proteins accumulate at the endoplasmic reticulum. Virology, 320, 276-290

Turpen T (1989) Molecular cloning of Potato Y virus genome: nucleotide sequence homology in non-coding regions of potyviruses. Journal of General Virology, 70(8), 1951-1960

Urcuqui-Inchima S, Haenni AL, Bernardi F (2001) Potyvirus proteins: a wealth of functions. Virus Research, 74, 157-175

Vance VB, Berger PH, Carrington JC, Hunt AG, Shi XM (1995) 5' proximal potyviral sequences mediate potato virus X/potyviral synergistic disease in transgenic tobacco. Virology, 206, 583-590

Van Damme D, Bouget FY, Van Poucke K, Inzé D, Geelen D (2004) Molecular dissection of plant cytokinesis and phragmoplast structure: a survey of GFP-tagegd proteins. The Plant Journal, 40, 386-398

Varrelmann M, Maiss E (2000) Mutations in the coat protein gene of plum pox virus suppress particle assembly, heterologous encapsidation and complementation in transgenic plants of *Nicotiana benthamiana*. Journal of General Virology, 81, 567-576

Verchot J, Carrington JC (1995a) Debilitation of plant potyvirus infectivity by P1 proteinase-inactivating mutations and restoration by second-site modifications. Journal of Virology, 69, 1582-1590

Verchot J, Carrington JC (1995b) Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. Journal of Virology, 69, 3668-3674

Voinnet O, Rivas S, Mestre P, Baulcombe D (2003) An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of *Tomato bushy stunt virus*. The Plant Journal, 33, 949-956

Wada M, Suetsugu N (2004) Plant organelle positioning. Current opinion in plant biology, 7, 626-631

Walter M, Chaban C, Schutze K, Batistic O, Weckermann K, Nake C, Blazevic D, Grefen C, Schumacher K, Oecking C, Harter K, Kudla J (2004) Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. Plant Journal, 40(3), 428-438

Wang X, Ullah Z, Grumet R (2000) Interaction between zucchini yellow mosaic potyvirus RNA-dependant RNA-polymerase and host poly-(A) binding protein. Virology, 275, 433-443

Wang YS, Motes CM, Mohamalawari DR, Blancaflor EB (2004) Green fluorescent protein fusions to *Arabidopsis* Fimbrin 1 for spatio-temporal imaging of F-actin dynamics in roots. Cell Motility and the Cytoskeleton, 59, 79-93

Ward CQ, Shukla DD (1991) Taxonomy of Potyviruses: current problems and some solutions. Intervirology, 32, 269-296

Waskiewicz AJ, Flynn A, Pround CG, Cooper JA (1997) Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases MNK1 and MNK2. EMBO Journal, 16, 1909-1920

Wisler GC, Purcifull DE, Hiebert E (1995) Characterization of the P1 protein and coding region of the zucchini yellow mosaic virus. Journal of General Virology, 76, 37-45

Wittmann S, Chatel H, Fortin MG, Laliberté JF (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 ML, Masuta C, nakahara K, Uyeda I (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(10), 2861-2869

Yoshii M, Nishikiori M, Tomita K, Yoshioka N, Kozuka R, Naito S, Ishikawa M (2004) The Arabidopsis cucumovirus multiplication 1 and 2 loci encode translation initiation factors 4E and 4G. Journal of Virology, 78(12), 6102-6111

Zamyatnin AA, Solovyev AG, Sablina AA, Agranovsky AA, Katul L, Vetten HJ, Schiemann J, Hinkkanen AE, Lehto K, Morozov SY (2002) Dual-colour imaging of membrane protein targeting directed by poa semilatent virus movement protein TGBp3 in plant and mammalian cells. Journal of General Virology, 83, 651-662

Zhang Y, Feigenblum D, Schneider RJ (1994) A late adenovirus factor induces eIF-4E dephosphorylation and inhibition of cell protein synthesis. Journal of Virology, 68, 7040-7050

Zhao MM, An DR, Huang GH, He ZH, Chen JY (2005) A viral protein suppresses siRNA-directed interference in *Tobacco mosaic virus* infection. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 37(4), 248-253

Zheng H, Kunst L, Moore I (2004) A GFP-based assay reveals a role for RHD3 in transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. The Plant Journal, 37, 398-414