



UNIVERSITE DE OUAGADOUGOU

.....
UNITE DE FORMATION ET DE
RECHERCHE EN SCIENCES DE LA
VIE ET DE LA TERRE (UFR/SVT)

.....
CENTRE DE RECHERCHE EN SCIENCES
BIOLOGIQUES ALIMENTAIRES ET
NUTRITIONNELLES (CRSBAN)

.....
ECOLE DOCTORALE REGIONALE DU
RA.BIOTECH



CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE
SCIENTIFIQUE ET TECHNOLOGIQUE (CNRST)

.....
INSTITUT DE L'ENVIRONNEMENT ET
DE RECHERCHES AGRICOLES
(INERA)

THESE UNIQUE

Présentée pour l'obtention du titre de

DOCTEUR ES-SCIENCES BIOLOGIQUES APPLIQUEES

Spécialité : **BIOCHIMIE-MICROBIOLOGIE**

Option : *Biotechnologie végétale/Virologie*

Par

Drissa SEREME

Maître ès-Sciences

*La protéine suppresseur P1 des virus de la panachure jaune du riz
(Oryza sp.) et du chiendent (Imperata cylindrica) : diversité, étude
fonctionnelle et applications en biotechnologies*

Soutenue le 17 Juin 2010 devant la commission d'examen :

Président : Pr Alfred S. TRAORE, Professeur Titulaire, Université de Ouagadougou (Burkina Faso)

Membres : Pr Gnissa KONATE, Directeur de Recherches, CNRST Ouagadougou (Burkina Faso)

Pr Christophe BRUGIDOU, Directeur de Recherches, IRD Montpellier (France)

Pr Nicolas BARRO, Maître de Conférences, Université de Ouagadougou (Burkina Faso)

*A la mémoire de mon Papa
qui nous a quitté le 09 mars 2010.
Que son âme repose en paix !*

A ma mère,

A mes frères et sœurs,

A Tonton Paco SEREME et sa Famille...

"Le ver de terre à force de ramper arrive au marigot"

Proverbe Sénoufo

Préface du Président du RA-BIOTECH

L'Ecole Doctorale Régionale de Ouagadougou offre une formation doctorale de biotechnologie dans ses options : Biotechnologie microbienne et cellulaire, Biotechnologie Animale et Biotechnologie végétale.

Elle regroupe la plus part des Universités de l'Afrique francophone sub-saharienne en un réseau : le Réseau Ouest Africain de Biotechnologie (RA-BIOTECH) fruit de la coopération inter-universitaire et dont le siège est au CRSBAN, à l'Université de Ouagadougou.

Les Universités et structures de formation des pays ci-dessous constituent les membres fondateurs de ce réseau : Bénin, Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Guinée-Conakry, Mali, Niger, Togo et d'autres partenaires comme le Centre International de Recherche Développement sur l'Elevage en zone Sub-humide (CIRDES)-Bobo Dioulasso ; EISMV-Sénégal.

Ce réseau sous régional bénéficie de l'appui de plusieurs partenaires de l'enseignement supérieur (Association des Universités Africaines -AUA, UNESCO, Banque Mondiale, CAMES, Agence Universitaire de la Francophonie -AUF, Agence Africaine de Biotechnologie -AAB, etc.

L'école Doctorale que le réseau anime assure une formation de haut niveau à travers une recherche utilitaire sur plusieurs thématiques touchant la vie quotidienne des populations africaines. Cette école a permis au CRSBAN d'être érigé en pôle régional d'excellence en Biotechnologie d'une part par l'AUA et d'autre part par l'AUF. Elle accueille des étudiants de plus de 14 pays d'Afrique Centrale et de l'Ouest.

Le réseau bénéficie aussi du soutien de certains spécialistes des biotechnologies des universités du Nord : Université de la méditerranée (France), Université Louis Pasteur de Strasbourg (France), Centre de Génétique Moléculaire de Gif-sur-Yvette-CNRS (Paris France), Université de liège (Belgique); Faculté Universitaire de Gembloux (Belgique), Université de Rome, Université Agronomique de Wageningen.

L'importance des biotechnologies dans la résolution des problèmes de développement socioéconomiques des pays de l'Afrique sub-saharienne (Alimentation, Santé, Environnement, etc.) Justifie amplement la mise en place de cette formation. Elle est cogérée par un comité pédagogique international africain, constitué par des enseignants, des chercheurs, tous spécialistes dans les divers domaines des biotechnologies.

La mutualisation des expériences par toutes ces compétences est un atout majeur pour la formation des ressources humaines de qualité au profit du continent africain et de l'humanité.

Pr Alfred S. TRAORE

***Professeur Titulaire de Biochimie Microbiologie
CRSBAN/UFR-SVT/Université de Ouagadougou***

Remerciements

Le présent travail a été effectué au Burkina Faso au Laboratoire de Virologie et de Biotechnologies Végétales (LVBV) de l'Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA) et en France (Montpellier) à l'Institut de Recherche pour le Développement (IRD) au sein des UMRs GDP (Unité Mixte de Recherches Génome et Développement des Plantes) et RPB (Résistance des Plantes aux Bioagresseurs). Au terme de ce travail, il m'est agréable d'exprimer ma profonde gratitude à plusieurs personnes et institutions sans lesquelles ce document n'aurait vu le jour. Ces remerciements sont rédigés dans un moment de doux relâchement intellectuel, sans véritable rigueur ni souci taxinomique. J'ai laissé au hasard de ma mémoire, plus impressionnée par les événements récents, répétés, ou chargés d'émotions, le soin de retrouver ces institutions et ces personnes.

Ainsi, je tiens à remercier l'IRD à travers son Département Soutien et Formation (DSF) pour l'octroi d'une bourse de Thèse de trois ans.

Grand merci (i) à la Fondation Internationale pour la Science (IFS) pour son soutien financier à la réalisation de ce travail et (ii) au Programme AIRES-SUD (Appuis Intégrés pour le Renforcement des Equipes Scientifiques du Sud) du LVBV pour le paiement d'une partie des frais de formation.

Merci Pr Alfred S. TRAORE, Professeur Titulaire à l'Université de Ouagadougou, Président de l'Ecole Doctorale du Réseau Ouest Africain de Biotechnologie (RA-BIOTECH) et Directeur de cette Thèse pour avoir accepté mon inscription, pour votre disponibilité et l'honneur que vous me faites en acceptant de présider le jury de soutenance.

Recevez, Pr Gnissa KONATE, Directeur de recherches à l'INERA/CNRST et mon Co-Directeur de Thèse, mes plus sincères remerciements pour avoir proposé ce thème et pour la confiance que vous m'avez accordée depuis mon DEA de biotechnologies végétales jusqu'à la fin de ma Thèse. Vous avez su me donner une grande liberté d'initiative tout en restant toujours présent pour discuter des problèmes rencontrés, des résultats obtenus et des orientations à suivre. Votre grande disponibilité, votre enthousiasme et votre dynamisme m'ont été d'un très grand apport pour la réalisation de ce travail. Les facilités de travail, vos remarques, votre rigueur scientifique m'ont beaucoup guidé tout au long de cette Thèse. Trouvez ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Merci Pr Denis FARGETTE, Directeur de recherches à l'IRD Montpellier et mon responsable scientifique IRD pour m'avoir accueilli dans votre Unité de Recherche et pour m'avoir initié à la bioinformatique et à la phylogénie moléculaire. Vous êtes l'un des promoteurs de cette Thèse. Vous avez su garder mon intérêt en virologie et en bioinformatique, en me faisant toujours raisonner aux réponses à mes propres questions avant de les répondre. Fin connaisseur des phytovirus, vous m'avez fait bénéficier de votre expérience. Votre grande disponibilité, vos précieux conseils, vos remarques et votre confiance en moi, m'ont été d'un grand profit. Au cours de cette Thèse, j'ai pu apprécier votre rigueur scientifique, votre méthode de travail mais aussi votre humour. Je me rappellerai toujours de nos séances de travaux tardives que nous (vous et moi) avons affectueusement appelées "confessionnal". Que dire de votre

discours d'aurevoir que vous avez intitulé "Drissa et les fées" et dont l'envie de le mettre en annexe de cette Thèse me hantait et me hante encore l'esprit.

Merci Pr Christophe BRUGIDOU, Directeur de recherches à l'IRD Montpellier et mon maître de stage à l'UMR GDP pour m'avoir accueilli dans votre Unité de Recherche et pour votre confiance en moi. Vous êtes l'autre promoteur de cette Thèse. Les facilités de travail que vous m'avez offertes (participation à des colloques, reproduction de documents, séjours à Montpellier), vos corrections avec un rythme exemplaire, votre rigueur scientifique et votre grande disponibilité ont été d'un grand apport dans la conduite de cette Thèse. Votre bonne humeur quotidienne et votre humour ont contribué à agrémenter nos séances de travail ainsi que mes séjours Montpelliérains. Merci à vous et à toute votre famille pour m'avoir souvent accueilli chez vous (dans votre famille) lors de mes multiples séjours à Montpellier. Mes vifs remerciements à toute votre équipe pour la bonne ambiance. Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites en acceptant de participer à ce jury de Thèse.

Mes vifs remerciements vont aux Prs Pascal GANTET et Emmanuel JACQUOT respectivement Professeur Titulaire à l'Université de Montpellier II et Directeur de Recherches à l'INRA (Institut National de la Recherche Agronomique) de Rennes. Vous m'avez fait l'honneur de prendre connaissance de ce travail et d'en être rapporteurs, trouvez ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Merci Pr Nicolas BARRO, Maître de conférences à l'Université de Ouagadougou pour les encouragements, les informations sur la procédure de soutenance. Vous m'avez également fait l'honneur en acceptant le double rôle de rapporteur et de membre du jury.

Merci Pr Michel NICOLE, Directeur de recherches à l'IRD Montpellier et Directeur de l'UMR RPB pour m'avoir accueilli au sein de votre UMR, vos conseils, les facilités de travail, les discussions enrichissantes et pour votre sympathie. Grand merci à votre personnel pour la bonne ambiance qui a régné tout au long de mon séjour.

Recevez, Pr J. Mike TRESH, mes plus sincères remerciements pour la correction des articles.

Merci Dr Oumar TRAORE, Maître de recherches à l'INERA/CNRST et responsable adjoint du LVBV pour la correction des articles, les discussions enrichissantes et pour votre sympathie.

Grand merci au chef du CREAM/Kamboinsé et à tout votre personnel en particulier Diane TRAORE, James Bouma NEYA, Jean ZABRE, Mamadou KOUTOU, Moumouni KONATE, Moro D. TRAORE, Valentin Stanislas Edgar TRAORE tous du LVBV pour vos contributions diverses et votre bonne et sincère collaboration. Grand merci à la main d'œuvre temporaire du LVBV.

Mes vifs remerciements à Agnès GALZI-PINEL, Eugénie HEBRARD, Florence VIGNOLS, Jamel ARIBI, Jean Paul BRIZARD, Martine BANGRATZ dite "Seignorito", Séverine LACOMBE et Sylvie POUNHET de l'IRD Montpellier et vos familles respectives pour votre accueil, vos encouragements, les discussions enrichissantes et pour votre disponibilité dont j'ai parfois peut-être abusé.

Serges GALZI du CIRAD Montpellier, vous avez gracieusement réalisé la microscopie électronique du "nouveau virus", recevez mes vifs remerciements.

A Tonton Paco SEREME et famille j'adresse ma profonde gratitude pour vos précieux conseils, vos encouragements. Vous avez toujours été là, où il faut et au bon moment, pour discuter des problèmes et trouver des solutions. Vous m'avez chaque fois permis de rebondir dans les moments difficiles à travers votre assistance matérielle, morale et financière. C'est pour moi un agréable devoir de vous rendre ce témoignage. Soyez rassuré de mon estime et de mon plus profond respect.

Tantie Mariam SANKARA/SEREME et famille, vous avez contribué à agrémenter mes séjours à Montpellier. Merci pour vos nombreux conseils, vos encouragements et vos délicieux plats que nous avons partagés ensemble. Simplement merci !

Merci Tantie Clémentine DABIRE/BINSO de l'INERA/CNRST pour vos précieux conseils et vos encouragements.

Merci mes aînés Drs Fatogoma SORHO et Jean Pierre BOGNONKPE de l'Université de Cocody (Côte d'Ivoire) pour vos nombreux conseils, vos encouragements et les petites sorties hors de Montpellier.

Une pensée émue pour tous mes collègues doctorants et amis avec qui j'ai partagé une salle, un café, un repas ou une console d'ordinateur pendant ces années de Thèse : Cheikna ZONGO, Clarisse Pulchérie BARRO/KONDOMBO, Deless THIEMELE, Fidèle TIENDREBEOGO, François-Xavier GILLET, Lamine DIALLO, Laurencia OUATTARA/SOUGRE, Mahamadou BELEM, Michelle Aurore ETHE, Nils POULICARD, Rakièta COMPAORE, Théodore KABORE, ...

Mes frères Mamadou et Siembou SEREME, mes amis Richard BATIONO et Issa SOMBIE, vous avez relu attentivement tout ou partie de ce manuscrit. Merci du temps que vous avez consacré à redonner un peu de rigueur à ma plume qui a quelques fois tendance à déraiper... Le théoricien génial L. Boltzmann conseillait, à juste titre, de laisser le souci d'élégance aux tailleurs et aux cordonniers ; qu'il en soit donc ainsi !!!

A tous mes amis qui, chacun à sa manière, inlassablement, m'ont été d'un secours, trouvez ici l'expression des remerciements d'une vraie amitié, car la réussite de ce travail est une réelle victoire que je voudrais partager avec vous. Je pense particulièrement à Abdoul Kader FOFANA, Aimé Sévérin KIMA, Mamoud SAWADOGO, Maxime ZERBO, Mme Kamboulé Perpétue Safiatou, Moussa BORO, Ousmane BORRO, Ousmane COULIBALY dit Rodo.

Je tiens à remercier ma copine Alimata Agathe OUEDRAOGO ; ta patience infinie et ton amour m'ont été d'un support inestimable tout au long de ces années de Thèse.

Je remercie tous les membres de ma famille. A mon cher regretté Papa et à Maman, il faut au moins une vie entière pour vous remercier de tout. Papa, tu nous as quitté exactement 100 jours avant la soutenance de cette Thèse, puisse Dieu, le tout puissant, t'avoir en sa sainte Miséricorde et t'accueillir dans son vaste Paradis !!!

Vous tous, vous avez contribué de près ou de loin, malheureusement vos noms ne figurent pas dans cette liste, loin de l'oubli, je vous rassure de ma profonde reconnaissance pour tous vos efforts déployés.

SOMMAIRE

Remerciements.....	i
Sommaire.....	iv
Liste des Figures.....	viii
Liste des Tableaux.....	viii
Liste des acronymes viraux.....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Liste des publications.....	xiii

INTRODUCTION GENERALE	1
Objectif de la thèse.....	3

PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. SOBEMOVIRUS	5
1. Classification et distribution.....	5
2. Biologie	6
2.1. Isolats et sérotypes	6
2.2. Hôtes	7
2.3. Symptômes et localisation cellulaire.....	7
2.4. Transmission	8
3. Structure	8
3.1. Morphologie.....	8
3.2. Organisation génomique	9
4. Comparaison des séquences	10
5. Poids moléculaires et fonctions des protéines sobémovirales.....	11
5.1. La protéine P1	11
5.2. La polyprotéine	12
5.3. La protéine de capsid.....	12
6. Les virus étudiés	13
6.1. RYMV.....	13
6.2. IYMV	16
II. SILENCING	17
1. Historique	17
2. Terminologie	18
3. Mécanisme général du PTGS	19

4. Principales composantes du silencing.....	20
4.1 Dicer.....	21
4.2. RDRs (ARN polymérase ARN dépendantes).....	21
4.3. Argonaute (AGO)	22
5. Biogénèse des petits ARNs	23
5.1. Les siARNs	23
5.2. Les miARNs.....	24
6. Initiation, amplification et propagation du silencing.....	24
6.1. Initiation	24
6.2. Amplification du signal.....	25
6.3. Propagation du signal.....	25
7. Rôles du silencing chez les plantes	25
7.1. Rôles de défenses contre les acides nucléiques invasifs.....	25
7.2. Rôle dans l'expression des gènes endogènes.....	26
7.3. Rôle de défense contre les stress biotiques et abiotiques.....	26
III. BIOTECHNOLOGIES	27
1. Applications du silencing	27
1.1. Le silencing, un outil de génomique fonctionnelle.....	27
1.2. Chez les plantes : Concept de résistance dérivée du pathogène	28
1.3. Chez les animaux : Technique aux indéniables qualités.....	28
1.4. Limites de l'ARN interference	29
2. Applications des supresseurs de silencing.....	29

DEUXIEME PARTIE : MATERIEL ET METHODES

1. MATERIEL.....	33
1.1. Matériel végétal.....	33
1.2. Matériel viral.....	33
1.2.1. Les isolats de RYMV	33
1.2.2. Les isolats de IYMV.....	33
1.3. Matériel bactérien, vecteurs de clonage et milieux de culture.....	34
1.3.1. Souches bactériennes.....	34
1.3.2. Vecteurs de clonage.....	35
1.3.3. Milieux de culture	35
1.3.4. Conditions de culture.....	35

2. METHODES	36
2.1. Echantillonnage et collecte des isolats viraux.....	36
2.1.1. Collecte des échantillons de RYMV	36
2.1.2. Maintien des isolats viraux.....	36
2.2. Etude de la suppression de silencing.....	37
2.2.1. Préparation des agrobactéries.....	37
2.2.2. Co-infiltration ou patch test.....	37
2.2.3. Prélèvement des feuilles.....	37
2.3. Biologie moléculaire	38
2.3.1. Extraction d'ARNs totaux.....	38
2.3.2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	38
2.3.3. RT-PCR.....	39
2.3.4. Electrophorèse et purification des fragments d'ADN.....	39
2.3.5. Mutagenèse dirigée.....	40
2.3.6. Clonage moléculaire.....	40
2.4. Biochimie	45
2.4.1. Extraction et dosage de protéines de <i>Nicotiana benthamiana</i>	45
2.4.2. Dosages de l'activité enzymatique GUS.....	45
2.4.3. Dosages ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay).....	45
2.5. Analyses bioinformatiques.....	47

TROISIEME PARTIE : RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 1. Les supresseurs de silencing : Etat des lieux et méthodes d'identification

1.1. Introduction.....	49
1.2. Article 1 : Les supresseurs du RNA silencing des phytovirus.....	49

CHAPITRE 2. Caractérisation biologique et moléculaire d'un nouveau sobémovirus

2.1. Introduction.....	62
2.2. Article 2 : Biological and molecular characterization of a putative new sobemovirus infecting <i>Imperata cylindrica</i> and maize in Africa	62

CHAPITRE 3. Caractérisation de la diversité interspécifique de sobémovirus et virus apparentés

3.1. Introduction.....	71
------------------------	----

3.2. Article 3 : Diversification of Rice yellow mottle virus and related viruses spans the history of agriculture from the Neolithic to the present.....	71
CHAPITRE 4. Diversité du virus de la panachure jaune du riz et contrainte fonctionnelle de sa protéine P1 sur la suppression de silencing	
4.1. Introduction.....	80
4.2. Caractérisation de la diversité sérologique et moléculaire du RYMV.....	81
4.3. Caractérisation de la diversité pathogénique du RYMV	82
4.4. Caractérisation de la diversité de la protéine P1 du RYMV et rôle des sites sous sélection positive dans la suppression de silencing	84
4.4.1. Introduction	84
4.4.2. Article 4 : Diversity and implications of sites under positive selection in the RNA silencing suppressor activity of <i>Rice yellow mottle virus</i> P1 protein.....	85
CHAPITRE 5. Etude de la suppression de silencing par les protéines P1 des virus de la panachure jaune du riz et d'<i>Imperata cylindrica</i> : applications en biotechnologies	
5.1. La protéine P1 de <i>Imperata yellow mottle virus</i> supprime le silencing dans <i>N. benthamiana</i>	113
5.2. Etude de la suppression de silencing par la P1 du RYMV et utilisations en biotechnologie (Article 5)	126
QUATRIEME PARTIE : DISCUSSION GENERALE	
1. Introduction	131
2. Synthèse des résultats	131
2.1. Caractérisation d'un nouveau virus et l'étude de la diversification des sobémovirus et des virus apparentés.....	131
2.2. Diversité du RYMV et contrainte fonctionnelle de sa protéine P1 sur la suppression de silencing.....	133
2.3. Identification de forts supresseurs de silencing et applications en biotechnologie	134
CONCLUSION GENERALE-PERSPECTIVES.....	136
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	139
ANNEXES.....	162

Liste des figures

Figure 1 : Organisation génomique des sobémovirus.....	9
Figure 2. Distribution géographique du RYMV.....	14
Figure 3 : Symptômes de panachure jaune (Plages encerclées) dans des champs de riz infecté par le RYMV.....	15
Figure 4 : Particules virales de IYMV (flèches) observées au microscope électronique.....	16
Figure 5 : Mécanisme général de silencing chez les plantes.....	20
Figure 6 : Protéines argonautes et les petits ARNs.....	22
Figure 7 : Classification des virus de plantes (ICTV, 2005) montrant les supprimeurs de silencing en rouge.....	32
Figure 8 : Alignement protéique des séquences de la VPg des 4 isolats avant et après contournement de la résistance de la variété de riz Giganté.....	84

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Les différentes espèces de sobémovirus, leur distribution géographique, leurs hôtes naturels et leurs modes de transmission.....	6
Tableau 2 : Pourcentage d'identité nucléotidique entre les différents sobémovirus.....	10
Tableau 3 : Produits de la translation <i>in vitro</i> des sobémovirus.....	11
Tableau 4 : Souches bactériennes utilisées.....	34
Tableau 5 : Réaction des anticorps monoclonaux utilisés pour la détermination des sérotypes de RYMV.....	47

Liste des acronymes viraux

BMV	<i>Brome mosaic virus, Bromovirus</i>
BSMV	<i>Barley stripe mosaic virus, Hordeivirus</i>
BSSV	<i>Blueberry shoestring virus, Sobemovirus</i>
BYDV	<i>Barley yellow dwarf virus, Luteovirus</i>
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus, Caulimovirus</i>
CfMV	<i>Cockfoot mottle virus, Sobemovirus</i>
CfMV	<i>Cocksfoot mottle virus, Sobemovirus</i>
CMMV	<i>Cockfoot mild mosaic virus, Sobemovirus</i>
CMV	<i>Cucumber mosaic virus, Cucumovirus</i>
CyMV	<i>Cynosurus mottle virus, Sobemovirus</i>
FHV	<i>Flock house virus, Nodaviridae</i>
HIV-1	<i>Human immunodeficiency virus type I, Lentivirus</i>
IYMV	<i>Imperata yellow mottle virus, Sobemovirus</i>
LTSV	<i>Lucerne transient streak virus, Sobemovirus</i>
LTSV	<i>Lucerne transient streak virus, Sobemovirus</i>
MSV	<i>Maize streak virus, Mastrevirus</i>
PVX	<i>Potato virus X, Potexvirus</i>
PVY	<i>Potato virus Y, Potyvirus</i>
RGMoV	<i>Ryegrass mottle virus, Sobemovirus</i>
RuCMV	<i>Rubus chlorotic mottle virus, Sobemovirus</i>
RYMoV	<i>Rottboellia yellow Mottle virus, Sobemovirus</i>
RYMV	<i>Rice yellow mottle virus, Sobemovirus</i>
SBMV	<i>Southern bean mosaic virus, Sobemovirus</i>
SCMoV	<i>Subterranean clover mottle virus, Sobemovirus</i>
SCPMV	<i>Southern cowpea mosaic virus, Sobemovirus</i>
SeMV	<i>Sesbania mosaic virus, Sobemovirus</i>
SnMoV	<i>Solanum nodiflorum mottle virus, Sobemovirus</i>
SoMV	<i>Sowbane mosaic virus, Sobemovirus</i>
TBSV	<i>Tomato bushy stunt virus, Tombusvirus</i>
TCV	<i>Turnip crinkle virus, Carmovirus</i>
TEV	<i>Tobacco etch virus, Potyvirus</i>

TMV	<i>Tobacco mosaic virus, Tobamovirus</i>
ToMV	<i>Tomato mosaic virus, Geminivirus</i>
TRoV	<i>Turnip rosette virus, Sobemovirus</i>
TRV	<i>Tobacco rattle virus, Tobravirus</i>
TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus, Tospovirus</i>
TuMV	<i>Turnip mosaic virus, Potyvirus</i>
TYLCV-C	<i>Tomato leaf curl virus-China, Bigeminivirus</i>
TYMV	<i>Turnip yellow mosaic virus, Tymovirus</i>
VTMoV	<i>Velvet tobacco mottle virus, Sobemovirus</i>

Liste des abréviations

i. Instituts - Organismes

CNRST	Centre National de la Recherche Scientifique et Technologique
CRSBAN	Centre de Recherche en Sciences Biologiques Alimentaires et Nutritionnelles
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses (Comité International de Taxonomie des Virus)
INERA	Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles
INRA	Institut National de la Recherche Agronomique
IRD	Institut de Recherche pour le Développement
RA.BIOTECH	Réseau Ouest Africain de Biotechnologie

ii. Unités de mesure

h	Heure
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
l	Litre
M	Molaire
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
mn	Minute
Nm	Nanomètre
Pmol	Picomole
sec (s)	Seconde
V	Volt
v/v	Volume à volume
w/v	Poids pour volume
µg	Microgramme
µl	Microlitre

iii. Abréviations générales

ADN	Acide désoxyribonucléique
AGO	Argonaute
ARN	Acide ribonucléique
ARNi (RNAi)	ARN interference
ARNm	ARN messenger
BEAST	Bayesian evolutionary analysis by sampling trees
BSA	Bovine serum albumine (Albumine de sérum de bœuf)
CP	Proteine de capsid (coque protéique)
DAS	Double anticorps sandwich direct
db	Double brin
DCL	Dicer-like proteins
dNTP	Mélange équimolaire des quatre désoxyribonucléotides triphosphate dATP, dCTP, dGTP, et DTTP

DTT	1,4-Dithiothréitol
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
GDP	Génome et développement des plantes
GFP	Green fluorescent protein
GUS	β -glucuronidase
HYPHY	Hypothesis testing using phylogenies
IDAS	Indirect double anticorps sandwich
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
LB	Luria- Bertani
miARN (miR)	Micro ARN
MU	4-méthylumbelliférol
MUG	4-méthylumbelliféryl- β -D-glucuronide
ncRNA	Non coding RNA
NLS	Nuclear localization signal
nt	Nucléotides
ORF	Open reading frame (Cadre ouvert de lecture)
P35S	35S promoter
PAUP	Phylogenetic analysis using parsimony
PAZ	Piwi, Argonaute, and Zwiille/Pinhead
pBin	Binary vector (vecteur binaire)
PBST	Phosphate buffered saline tween-20
PCR	Polymerase chain reaction
PDR	Pathogen-derived resistance
PHYML	Phylogenies by maximum likelihood
PSA	Promastigote surface antigen
PTGS	Post-transcriptional gene silencing ou répression génique post-transcriptionnelle
PVP	Polyvinyl pyrrolidone
qsp	Quantité suffisante pour
RDP	Recombination detection program
RdRp (RDR)	RNA-dependent RNA polymerase
RISC	RNA induced silencing complex
RPB	Résistance des plantes aux bioagresseurs
rpm	rotations par minute
RT	Rétro-transcription
RT-PCR	Reverse transcriptase-polymerase chain reaction
sb	Simple brin
Ser	Sérotype
siRNA	Small interfering RNA (petit ARN interférent)
snRNA	Small nuclear RNA (petit ARN nucléaire)
sRNA	Small RNA (petit ARN)
T35S	35S terminator
TAE	Tris-acetate-EDTA
UMR	Unité mixte de recherches
UTR	Untranslated region (région non traduite)
VPg	Viral protein genome-linked
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-b-D-galactoside

Publications

Publications associées à cette thèse

(i) Articles acceptés

1. Agnès Pinel-Galzi, Mbolarinosy Rakotomalala, Emmanuel Sangu, Fatogoma Sorho, Zakaria Kanyeka, Oumar Traoré, **Drissa Sérémé**, Nils Poulicard, Yvonne Rabenantoandro, Yacouba Séré, Gnissa Konaté, Alain Ghesquière, Eugénie Hébrard, Denis Fargette, **2007**. Theme and variations in the evolutionary pathways to virulence of an RNA plant virus species. *PLoS Pathogens* 3 : e180.
2. **Drissa Sérémé**, Séverine Lacombe, Moumouni Konaté, Agnès Pinel-Galzi, Valentin Stanislas Edgar Traoré, Eugénie Hébrard, Oumar Traoré, Christophe Brugidou, Denis Fargette, Gnissa Konaté, **2008**. Biological and molecular characterization of a new putative sobemovirus infecting *Imperata cylindrica* and maize in Africa. *Archives of virology* 153 : 1813-1820.
3. **Drissa Sérémé**, Martine Bangratz, Jean Loup Lemesre, Denis Fargette, Christophe Brugidou, Gnissa Konaté, **2008**. Le virus de la panachure jaune du riz, un outil prometteur pour la production de protéines recombinantes d'intérêt. *Applied Biology and Biotechnology* 1 : 17-20.
4. Denis Fargette, Agnès Pinel-Galzi, **Drissa Sérémé**, Séverine Lacombe, Eugénie Hébrard, Oumar Traoré, Gnissa Konaté, **2008**. Diversification of *Rice yellow mottle virus* and related viruses spans the history of agriculture from the neolithic to the present. *PLoS Pathogens* 4 : e1000125.
5. **Drissa Sérémé**, Séverine Lacombe, Florence Vignols, Gnissa Konaté, Alfred S. Traoré, Christophe Brugidou, **2009**. Les supprimeurs du RNA silencing des phytovirus : caractérisation et mode d'action. *Virologie* 13 : 305-316.

(ii) Dépôt de brevet

Drissa Sérémé, Moumouni Konaté, Denis Fargette, Jean Loup Lemesre, Gnissa Konaté, Brugidou Christophe. Moyens pour la production transitoire dans les plantes de protéines recombinantes utilisables notamment en prophylaxie et en thérapeutique. Brevet INERA/IRD

(iii) Articles soumis ou en préparation

Drissa Sérémé, Martine Bangratz, Agnès Pinel-Galzi, Moumouni Konaté, Séverine Lacombe, Denis Fargette, Alfred S. Traoré, Christophe Brugidou, Gnissa Konaté. Diversity and implications of sites under positive selection in the RNA silencing suppressor activity of *Rice yellow mottle virus* movement protein P1. (**A soumettre**).

Autres publications acceptées

1. Denis Fargette, Agnès Pinel-Galzi, Mbolarinosy Rakotomalala, Emmanuel Sangu, Oumar Traoré, **Drissa Sérémé**, Fatogoma Sorho, Souley Issaka, Eugénie Hébrard, Yacouba Séré, Zakaria Kanyeka, Gnissa Konaté, **2008**. *Rice yellow mottle virus*, an RNA plant virus, evolves as rapidly as most RNA animal viruses. *Journal of Virology* 82 : 3584-3589.
2. Agnès Pinel-Galzi, Anatolia Mpunami, Sangu Emmanuel, Mbolarinosy Rakotomalala, Oumar Traoré, **Drissa Sérémé**, Fatogoma Sorho, Yacouba Séré, Zakaria Kanyekae, Gnissa Konaté, Denis Fargette, **2009**. Recombination, selection and clock-like evolution of *Rice yellow mottle virus*. *Virology* 394 : 164-172.

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Au cours de l'évolution, les plantes, soumises aux agressions physiques, chimiques et biologiques de leur environnement, ont su évoluer en renforçant leurs défenses constitutives afin de pouvoir réagir très rapidement au moindre changement du milieu extérieur. La chaleur, la salinité, le taux d'humidité (sécheresse, inondation), le changement de luminosité sont autant de stimuli déclenchant une réponse rapide de la part de la plante qui active ou inhibe spécifiquement des gènes (Scandalios, 1990 ; Hansen *et al.*, 2001). Outre ces facteurs environnementaux, les végétaux sont sous l'influence permanente d'agressions d'agents pathogènes. Là encore, les réponses permettant aux végétaux de se prémunir contre ces infections sont nombreuses et variées (Klarzynski et Fritig, 2001 ; Bonnemain et Chollet, 2003 ; Dangl et McDowell, 2006 ; Jones et Dangl, 2006).

Parmi les pathogènes qui infectent les plantes, les virus sont nombreux et représentent donc un intérêt majeur ne serait ce que d'un point de vue économique. En effet, les virus occasionnent chaque année d'importantes pertes sur la production mondiale. Hormis cet aspect économique, la compréhension des mécanismes mis en œuvre par le virus pour infecter la plante et l'étude de la réponse de la plante face à cette agression représentent un aspect important au niveau fondamental. Dans cette optique, l'un des atouts principaux des virus réside dans la petite taille de leur génome comparée à celle d'organismes procaryotes ou eucaryotes. En effet, les quelques kilobases des génomes viraux sont très faciles à manipuler et permettent d'obtenir rapidement des mutants dans le gène étudié.

Différents mécanismes sont développés par les plantes pour se protéger des virus (Dangl et McDowell, 2006 ; Jones et Dangl, 2006). Au nombre de ces mécanismes on peut citer, les réactions d'hypersensibilité conduisant à une résistance acquise locale et systémique (Lam *et al.*, 2001). Ce type de résistance est basé sur des interactions gène pour gène et implique la reconnaissance du produit d'un gène d'avirulence du pathogène par le produit d'un gène de résistance de la plante (Van der Biezen et Jones, 1998 ; Dangl et McDowell, 2006). Il existe aussi un autre type de résistance de type récessif qui est due soit à un défaut de co-facteur de la plante capable d'interaction spécifique avec les facteurs viraux de réplication ou de mouvement, soit à la production d'un inhibiteur d'une des fonctions virales (Astier *et al.*, 2001 ; Parrella *et al.*, 2002 ; Caranta *et al.*, 2003). Le cas le plus étudié est celui des gènes codant le facteur d'initiation de la traduction *eIF4E/eIF(iso)4E* chez les potyvirus (Robaglia et Caranta, 2006) et *eIF4G/eIF(iso)4G* chez les sobémovirus (Albar *et al.*, 2006). En ce qui nous concerne, nous nous intéresserons particulièrement à un autre type de réponse, qui fait

l'objet de cette thèse et qui est basé sur la résistance médiée par l'ARN. Ce mode de résistance est, en effet, basé sur la reconnaissance d'intermédiaires de réplication chez les virus à ARN double brin. Il a été récemment identifié chez les virus à ARN simple brin de polarité positive (Cogoni et Macino, 2000 ; Ketting *et al.*, 2001 ; Voinnet, 2001). L'ARN double brin est la molécule qui sera reconnue par la plante et qui va alors initier les réactions conduisant à la dégradation de toutes les molécules d'ARNs partageant une homologie de séquence suffisamment importante avec cet ARN double brin. Les découvertes qui ont conduit à l'identification de ce nouveau mécanisme de défense, connu sous le nom de PTGS (*Post-Transcriptional Gene Silencing*), remontent à quelques dizaines d'années et se sont accélérées de façon exponentielle au cours des dernières années (Voinnet, 2001 ; Sijen et Plasterk, 2003 ; Baulcombe, 2004). En réponse à ce mécanisme de défense de la plante, les virus ont développé des protéines appelées protéines "suppresseurs de silencing" qui leur permettent de contrecarrer les étapes intercellulaires et de signalisation du PTGS (Brigneti *et al.*, 1998 ; Voinnet, 2001 ; Lu *et al.*, 2004 ; Roth *et al.*, 2004). Ainsi, de nos jours plus d'une quarantaine de suppressors de silencing a été décrite aussi bien chez les phytovirus que chez les virus animaux. Cette capacité de suppression de silencing des virus fait d'eux de très bons outils utilisés en biotechnologies (Mallory *et al.*, 2002a ; Voinnet *et al.*, 2003 ; Siré *et al.*, 2006). Les virus sont alors de plus en plus utilisés dans la production de protéines recombinantes comme la production de vaccins. Actuellement, la plupart des vecteurs de clonage moléculaire contiennent des composants viraux. Ainsi, les systèmes d'expression hétérologues sont le plus souvent dépendant des promoteurs viraux tels que le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV).

Objectif de la thèse

La recherche fondamentale en virologie telle que l'étude de la fonction des gènes viraux constitue la base de la recherche appliquée à savoir la compréhension des mécanismes de résistance des plantes et le contournement de ces résistances par les virus ainsi que leurs applications en biotechnologie. Les sobémovirus sont des virus qui occasionnent d'importantes pertes de productions (Traoré *et al.*, 2009), ils méritent de ce fait une attention particulière de la part des phytopathologistes. Face aux mécanismes de défense mis en place par la plante, les virus ont développé des stratégies pour pouvoir se multiplier activement dans leurs hôtes. L'objectif de cette thèse est de caractériser la diversité de deux sobémovirus (IYMV et RYMV) qui sont particulièrement étudiés dans notre laboratoire, afin d'identifier des forts suppresseurs de silencing utilisables pour mettre au point des outils en biotechnologie notamment pour la production de protéines d'intérêt. Pour atteindre cet objectif, nous avons :

- (i) caractérisé (biologiquement et moléculairement) le virus de la panachure jaune du chiendent, un virus qui avait fait l'objet d'études préliminaires au cours de notre DEA (Diplôme d'Etudes Approfondies). Cette étude nous a permis de déterminer la séquence complète de ce virus et de déduire celle de sa protéine P1 ;
- (ii) caractérisé la diversité des sobémovirus et virus apparentés en exploitant des séquences génomiques disponibles dans les banques de données et ce, à l'aide d'outils bioinformatiques. Cette étude de la diversité interspécifique a permis de mettre en évidence une corrélation entre la diversification de ce groupe de virus et l'évolution de l'agriculture ;
- (iii) évalué ou ré-évalué la diversité sérologique, pathologique et moléculaire d'isolats atypiques représentatifs de la diversité du RYMV en Afrique de l'Ouest, le second centre de diversification du RYMV (Traoré *et al.*, 2005). Le rôle des sites sous sélections positives dans la suppression de silencing a aussi été évalué. A travers cette étude, nous avons montré que la diversité du RYMV est loin d'être épuisée en identifiant, pour la première fois, des isolats de sérotype Ser2 capables de contourner la résistance élevée de la variété de riz Giganté avec ses implications pour le déploiement de variétés résistantes. Elle a également permis de montrer que la protéine P1 du RYMV est fortement soumise à des contraintes évolutives et

qu'il est possible d'améliorer artificiellement la force de suppression de silencing de cette protéine par mutagenèse des sites sous sélection positive ;

(iv) étudié la suppression de silencing des protéines P1 du IYMV et du RYMV en relation avec leurs utilisations en biotechnologie comme outils pour sur-exprimer des protéines recombinantes. Nous avons, à l'issue de cette étude, montré que la protéine P1 du nouveau sobémovirus est un suppresseur de silencing. Des résultats promoteurs pour l'utilisation de ces protéines suppresseurs dans la production de protéines d'intérêt ont été obtenus.

Les bases sous-jacentes à cette recherche se divisent en quatre volets qui sont ici revus, les sobémovirus, la répression génétique post-transcriptionnelle (PTGS), la suppression de silencing et les applications biotechnologiques qui en découlent.

Première Partie:

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. SOBEMOVIRUS

1. Classification et distribution

Les sobémovirus regroupent les virus de plante dont le génome est constitué d'un ARN simple brin (ARNsb) positif. L'espèce type du genre *Sobemovirus* est le *Southern bean mosaic virus* (SBMV). Le genre *Sobemovirus* n'est pas assigné à une famille (Hull, 1977 ; Hull *et al.*, 2000) et comprend à ce jour 13 espèces virales (Tableau 1). Cinq autres espèces virales sont proposées pour être membre des sobémovirus (Fauquet et Mayo, 1999). Ce sont : le virus de la mosaïque légère du dactyle (*Cocksfoot mild mosaic virus*, CMMV), le virus de la panachure du cynosurus (*Cynosurus mottle virus*, CnMoV), le virus de la moucheture chlorotique du gingembre (*Ginger chlorotic fleck virus*, GCFV), le virus de la mosaïque chlorotique du rubus (*Rubus chlorotic mottle virus*, RuCMV) et le virus de la panachure jaune du chiendent (*Imperata yellow mottle virus*) que nous avons identifié au cours de cette étude et proposé comme un nouveau membre des sobémovirus.

La distribution géographique de la plupart des sobémovirus est limitée. Par contre, le genre *Sobemovirus* est présent à travers le monde (Tableau 1). Le SBMV et le SCPMV ont été identifiés sur tous les continents excepté l'Australie. Le CfMV se rencontre seulement en Asie, en Europe et en Nouvelle Zélande (Mäkinen *et al.*, 1995 ; Campbell et Guy, 2001). Certains sobémovirus ont été rapportés dans un seul pays ou continent probablement du fait de l'insuffisance des prospections. C'est le cas de SCMoV en Australie (Francki *et al.*, 1983) et de SeMV en Inde (Lokesh *et al.*, 2001). D'autres, comme le RYMV, sont confinés au seul continent Africain (Bakker, 1974 ; Traoré *et al.*, 2009) en raison principalement de leurs vecteurs et l'absence de transmission par les graines.

Tableau 1 : Les différentes espèces de sobémovirus, leur distribution géographique, leurs hôtes naturels et leurs modes de transmission

Espèces virales	Distribution géographique	Hôtes naturels	Mode de transmission		
			Mécanique	Graines	vecteurs
BSSV	USA, Canada	<i>Vaccinium corymbosum</i> (myrtille), <i>V. angustifolium</i> (bleuet nain)	Oui	Non	Aphides
CfMV	Europe (Norvège, Russie), Nouvelle Zélande, Asie	<i>Dactylis glomerata</i> (dactyle), <i>Triticum aestivum</i> (blé)	Oui	Non	Insectes
LTSV	Nouvelle Zélande, Australie, Canada	<i>Medicago sativa</i> (luzerne)	Oui	Non	ND
RYMV	Afrique (Est, Ouest, Centre)	<i>Oryza sativa</i> (riz), <i>Oryza longistaminata</i>	Oui	Non	Insectes
RGMoV	Japon	<i>Lolium multiflorum</i> (ray-grass), <i>Dactylis glomerata</i> ,	Oui		
SeMV	Inde	<i>Sesbania grandiflora</i>	ND	ND	ND
SNMoV	Australie	<i>Solanum nodiflorum</i> , <i>S. nitidibaccatum</i> , <i>S. nigrum</i> (morelle noire)	ND	Non	Insectes
SBMV	USA, Amérique du sud et central (Mexico), Afrique (Ghana), Asie	<i>Phaseolus vulgaris</i> (haricot vert)	Oui	Oui	Insectes
SoMV	USA, Europe, Asie, Amérique du sud et central	<i>Chenopodium spp</i> ; <i>C. murale</i> , <i>Vitis sp.</i> , <i>Prunus domestica</i> , <i>Atriplex suberecta</i>	Oui	Oui	Controversé
SCMoV	Australie	<i>Trifolium subterraneum</i> (trèfle)	Oui	Oui	ND
TRoV	Royaume Uni	<i>Brassica campestris ssp. napus</i> (colza), <i>Brassica campestris ssp. rapa</i> (navet)	Oui	ND	Insectes
VTMoV	Australie	<i>Nicotiana velutina</i>	Oui	Non	Mirids
SCPMV	USA, Centre et Amérique du sud, Afrique, Asie	<i>Vigna unguiculata</i> (niébé)	Oui	Oui	Insectes

ND : *Non Déterminé* (Source : Tamm et Truve, 2000)

2. Biologie

2.1. Isolats et sérotypes

Les souches et les isolats de sobémovirus identifiés diffèrent selon leurs hôtes, leur symptomatologie et leur distribution (Tableau 1). Pour le LTSV par exemple, quatre souches ont été rapportées : la souche Australienne (LTSV-Au), Sud Australienne (LTSV-SA), Sud Canadienne (LTSV-Ca) et Néo-Zélandaise (LTSV-NZ). Ces souches développent des symptômes différents sur leur hôte commun qu'est la luzerne ainsi que sur différentes gammes

d'hôtes (Forster et Jones, 1979 ; Dall *et al.*, 1990). Les souches et les isolats sobémoviraux diffèrent également par leur capacité à contourner les résistances. Des isolats de SBMV et de RYMV capables de contourner la résistance après plusieurs passages successifs sur leurs hôtes naturels ont été rapportés (Lee et Anderson, 1998 ; Fargette *et al.*, 2002a). Des contournements au champ ont aussi été observés pour le RYMV (Konaté *et al.*, 1997 ; Traoré *et al.*, 2006). Les études phylogéographiques basées sur les séquences de la protéine de capsid (CP) et celles des régions non traduites de différents isolats de RYMV ont permis de montrer une dispersion du virus d'Est en Ouest du continent Africain (Abubakar *et al.*, 2003 ; Traoré *et al.*, 2005). Des isolats de SCMoV et de RYMV développant différents degrés de sévérité des symptômes ont aussi été rapportés.

2.2. Hôtes

Les hôtes naturels des différents sobémovirus sont énumérés dans le tableau 1. Les sobémovirus infectent plusieurs espèces de plantes. Cependant, pris individuellement, chaque virus présente une gamme d'hôtes restreinte, infectant seulement un nombre réduit d'espèces dans une, deux et rarement trois familles de plantes. Ainsi, la gamme d'hôtes des virus SBMV, SCMPV et de SCMoV est restreinte à un faible nombre d'espèces de la famille des *Fabaceae*. Celles du CfMV et du RYMV sont restreintes à la famille des *Gramineae*, tandis que celle du VTMoV est confinée à la famille des *Solanaceae*. Les virus LTSV et TroV infectent peu d'espèces appartenant à 3-4 familles différentes. Les hôtes communs aux sobémovirus se rencontrent dans les familles des *Fabaceae* (*Caesalpinioideae* et *Papilionoideae*), *Amaranthaceae*, *Chenopodiaceae*, *Asteraceae* et des *Gramineae*.

2.3. Symptômes et localisation cellulaire

Les symptômes résultant d'une infection par les sobémovirus varient en forme et en sévérité selon l'âge et l'espèce de la plante hôte, de la saison de l'année et de la souche ou de l'isolat du virus concerné. Généralement, les sobémovirus induisent des symptômes de panachure et/ou de mosaïque sur les feuilles infectées qui deviennent jaunes/chlorotiques, déformées ou striées. Une infection précoce de variétés de plantes sensibles peut entraîner dans certains cas la mort de la plante. C'est le cas de l'infection des plants de riz (*Oryza sp.*) par le RYMV (Bakker *et al.*, 1974).

Après infection, les particules de sobémovirus sont présentes dans tous les organes et tissus : épiderme, mésophylle, vasculaire (Brunt *et al.*, 1996 ; Opalka *et al.*, 1998). Au niveau cellulaire, elles sont présentes dans le cytoplasme, le noyau, les vacuoles (cas du RYMV,

Brugidou *et al.*, 2002) et leur présence est aussi suspectée dans les mitochondries et les chloroplastes.

2.4. Transmission

Les sobémovirus sont très infectieux et se multiplient en fortes concentrations dans leurs hôtes. Leurs virions sont hautement stables dans les extraits et ils sont facilement transmissibles par inoculation mécanique (Tableau 1). La plupart des sobémovirus sont transmis par des insectes vecteurs de l'ordre des *Aphididae*, *Chrysomellidae*, *Coccinellidae* ou *Miridae*, de manière semi-persistante ou non (Tableau 1) (Mohamed *et al.*, 1981 ; Tremaine et Hamilton, 1983). La transmission par graine n'est pas un mode de transmission commun aux sobémovirus. Le SBMV, SCPMV, SCMoV et SoMV sont les seuls sobémovirus transmissibles par graine (Brunt *et al.*, 1996). Plusieurs autres modes de transmission ont été mis en évidence. Ainsi, il a été montré que les mammifères, notamment les animaux herbivores domestiques transmettent les sobémovirus (Ferris *et al.*, 1996 ; Sarra et Peters, 2003). Le rôle des pépinières, du vent, du sol contaminé et de l'eau de gutation dans la transmission du sobémovirus RYMV a aussi été démontré (Sarra *et al.*, 2004 ; Traoré *et al.*, 2006 ; Traoré *et al.*, 2008 ; Traoré *et al.*, 2009).

3. Structure

3.1. Morphologie

La particule virale des sobémovirus mesure 26 à 30 nm de diamètre et sédimente entre 110 et 120 S sur un gradient de sucrose. Le virion contient la CP de 30 kDa, un ARNs_b de polarité positive et un ARN subgénomique (Tamm et Truve, 2000). La molécule d'ARN est liée à une protéine à l'extrémité 5' terminale appelée VPg (*Virus protein genome-linked*). L'extrémité 3' terminale des sobémovirus est dépourvue d'une queue polyadénylée.

La structure de la CP et des sous-unités de quelques sobémovirus (SBMV, SCPMV, SeMVet RYMV) sont bien connues à différentes résolutions (Abad-Zapatero *et al.*, 1980 ; Erickson *et al.*, 1985 ; Subramanya *et al.*, 1993 ; Bhuvaneshwari *et al.*, 1995 ; Murthy *et al.*, 1997 ; Opalka *et al.*, 2000 ; Qu *et al.*, 2000).

La CP présente une symétrie icosaédrique de type T=3 organisée en 180 sous-unités protéiques stabilisées par des cations bivalents Ca^{2+} et Mg^{2+} (Qu *et al.*, 2000). Les interactions entre les sous-unités dépendent du pH et elles jouent un rôle essentiel dans le maintien de la conformation de la CP. Une modification du pH et de la composition en cations divalents

engendrent un gonflement de la particule et une diminution de la stabilité (Brugidou *et al.*, 2002). Dans cet état, les virions deviennent sensibles aux protéases et aux ribonucléases (Hull *et al.*, 2000).

3.2. Organisation génomique

Le génome de neuf sobémovirus a été complètement séquencé (Tableau 2). Celui de deux nouveaux sobémovirus viennent d'être identifiés. Il s'agit du génome de *Imperata yellow mottle virus* (Séréme *et al.*, 2008a) et celui du *Rubus chlorotic mottle virus* (RuCMV) (McGavin et MacFarlane, 2009). Les sobémovirus font partie des plus petits virus à ARN avec des tailles de génomes de moins de 4500 nucléotides (nt). Leur génome est constitué de quatre cadres ouverts de lecture (*open reading frames*, ORF) : ORF1, ORF2a, ORF2b et ORF4. Les ORFs sont bordés aux extrémités 5' et 3' par des régions non codantes de tailles variables. Récemment, il a été montré que les sobémovirus possèdent la même organisation génomique qui est celle représentée par le CfMV avec un décalage de lecture au niveau de l'ORF2b (Tamm et Truve, 2000 ; Meir et Truve, 2006 ; Balke *et al.*, 2007) (Figure 1).

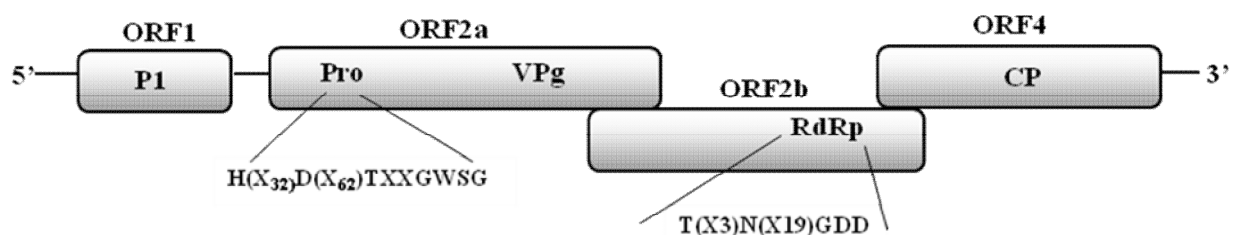


Figure 1 : Organisation génomique des sobémovirus. Les ORFs sont représentés par les rectangles avec les noms en haut tandis que le nom des protéines codées par chaque ORF est mentionné dans le rectangle. La VPg est représentée par le petit cercle à l'extrémité 5' du génome. P1 : protéine P1 ; Pro : Putative protéase à sérine ; VPg : protéine de liaison au génome ; RdRp : polymérase. Les motifs conservés de la protéase à sérine putative et de la polymérase sont indiqués. (Source : Balke *et al.*, 2007)

4. Comparaison des séquences

L'analyse des séquences nucléotidiques et protéiques des sobémovirus ont montré une variation aussi bien au niveau du génome entier (Tableau 2) qu'au niveau des différents ORFs. L'ORF1 codant la protéine P1 est la plus variable, suivi de l'ORF4 codant la CP puis celui codant la polyprotéine. L'analyse multiple des séquences montre qu'il n'existe pas de similarité entre les acides aminés de la P1 des sobémovirus (Ngon *et al.*, 1994 ; Mäkinen *et al.*, 1995 ; Othman et Hull, 1995). Les P1 sobémovirales ne présentent aucune région conservée. Il n'existe pas également de similarité entre les P1 sobémovirales et d'autres séquences présentes dans les bases de données.

Contrairement à la P1, les séquences des polyprotéines sont assez similaires et présentent des motifs conservés. Par comparaison de séquences avec d'autres virus à ARNs positifs, il a été montré que la polyprotéine code une protéase à serine et une ARN polymérase ARN dépendant (RdRp) (Kamer et Argos, 1984 ; Gorbalenya *et al.*, 1988). Le motif conservé GDD de la RdRp caractérisé par SGSYCTSSSTNX₁₉₋₃₅GDD est localisé dans l'ORF2b. Le motif protéase à serine, H(X₂₆₋₃₅)[D/E](X₆₁₋₆₂)TXXGXSG, similaire aux protéases cellulaires et virales (Gorbalenya *et al.*, 1988 ; Koonin, 1991), est présent à l'extrémité N-terminal de l'ORF2a (Figure 1).

Les séquences de la CP sont les plus similaires parmi les protéines codées par les autres ORFs mais elles ne présentent pas de motifs conservés.

Tableau 2 : Pourcentage d'identité nucléotidique entre les différents sobémovirus

	IYMV	CfMV	LTSV	RGMoV	SBMV	SCMoV	SeMV	SCPMV	TRoV
CfMV	45,4								
LTSV	41,8	44,1							
RGMoV	40,3	41,8	42,9						
SBMV	44,7	44,6	44,4	42,7					
SCMoV	41,7	43,7	61,0	43,1	45,1				
SeMV	44,3	45,0	46,7	44,0	71,5	46,5			
SCPMV	44,1	44,4	45,8	44,3	58,0	45,4	59,8		
TRoV	41,7	41,3	44,5	41,7	44,4	44,9	45,9	44,7	
RYMV	56,5	46	42,6	41,8	43,5	42,9	44,2	44,9	41,1

Source : Sérémé *et al.*, 2008a

5. Poids moléculaires et fonctions des protéines sobémovirales

Les poids moléculaires de chacune des protéines codées par les sobémovirus sont présentés dans le tableau 3. Les fonctions des différentes protéines sobémovirales ont été déterminées par mutagenèse des clones infectieux (pour RYMV et SCPMV) (Brugidou *et al.*, 1995 ; Sivakumaran *et al.*, 1998) et aussi par des tests *in vitro* (Tamm et Truve, 2000).

Tableau 3 : Produits de la translation *in vitro* des sobémovirus

Virus	Masse moléculaire du produit de la translation (kDa)			Références
	Protéine P1	Polyprotéine	Protéine de capsid	
CfMV	12	100	34	Mäkinen <i>et al.</i> , 1995 ; Tamm <i>et al.</i> , 1999
LTSV	18	105	33	Morris-Krsinich et Forster, 1983
SBMV	14	105	29	Salerno-Rife <i>et al.</i> , 1980 ; Mang <i>et al.</i> , 1982
SCPMV	20	100	30	Mang <i>et al.</i> , 1982
SNMoV	28	100	38	Kiberstis et Zimmern, 1984
TRoV	17	105	30	Morris-Krsinich et Hull, 1981
RYMV	18	109	26	Fargette <i>et al.</i> , 2004
RGMV	15	104	26	Balke <i>et al.</i> , 2007
SeMV	18	70	29	Lokesh <i>et al.</i> , 2001
RuCMV	18	104	26	McGavin et MacFarlane, 2009
IYMV	24	112	29	Séréme <i>et al.</i> , 2008a

5.1. La protéine P1

La fonction de la P1 dans le cycle d'infection des sobémovirus a été largement étudiée. L'analyse des mutants RYMV et SCPMV déficients en P1 ou produisant des P1 tronquées a montré que cette protéine n'est pas nécessaire pour la réplication (Bonneau *et al.*, 1998 ; Sivakumaran *et al.*, 1998). Cependant, l'absence de la P1 entière abolit le mouvement de cellule-à-cellule et longue distance des virus (Bonneau *et al.*, 1998 ; Sivakumaran *et al.*, 1998). Elle n'est pas essentielle pour l'assemblage du SCPMV. La P1 du RYMV est un déterminant de la pathogénie (Bonneau *et al.*, 1998). Elle a été récemment caractérisée comme suppresseur de silencing chez le RYMV et le CfMV (Voinnet *et al.*, 1999 ; Sarmiento *et al.*, 2007 ; Siré *et al.*, 2008). Chez le RYMV, elle supprime le silencing aussi bien dans le riz que dans le tabac (Voinnet *et al.*, 1999 ; Siré *et al.*, 2008) tandis que la P1 du CfMV le supprime dans le tabac, la suppression n'ayant pas été testée dans son hôte naturel (Sarmiento

et al., 2007). La protéine P1 du CfMV est capable de se lier de manière non spécifique aux ARNs (Tamm et Truve, 2000 ; Bonneau, 1998).

La divergence des séquences P1 fait qu'il est difficile de prédire des fonctions similaires pour les sobémovirus dont la fonction de la P1 n'a pas été démontrée. Cependant, les données ci-dessus suggèrent que la protéine P1 des sobémovirus pourrait être un facteur de pathogénie et/ou un suppresseur de silencing adapté à leurs hôtes. En effet, l'absence de similarité suggère que ces protéines ont évolué dans leurs hôtes respectifs pour développer des fonctions similaires comme le mouvement et la suppression de silencing.

5.2. La polyprotéine

La polyprotéine des sobémovirus produit, après protéolyse, trois protéines : une protéase à sérine, une VPg et une RdRp. Bien que le processus de production de la VPg à partir de la polyprotéine aie été démontré chez le CfMV et le SBMV par séquençage de l'extrémité N-terminale (Gorbalenya *et al.*, 1988 ; van der Wilk *et al.*, 1998 ; Makinen *et al.*, 2000), son expression ainsi que celle de la protéase et de la RdRp restent à être expérimentalement déterminées pour tous les sobémovirus. La VPg joue un rôle dans la virulence et est impliquée dans le contournement de la résistance chez le RYMV (Hébrard *et al.*, 2006). Elle a été récemment prédite comme une protéine désordonnée (Hébrard *et al.*, 2009). La protéase et la RdRp sont déduites par analyse de séquence. Elles sont impliquées dans la capacité du virus à se répliquer et à se propager dans leurs hôtes.

5.3. La protéine de capsid

Les informations structurales relatives à la fonction de la CP des sobémovirus, proviennent des études réalisées sur le RYMV, le SCPMV et le SeMV. La CP de ces virus est constituée de deux domaines : R et S (Bhuvaneshwari *et al.*, 1995 ; Opalka *et al.*, 2000). Le domaine S est responsable de l'interaction sous-unité/sous-unité dans les particules et l'encapsidation est nécessaire pour le mouvement longue distance des sobémovirus tandis que le domaine R se lie aux ARNs (Rossmann *et al.*, 1983). La CP n'est pas requise pour la synthèse de l'ARN du RYMV et du SCPMV dans le riz et la dolique (*Vigna sp*) respectivement. Cependant, elle est indispensable pour le mouvement (Brugidou *et al.*, 1995 ; Sivakumaran *et al.*, 1998). La caractérisation des mutants contournant la résistance du SBMV a montré que la CP détermine la gamme d'hôtes des sobémovirus (Lee et Anderson, 1998).

6. Les virus étudiés

Au cours de nos travaux de recherches, nous nous sommes intéressés à deux sobémovirus : le virus de la panachure jaune du riz (RYMV, *Rice yellow mottle virus*) et le virus de la panachure jaune du chiendent (IYMV, *Imperata yellow mottle virus*). Les informations générales concernant les maladies causées par ces virus sont données dans ce qui suit.

6.1. RYMV

Le RYMV est l'agent pathogène responsable de la maladie de la panachure jaune du riz. Cette maladie fut décrite pour la première fois en 1966 à Kisumu au Kenya (Bakker, 1970). Elle a été signalée par la suite dans différents pays d'Afrique de l'Ouest (Fauquet et Thouvenel, 1977), puis à Madagascar (Awoderu, 1991) et en Afrique Centrale (Traoré *et al.*, 2001) (Figure 2). Le RYMV cause des dégâts très importants à la culture du riz et en fonction de la sensibilité des variétés, ces pertes varient entre 20 à 100 % (Fomba, 1988 ; Taylor, 1989). Le RYMV est décrit comme un virus émergent, confiné au seul continent Africain. Il appartient au genre *Sobemovirus* et possède toutes les caractéristiques biologiques et biophysiques des membres de ce genre. Son génome de type CfMV, comporte quatre ORFs. Le premier code une protéine nommée P1 impliquée dans le mouvement du virus (Bonneau *et al.*, 1998) et dans la suppression de silencing (Voinnet *et al.*, 1999 ; Siré *et al.*, 2008). Cette protéine présente une forte diversité fonctionnelle pour la suppression de silencing (Siré *et al.*, 2008). L'ORF2a code une protéine de fusion qui contient une protéase et la VPg (Fargette *et al.*, 2004). La VPg, qui se fixe de façon covalente à l'extrémité 5' de l'ARN viral, est le facteur de virulence du RYMV vis-à-vis de la résistance élevée du riz (Hébrard *et al.*, 2006). Elle a été récemment caractérisée comme une protéine désordonnée (Hébrard *et al.*, 2009). Après un décalage du cadre de lecture, l'ORF2b code pour la polymérase. L'ORF4 code la CP à partir d'un ARN sub-génomique. L'analyse des séquences du gène de la CP d'isolats originaires de toutes les régions d'Afrique où la maladie est présente a permis de révéler une forte diversité du RYMV avec une différence nucléotidique de 15 % (Pinel *et al.*, 2000 ; Traoré *et al.*, 2001 ; Pinel *et al.*, 2003). Cette diversité présente également une structure géographique marquée (Abubakar *et al.*, 2003 ; Traoré, 2005). Les souches virales du RYMV diffèrent d'une région à l'autre et il existe une spatialisation des souches au sein de chacune de ces régions (Traoré *et al.*, 2005). Il apparaît maintenant que ces souches ont aussi des propriétés pathogéniques contrastées. En effet, certaines souches sont capables d'infecter

certaines espèces végétales mais pas d'autres. C'est le cas, par exemple, de la graminée *Dactyloctenium aegyptum* qui a été récemment identifié comme un hôte différentiel du RYMV (Allarangaye *et al.*, 2007). Comme la plupart des sobémovirus, le RYMV a une gamme d'hôtes restreinte qui est limitée essentiellement aux riz cultivés, sauvages et à quelques espèces de graminées apparentées. Le RYMV est l'un des rares virus de plantes dont l'épidémiologie (au champ et au niveau moléculaire) a été aussi bien caractérisée (Traoré *et al.*, 2009). L'Homme, de part ses activités culturelles (labour, pépinières...), joue un rôle important dans la dissémination du virus ce qui le place au centre du processus épidémiologique (Traoré *et al.*, 2009).

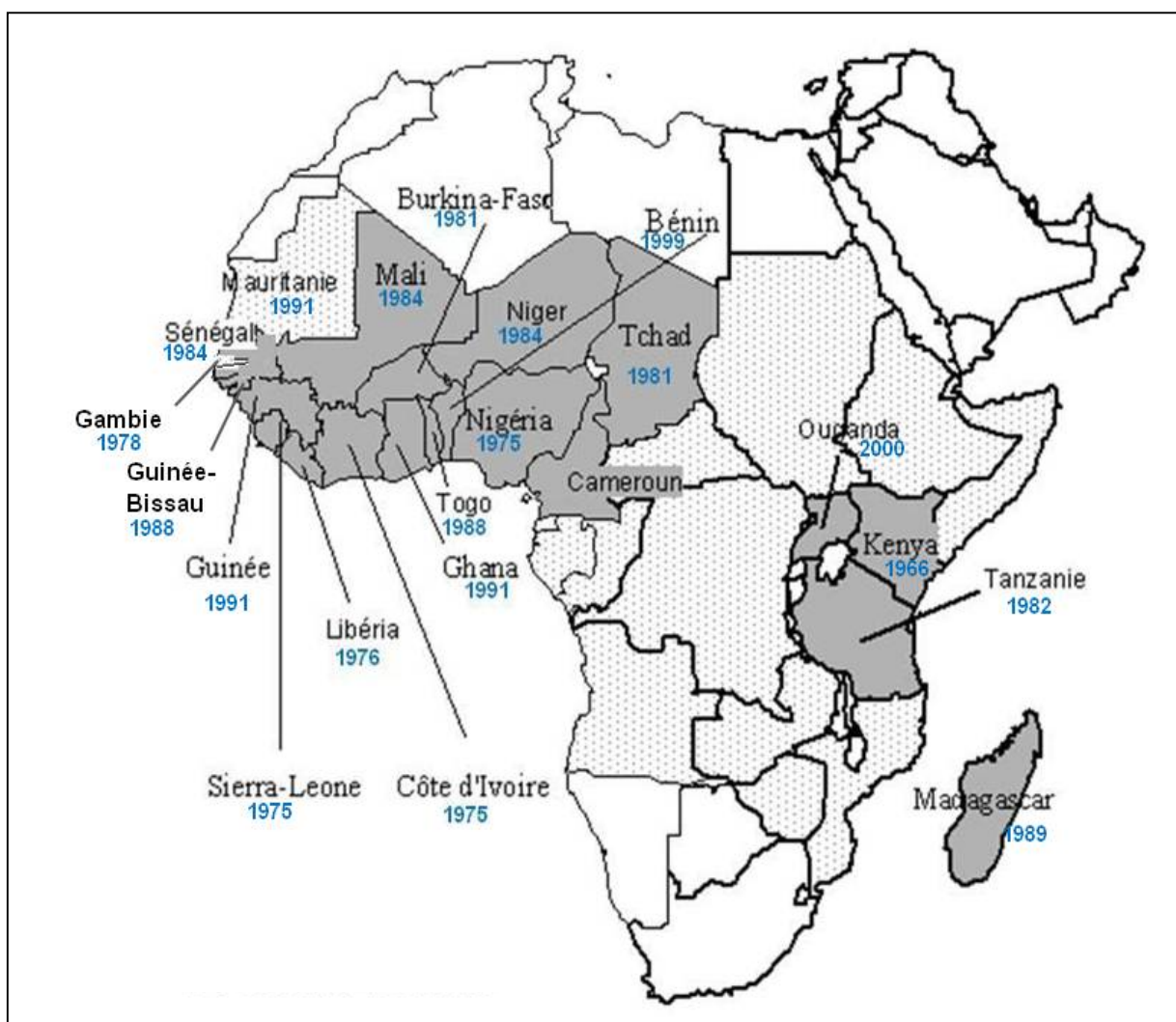


Figure 2. Distribution géographique du RYMV. Les années indiquées en dessous des noms de pays sont les dates auxquelles la maladie a été rapportée pour la première fois dans ces pays. □ = Zone où la présence de RYMV n'a pas été rapportée, ▤ = Zone peu explorée, ■ = Zone où la présence de RYMV a été rapportée (Source : F. Sorho modifiée par D. Sérémé)

a)



b)



Figure 3 : Symptômes de panachure jaune (Plages encadrées) dans des champs de riz infecté par le RYMV. a) au Mali à l'office du Niger en 2002 ; b) au Tchad à Bongor en 2005. (Photo O. Traoré)

6.2. IYMV

IYMV est l'agent pathogène responsable de la maladie de la panachure jaune du chiendent (*Imperata cylindrica* (L.) P. Beauv.). Il a été décrit pour la première fois en 2000 à Banzon au Burkina Faso (Kaboré, 2002 ; Sérémé, 2005). Les symptômes induits par ce pathogène se caractérisent par des stries chlorotiques discontinues de couleur jaune (Sérémé *et al.*, 2008a). La particule virale a une taille de 32 nm de diamètre (Figure 4). *Rottboellia exaltata* a été identifié comme hôte expérimental du virus tandis que *Imperata cylindrica* et le maïs (*Zea mays*) sont des hôtes naturels. Le IYMV n'est pas transmissible par la graine (Sérémé, 2005). Un fragment d'acide nucléique de 340 pb a pu être amplifié par RT-PCR en utilisant des amorces dégénérées à partir des séquences consensus identifiées chez les sobémovirus. Le séquençage et l'analyse phylogénétique à partir de ces 340 pb ont permis de rapprocher IYMV du RYMV qui est un sobémovirus de monocotylédone. Le séquençage complet (cet étude) a permis de confirmer cette proximité et son appartenance au genre *Sobemovirus* (Sérémé *et al.*, 2008a).

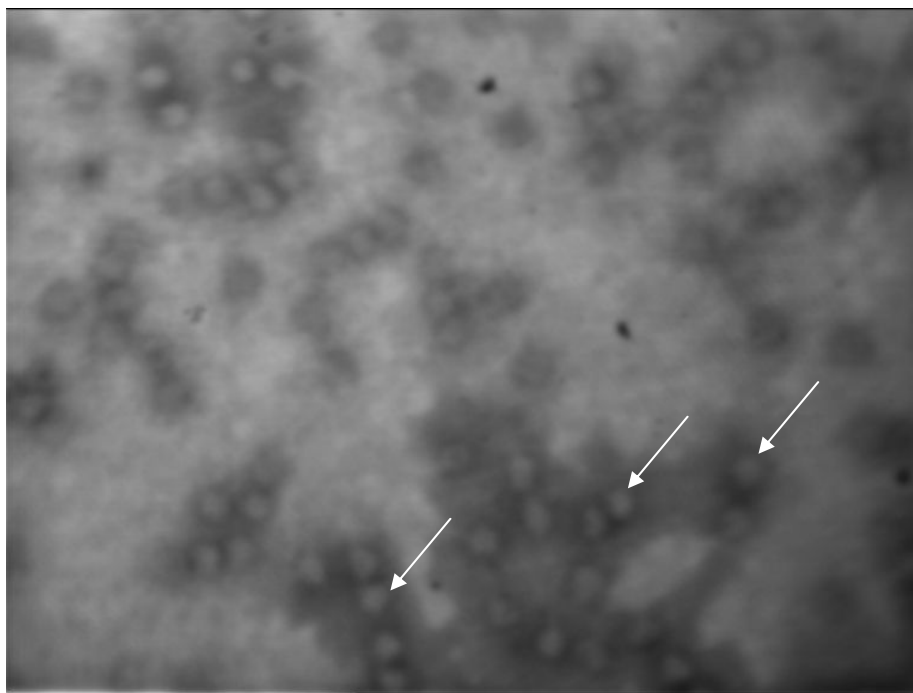


Figure 4 : Particules virales de IYMV (flèches) observées au microscope électronique (grossissement : x 14000) (Micrographie : S. Galzi)

II. SILENCING

1. Historique

Les premières études ayant révélé le processus d'inactivation épigénétique post-transcriptionnelle ont été réalisées chez les plantes au début des années 90 simultanément par une équipe hollandaise et une équipe américaine (Napoli *et al.*, 1990 ; van der Kroll *et al.*, 1990). Ces auteurs, désireux d'intensifier la couleur pourpre des pétales d'une variété de Pétunia, introduisèrent par transformation génétique une copie supplémentaire du gène de la chalcone synthétase A (*ChSA*), enzyme impliquée dans la voie de biosynthèse des pigments rouges, les anthocyanes. Parmi les transformants obtenus, certains présentaient des pétales blancs, totalement dépigmentés. L'analyse moléculaire de ces transformants a montré que cette dépigmentation résultait de la dégradation spécifique des ARNm de chalcone synthase (van Blokland *et al.*, 1994). Ainsi, on démontrait pour la première fois que l'introduction d'une copie supplémentaire d'un gène pouvait entraîner simultanément son inactivation ainsi que celle du gène endogène. Ce phénomène a été nommé co-suppression car on pensait à l'époque que l'extinction simultanée des gènes endogènes et exogènes homologues découlait obligatoirement d'une interaction entre eux.

Ces expériences de co-suppression ont mis en évidence un mécanisme très répandu chez les plantes : la protection du génome contre les éléments transposables mobiles et les virus à ARN (Vaucheret *et al.*, 2001). Ce mécanisme a été appelé « *Post Transcriptional Gene Silencing* » ou PTGS.

Des processus agissant de façon similaire, c'est-à-dire par dégradation spécifique d'un transcrit donné, ont ensuite été décrits chez de très nombreux organismes, tels que des protozoaires (*Trypanozoma brucei* (Ngo *et al.*, 1998), *Plasmodium falciparum* (McRobert et McConkey 2002), *Toxoplasma gondii* (Al-Anouti et Ananvoranich, 2002)), des invertébrés (*Caenorhabditis elegans* (Fire *et al.*, 1991), *Drosophila melanogaster* (Pal-Bhadra *et al.*, 1997)), des champignons (*Neurospora Crassa*, *Schyzosaaharomyces pombe*) (Cogoni *et al.*, 1996), des algues (*Chlamydomonas reinhardtii*) (Wu-Scharf *et al.*, 2000) ou encore des mammifères (*Mus musculus* (Elbashir *et al.*, 2001), *Homo sapiens sapiens* (Wianny et Zernicka-Goetz, 2000)). Certains facteurs de ces processus sont conservés d'un point de vue phylogénétique, indiquant une origine ancestrale commune de tous ces processus (Cogoni et Macino 1999 ; Dalmay *et al.*, 2000 ; Fagard *et al.*, 2000). Chez les animaux ce mécanisme est appelé *ARN interférence* (RNAi) et *quelling* chez les champignons.

Le processus de PTGS peut être déclenché par différents types d'inducteurs, tels qu'un transgène en orientation antisens ou encore en répétition inversée (IR) du même gène (Fagard et Vaucheret, 2000 ; Wesley *et al.*, 2001). Ce dernier type de transgène induit le processus de PTGS de façon beaucoup plus efficace (Wesley *et al.*, 2001). De nombreuses hypothèses concernant la base moléculaire de l'induction de ces processus post-transcriptionnels ont été formulées : production d'ARNs aberrants tels que des ARNs tronqués, non polyadénylés ou encore des ARNs méthylés et l'existence d'une machinerie permettant de détecter une quantité d'ARNs anormalement abondante (Meins et Kunz, 1995 ; Meins, 2000). Le mécanisme responsable de la spécificité de ces processus a suscité un très grand intérêt au niveau fondamental.

Bien que le mécanisme d'action du PTGS commence à être élucidé, il subsiste encore quelques zones d'ombre. En effet, on connaît à présent les mécanismes biochimiques qui conduisent à la dégradation spécifique de la séquence d'un ARN donné, mais on ne connaît pas encore la totalité des gènes impliqués dans la mise en place du PTGS.

Le PTGS régule l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel mais aussi au niveau transcriptionnel, *via* la méthylation de l'ADN et le remodelage de la chromatine. Dans cette partie ne seront décrits que les mécanismes post-transcriptionnels auxquels nous nous sommes particulièrement intéressés.

2. Terminologie

La terminologie utilisée pour décrire les mécanismes du PTGS est parfois complexe. Afin de bien cerner les phénomènes reliés au PTGS, nous donnons ici une description sommaire de ceux-ci.

Le terme co-suppression est utilisé chez la plante pour décrire la répression d'un gène ou d'un transgène par un transgène homologue (Napoli *et al.*, 1990). Cette répression peut agir soit *via* une réduction de la transcription des gènes affectés, soit *via* la modification du traitement des ARNm après transcription. Les deux phénomènes ne sont pas mutuellement exclusifs, mais agissent plutôt de façon concomitante.

La réduction de la transcription se nomme répression génétique transcriptionnelle (TGS). Elle fait appel principalement à des mécanismes épigénétiques comme la méthylation du promoteur ou de la séquence codante (Mette *et al.*, 2000). Ce volet de la répression par ARN n'est pas encore complètement élucidé. Il fait l'objet d'intenses recherches dans des domaines

connexes, tels les fonctions centromériques et le contrôle des éléments transposables (Llave *et al.*, 2002).

L'altération de l'ARNm après transcription, visant une réduction de l'expression, se nomme répression génétique post-transcriptionnelle (PTGS). Ce terme est surtout employé chez les végétaux et les eucaryotes inférieurs, le mot «*quelling*» pour ce même mécanisme étant réservé aux champignons et l'expression «ARN interférence» (RNAi) s'adressant surtout aux animaux (Tang *et al.*, 2003). Chez ces derniers, le RNAi agit soit en procédant à la dégradation des transcrits, soit en empêchant leur traduction. Chez les végétaux, le terme PTGS se réfère surtout à la dégradation des transcrits, quoiqu'un effet traductionnel ne soit pas écarté. L'expression RNAi s'emploie également chez les plantes. Elle se rapporte alors le plus souvent à l'induction artificielle du PTGS, par exemple lors de la création de «lignées RNAi» destinées à réprimer l'expression d'un gène. Nous utiliserons dans le document le terme silencing pour désigner le PTGS.

3. Mécanisme général du PTGS

Le PTGS est un phénomène dynamique dont le modèle actuel s'appuie sur le rôle clef des ARNdb et des petits ARNs interférants (siRNA) qui en dérivent. Selon ce modèle (Figure 5), les ARNdb présents dans une cellule seraient reconnus par une ribonucléase nommée DICER (DCL1 à DCL4 chez *Arabidopsis thaliana* [Schauer *et al.*, 2002]) qui les dégraderait en petits ARNs interférants de 21 à 25 nt. Les brins du duplex de siARNs sont dissociés par une hélicase ATP-dépendante et le brin dont l'appariement à l'extrémité 5' est le moins stable dans le duplex est pris en charge par le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*) de façon à cliver spécifiquement tout ARN leur étant homologue ce qui entraînerait la répression post-transcriptionnelle (Vaucheret *et al.*, 2001 ; Schwarz *et al.*, 2003). L'autre brin du duplex de siARNs, nommé brin «passager», est clivé par la protéine Argonaute (AGO) chez la *Drosophile* et chez l'humain, puis dégradé (Matranga *et al.*, 2005 ; Rand *et al.*, 2005). Il a été montré que le brin passager est ensuite dégradé par une ribonucléase nommée QIP chez *N. crassa* (Maiti *et al.*, 2007). Plusieurs autres protéines ont un rôle dans le PTGS (Vaucheret, 2008).

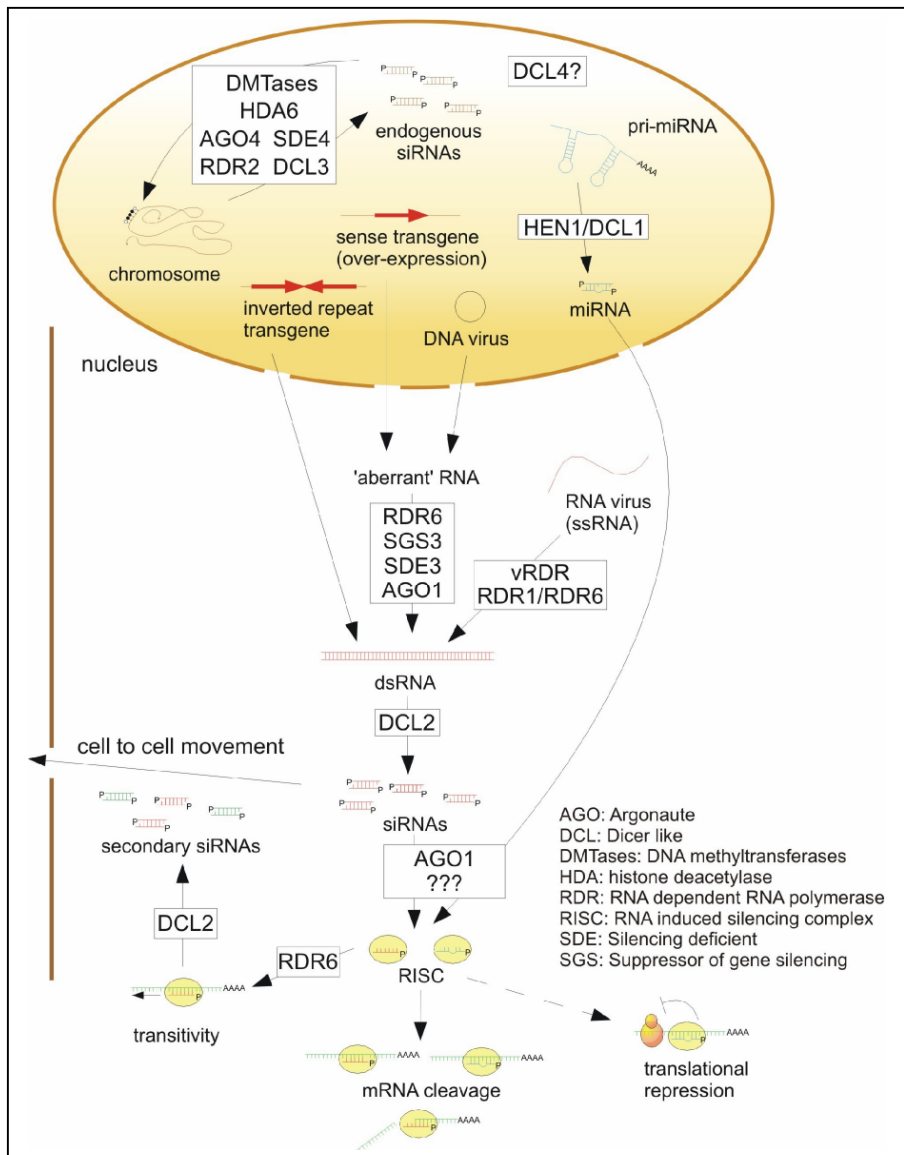


Figure 5 : Mécanisme général de silencing chez les plantes. Les rectangles indiquent les protéines ou les gènes impliqués dans les différents processus de silencing ; ??? indiquent la position des protéines associées au DICER (Bucher, 2006).

4. Principales composantes du silencing.

Bien qu'il existe de nombreuses catégories de petits ARNs, le schéma général du mécanisme de silencing est très conservé entre les organismes. Plusieurs acteurs interviennent dans le processus de silencing. Dans cette partie seront présentées par famille les principales protéines actrices du silencing, des protéines impliquées dans la biogenèse des petits ARNs, jusqu'aux protéines effectrices du mécanisme d'inactivation.

4.1 Dicer

Les protéines Dicer sont des membres de la famille des ribonucléases de classe III qui hydrolysent les ARNdb en fragments de 21 à 24 nt. Ces enzymes possèdent un domaine hélicase et deux domaines à ribonucléase de classe III. Comme les protéines de la famille Argonaute (voir plus loin), elles contiennent un domaine PAZ de liaison à l'ARNdb (MacRae et Doudna, 2007). Il existe quatre protéines Dicer chez *Arabidopsis* nommées DCL1 à 4 (Dicer-Like) qui produisent chacune des duplex de petits ARNs de 21, 22, 24 et 21 nt respectivement (Deleris *et al.*, 2006 ; Fusaro *et al.*, 2006).

Chez les animaux, les duplex de petits ARNs sont produits par deux types de ribonucléases de classe III : Drosha et Dicer. Chez les plantes, on ne connaît pas de protéines Drosha et ce sont les protéines Dicer-like seules qui produisent les duplex.

Chez *Arabidopsis*, il existe quatre isoformes DCL qui sont partiellement redondants. Par exemple, pour la biogénèse des *tasi*ARNs (voir plus loin), la protéine DCL4 qui produit normalement des *tasi*ARNs de 21 nt, peut être remplacée par DCL2, qui produit des *tasi*ARNs de 22 nt, ou DCL3, qui produit des *tasi*ARNs de 24 nt (Gascioli *et al.*, 2005 ; Xie *et al.*, 2005). Dans la réponse à une infection virale ou dans le cas d'inactivation de transgènes, la protéine DCL2 peut remplacer DCL4 (Deleris *et al.*, 2006 ; Fusaro *et al.*, 2006).

4.2. RDRs (ARN polymérase ARN dépendantes)

Les polymérase semblent nécessaires à plusieurs niveaux : pour convertir les ARNs aberrants (ARNab) en ARNdb et de façon plus générale pour amplifier le silencing en synthétisant du ARNdb à partir de l'ARNm et des siARNs utilisés comme amorce. Les RDR cellulaires, nommées RDR6, SGS2 (*suppressor of gene silencing 2*) ou encore SDE1 (*silencing defective 3*) (notée ici RDR6), semblent remplir cette fonction de synthèse d'ARNdb en utilisant comme matrice les ARNab (Dalmay *et al.*, 2000 ; Mourrain *et al.*, 2000).

D'autres RDRs cellulaires ont été identifiés chez d'autres organismes lors de criblage de mutants visant à identifier les composants nécessaires au silencing. Ainsi, les RDRs EGO1 et RRF-1 sont requises pour l'ARNi, respectivement, dans la lignée germinale et dans la lignée somatique chez *C. elegans* et QDE1 pour le *quelling* chez *N. crassa* (Cogoni et Macino, 1999 ; Smardon *et al.*, 2000 ; Sijen *et al.*, 2001). Chez *Arabidopsis*, six gènes codant des RDRs ont été identifiés et nommés RDR1 à 6.

4.3. Argonaute (AGO)

Les protéines de la famille AGO sont les effecteurs du silencing et elles sont conservées des bactéries procaryotes (*Aquifex aeolicus*) à l'homme. Ces protéines homologues au facteur d'initiation à la traduction, sont caractérisées par deux domaines protéiques PAZ (*Piwi/Argonaute/Zwille*) et PIWI (*P-Element-induced wimpy testis*), séparés par un domaine médian nommé MID (Hutvagner et Simard, 2008) (Figure 6). Ce sont des protéines très basiques qui portent des motifs GW (répétitions glycine tryptophane) dont le rôle dans le silencing commence à être elucidé. Ces motifs correspondraient à un motif de liaison aux protéines de la famille AGO *via* le domaine PIWI (El-Shami *et al.*, 2007). En effet, la protéine AGO1 de *S. pombe* interagit avec la protéine Tas3, chez les mammifères les protéines AGO1 et AGO2 interagissent avec GW182, et la protéine AGO4 d'*Arabidopsis* interagit avec la sous-unité NRPD1b de l'ARN polymérase IV (Vaucheret, 2008). On distingue trois groupes de protéines AGO (Hutvagner et Simard, 2008) : le groupe I regroupe les protéines liant les miARNs et les siARNs (protéines AGO vraies), le groupe II comprend les piARNs (protéines PIWI) et le groupe III est spécialisé dans la liaison des siARNs secondaires qui n'ont été décrites que chez *C. elegans* (Yigit *et al.*, 2006).

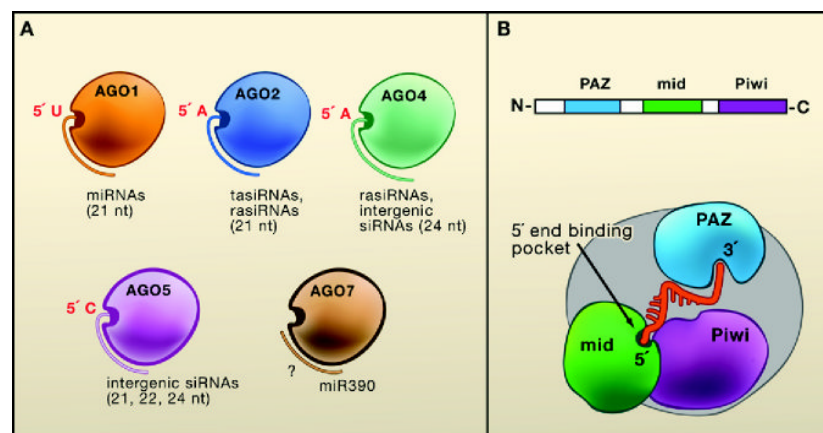


Figure 6 : Protéines argonautes et les petits ARNs. A) les protéines AGO chez *Arabidopsis* et leurs petits ARNs associés. Pour chaque protéine AGO, l'extrémité 5' préférentielle du nucléotide est indiquée. B) représentation de la structure d'une protéine AGO (en haut) et schéma montrant un modèle d'interaction AGO-petits ARNs (en bas) (Kim, 2008)

5. Biogénèse des petits ARNs

Les petits ARNs qui déclenchent l'extinction de l'expression des gènes constituent une famille d'ARNs non codants, régulateurs de 19-28 nt issus d'ARNdb (Kim, 2005). Ces petits ARNs peuvent être classés en deux sous-ensembles en fonction de la nature de leurs précurseurs : les siARNs, qui sont issus d'une molécule d'ARNdb et les miARNs, qui proviennent d'un ARNs se repliant selon une structure spécifique en épingle à cheveux.

5.1. Les siARNs

Les *small interfering RNAs* (siARNs) regroupent tous les petits ARNdb qui proviennent de précurseurs constitués de deux brins indépendants appariés. Ils peuvent être issus de l'activité d'une RDR ou d'une transcription bidirectionnelle de gènes ou de transposons. Les siARNs peuvent également être produits à partir de structures intramoléculaires formées par certains ARNs viraux (Molnar *et al.*, 2005).

Les siARNs sont séparés en quatre sous-classes qui sont définies en fonction de leur mécanisme d'action et de l'origine de leur précurseurs (Rana, 2007 ; Kim, 2008) : les *tasiARNs* (*endogenous trans-acting siRNA*, siARNs endogènes de 21 nt qui agissent en trans), les *rasiRNA* (*repeat-associated siRNA*, siARNs associés à des répétitions dans le génome comme des transposons ou des rétro-éléments), les *scanRNA* (*small scan RNA*, siARNs de 28 nt qui scannent l'ADN afin d'induire un réarrangement du génome) et les *piRNAs* (*Piwi-interacting*, siARN de 26-31 nt qui se lient aux protéines de la famille des PIWI).

Chez les plantes, les *rasiARNs* sont la classe majoritaire des siARNs (Llave *et al.*, 2002 ; Xie *et al.*, 2004). Les *nat-siARNs* (*natural antisense siARN*), une autre classe de siARNs, ont été identifiés chez des plantes ayant subi un stress salin (Borsani *et al.*, 2005) ou infectées par des pathogènes (Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006).

Chez les animaux tels que les mouches et les mammifères, il a été mis en évidence l'existence de siARNs endogènes (Czech *et al.*, 2008 ; Ghildiyal *et al.*, 2008 ; Kawamura *et al.*, 2008 ; Okamura *et al.*, 2008 ; Tam *et al.*, 2008 ; Watanabe *et al.*, 2008). Ces sARNs, nommés endo-siARNs, sont homologues à des transposons ou à des gènes dont ils régulent leurs expressions.

5.2. Les miARNs

Les *micro*ARNs (miARN) sont des molécules d'ARN de 18 à 24 nt dont les précurseurs sont des ARNs qui se replient selon une structure en tige-boucle (aussi appelée épingle à cheveux) et dont la structure tige contient des appariements imparfaits.

Les miARNs sont transcrits par la polymérase à ARN II sous la forme de transcrits primaires, appelés pri-miARNs (Cai *et al.*, 2004 ; Lee *et al.*, 2004). Les pri-miARNs sont ensuite exportés dans le cytoplasme par la protéine Exportin-5. Une fois dans le cytoplasme, les pri-miARNs sont clivés par des enzymes de la famille Dicer qui ôtent la boucle de l'épingle à cheveux et donne naissance à un miARN double-brin (Bernstein *et al.*, 2001 ; Grishok *et al.*, 2001 ; Hutvagner *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2004 ; Xie *et al.*, 2004). Un des brins de ce duplex est rapidement intégré dans un complexe ribonucléo-protéique où il devient un miARN mature alors que le brin complémentaire est dégradé (Khvorova *et al.*, 2003 ; Schwarz *et al.*, 2003).

Les miARNs réguleraient une grande variété de procédés physiologiques et de développement, comme la prolifération cellulaire, l'apoptose, la morphogenèse, la sécrétion d'hormones ou la plasticité neuronale (Plasterk, 2006).

6. Initiation, amplification et propagation du silencing

6.1. Initiation

Les études génétiques réalisées chez les plantes ont permis de mettre en évidence l'existence de différents inducteurs capables d'initier le silencing. L'étape commune à tous ces inducteurs est la formation d'un long ARNdb, qui après clivage par une enzyme de type DICER-Like conduit à la production des siRNAs.

Les siARNs de 21 nt produits par l'action de DCL4, AGO1 sont le signal actif au niveau du silencing cellule-à-cellule (Dunoyer *et al.*, 2005 ; Dunoyer *et al.*, 2007). La nature moléculaire du signal de silencing à longue distance n'est pas connue, mais il semble qu'il ne s'agisse pas de petits ARNs. En effet, la transmission systémique du signal n'est pas affectée à partir de greffons mutants *dcl1* ou *dcl2dcl3dcl4* (Brosnan *et al.*, 2007). Les RDRs sont ensuite les facteurs clés pour l'amplification de ces signaux.

6.2. Amplification du signal

Le silencing peut être amplifié d'une part par la multiplication du nombre de siARNs et d'autre part, par la diversification de ces siARNs : c'est la transitivity. La transitivity, mise en évidence chez les plantes (Voinnet *et al.*, 1998) et chez *C. elegans* (Sijen *et al.*, 2001), correspond à la production de siARNs secondaires qui ciblent de nouvelles régions par rapport aux siARNs primaires (Voinnet, 2008). Ces siARNs primaires servent d'amorce pour la RDR qui polymérise la séquence adjacente en 5' à la séquence ciblée par les siARNs primaires (Moissiard *et al.*, 2007).

Le mécanisme d'amplification du silencing décrit chez *C. elegans* dépend d'une protéine AGO de type III spécifique SAGO ou WAGO (Yigit *et al.*, 2006 ; Baulcombe, 2007 ; Pak et Fire, 2007 ; Sijen *et al.*, 2007).

6.3. Propagation du signal

Le silencing, nous l'avons vu, est initié à l'échelle de la cellule par la présence d'ARNdb. Cependant, il possède la propriété de ne pas rester localisé dans la cellule. Chez les plantes et chez certains invertébrés, le silencing possède une composante mobile capable de se propager de cellule-à-cellule *via* les plasmodesmes et à longue distance *via* les vaisseaux du phloème (Voinnet *et al.*, 1998). Cet aspect systémique du silencing est très important pour la défense des plantes contre les infections virales (Schwach *et al.*, 2005). Cette composante est spécifique aux siARNs et le silencing guidé par des miARNs est strictement cellule autonome.

7. Rôles du silencing chez les plantes

7.1. Rôles de défenses contre les acides nucléiques invasifs

Le silencing est un ancien mécanisme de défense contre les virus. Le plus ancien indice d'un tel rôle du silencing date de 1928 où Wingard a mis en évidence le phénomène de 'recovery' (Wingard, 1928). Des plants de tabac chez qui les premières feuilles sont nécrotiques à cause de l'infection par le TRV, sont capables de produire de jeunes feuilles indemnes de symptômes après une deuxième infection par le virus. Par ailleurs, les résultats de travaux visant à obtenir des plantes transgéniques résistantes aux virus militent en faveur d'un rôle antiviral du silencing. En effet, en 1966 il a été mis en évidence, que la sur-expression de la protéine de capsid (CP) du TMV chez des plants de tabacs les rends résistants à l'infection virale (Abel *et al.*, 1986). Six ans plus tard, Lindbo et Dougherty

(1992), réussissent à conférer à des tabacs exprimant le gène de la CP de TEV, une immunité contre le virus. L'importance du silencing dans la réponse des plantes aux infections virales est confirmée par le fait que de nombreux phytovirus, sinon tous, codent une ou plusieurs protéines capable supprimer la machinerie du silencing endogène (voir plus loin). Il y a eu co-évolution entre les stratégies d'infections virales et les mécanismes de défense mis en place par la plante. L'utilisation du silencing comme moyen de lutte contre les infections virales est conservée entre les espèces (Ding et Voinnet, 2007).

Comme indiqué en début de cette partie (historique), le silencing a été, pour la première fois, mis en évidence lors des expériences de transgénèse chez le Pétunia : la co-suppression. De même, la surexpression de la GFP chez *C. elegans* entraîne une baisse de l'accumulation de l'ARNm GFP (Fire *et al.*, 1998).

Un des rôles du silencing est de prémunir l'organisme contre des événements de transposition trop nombreux, ce qui pourrait être délétère pour le génome. Le silencing permet la régulation des transposons chez *Drosophila* et *C. elegans* (Ketting *et al.*, 1999), chez *Chlamydomonas* (protiste) (Wu-Scharf *et al.*, 2000) et chez les plantes (Hamilton *et al.*, 2002).

7.2. Rôle dans l'expression des gènes endogènes

Un autre rôle du silencing est d'intervenir dans le développement de l'organisme. En effet, les mutations dans certains gènes nécessaires au silencing entraînent souvent des aberrations phénotypiques et un développement perturbé (Ketting *et al.*, 2001 ; Lobbes *et al.*, 2006 ; Yang *et al.*, 2006). Les *tasi*ARNs sont également impliqués dans le développement. Ils réguleraient la transition de la phase juvénile vers la phase adulte (Fahlgren *et al.*, 2006).

7.3. Rôle de défense contre les stress biotiques et abiotiques

Des études commencent à mettre en évidence le rôle de défense du silencing contre les stress biotiques et abiotiques. Ainsi, il joue un rôle dans la défense de la plante contre les infections bactériennes (Navarro *et al.*, 2006). Ces auteurs ont montré que la perception par la plante de la flagelline bactérienne (PAMP, *Pathogen associated molecular pattern*) induit l'accumulation du miR393 et l'inhibition de l'expression de ses cibles afin d'améliorer la résistance au pathogène. Plus récemment, il a été montré l'existence chez les bactéries pathogènes d'acides nucléiques qui codent pour des protéines capables d'inhiber le silencing cellulaire (Navarro *et al.*, 2008). Comme dans le cas des virus, il y a co-évolution entre le mécanisme de défense cellulaire et celui des pathogènes.

Les premières preuves du rôle de défense du silencing contre les stress abiotiques datent des études visant à prédire l'existence de nouveaux miARNs et des cibles correspondantes chez *Arabidopsis* (Jones-Rhoades et Bartel, 2004). Ces travaux ont permis de montrer qu'il existait parmi les cibles potentielles de miARNs, de nombreuses protéines de réponse aux stress. D'autres études ont permis d'identifier aussi des petits ARNs impliqués dans la réponse aux stress abiotiques (Borsani *et al.*, 2005 ; Sunkar *et al.*, 2006). Enfin, une étude récente basée sur des expériences de puces à ADN a permis d'identifier 14 miARNs régulés en réponse aux stress (Liu *et al.*, 2008).

III. BIOTECHNOLOGIES

1. Applications du silencing

Presque vingt ans après la découverte des siARNs, les connaissances sur leurs caractéristiques et leurs rôles ne cessent d'évoluer. Le silencing a captivé le monde scientifique en amenant de nouveaux outils génétiques pour les organismes modèles, en améliorant la compréhension des mécanismes de régulation de l'expression des gènes, et par l'ouverture de toutes nouvelles perspectives pour la pharmacologie et les biotechnologies.

1.1. Le silencing, un outil de génomique fonctionnelle

Avec la technique, nommée ARN interférence (ARNi), il est possible d'inactiver le fonctionnement d'un gène donné avec une remarquable efficacité et spécificité (Bosher et Labouesse, 2000) et d'évaluer son implication fonctionnelle dans un processus physiopathologique. L'ARNi a été plébiscitée pour la production de mutants et le nombre de travaux ayant utilisé à ce jour cette technique pour identifier la fonction d'un gène donné est considérable. Elle permet également d'identifier à grande échelle la fonction des gènes. En effet, dans des études visant à identifier des gènes impliqués dans le cycle cellulaire et le développement embryonnaire, des mutants ont été obtenus par ARNi pour l'ensemble des gènes des chromosomes I et III de *C. elegans* (Fraser *et al.*, 2000). Cette technique peut également permettre d'inactiver en une seule expérience plusieurs membres, voire tous les membres d'une même famille de protéines.

1.2. Chez les plantes : Concept de résistance dérivée du pathogène

Les maladies virales causent des dégâts et des dommages qualitatifs et quantitatifs considérables sur les cultures. Face à ces virus phytopathogènes, l'utilisation de variétés résistantes constitue l'approche de lutte la plus efficace. Récemment, le génie génétique a ouvert la voie à des approches innovantes de création de variétés résistantes. Historiquement, le concept de résistance dérivée du pathogène (PDR pour *pathogen-derived resistance*) a été émis par Sanford et Johnston en 1985. Ce concept fut, un an après, validé vis-à-vis d'un virus de plante (Abel *et al.*, 1986). La sur-expression de la protéine de capsid du TMV a permis d'obtenir des plantes transgéniques résistantes à ce virus (Abel *et al.*, 1986). Depuis l'aboutissement de ces travaux, le gène de la capsid a été utilisé avec succès pour induire une résistance à de nombreux phytovirus (Beachy, 1997 ; Gonsalves, 2006 ; Fuchs et Gonsalves, 2007). Toutefois, d'autres gènes viraux ont également été utilisés pour conférer un phénotype de résistance, notamment les gènes de la réplicase (Beachy, 1997), de la protéase, de la protéine de mouvement, des séquences non codantes (Fuchs et Gonsalves, 2007), des ARNs satellite (Jacquemond et Tepfer, 1998) et des ARNs défectifs interférents (Havelda *et al.*, 1998).

L'exemple réussi de ce type de résistance est la résistance conférée à la papaye (*Carica papaya*) contre le PRSV (*Papaya ringspot virus*) (Gonsalves, 1998) qui, dès sa commercialisation en 1998, plusieurs revues lui ont été consacrées (Gonsalves *et al.*, 1998 ; Gonsalves *et al.*, 2004 ; Gonsalves, 2006 ; Gonsalves *et al.*, 2006).

Deux décennies après la création de la première plante transgénique résistante aux phytovirus, environ une quarantaine de plantes résistantes à un ou plusieurs virus existent aujourd'hui (pour revue, voir Fuchs et Gonsalves, 2007 ; Shepherd *et al.*, 2009). Bien que les diverses stratégies se soient avérées concluantes en serre et en condition naturelle, les plantes transgéniques exprimant un (ou partie) gène viral n'ont pas été introduites intensément du fait des problèmes législatifs liés à la biosécurité.

1.3. Chez les animaux : Technique aux indéniables qualités

La technique de l'ARNi représente de grands espoirs pour la médecine grâce à l'utilisation de siARN (Siomi, 2009). Des études ont montré que l'ARNi est spécifique du gène ciblé dans des cultures de cellules humaines (Chi *et al.*, 2003 ; Jackson *et al.*, 2003 ; Semizarov *et al.*, 2003). L'utilisation de cette technique *in vivo* reste confrontée, comme les autres techniques de transferts d'acide nucléique, aux problèmes de ciblage cellulaire.

Cependant, certaines études ont déjà permis d'apporter des résultats encourageants en terme de thérapie humaine. Des études ont, par exemple, permis d'inactiver les virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) (Jacque *et al.*, 2002 ; Lo *et al.*, 2007) et de l'Hépatite (Yokota *et al.*, 2003 ; Ren *et al.*, 2006) dans des cultures cellulaires.

Les résultats d'ARNi obtenus pour la thérapie anti-cancéreuse sont également très encourageants. En effet, il a été possible de bloquer l'expression d'oncogène dans divers types de cellules cancéreuses humaines en culture et ainsi d'induire spécifiquement leur apoptose (Wilda *et al.*, 2002 ; Aoki *et al.*, 2003). L'ARNi serait également une technique efficace dans la lutte anti-parasitaire (Malhotra *et al.*, 2002 ; Robinson et Beverley, 2003).

1.4. Limites de l'ARN interference

Bien que l'ARNi soit une technique aux multiples applications, force est de reconnaître qu'elle présente des limites. En effet, plusieurs études ont montré que les siARNs peuvent induire une réponse anti-virale de type interféron dans des cellules mammifères. Cela provoque une dégradation non spécifique des ARNm. La taille des siARNs est donc un facteur important dans les "contraintes" en ce sens qu'il faut utiliser des siARNs de moins de 30 nucléotides (Chauchereau et Harel-Bellan, 2004) pour que l'ARNi soit efficace.

Dans des études expérimentales *via* le transcriptome, l'existence de cibles collatérales a été observée, mais avec des efficacités limitées (Jackson *et al.*, 2003). Plusieurs gènes peuvent donc être simultanément ciblés par les siARNs, et cela peut compromettre l'interprétation correcte de la fonction des gènes à cause de la non-spécificité de la réaction. Pour confirmer un phénotype, il est donc indispensable d'utiliser deux ARNs interférants qui ciblent des séquences différentes sur le même gène (Anonymous, 2003).

Une autre contrainte liée à l'utilisation de l'ARNi est qu'une différence de seulement quelques nucléotides dans la séquence de l'ARN cible peut modifier l'efficacité d'un siARN.

Quoi qu'il en soit, le fait que l'ARNi est un processus naturel et probablement fondamental chez les plantes, les animaux et l'Homme contribue à en faire un des domaines de recherche les plus passionnants de la biologie.

2. Applications des suppresseurs de silencing

Les progrès en matière de génie génétique et l'intérêt grandissant de l'industrie pharmaceutique pour la production de protéines aux propriétés thérapeutiques ont fait naître

ces deux dernières décennies un nouveau système de production de protéines recombinantes, connu sous le nom de "*Molecular pharming*", qui utilise les plantes comme « bioréacteur » (Whitelam *et al.*, 1993 ; Theisen, 1997 ; Deckers *et al.*, 1999 ; Gidding, 2001). Ce système nécessite le plus souvent l'intégration d'un transgène dans leur génome. Cependant, l'obtention de transformants stables est longue (plusieurs mois) et est inefficace si la surproduction de la protéine d'intérêt est toxique pour la plante.

C'est pourquoi la transformation transitoire apparaît comme une technique de choix pour la production de protéines d'intérêt dans les plantes. Elle permet de dissocier la transformation de l'expression et est, en plus, rapide, flexible, non affectée par des effets chromosomiques et peut être utilisée dans les tissus végétaux entièrement différenciés (Fischer *et al.*, 1999). Très récemment, il a été montré que le silencing est un facteur limitant pour l'expression des protéines recombinantes dans les plantes (Johansen et Carrington, 2001). Le silencing est en effet un mécanisme de défense très efficace de la plante qui reconnaît et neutralise les ARNs ou ADN étrangers (dont les transgènes). La découverte récente des protéines suppresseurs de silencing, chez presque tous les genres viraux (Figure 7), a permis de lever en partie la contrainte liée à l'utilisation des plantes pour la production de protéines recombinantes. Ainsi, de plus en plus, les suppresseurs de silencing sont utilisés dans des systèmes hétérologues permettant d'optimiser l'expression d'un gène donné. Ainsi, la co-expression de protéines suppresseurs de silencing permet d'atténuer la réponse de silencing de l'hôte et donc d'améliorer l'expression du gène d'intérêt. Dans une étude récente, Voinnet *et al.*, (2003) a montré que la co-infiltration d'un gène d'intérêt en présence de la protéine suppresseur P19 du TBSV (*Tomato bushy stunt virus*) permet d'augmenter de façon significative l'expression du gène d'intérêt. En effet, en présence de la protéine P19, l'expression du gène d'intérêt est multipliée par 50 (Voinnet *et al.*, 2003). Il a aussi été rapporté qu'un bon niveau d'expression peut être obtenu en couplant l'approche amplicon viral avec un suppresseur de silencing. Des feuilles co-exprimant le suppresseur HC-Pro du TMV et un vecteur PVX/Gus amplicon accumulent la protéine GUS d'environ 3 % de protéine totale (Mallory *et al.*, 2002a). Des résultats similaires ont également été observés en utilisant en système hétérologue chez le tabac la protéine suppresseur P1 du RYMV pour l'expression de la protéine PSA-*Promastigote Surface Antigen*- d'intérêt vaccinal contre la Leishmaniose (Siré *et al.*, 2006 ; Sérémé *et al.*, 2008b).

Dans une étude visant à identifier les interactomes d'une protéine kinase *AtS6k2* Léonard (2005) est parvenu à sur-exprimer cette protéine en utilisant la protéine suppresseur de silencing P19 dans un système d'expression transitoire. L'expression constitutive de la

protéine kinase *AtS6k2* étant toxique pour la plante. Ainsi, il ressort que l'utilisation des suppresseurs de silencing comme outils pour sur-exprimer des protéines recombinantes a de beaux jours devant elle.

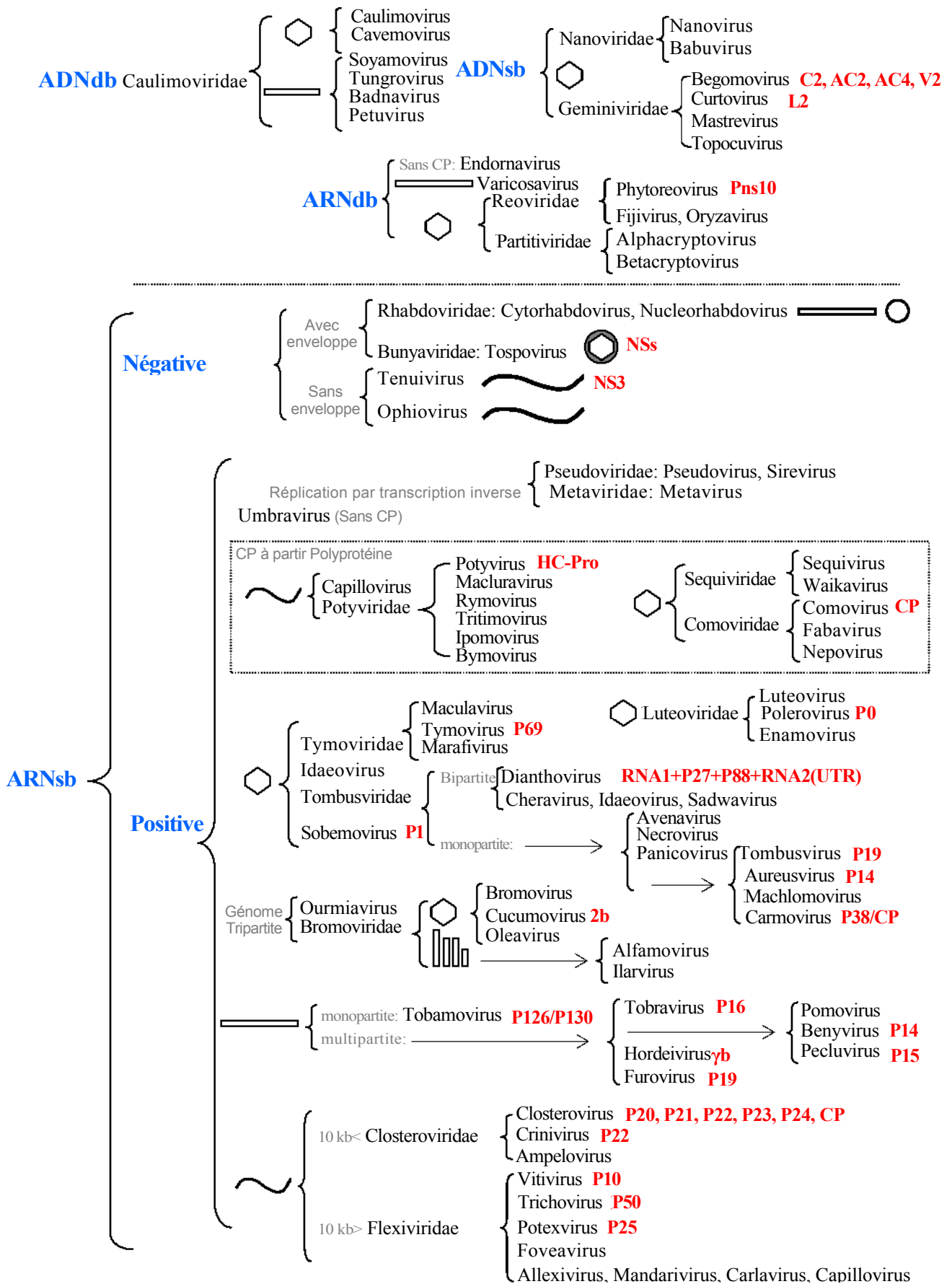


Figure 7 : Classification des virus de plantes (ICTV, 2005) montrant les supprimeurs de silencing en rouge

Deuxième Partie:

MATERIEL ET METHODES

1. MATERIEL

1.1. Matériel végétal

Afin de tester les propriétés pathogéniques des isolats de RYMV, les variétés de riz sensibles IR64 (*Oryza sativa indica*) et BG90-2 (*O. sativa indica*) et résistante Giganté (*O. sativa indica*) ont été utilisées.

La variété de maïs (*Zea mays*) FBC6 et la poacée pérenne *I. cylindrica* ont été utilisées au cours de la caractérisation biologique et moléculaire du IYMV. Le matériel végétal utilisé dans la recherche des hôtes du IYMV est présenté dans Sérémé *et al.* (2008).

Les infiltrations transitoires ont été effectuées avec *Nicotiana benthamiana* sauvage et transgénique appelée lignée 16C. La lignée transgénique porte une seule copie du transgène correspondant à l'ORF codant pour une GFP modifiée par Haselhoff *et al.* (1997) au niveau d'un locus unique et de manière homozygote (Ruiz *et al.*, 1998).

N. benthamiana a été cultivée dans des conditions de jours longs 14 h de jour à 28 °C, 10 h de nuit à 26 °C avec une humidité relative de 70 %.

1.2. Matériel viral

1.2.1. Les isolats de RYMV

Les isolats de RYMV provenant du Burkina Faso, du Mali, du Niger et du Tchad représentent nos souches virales. Certains ont été collectionnés au cours de cette étude tandis que d'autres, notamment ceux provenant du Niger et du Tchad, ont été prélevés dans la collection RYMV du laboratoire de virologie et de biotechnologies végétales de l'INERA. Les différents isolats ont été utilisés pour les études de la diversité pathogénique du RYMV et de suppression de silencing. Certaines séquences d'isolats de RYMV utilisées ont été récupérées dans les bases de données. Les numéros d'accèsion sont mentionnés dans le tableau 2 (Pinel-Galzi *et al.*, 2007).

1.2.2. Les isolats de IYMV

L'isolat de virus utilisé dans la détermination de la séquence complète et dans l'étude de la suppression de silencing du IYMV a été isolé en 2000 à Banzon (Sud-Ouest du Burkina Faso) sur la poacée pérenne *I. cylindrica*.

1.3. Matériel bactérien, vecteurs de clonage et milieux de culture

1.3.1. Souches bactériennes

Les souches bactériennes DH5 α , SCS110, HB101 d'*Escherichia coli* et GV3101 (pM90) d'*Agrobacterium tumefaciens* (Tableau 4) ont été utilisées pour les clonages et les transformations.

La souche DH5 α (Invitrogen) a été utilisée pour l'amplification des plasmides lors des clonages. Cette souche possède le gène codant pour la sous-unité β de la β -galactosidase. Ce gène est sous la dépendance d'un promoteur induit par l'IPTG. Elle permet de limiter les risques de recombinaison, permet l' α -complémentation et aussi la sélection des clones recombinants par la couleur des colonies en présence d'IPTG, un substrat chromogène de la β -galactosidase.

La souche SCS110 (Stratagene) est déficiente pour les méthylases Dam et Dcm. De ce fait, l'ADN produit par cette souche peut être digéré par des enzymes de restriction sensibles à la méthylation. Elle a été utilisée dans le clonage des protéines P1 du IYMV et du RYMV.

La souche HB101 (Invitrogen) est, à l'inverse de la souche SCS110, pourvue des méthylases Dam et Dcm et l'ADN produit par cette souche ne peut pas être digéré par des enzymes de restriction sensibles à la méthylation. Elle a été utilisée pour produire l'ADN qui a servi pour la mutagenèse dirigée.

La souche GV3101 (Invitrogen) dérive de la souche sauvage C58 dont le plasmide Ti a été délété de son ADN-T, lequel a été remplacé par le gène de résistance à la Gentamycine (Koncz et Schell, 1986).

Tableau 4 : Souches bactériennes utilisées

Espèce	Souche bactérienne	Origine	Génotype
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	Invitrogen	F ⁻ Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>phoA supE44</i> λ - <i>thi-1 gyrA96 relA1</i>
	SCS110	Stratagene	<i>rpsL</i> (Str ^r) <i>thr leu endA thi-1 lacY galK galT ara tonA tsx dam dcm supE44</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) [F' <i>traD36 proAB lacI q</i> Δ M15]
	HB101	Invitrogen	F ⁻ <i>mcrB mrr hsdS20</i> (r _B ⁻ m _B ⁻) <i>recA13 leuB6 ara-14 proA2 lacY1 galK2 xyl-5 mtl-1 rpsL20</i> (Sm ^R) <i>glnV44</i> λ ⁻
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GV3101	Invitrogen	<i>rpoH</i> ⁺ <i>hrcA</i> ⁺

1.3.2. Vecteurs de clonage

pGEMT-easy : Le vecteur de clonage pGEMT-easy (Promega) est utilisé pour la plupart des clonages. Ce plasmide est sous forme linéaire et le site de clonage est bordé par une thymidine aux extrémités 3'OH. La présence de ces bases permet la ligation de produit d'amplification par PCR utilisant la Taq polymérase (qui ajoute une adénosine en 3'). Ce vecteur a une taille de 3000 pb, porte le gène de résistance à l'ampicilline. On trouve de part et d'autre de la cassette de clonage les promoteurs des ARNs polymérases T7 et SP6.

pBin61 : Il dérive du plasmide binaire pBin19 (Bevan, 1984) et possède l'origine de répllication peu spécifique ainsi que les séquences bordantes provenant du plasmide Ti. Il contient le gène de résistance à la kanamycine et une cassette de clonage flanquée du promoteur 35S du CaMV et du terminateur 35S. Ce vecteur a été utilisé pour exprimer la GFP dans *A. tumefaciens*. Le plasmide pBin61 contenant le gène *GFP* (pBin61-GFP) a été gracieusement fourni par Dr D. Baulcombe (Sainsbury Laboratory, John Innes Centre, Colney Lane, Norwich).

pCaK7 : Le vecteur plasmidique binaire pCaK7 est utilisé pour la transformation des agrobactéries. Il dérive du plasmide pCambia1300 et a été obtenu en clonant la cassette 35S (Siré *et al.*, 2008) au niveau du site *SmaI* du pCambia1300. Cette cassette renferme les sites de restriction *XbaI* et *HindIII*. Les séquences des différentes protéines P1 du RYMV et du IYMV ont été clonées de façon orientée grâce à la digestion par des enzymes de restriction (*XbaI* et *HindIII*). Le vecteur ainsi généré a été utilisé pour permettre l'expression des protéines P1 et GUS dans *A. tumefaciens*. Il contient un gène de résistance à la kanamycine capable de s'exprimer dans les bactéries permettant ainsi de les sélectionner.

1.3.3. Milieux de culture

Le milieu complet LB (Luria Bertani) (Annexe 1) (Sambrook *et al.*, 1989) a été utilisé. Les milieux gélosés (sur les boîtes de Pétri) ont été obtenus par addition de 15 g d'agar par litre de milieu. De plus, si nécessaire, ces milieux ont été supplémentés en antibiotiques tels que l'ampicilline à 100 mg/l ou la kanamycine à 50 mg/l. Le substrat chromogène X-Gal a été utilisé à la concentration de 40 mg/l.

1.3.4. Conditions de culture

La bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*) est cultivée à 37 °C dans le milieu LB contenant de l'extrait de levure (5 g/l), du bacto-tryptone (10 g/l) et du NaCl (5 g/l). De l'agar à 10 g/l a

été ajouté pour le milieu solide. A ces milieux peuvent être additionnés des antibiotiques adéquats. *A. tumefaciens* a été cultivée dans les mêmes conditions que *E. coli* à l'exception de la température qui est de 28 °C au lieu de 37 °C.

Les antibiotiques dont le gène de résistance est apporté par le plasmide ont été utilisés aux concentrations suivantes pour sélectionner les bactéries transformées : ampicilline 100 µg/ml, kanamycine 50 µg/ml et rifampicine à 100 µg/ml.

2. METHODES

2.1. Echantillonnage et collecte des isolats viraux

2.1.1. Collecte des échantillons de RYMV

Les échantillons de feuilles ont été prélevés sur la base de la présence de symptômes (jaunissement, panachure, mosaïque, nécrose). Le prélèvement a concerné le riz cultivé ou sauvage ainsi que les graminées sauvages. Les feuilles prélevées ont été conditionnées dans des sachets minigrip en prenant le soin d'éviter tout contact entre la main et les feuilles. Les sachets contenant les échantillons ont été étiquetés et stockés sur la glace jusqu'à leur acheminement au laboratoire où ils ont été transférés au congélateur à -20 °C.

2.1.2. Maintien des isolats viraux

Les deux virus RYMV et IYMV utilisés au cours de nos travaux ont été multipliés et conservés dans les mêmes conditions à -20 °C. Cependant, les isolats de RYMV ont été maintenus sur les variétés de riz sensibles BG90-2 et IR64 tandis que IYMV a été multiplié sur *I. cylindrica* et sur la variété de maïs sensible FBC6.

Pour chaque isolat, les feuilles ont été broyées au mortier dans du tampon d'inoculation (Annexe 2) en présence de sable fin ou d'azote liquide selon un rapport 1 : 10 (1 g de feuille dans 10 ml de tampon). Le broyat a été filtré puis du carborundum 600 mesh a été additionné au filtrat à 10 % pour servir d'abrasif. L'inoculation a été réalisée de façon mécanique par frottement des feuilles, âgées de 14 jours, avec les doigts préalablement trempés dans l'inoculum.

2.2. Etude de la suppression de silencing

2.2.1. Préparation des agrobactéries

Préalablement à chaque infiltration, les souches d'*A. tumefaciens* ont été étalées sur un nouveau milieu de culture contenant les antibiotiques adéquats (kanamycine et rifampicine). Les agrobactéries ont été mises en préculture dans 5 ml de LB en présence de kanamycine (50 µg/ml) pendant environ 24 h et placées sous agitation à 28 °C. La préculture a été utilisée pour ensemercer 50 ml de milieu de culture (LB, kanamycine 50 µg/ml, acétylsyringone 20 µM) puis mis sous agitation, pendant 20 h à 28 °C. Les agrobactéries ont été ensuite sédimentées (10 min à 5000 rpm), resuspendues dans une solution de MgCl₂ (10 mM) et d'acétylsyringone (150 mM) de telle sorte que la DO_{600 nm} soit égale à 0,9 (Voinnet *et al.*, 2003). La suspension bactérienne a été incubée à température ambiante 2 à 3 h avant l'infiltration.

2.2.2. Co-infiltration ou patch test

Pour évaluer l'activité de suppression d'une protéine virale, on réalise une agro-infiltration avec un mélange d'agrobactéries dont l'une des souches possède le plasmide pBin-GFP (ou pBin-GUS) et l'autre souche un plasmide binaire portant le gène de la protéine virale à étudier. Les deux suspensions bactériennes ont été préparées de la même manière que précédemment puis ont été mélangées à volume égal 1 : 1. Le mélange a été ensuite utilisé pour infiltrer des plantes *N. benthamiana* lignée 16c (lorsque pBin-GFP est utilisé) ou des plantes *N. benthamiana* sauvages (lorsque pBin-GUS est utilisé).

La co-infiltration a été réalisée sur des jeunes feuilles, âgées de 3 semaines, à l'aide d'une seringue de 2 ml sans aiguille. Elle consiste à appliquer l'extrémité de la seringue sur la partie abaxiale de la feuille à infiltrer puis par une pression adaptée, le mélange bactérien a été injecté dans les tissus foliaires.

2.2.3. Prélèvement des feuilles

Les feuilles agro-infiltrées ont été quotidiennement prélevées pendant une semaine afin de suivre la cinétique d'expression du GUS. Pour tester l'effet de la protéine P1 du IYMV sur le silencing systémique, les feuilles néoformées 7 ; 14 et 21 jours après infiltration ont été prélevées et analysées. Ces feuilles ont été utilisées pour doser l'activité enzymatique GUS et la fluorescence de la GFP.

2.3. Biologie moléculaire

2.3.1. Extraction d'ARNs totaux

L'extraction des ARNs totaux a été réalisée à partir de tissus végétaux infectés par le RYMV ou IYMV à l'aide du kit "RNesasy Plant Mini kit" (Qiagen). Ce kit permet d'obtenir, à partir de quelques centaines de mg de matériel frais, des ARNs purs, de bonne qualité et en forte concentration. Le matériel végétal a été broyé dans l'azote liquide, jusqu'à obtention de poudre fine, à l'aide d'un microbroyeur en microtube de 1,5 ml. La poudre a été solubilisée dans le tampon lyse RLT contenant de l'isothiocyanate de guanidium et du β -mercaptoéthanol (10 μ l/ml). Ensuite, l'échantillon a été filtré sur une colonne permettant d'éliminer la majeure partie des débris cellulaires. L'ajout d'éthanol absolu permet d'optimiser les conditions de liaison des ARNs lorsque le lysat est transféré sur une membrane de silice fixant préférentiellement les ARNs. La colonne a été lavée une seconde fois avec le même tampon et deux autres fois avec un deuxième tampon contenant tous les deux de l'éthanol. Après séchage par centrifugation, les ARNs ont été élués dans 30 μ l d'eau pure garantie sans ribonucléase.

Les ARNs extraits ont été dosés par spectrophotométrie à 260 nm à l'aide du Nanodrop (Labtech Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer) sachant qu'une absorbance à 260 nm égale à 1, correspond à une quantité d'ARN total égale à 40 ng/ μ l. La qualité des ARNs a été évaluée en calculant le rapport $DO_{260}/DO_{280\text{ nm}}$. Pour un ARN pur, ce rapport doit être compris entre 1,8 et 2. Les ARNs ont été conservés à -80 °C pour une longue durée, à -20 °C en fraction aliquote pour les utilisations courantes et à 4 °C pour les utilisations quotidiennes.

2.3.2. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR permet l'amplification *in vitro* d'un fragment d'ADN de manière exponentielle grâce à l'utilisation de l'ADN polymérase thermostable isolée de *Thermus aquaticus* (Taq) (Chien *et al.*, 1976). Différentes polymérases ont été utilisées pour les réactions de PCR selon le but final de l'amplification. De manière générale, l'amplification de séquences d'ADN par PCR a été effectuée à partir d'ADN matriciel dans un volume réactionnel de 50 μ l contenant du tampon de réaction PCR dilué 1X, 200 nM de chaque amorce (spécifiques de la séquence à amplifier), 0,1 mM de dNTPs (mélange contenant 10 mM de chaque nucléotide tri-phosphate), et 0,5 U de polymérase. Du $MgCl_2$ peut être ajouté si nécessaire. Les PCR ont été conduites dans un thermocycleur selon le programme suivant :

dénaturation de 10 min à 94 °C ; 20 à 35 cycles comprenant une étape de dénaturation de 30 sec à 94 °C, une étape d'hybridation de 40 sec à une température inférieure de 5 °C à la plus faible des températures de fusion (T_m) des amorces utilisées et une étape d'élongation de x secondes à 72 °C (x étant proportionnel à la taille du fragment souhaité avec en moyenne 30 sec pour un fragment de 500 pb) ; élongation finale de 10 min à 72 °C. La T_m est déterminée en fonction des amorces choisies. Ainsi, la T_m d'un oligonucléotide de taille inférieure à 25 nt est donnée par la relation suivante : $T_m = 4 \times \text{le nombre de paires G/C} + 2 \times \text{le nombre de paires A/T}$. Pour les oligonucléotides dont la taille excède 25 nt, la formule à utiliser devient : $T_m = 69,3 + 0,41 \times (\% \text{ GC}) - (650 / \text{taille amorce})$.

2.3.3. RT-PCR

La synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc) a été réalisée en utilisant le kit "SuperscriptII RNase H- Reverse Transcriptase" (Gibco BRL, Life Technologies). Cinq μg d'une solution d'ARN total ont été mis en incubation à 65 °C pendant 10 min avec 500 ng d'amorce antisens spécifique de la séquence recherchée dans un volume final de 12 μl puis rapidement refroidis sur glace. On ajoute ensuite 4 μl de 5x "first strand reaction buffer", 2 μl de 0,1 M DTT et 1 μl de dNTPs (mélange contenant 10 mM de chaque nucléotide triphosphate). La réaction de transcription inverse est débutée après ajout de 1 μl de transcriptase inverse Superscript II (200 U/ μl) puis mise en incubation à 42 °C pendant 50 min. Enfin, une incubation de 10 min à 70 °C arrête la réaction en inactivant l'enzyme. Une PCR a ensuite été réalisée, comme précédemment, en utilisant 2 μl d'ADNc issu de la transcription inverse.

2.3.4. Electrophorèse et purification des fragments d'ADN

Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1 % (p/v) dans un tampon TAE (Tris, Acétate, EDTA) x 0,5. Du bromure d'éthydiu a été incorporé au gel à la concentration finale de 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Un marqueur de poids moléculaire a été déposé en parallèle afin d'évaluer la taille des bandes. Le marqueur de poids moléculaire 1 kb *DNA ladder* (Invitrogen, Ref. 15615-016) a été utilisé pour les fragments supérieurs à 100 pb et le marqueur 100 pb *DNA ladder* (Invitrogen, Ref. 15628-050) pour les fragments de plus petite taille. Après migration sous une tension électrique de 100 V dans le tampon TAE x 0,5, les fragments d'ADN ont été visualisés sous lumière UV puis photographiés à l'aide d'un appareil photo Gel doc 2000 (Biorad) incorporé à un micro-ordinateur Power Mac 4400/200. En fonction des objectifs, les fragments amplifiés ont été excisés du gel et purifiés à l'aide du

kit "QIAquick gel extraction" (Qiagen) ou purifiés directement (produit RT-PCR) à l'aide du kit "GeneClean Turbo" (Promega). Ces opérations de purification ont été réalisées suivant les recommandations des fournisseurs.

2.3.5. Mutagenèse dirigée

Le kit "QuikChange® II XL Site-Directed Mutagenesis" de Stratagene™ a été utilisé pour la mutagenèse dirigée. Cette technique a été initialement proposée par Weiner *et al.* (1994). Les amorces utilisées peuvent permettre plusieurs types de mutagenèses comme l'insertion d'un site unique de restriction, des délétions de toutes tailles et des insertions de séquences pouvant aller jusqu'à 120 nt. La méthode est basée sur une PCR longue, réalisant l'amplification du plasmide complet, ce qui nécessite une ADN polymérase avec une bonne activité correctrice comme l'enzyme *Pfu* commercialisée par Stratagene™. La PCR a été effectuée dans un milieu réactionnel de 50 µl contenant une concentration 10 fois supérieure en amorces et en dNTP que dans le protocole PCR décrit précédemment. 20 cycles d'amplification comportant une dénaturation de 30 sec à 94 °C, l'hybridation des amorces de 30 sec à la température adaptée et l'élongation de 5 min à 72 °C, ont été effectués. L'ADN néo-synthétisé et les hybrides brins parents/nouveaux ont été purifiés puis traités avec l'enzyme de restriction *DpnI* pour digérer les brins provenant de la matrice parentale méthylée. Après purification, l'ADN a été phosphorylé, soumis à une ligation intramoléculaire afin de transformer des cellules ultracompétentes XL10-Gold fourni dans le kit (Stratagene).

2.3.6. Clonage moléculaire

2.3.6. 1. Préparation des vecteurs et des inserts

(i) Digestion par les enzymes de restriction

Les endonucléases (*HindIII*, *SmaI*, *XbaI*) coupent les molécules d'ADN bicaténaire au niveau de séquences spécifiques, génèrent des fragments ayant soit des extrémités cohésives 5' ou 3' sortantes, soit des extrémités franches. Chaque enzyme de restriction présente une activité optimale dans un tampon spécifique et à une température donnée. En général, l'incubation se déroule pendant 1 h à 37 °C.

Les vecteurs et les inserts ont été préparés par digestion respective d'ADN plasmidique et de produits PCR avec des enzymes de restriction appropriées. Pour digérer 1 à

5 µg d'ADN (vecteur ou insert), le milieu réactionnel suivant a été utilisé : 1 µl à 5 µl d'ADN à 1 µg/µl, 1 µl de BSA à 2 mg/ml, 2 µl de tampon 10x spécifique de l'enzyme, 0,2 µl d'enzyme à 10 U/ml et de 20 µl d'eau qsp.

La digestion a été vérifiée par électrophorèse en gel d'agarose à 1 % puis visualisée sous lumière UV. Le produit de restriction a été exisé et purifié à l'aide du kit "GeneClean Turbo" (Qbiogen) selon les recommandations du fournisseur et repris dans 30 µl de tampon d'élution.

(ii) Déphosphorylation d'un vecteur

La déphosphorylation empêche un vecteur linéarisé de se refermer sur lui-même lors de l'étape de ligation et favorise ainsi l'insertion du fragment de DNA à cloner. La déphosphorylation a été réalisée par action de la phosphatase alcaline d'intestin de veau, qui élimine les phosphates 5'-terminaux. 1 µg d'ADN a été déphosphorylé par 1 U de CIP (*Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal*) (New England Biolabs) avec du tampon NEB3 1 X (New England Biolabs) dans un volume réactionnel de 50 µl, pendant 1 h à 37 °C. L'enzyme a été ensuite inactivée par chauffage à 68 °C pendant 10 mn. Les vecteurs déphosphorylés ont été ensuite purifiés à l'aide du kit "GeneClean Turbo" de Qbiogen.

(iii) Ligation de fragment d'ADN purifié

La T4 ADN ligase catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre les extrémités 3'-hydroxyle et 5'-phosphate des molécules d'ADN. La ligation a été faite dans un volume total de 10 µl. Le milieu réactionnel était constitué de 100 ng de vecteur linéarisé, de 50 à 100 ng de fragment d'ADN à cloner, de 2 µl de tampon de ligation 5X (Invitrogen), de 1 U de T4 DNA (Invitrogen) ligase et qsp 10 µl d'eau.

La réaction a été incubée pendant une nuit à 16 °C. La T4 ligase a été inactivée par traitement thermique à 65 °C pendant 10 mn. Après purification avec le kit "GeneClean Turbo" (Qbiogen), les produits de ligation ont été repris dans 5 à 10 µl d'eau puis utilisés pour les transformations.

2.3.6.2. Transformations bactériennes

Pour les différentes transformations, des bactéries *E. coli* compétentes commerciales HB101 (Invitrogen) et SCS110 (Stratagene) ont été utilisées suivant les recommandations des fournisseurs. Les souches DH5α d'*E. coli* et GV3101 d'*A. tumefaciens* compétentes ont été préparées au laboratoire et utilisées.

(i) Préparation de bactéries thermocompétentes (Souche DH5 α , Invitrogen)

La compétence d'une bactérie est un état temporaire qui lui permet d'incorporer des molécules d'ADN exogènes.

Une préculture de bactéries *E. coli* (souche DH5 α) a été réalisée dans 5 ml de milieu LB et conduite pendant une nuit à 37 °C sous agitation. 1 ml a été prélevé et mis en culture dans 100 ml de milieu LB pendant 2 h environ à 37 °C. Les bactéries ont été alors en phase exponentielle de croissance. Lorsque la DO₆₀₀ était entre 0,3 et 0,8 max (idéal entre 0,5 et 0,6), les bactéries ont été placées 15 mn à 4 °C. La culture a ensuite été centrifugée à 4 °C pendant 20 mn à 3000 trs/min. Après élimination du milieu LB, les bactéries ont été remises en suspension dans 50 ml d'une solution de CaCl₂ 100 mM froid puis laissées 20 mn sur glace. La solution de CaCl₂ perméabilise les membranes bactériennes. Elles ont été centrifugées 20 mn à 3000 trs/min. Le culot a été remis en suspension dans 1 ml d'une solution de CaCl₂ 100 mM froid et mis en incubation 30 min sur glace. Les bactéries ainsi préparées sont dites compétentes. Les bactéries compétentes ont été ensuite conservées à -80 °C en ajoutant 0,35 ml de glycérol par ml de cellules.

(ii) Préparation de bactéries électrocompétentes (Souche GV3101, Invitrogen)

La souche GV3101 d'*A. tumefaciens* a été cultivée à 37 °C dans 250 ml de milieu LB jusqu'à une DO_{600 nm} de 0,5 à 0,8. La culture a été placée 30 min dans la glace puis, après des centrifugations successives de 10 min à 4000 rpm, le culot bactérien obtenu a été remis en suspension d'abord dans 250 ml d'eau froide, ensuite dans 125 ml d'eau froide, puis dans 10 ml de glycérol 10 % et finalement dans 2 à 3 ml de glycérol 10 % (annexe 3). Les bactéries ainsi préparées peuvent être conservées à -80 °C pendant plusieurs mois.

(iii) Transformation de bactéries compétentes par choc thermique

Les souches d'*E. coli* compétentes commerciales HB101 (Invitrogen) et SCS110 (Stratagene) ont été transformées par choc thermique et suivant les recommandations des fournisseurs.

La transformation de la souche DH5 α compétentes préparées au laboratoire a également été réalisée par choc thermique mais selon un protocole simple : les bactéries ont été doucement décongelées puis à 40 μ l ont été ajoutés 4 μ l de produits de ligation et le mélange a été maintenu dans la glace pendant 30 min. Les bactéries ont ensuite été soumises à un choc thermique de 42 °C pendant 45 sec et replacées immédiatement dans la glace pendant 2 mn. 500 μ l de milieu LB ont été ajoutés aux cellules et incubés à 37 °C pendant 1 h sous agitation

(225 rpm). Les cellules ont ensuite été étalées sur milieu LB solide sélectif (Ampicilline pour les vecteurs pGEMT-easy, et Kanamycine pour les vecteurs pCaK7 et pBin61). Les boîtes ont été incubées une nuit à 37 °C.

(iv) Transformation d'Agrobacterium tumefaciens compétentes par électroporation

Afin d'améliorer l'efficacité de transformation on peut utiliser la technique d'électroporation. Cette technique consiste à utiliser de hauts voltages pour créer des pores transitoires dans la membrane cellulaire.

La transformation d'agrobactéries compétentes (souche GV3101) a été réalisée par électroporation. Le produit de ligation (4 µl) a été mélangé à 40 µl de cellules compétentes dans des cuves à électroporation de 4 mm sur de la glace. Une décharge électrique de 2,5 kV (25 µFa ; 200 Ohms) a été appliquée à l'aide d'un électroporateur (Biorad Gene Pulser system). Les bactéries ont été remises en suspension dans 1 ml de milieu LB et placées à 28 °C sous agitation pendant 2 à 3 h. Elles ont ensuite été étalées sur boîte de Pétri contenant des antibiotiques adéquats (LB additionné de 50 µg/ml rifampicine et de 50 µg/ml kanamycine) et incubées 2 à 3 jours à 28 °C.

(v) Sélection des bactéries transformées

Pour sélectionner les bactéries, un gène de résistance à un antibiotique est présent sur le vecteur. Une fois la transformation effectuée, les bactéries ont été cultivées 1 h dans 500 µl de milieu LB afin qu'elles puissent commencer à exprimer le ou les gènes de résistance (culture d'expression). Cette étape n'est pas nécessaire dans le cas d'antibiotiques qui empêchent juste la division cellulaire (comme c'est le cas de l'ampicilline) sans tuer les bactéries. L'étape suivante consiste à étaler les bactéries sur le milieu sélectif qui consiste en du milieu LB agar supplémenté en antibiotique. Les bactéries sont ensuite cultivées jusqu'à apparition des colonies. Certains vecteurs permettent l'utilisation du criblage "blanc bleu". Dans ce cas, de l'IPTG et du X-gal ont été incorporés au milieu de culture LB comme indiqué en annexe 1.

2.3.6.2. Analyse et purification des clones recombinants

(i) Analyse directe par PCR

Après transformation avec les vecteurs pGEMT-easy, pBin61 ou pCaK7, les colonies bactériennes ont été analysées par PCR afin de vérifier la présence effective de l'ADN

recombinant et définir son sens d'insertion. Ainsi pour chaque clone, un cure-dent stérile a été utilisé pour prélever et transférer à la fois sur milieu sélectif (solide ou liquide) et dans un milieu réactionnel de PCR. La réaction de PCR a donc été directement effectuée en utilisant l'ADN bactérien comme matrice. Un couple d'amorces spécifiques de l'ADN recombinant ou la combinaison d'une amorce spécifique du plasmide et d'une amorce à l'intérieur de l'ADN intégré a été utilisé pour l'amplification.

(ii) Analyse par digestion enzymatique

L'analyse des clones recombinants par la technique de digestion enzymatique nécessite de disposer d'ADN plasmidique suffisamment pur. L'obtention d'un tel ADN passe par la préparation de petites quantités d'ADN plasmidique et la purification.

Mini-préparation de plasmide : 1,5 ml de milieu liquide LB sélectif a été ensemencé avec une colonie recombinante et incubé pendant une nuit à 37 °C sous agitation à 225 rpm.

Purification d'ADN plasmidique (midipréparation) : A partir de la mini-préparation, les bactéries ont été recueillies par centrifugation à 14 000 rpm pendant 1 mn et l'ADN plasmidique a été extrait à l'aide du kit "QIAprep® Spin Miniprep" (Qiagen) selon les indications du fournisseur. La séparation de la fraction plasmidique est basée sur le principe de la lyse alcaline des bactéries qui permet une dissociation relativement aisée entre l'ADN chromosomique bactérien et les petits plasmides de structure circulaire. De plus, la purification est améliorée par la fixation des ADNs sur une résine échangeuse d'anions en présence de faible concentration saline. Cette étape permet une meilleure élimination des contaminants (ARNs, protéines). L'ADN plasmidique a été élué de la colonne à l'aide d'un tampon salin avant d'être précipité à l'isopropanol.

La concentration de l'ADN extrait a été évaluée par mesure de la densité optique à 260 nm et sa pureté par le rapport des densités optiques à 260 et 280nm.

Une fois l'ADN du clone recombinant extrait et purifié, sa conformité a été vérifiée par digestion avec les enzymes de restriction *HindIII* et *XbaI*.

(iii) Séquençage

Des mutations sont susceptibles d'apparaître dans les séquences clonées. Elles peuvent être dues aux erreurs de la polymérase lors de la PCR dans le cas du clonage d'un amplicon ou à l'exposition au UV dans le cas d'une purification sur gel. Dans tous les cas, il est nécessaire de séquencer les clones obtenus afin de vérifier l'absence de mutations. Pour ce

faire, les ADNs purifiés ont été acheminés à Grenoble (France) où les réactions de séquençage ont été réalisées par la société "Genome Express".

2.4. Biochimie

2.4.1. Extraction et dosage de protéines de *Nicotiana benthamiana*

Les feuilles agro-infiltrées ou systémiques de tabac *N. benthamiana* ont été broyées dans l'azote liquide et reprises dans du tampon d'extraction (Annexe 2). Le surnageant, qui contient les protéines totales hydrosolubles, a été récupéré à l'issue de deux centrifugations successives de 30 min à 20 000 g à 4 °C et la quantité de protéines a été évaluée par un dosage de Bradford (*Coomassie protein assay kit*, Pierce) (Bradford, 1976). A l'aide d'un Multiskan Ascent (Labsystems) la densité optique à 595 nm a été déterminée. La teneur en protéine a été déterminée par comparaison de la densité optique à 595 nm avec une gamme étalon établie avec du Sérum Albumine Bovine (BSA) (Sigma).

2.4.2. Dosages de l'activité enzymatique GUS

Le dosage de l'activité glucuronidase GUS a été réalisé sur les extraits protéiques précédemment dosés. Il a été réalisé par fluorimétrie en présence de 1 mM du substrat MUG (4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide, Sigma). Deux microlitres de chaque fraction protéique ont été incubés à 37 °C dans 200 μ l de tampon d'extraction contenant 1 mM de substrat MUG (Sigma). La quantification de l'activité enzymatique a été effectuée à l'aide du Fluoroskan Ascent (Labsystems) sous des longueurs d'onde d'excitation de 365 nm et d'émission de 455 nm mesurant en fait la quantité de MU, produit fluorescent de la réaction enzymatique, formé au cours du temps, l'appareil étant au préalable étalonné avec des solutions de MU (Sigma) de concentration connue. Elle a été exprimée en quantité de produit synthétisé par unité de temps et de protéine : pmol MU/mn/ μ g protéine.

2.4.3. Dosages ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay)

Deux variantes du test ELISA ont été utilisées : ELISA double anticorps sandwich directe (DAS-ELISA) et ELISA double anticorps sandwich indirect (IDAS-ELISA). Les protocoles détaillés sont fournis en annexe 4 et 5 respectivement.

2.4.3.1. Test ELISA double anticorps sandwich directe (DAS-ELISA)

Cette variante a été utilisée avec les anticorps polyclonaux pour détecter le RYMV dans les échantillons collectés et le IYMV, virus pour lequel des anticorps monoclonaux ne sont pas encore disponibles.

La variante ELISA double anticorps sandwich décrite par Konaté *et al.* (1997) a été utilisée. L'antigène est constitué de marqueurs protéiques situés à la surface de la protéine de capsid du virus. Il a été placé entre deux couches d'anticorps spécifiques du virus. Le deuxième anticorps, identique au premier, a été conjugué à la phosphatase alcaline. L'activité de la phosphatase alcaline est révélée par la transformation d'un substrat, la p-nitrophényl phosphate incolore en p-nitrophénol jaune. La densité optique à 405 nm de l'activité enzymatique a été mesurée à l'aide d'un lecteur automatique de plaque de type Multiskan Ascent (Labsystems). Elle est proportionnelle à la concentration virale dans un intervalle donné. Les échantillons sont considérés comme positifs si les densités optiques obtenues sont à la fois supérieures à 0,1 et à 2 fois la densité optique des témoins négatifs (BG90.2, contrôle inoculé avec du tampon).

2.4.3.2. Test ELISA double anticorps sandwich indirect (IDAS-ELISA)

Cette variante a été adoptée comme décrit par N'Guessan *et al.* (2000), en utilisant les anticorps monoclonaux préparés à l'IRD et gracieusement fournis par Dr D. Fargette (IRD Montpellier, France), pour caractériser les variants sérologiques du RYMV.

L'antigène a été placé entre deux couches d'anticorps spécifiques du virus. L'anticorps polyclonal RYMV-Mg produit contre un isolat malgache appartenant au sérotype Ser4 a été utilisé comme le premier anticorps. Cet anticorps a été fixé sur la paroi de la plaque de microtitration. Un anticorps monoclonal dirigé contre un épitope précis de la protéine de capsid a été utilisé comme deuxième anticorps. Le tableau 5 présente la liste des anticorps monoclonaux et leurs réactions vis-à-vis du RYMV. Le conjugué polyclonal anti-souris a été utilisé comme troisième anticorps. Il s'agit d'un anticorps de lapin anti-immunoglobuline de souris conjugué à la phosphatase alcaline. La révélation a été réalisée comme décrite dans la variante DAS-ELISA.

Tableau 5 : Réaction des anticorps monoclonaux utilisés pour la détermination des sérotypes de RYMV

Sérotypes	Anticorps monoclonaux						
	M	C	G	E	B	D	A
Sérotipe 1	+	+	+	+	+/-	-	+
Sérotipe 2	+	+	+	+	+/-	+	-
Sérotipe 3	+	+	-	+	+/-	+	+
Sérotipe 4	+	+	+	+	+	+	+
Sérotipe 5	+	+	+	-	+/-	+	+

2.5. Analyses bioinformatiques

Plusieurs programmes ont été utilisés au cours de nos travaux de recherches et sont mentionnés dans les différents articles présentés dans le présent document. Dans cette rubrique, nous présentons succinctement les différents logiciels utilisés.

Les séquences envoyées par Genome Express (Grenoble, France) sont analysées à l'aide du paquetage Lasergene de DNASTAR qui comporte cinq programmes : l'assemblage des séquences en contigs a été réalisé à l'aide du programme SEQMAN en utilisant les paramètres par défaut. EDITSEQ a servi à éditer les séquences assemblées et aussi à rechercher les cadres ouverts de lecture (ORF). Les séquences ont été alignées par la méthode Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) implémentée dans le programme MEGALIGN. Une fois les séquences alignées, il est alors possible d'implémenter d'autres analyses. Ainsi, les sites sous sélection positives ont été identifiés avec l'aide des logiciels HYPHY (Pour *Hypothesis Testing Using Phylogenies*) (Pond *et al.*, 2005) et SELECTON version 2.4 (Stern-Ginossar *et al.*, 2007).

Les analyses phylogénétiques ont été réalisées en utilisant la méthode de maximum de vraisemblance avec le logiciel PHYML (pour *PHYlogenies by Maximum Likelihood*) (Guindon et Gascuel, 2003). Le logiciel PAUP 4.0 (pour *Phylogenetic Analysis Using Parsimony*) (Swofford, 2000) a aussi été utilisé dans certains cas. Les arbres phylogénétiques générés ont été visualisés à l'aide du logiciel Treeview. La diversité et le polymorphisme des séquences ont été analysés à l'aide du logiciel DnaSP version 5 (Rozas *et al.*, 2003). Les évènements de recombinaison ont été recherchés avec le logiciel RDP (Martin *et al.*, 2005). Le programme BEAST (Bayesian evolutionary analysis by sampling trees)

(<http://beast.bio.ed.ac.uk>, Drummond et Rambaut, 2007) a été utilisé pour les analyses d'évolution moléculaire.

Le choix des amorces ainsi que l'annotation des séquences permettant la détermination de la séquence entière et l'identification des ORFs potentiels du IYMV ont été effectués en utilisant le logiciel Vector NTI Advance 10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).

Troisième Partie:

RESULTATS ET DISCUSSION

CHAPITRE 1

Les supprimeurs de silencing : Etat des lieux et méthodes d'identification

1.1. Introduction

Tout parasite confronté à un mécanisme de défense déploie un mécanisme de contre-défense. Les phytovirus n'échappent pas à cette règle. En effet, bien que la plupart des espèces végétales possèdent la machinerie cellulaire nécessaire à l'établissement du silencing et malgré le fait que ce mécanisme semble être dirigé contre les virus, ces derniers sont capables d'infecter efficacement les plantes. Les virus ont donc certainement développé des stratégies de contournement du silencing pour parvenir à infecter leurs hôtes. Plusieurs phytovirus codent au moins un suppresseur de silencing. Actuellement, plus de 40 suppresseurs de silencing ont été identifiés chez les différents types de virus (ARN et ADN). Ces suppresseurs de silencing appartiennent à différentes familles de virus et n'ont en général aucune homologie de séquence entre elles. Pour la plupart, les protéines suppresseurs de silencing ont été identifiées depuis longtemps comme des déterminants de pathogénie du virus mais leur fonction n'avait pas pu être précisée (Voinnet *et al.*, 1999). Leur mode d'action reste encore largement méconnu et fait l'objet d'intenses recherches de nos jours. L'article 1 (Séréme *et al.*, 2009) fait la synthèse des suppresseurs de silencing jusqu'ici décrits. Les différentes méthodes utilisées pour les identifier, leurs modes d'action ainsi que les motifs impliqués dans l'inhibition du silencing y sont présentés.

1.2. Article 1 : Les suppresseurs du RNA silencing des phytovirus : Caractérisation et mode d'action (Séréme *et al.*, 2009. *Virologie* 13 : 305-316).

Les suppresseurs du RNA silencing des phytovirus : caractérisation et mode d'action

Drissa Sérémé^{1,2}
Séverine Lacombe²
Florence Vignols²
Gnissa Konaté¹
Alfred S. Traoré³
Christophe Brugidou²

¹ Inera, Laboratoire de virologie et de biotechnologies végétales, Station de Kamboinsé, 01 BP 476 Ouagadougou 01, Burkina Faso

² UMR UP-IRD-CNRS 5096, Centre IRD, 911, avenue Agropolis BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France
<Christophe.Brugidou@ird.fr>

³ Université de Ouagadougou, CRSBAN, UFR SVT, 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso

Résumé. L'extinction post-transcriptionnelle des gènes ou *post-transcriptional gene silencing* (PTGS) est un mécanisme fondamental de défense des plantes contre les virus, les transgènes et les transposons. Certains virus de plantes sont cependant capables de contourner ce mécanisme de défense *via* la synthèse de protéines virales antagonistes appelées « suppresseurs de silencing ». Cette stratégie, bien connue chez les virus de plantes, est également présente chez les virus qui infectent les animaux. Ces protéines inhibent le mécanisme d'extinction post-transcriptionnelle des gènes par différentes stratégies qu'il est possible d'analyser. Dans cette revue, nous présenterons les principales protéines « suppresseur de silencing » codées par les virus de plantes, ainsi que les méthodes utilisées pour les identifier et caractériser leur mode d'action.

Mots clés : PTGS, suppresseurs de silencing, phytovirus, mode d'action

Abstract. RNA silencing or Post-transcriptional gene silencing (PTGS) in plants is a fundamental defence mechanism against viruses, transgenes and transposons. Most viruses, if not all, are able to overcome RNA-silencing through the production of so-called "silencing suppressors" with counter-defence ability". This strategy is well known for plant and animal viruses. Silencing suppressor proteins block the host RNA silencing by targeting different steps of the silencing pathway. In this review, we will focus on the major silencing suppressor proteins encoded by plant viruses and on the methods used to identify and characterize the molecular bases of silencing suppression.

Key words: PTGS, silencing suppressor, plant viruses, molecular basis of suppression

Introduction

Le silencing est un mécanisme ancestral très conservé dans l'évolution. Identifié tout d'abord chez les plantes comme phénomène de « co-suppression » [1], sa véritable mise en évidence n'a été réalisée qu'en 1998 chez le nématode *Caenorhabditis elegans* [2], et son mécanisme formellement identifié un an après avec la découverte des petits ARNs [3], d'où son nom actuel de « *post transcriptional gene silencing* » (PTGS). Ce mécanisme existe également chez les Ciliates [4] et le champignon ascomycète (*Neurospora crassa*) où il est appelé *quelling* [5], ainsi que chez les animaux tels que la drosophile [6] et les mammifères [7] où il est appelé ARNi (*ARN interference*). Il est impliqué dans des fonctions cellulaires fondamentales

aussi variées que la défense antivirale, le maintien de l'intégrité du génome, le contrôle épigénétique ou le développement.

Le mécanisme en amont conduisant au silencing est activé par des molécules d'ARN double brin (ARNdb) ou structure secondaire de l'ARN (*figure 1*), et comprend deux phases distinctes : une phase d'initiation et une phase effectrice, comprenant elle-même le maintien et la propagation systémique du signal silencing (pour revue [8, 9]). Chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, les ARNdb sont reconnus par quatre paralogues appartenant à la famille des ribonucléases de classe III appelées Dicer (ou DCL pour *Dicer-like*). Les ARNdb reconnus sont clivés spécifiquement par une des 4 enzymes Dicer en ARN duplex de 21 à 24 paires de base. Ces enzymes, nommées DCL1, 2, 3 et 4, possèdent un domaine de liaison à l'ARNdb [10] et produisent respectivement des duplex de petits ARNs de 21, 22, 24 et 21 nt [11].

Tirés à part : C. Brugidou

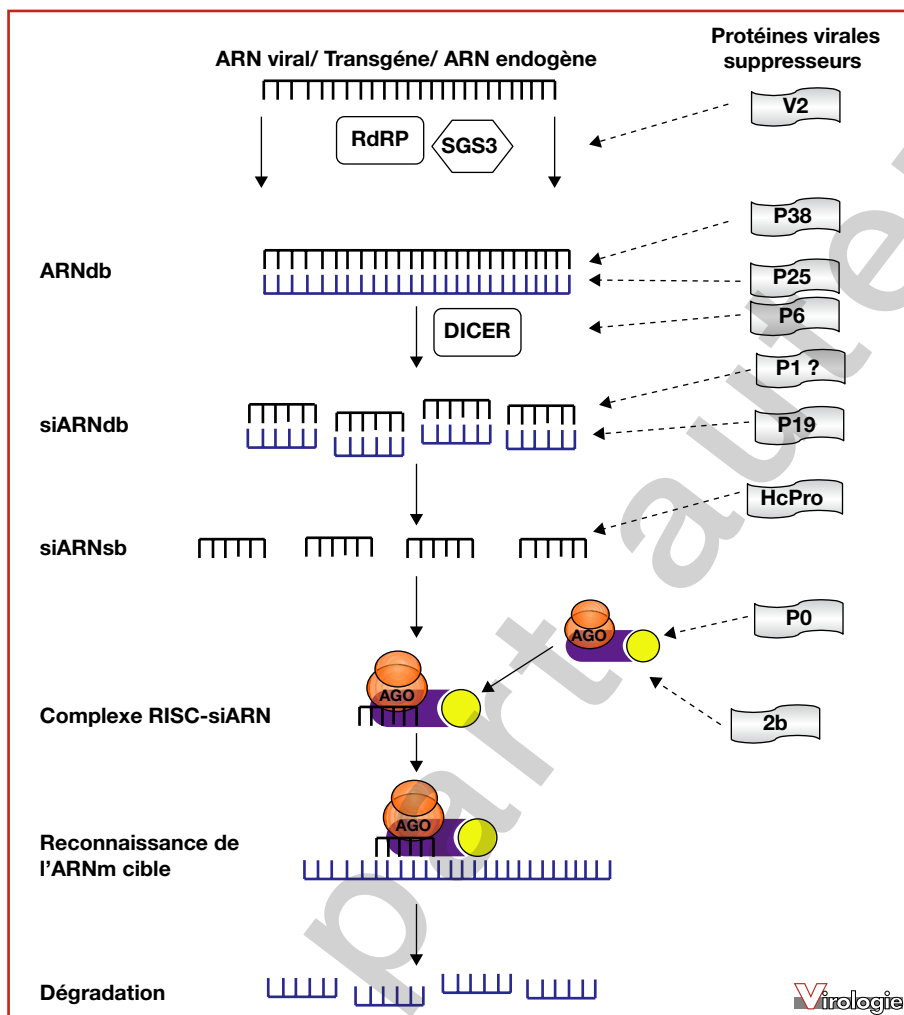


Figure 1. Mécanisme de silencing et mode d'action des supprimeurs. Le silencing est initié par la présence d'ARNdb dont les précurseurs sont soit d'origine endogène (transcrits à partir du génome), soit d'origine exogène, et provenant de molécules étrangères (transgènes ou transcrits viraux) sous l'action d'une RdRp et d'une protéine supprimeur de silencing (SGS3, *suppressor of gene silencing*) issue de la plante (i). L'ARNdb est reconnu spécifiquement par Dicer qui le clive en petits duplex de 21-24 nt appelés siARNs (ii), se dissociant eux-mêmes en ARNsb probablement sous l'action d'une hélicase (iii). Les siARNs ainsi produits par Dicer sont pris en charge par un complexe multiprotéique à activité nucléasique RISC contenant un membre de la famille AGO (iv). Après assemblage, le complexe s'apparie à la molécule d'ARN cible grâce au siRNA (v), puis le dégrade spécifiquement. Pour contourner ce mécanisme, les virus utilisent leurs protéines supprimeuses de silencing qui interfèrent avec cette machinerie de défense de leurs hôtes. Plusieurs supprimeuses de silencing de virus ont été identifiées : V2 interagit avec SGS3 et la RdRp en inhibant la formation d'ARNdb, P38 se lie aux longs ARNdb et empêche l'activité de Dicer, P6 inactive DRB4, une protéine régulatrice de DCL4. HcPro, P19 et probablement P1 se lient aux siARNs empêchant leur incorporation dans le RISC. Quant à P0 et 2b, elles interfèrent directement avec AGO1, P0 en dégradant directement AGO1, 2b en inhibant son activité de clivage.

L'un des deux brins du duplex produit par Dicer est alors incorporé dans un complexe ribonucléoprotéique appelé RISC (*RNA-induced silencing complex*) contenant un membre de la famille Argonaute (AGO). Selon la nature des petits ARNs, ce complexe ainsi formé dégrade spécifiquement les molécules d'ARN simple brin (sb) cellulaires dont la séquence est complémentaire aux petits ARNs, ou bien induit la méthylation de l'ADN complémentaire (siRNA associé à l'hétérochromatine) [8]. Chez l'humain et la dro-

sophile, l'autre brin du duplex de siARN est clivé par la protéine AGO puis dégradé [12]. Dans le cas du silencing contre des ARNs exogènes d'origine virale ou transgénique chez les plantes, le signal silencing peut se propager localement (10 à 15 cellules) hors de la zone d'induction de silencing. Un signal longue distance conduisant au silencing dans les feuilles systémiques se met également en place. Ce signal systémique est amplifié par un membre de la famille des ARNs polymérase ARN dépendante (RDR) et permet ainsi

un mouvement plus important à travers une succession d'amplifications de courte distance, phénomène qui est aussi appelé transitivity [13-15].

Pour contrecarrer ce mécanisme de silencing et réduire l'efficacité de défense des cellules, certaines protéines des virus et des bactéries ont acquis une fonction de suppression de silencing (d'où leur appellation « supprimeurs de silencing ») [16, 17]. Ces protéines, très variées, tant par leur séquence que par leur structure, interviennent à différents niveaux de la cascade d'événements aboutissant à l'extinction des gènes (*figure 1*). Certains séquestrent les siARNs et empêchent leur incorporation dans le complexe RISC ; d'autres agissent sur les enzymes et les cofacteurs des événements de défense antivirale [14, 18, 19].

Malgré l'importance majeure du phénomène de silencing/suppression de silencing dans les relations hôte/pathogène, et l'actualité du sujet due aux avancées rapides et constantes dans ce domaine, il n'existe que très peu de revues en langue française traitant des supprimeurs de silencing. Nous nous proposons ici donc de décrire, au travers d'exemples de supprimeurs de silencing viraux agissant chez les plantes, les principales techniques utilisées pour mettre en évidence et caractériser le mode d'action des protéines impliquées dans ce phénomène.

Méthodes d'identification de la fonction de supprimeur de silencing d'une protéine

Trois méthodes sont principalement utilisées pour mettre en évidence la capacité d'une protéine à se comporter comme un supprimeur de silencing (pour revue [20]).

La technique d'expression transitoire

Établie conjointement par Llave *et al.* [21] et Voynet *et al.* [22], cette méthode est facile à mettre en œuvre et peu onéreuse (*figure 2*). Elle consiste à induire de façon transitoire l'extinction de l'expression d'un gène rapporteur de type GFP (*Green Fluorescent Protein*) dans des plants de *Nicotiana benthamiana* préalablement transformés de façon stable, par introduction de ce même gène rapporteur sous le contrôle d'un promoteur constitutif (lignée 16C, [4]). L'extinction de l'expression du transgène d'intérêt (GFP dans l'exemple cité) est induite par infiltration d'une culture d'*Agrobacterium* contenant une construction inductrice de gène silencing (séquence GFP en orientation sens ou inversée répétée) dans les feuilles de *N. benthamiana*. Le silencing se manifeste alors par une coloration rouge sous UV au niveau de la zone d'infiltration (extinction du transgène rapporteur), alors que le reste de la feuille exprimant la protéine GFP reste vert. Le signal silencing se propage alors à courte distance et de façon systémique ce qui se manifeste d'abord par un anneau rouge autour de la zone d'infiltration, puis par une coloration rouge au niveau des feuilles systémiques non infiltrées. L'infiltration simultanée (co-infiltration) de deux constructions produisant la protéine supprimeur de silencing et un signal inducteur de silencing, permet alors d'évaluer l'effet supprimeur sur le silencing local et systémique (*figure 2*). En revanche, une limite majeure reste le niveau de sensibilité de cette approche. Certains supprimeurs de silencing tels que les protéines 2b, P25, et P38 (*tableau 1*) présentent des niveaux de suppression insuffisants pour être visualisés par cette technique [16]. Dans ce cas, il est nécessaire d'utiliser des techniques alternatives pour évaluer la fonction de suppression de silencing.

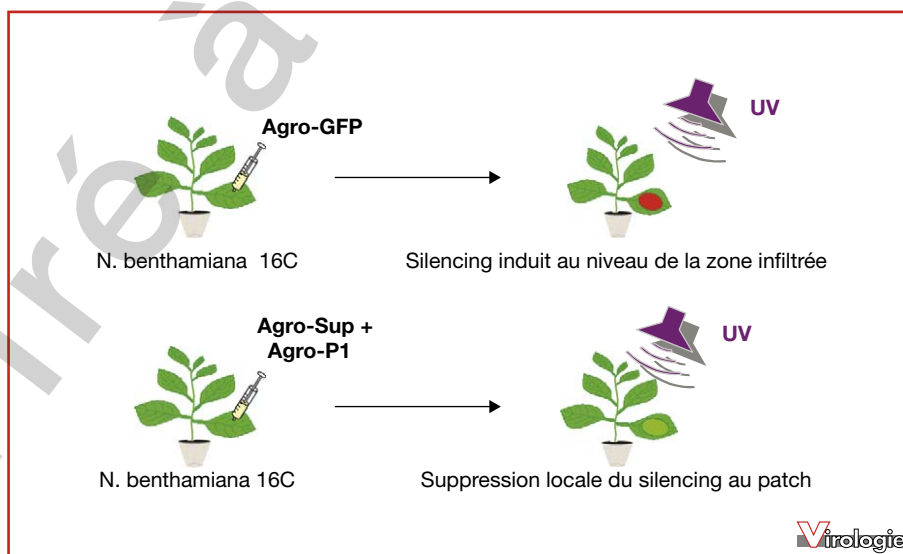


Figure 2. Identification de la fonction de supprimeur par la technique d'expression transitoire.

Tableau 1. Suppresseurs de silencing de phytovirus.

Virus	Protéine supprimeur	Caractéristiques et mode d'action	Références
Virus à ARNsb positif			
Virus de la gravure du tabac (TEV) Virus Y de la pomme de terre (PVY) Virus de la mosaïque jaune du navet (TYMV) Virus de a mosaïque de la canne à sucre (SCMV)	HC-Pro/P1b	Liaison avec les ARNsb, réduction des petits ARNs de 21nt, interfère avec la méthylation des micros et des petits ARNs Régule négativement l'accumulation des siARNs	[25, 50, 75]
Virus du nanisme rabougri de la tomate (TBSV) Virus de la tache annulaire du cybidium (CyRSV) Virus italien de la tache annulaire de l'œillet (CRSV)	P19	Liaison et séquestration des mi et siARNs de 21 nt et bloque la propagation du signal de silencing, augmente l'accumulation des ARNs	[24]
Virus de la mosaïque du concombre (CMV) Virus de l'aspermie de la tomate (TAV)	2b	Bloque le signal du silencing, Interagit avec AGO et l'inhibe	[54]
Virus de la panachure jaune du riz (RYMV)	P1	Nécessaire pour le mouvement du virus,	[23, 24]
Virus de la marbrure du dactyle (CfMV)	P1	Requise pour l'infection systémique	[80]
Virus des jaunisses occidentales de la betterave (BWYV) virus du jaunissement des courges (CABYV)	P0	Indispensable pour la réplication virale Interagit directement avec AGO1	[51, 59]
Virus de la mosaïque jaune de l'orge (BYMV) (Virus de la mosaïque striée de l'orge)	yb	Liaison taille spécifique avec les ARNs (Protéines riches en cystéines)	[29, 32]
Virus X de la pomme de terre (PVX)	P25	bloque la propagation du signal de silencing	[22]
Virus de la jaunisse de la betterave (BYV)	P21	Liaison et séquestration des mi et siARNs de 21nt, augmente l'accumulation des ARNs	[39, 42]
Virus de la tristesse des agrumes (CTV) Virus de la jaunisse nanisante de la betterave (BYSV) (P22)	CP P20 P23	P20 et P23 suppriment le silencing intracellulaire (mais pas la CP) P20 et CP suppriment le silencing intercellulaire (export du signal de silencing), P23 : protéine de liaison aux ARN	[42]
Virus des nervures jaunes et nécrotiques de la betterave (BNYVV)	P14	Faible supprimeur de silencing Liaison avec les petits ARNs	[81]
Virus de l'enroulement de la vigne (GRL-AV)	P24	Fort supprimeur de silencing	[82]
Virus de la mosaïque du tabac (TMV)	P126		[83]
Virus de la mosaïque de la tomate (ToMV)	P130		
Virus de la rattle du tabac (TRV)	16K	Protéines riches en cystéines bloque le silencing local	[84]
Virus du clump de l'arachide (PCV)	P15	Liaison siARNs de 21nt, régule des ARNm cellulaires dimérisation (Protéine riches en cystéines)	[32, 38]
Virus de la mosaïque nécrosée du trèfle violet (RCNMV)	RNA1+P27+ P88+ 3'UTR RNA2	Combinaison d'ARNs et de protéines pour supprimer le silencing	[76]
Virus de Pothos latent	P14	Supprime le silencing sens et IR, liaison avec les ARNdb (Séquestre les long et petits ARNs sens indépendamment de leur taille)	[32, 81]
Virus de la mosaïque du vigna (VPMV)	S protein	Petite protéine de capsid	[85]
Virus de la mosaïque jaune du navet (TYMV)	P69	Augmente l'accumulation des miARNs et des ARNm de DCL1 Empêche la synthèse de RDR-dépendant ARNdb secondaires	[28]
Virus frisolé du navet (TCV)	P38	Protéine de capsid, cible DCL4 et DCL2	[65]

Tableau 1. Suppresseurs de silencing de phytovirus (*fin*).

Virus	Protéine suppresseur	Caractéristiques et mode d'action	Références
Virus de la mosaïque du blé	19K	Protéines riches en cystéines	[86]
Virus A de la vigne (GVA)	P10	Supprime le silencing local et systémique, liaison avec les mi et siARNs (sb ou db)	[82]
Virus de la tache chlorotique du pommier (ACLV)	P50	Supprime le silencing systémique	[87]
Virus à ARNsb négatif			
Virus de la maladie bronzée de la tomate (TSWV)	NSs	Supprime le silencing induit par une séquence sens mais pas celui induit par des séquences répétées inversées	[88]
Virus de la feuille blanche du riz (RHBV)	NS3	Liaison avec les mi et siARNs	[45, 88]
Virus à ARNdb			
Virus du nanisme du riz (RDV)	Pns10	Supprime le silencing local et systémique	[89]
Aspergillus nidulans virus	virus		[90]
Virus à ADNsb			
Virus de l'enroulement jaune de la tomate (TYLCV)	AC2	Interagit avec l'adénosine kinase (ADK) et l'inactive	[91]
Virus de l'enroulement jaune de la tomate (TYLCV)	AC2	NLS	[74]
Virus africain de la mosaïque du manioc (ACMV)	AC2	Transactivateur des gènes viraux et cellulaires Liaison avec les miARNs	[24, 72]
Virus africain de la mosaïque du manioc (CM)	AC4		[92]
Virus sri-lankais de la mosaïque du manioc	AC4		
Virus est-africain de la mosaïque du manioc (CM)	AC2		
Virus indien de la mosaïque du manioc	AC2		
Virus de l'enroulement apical de la betterave (BCTV)	L2	Interagit avec l'adénosine kinase (ADK) et l'inactive	[91]
Virus de l'enroulement jaune de la tomate (Is)	V2	Agit en aval de Dicer Interaction directe avec SGS3	[52, 70]
Satellites associés au virus de l'enroulement jaune de la tomate isolat Y10 chinois	βC1	Liaison des ADNs et NLS	[93]
Satellite DNAB02 du virus de l'enroulement de la tomate de Java (ToLCJAV)	βC1		[94]

Trois à quatre jours après l'agro-infiltration dans la plante transgénique *N. benthamiana* 16C de l'inducteur de silencing (Agro-GFP), un silencing local est déclenché ce qui induit l'extinction de la fluorescence de la GFP sous lumière UV. En conséquence, du fait de la fluorescence de la chlorophylle présente dans les feuilles, la zone infiltrée devient rouge sous lumière UV. La co-infiltration de deux souches d'agrobactéries contenant l'une, le gène de la GFP (Agro-GFP) et l'autre, le suppresseur de silencing putatif (Agro-P1) renseigne sur la fonction de ce dernier. Si le suppresseur candidat interfère avec le silencing, la zone infiltrée reste vert intense. Dans le cas contraire, la zone infiltrée vire au rouge. Agro-GFP : agrobactéries portant le plasmide vecteur exprimant la GFP ; Agro-sup : agrobactéries portant le plasmide vecteur exprimant la protéine P1.

La technique dite de réversion

Cette technique repose sur l'exploitation du mécanisme au cours duquel l'inoculation mécanique directe ou transitée par des agrobactéries d'un virus supprime le silencing ce qui prouve qu'il code un ou plusieurs suppresseurs de silencing. Elle consiste à infecter par le virus candidat, une plante transgénique dite « silencée » pour un gène rapporteur puis à observer la réversion du phénotype de silencing ([23] ; *figure 3*). Si l'infection virale permet à la plante d'exprimer de nouveau le gène rapporteur initialement éteint, le virus code au moins un suppresseur de silencing [24]. L'avantage de cette technique est qu'elle permet d'identifier des protéines dont le pouvoir de suppression de silencing est faible. Il existe toutefois des inconvénients : elle ne permet pas d'évaluer l'effet des suppresseurs sur le mouvement du signal

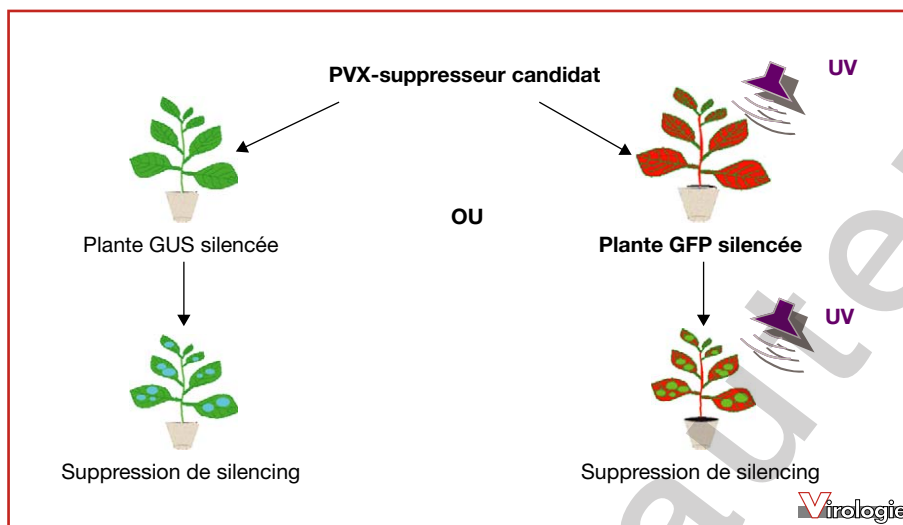


Figure 3. Identification de suppresseur de silencing par la technique de réversion. Les plantes infiltrées avec des agrobactéries porteuses de construits exprimant la GFP ou le GUS (gène de la β -glucuronidase), induisent le silencing local et systémique. Une fois les plantes entièrement silencées pour le gène rapporteur, le virus candidat est inoculé. Si l'infection permet à la plante de restaurer l'expression de la GFP ou de la protéine GUS, le virus code un suppresseur de silencing.

silencing. De même, elle s'avère inefficace pour les suppresseurs viraux qui sont incapables d'inverser le silencing comme c'est le cas de la P25 du PVX par exemple (tableau 1), [22]. Enfin, comme la technique d'expression transitoire, cette technique est très dépendante de l'âge de la plante et des conditions de culture. Pour cela, il est nécessaire d'effectuer les expérimentations en conditions contrôlées.

La technique d'expression constitutive

Elle consiste, soit à croiser une plante transgénique exprimant la protéine virale candidate pour la suppression du silencing avec une plante portant un gène rapporteur soumis au silencing [25], soit en un greffage entre un porte-greffe portant un gène rapporteur soumis au silencing et un greffon exprimant le gène rapporteur et le suppresseur d'intérêt. En l'absence de suppresseur, le signal de silencing venant du porte-greffe se propage dans le greffon pour éteindre le gène rapporteur. À l'inverse, en présence d'un suppresseur qui bloque la production, le mouvement ou la réception du signal de silencing, le greffon n'est pas silencé [26]. La technique de greffage présente deux avantages : elle permet d'une part de mettre en évidence le rôle des suppresseurs dans le silencing systémique [27], et d'autre part, d'identifier les suppresseurs de silencing ayant une activité intercellulaire sans activité intracellulaire. C'est le cas par exemple de la protéine de capsid du virus de la tristesse des agrumes (CTV, *Citrus tristeza virus*) [28]. Toutefois, l'inconvénient majeur de cette technique est la durée et la lourdeur de

l'expérimentation qui nécessite à la fois la production de plantes transgéniques et le greffage de ces plantes entre elles.

Autres techniques d'identification des suppresseurs

En plus des techniques classiques décrites ci-dessus, il existe d'autres méthodes qui permettent une évaluation préliminaire de la fonction de suppression de silencing. Il s'agit de techniques d'expression des protéines candidates en virus hétérologue, fondées soit sur l'observation de l'intensité des symptômes, soit sur leur capacité de complément fonctionnelle. Dans le premier cas, le suppresseur candidat est exprimé à partir d'un vecteur viral (cas du PVX décrit ci-dessus). Cette construction est inoculée à des plantes (*N. benthamiana* par exemple). Si la protéine testée a une activité de suppresseur de silencing, l'infection produite sera aggravée par la présence du suppresseur, ce qui se traduira par une sévérité accrue des symptômes, comparé à ceux observés en absence de la protéine candidate. La seconde technique consiste en une complément fonctionnelle d'une protéine contrôle ayant une activité connue de suppression par une protéine candidate [29]. Dans ce test, l'absence de la protéine contrôle suppresseur se traduit par une baisse de la virulence et donc par l'atténuation des symptômes. Ces propriétés sont restaurées suite à une complément fonctionnelle par la protéine candidate possédant effectivement une activité de suppression de silencing (figure 4).

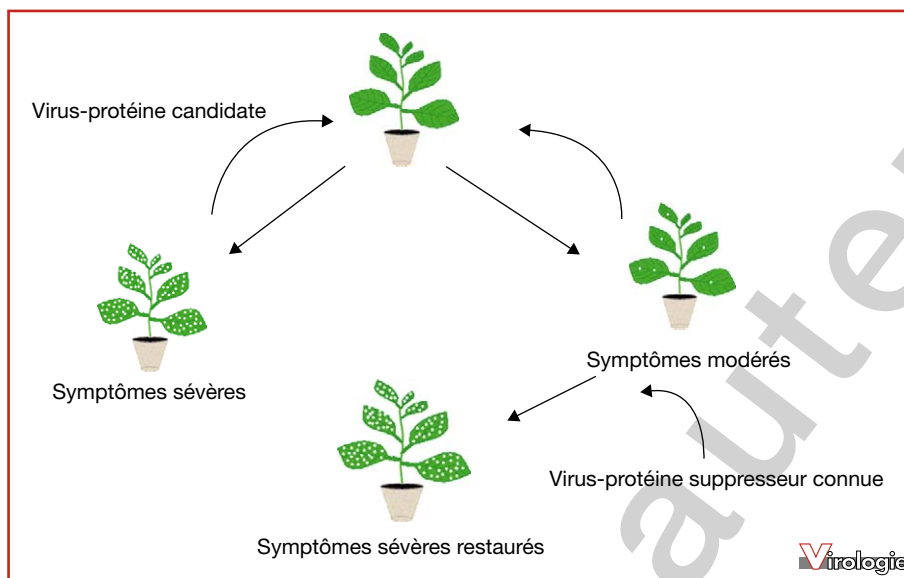


Figure 4. Identification de suppresseur de silencing par la technique de complémentation hétérologue. La suppression ou le remplacement de la protéine inhibitrice du silencing se traduit par une baisse de la virulence et donc par l'atténuation des symptômes. Ces propriétés sont ensuite restaurées suite à une complémentation par un suppresseur connu si la protéine candidate possède une activité de suppression de silencing.

Mode d'action des suppresseurs de silencing

Les virus ont développé des mécanismes très sophistiqués et complexes permettant de contourner le système de défense de la plante qu'est le silencing. Ces mécanismes diffèrent d'un virus à l'autre. En effet, les protéines impliquées dans la suppression de silencing sont variées, tant par leur séquence que par leur structure, ce qui se traduit par une diversité de mécanismes d'action et une diversité des molécules ciblées [25]. Le mécanisme moléculaire de suppression et les modes d'action des différents suppresseurs de silencing ont fait l'objet de nombreuses recherches ces dernières années. Les suppresseurs les plus étudiés sont présentés et regroupés en fonction de leur principal mode d'action.

La suppression de silencing par liaison et séquestration des petits ARNs

La liaison aux siARNs et miARNs (pour revue voir [30]) apparaît comme la stratégie de suppression de silencing la plus répandue chez les plantes, au regard des nombreuses protéines suppresseurs (*tableau 1*) montrant une affinité de liaison à ce type de molécules [31, 32].

La protéine suppresseur type est représentée par la protéine P19 des virus du genre *Tombusvirus* [24], elle est décrite comme une protéine impliquée dans la virulence [33] et le

mouvement à longue distance du virus [34]. La dimérisation de la protéine permet une séquestration spécifique [35] des petits ARNs de 21 pb et empêche ainsi leur incorporation dans le complexe RISC [36]. Le degré de cette liaison P19-siRNA est corrélé, *in vivo*, avec la sévérité de l'infection virale [37, 38].

Dans le cas de la protéine P21 du virus de la jaunisse de la betterave (BYV, *Beet yellows Closterovirus*) c'est la formation d'un octamère qui est nécessaire pour la liaison aux petits ARNs [39, 40], la séquestration des duplex siARN et miARN empêchant la formation du complexe RISC [31, 32, 37]. Contrairement au BYV qui code un seul suppresseur de silencing, le virus de la tristesse des agrumes (CTV, *Citrus tristeza virus Closterovirus*), code trois suppresseurs, P20, P23 et la P25 [41]. P23 est l'homologue de la P21 du BYV, son domaine en doigt de zinc (*zn finger*) agirait en séquestrant les siARN ce qui limiterait leur incorporation dans le complexe RISC [42]. Les protéines P20 et P25 renforceraient l'activité de P23 et leurs actions simultanées expliqueraient la forte virulence de ce virus chez les agrumes [43]. Contrairement aux virus à ARNs positifs décrits ci-dessus, Les Tenuivirus sont des virus à ARNs négatif qui se répliquent à la fois dans les insectes vecteurs et dans les plantes hôtes [44]. Le virus des feuilles blanches du riz (RHBV, *Rice hoja blanca virus*) est transmis par une sauterelle dans laquelle il se réplique avant d'être inoculé dans la plante hôte [44]. La protéine NS3 supprime le silencing par séquestration des si- et miARNs, ce qui limite leur incorporation dans le complexe RISC [45]. Cette liaison est

fortement dépendante de la taille des petits ARNs : elle est 100 fois plus efficace avec les petits ARNs de 21 nt comparé aux 24 nt.

D'autres protéines supprimeuses peuvent avoir plusieurs modes d'action. C'est le cas de la protéine *Helper Component Proteinase* (HC-Pro) des Potyvirus, une protéine multifonctionnelle requise non seulement pour la transmission du virus par son vecteur [46], mais également pour les mouvements de cellule à cellule et à longue distance [47], ainsi que pour la maintenance de l'amplification du génome viral [48]. C'est aussi le premier supprimeur de silencing identifié qui bloque aussi bien le silencing induit par le virus que par un transgène [25]. Plusieurs de ses modes d'action ont été rapportés : capacité à réduire la disponibilité des petits ARNs pour la formation du complexe RISC par séquestration des siARN et miARN de 21-22 nt [21, 31, 37] ; de façon indirecte, activation d'un supprimeur cellulaire *rgs-CaM* (*regulator of gene silencing Calmodulin*) de silencing dans la plante [49]. Enfin, régulation négative de l'accumulation de l'ARNm codant l'ARN polymérase ARN dépendante RDR6 impliquée notamment dans la production de siRNA secondaires [50].

Suppression de silencing par interaction avec les protéines de la voie du silencing

Les protéines supprimeuses interagissent aussi à différents niveaux avec les protéines de la voie du silencing [51, 52]. La protéine 2b des Cucumovirus inhibe l'activité de la protéine Argonaute 1. Elle joue un rôle important dans le mouvement local et systémique [53] et a été identifiée comme supprimeur de silencing dans les feuilles émergentes où elle empêcherait l'initiation du silencing ou la perception du signal systémique du silencing [54]. Elle est cependant incapable d'inhiber le silencing déjà établi [55]. La protéine 2b et AGO1 co-localisent dans les cellules de *N. benthamiana* et co-immunoprécipitent dans des tests d'expression transitoire dans des plants de *A. thaliana* et de concombres infectés par le CMV (*Cucumber mosaic virus*). La protéine 2b interagit directement avec AGO1 au niveau de son site de clivage des ARNs inhibant ainsi cette activité [54]. La protéine 2b agirait également en se liant directement aux siARNs [56] via un domaine NLS (signal de localisation nucléaire) généralement constitué d'une séquence riche en résidus arginine du type $_{22}KRRRRR_{27}$, lequel serait impliqué directement dans la suppression de silencing, suggérant ainsi un mode d'action dans le noyau [57]. La protéine P0 des Polerovirus est un autre exemple d'interaction avec Ago1 qui montre bien la diversité des mécanismes d'interaction sur une même cible. Cette protéine de pathogénie est nécessaire à l'accumulation du virus [58] et a été décrite comme supprimeur de silencing [59]

chez le virus de la jaunisse occidentale de la betterave (BWYV, *Beet western yellow virus*), le virus du jaunissement de la courge (CABYV, *Cucurbit aphid-borne yellow virus*), le virus de l'enroulement de la pomme de terre (PLRV, *Potato leaf roll virus*) et le virus de la feuille jaune de la canne à sucre (SCYLV, *Sugarcane yellow leaf virus*) [60]. En essai transitoire chez *Nicotiana benthamiana*, la protéine P0 se présente comme un supprimeur fort capable de supprimer un silencing artificiellement initié par un inducteur de type « Inverted-Repeat », indiquant qu'elle agirait à une étape située en aval de l'activité de RDR (RNA polymérase RNA dépendante). L'expression transitoire ou constitutive de P0 conduit à la dégradation spécifique de la protéine AGO1 [51] (*figure 1*) via une interaction physique entre P0 et AGO1 confortant ainsi l'hypothèse selon laquelle AGO1 est la cible directe de P0 [52]. Le domaine F-box de la protéine P0 jouerait un rôle important dans l'interaction P0/AGO1 car il est requis pour la suppression de silencing [61]. Ce domaine permet de cibler spécifiquement la protéine AGO1 pour l'adresser via le complexe E3 ubiquitine-ligase vers la voie de dégradation par le protéasome 26S [51, 62].

D'autres protéines virales, supprimeuses de silencing, agissent plus en amont dans la voie du silencing. La protéine de capsid (P38) des Carmovirus par exemple cible les protéines Dicer (*figure 1*). Elle est indispensable pour le mouvement local et systémique du signal silencing chez *N. benthamiana* [41, 63]. Chez *A. thaliana*, elle a été identifiée comme éliciteur de la résistance gène-pour-gène [41] en interagissant directement avec un facteur de transcription de la famille des protéines NAC (Nitrogen Assimilation Control) [64]. Chez le virus frisolé du navet (TCV, *Turnip crinkle virus*), elle a également été identifiée comme supprimeur de silencing [36]. P38 bloque le silencing local et empêche le silencing systémique en inhibant d'abord l'activité de DCL4, puis ensuite celle de DCL2 [14, 15, 65]. Cependant, le mécanisme mis en jeu par la protéine P38 pour inhiber DCL4 n'est pas encore connu. De plus, bien que démontré uniquement *in vitro*, la protéine P38 a aussi une activité de liaison avec les petits et longs ARNdb [21]. Des activités similaires de suppression de silencing associées à la protéine P38 ont été décrites chez plusieurs autres Carmovirus [66].

La protéine P6, protéine de pathogénie du virus à ADNdb de la mosaïque du chou-fleur (CaMV, *Cauliflower mosaic virus*), interagit avec la protéine DRB4, une protéine de régulation de DCL4 et donc nécessaire pour la production des siARNs de 21 nt par DCL4 [67]. Identifiées comme transactivateurs de la traduction et supprimeuses de silencing [68], des molécules de P6 transitent également entre les compartiments nucléo-cytoplasmiques. L'import nucléaire de P6 est nécessaire pour son activité de supprimeur de silencing [69].

Encore plus en amont dans la voie du silencing (*figure 1*), la protéine V2 des Géminivirus inactive la protéine SGS3. La protéine V2, codée par un virus à ADNsb qui se réplique dans le noyau de l'hôte, est également un suppresseur de silencing particulièrement étudié chez le virus de l'enroulement de la tomate (TYLCV, *Tomato yellow curl leaf geminivirus*) [70]. Comme la protéine 2b avec AGO1, la protéine V2 interagit directement avec SGS3 pour inhiber ses activités dans le silencing telles que la production de l'ARNdb, le transport du signal de silencing ou la protection de la matrice ARN pour son amplification par RdR6 [52].

Ces quelques exemples montrent bien la diversité des mécanismes du silencing potentiellement ciblés par les suppresseurs viraux, et suggèrent la très grande capacité des virus à s'adapter à leurs différents hôtes en spécialisant certaines de leurs protéines.

Suppression de silencing par des mécanismes multiples ou combinaison de suppresseurs

Les suppresseurs de silencing peuvent aussi combiner l'inhibition de protéines de la voie de silencing et la séquestration des petits ARNs comme cela a été évoqué pour les protéines 2b, Hc-Pro, P38 citées précédemment. La protéine AC2 aussi dénommée AL2, L2, C2 ou TrAP (*Transcriptional Activator Protein*) serait aussi une protéine de ce type. C'est un facteur de transcription et de pathogénie présent chez tous les Begomovirus (virus ADNsb), indispensable à l'expression de gènes viraux [71], et possédant trois domaines conservés :

- à l'extrémité N terminale, un domaine basique avec un signal de localisation nucléaire ;
- un domaine central avec un motif en doigt de zinc permettant une association avec l'ADN ;
- à l'extrémité C terminal, un domaine activateur acide [72].

Le motif en doigt de zinc et le domaine NLS sont essentiels pour la suppression de silencing par la protéine C2 du virus de l'enroulement jaune de la tomate (TYLCV, *Tomato yellow leaf curl virus*), [73]. La position des cystéines (et parfois des histidines) des protéines suppresseurs riches en résidus cystéines est compatible avec la formation d'une structure en doigt de zinc qui expliquerait leur capacité à fixer les acides nucléiques, comme cela a été démontré pour les protéines γ b et P15 du BSMV et du BNYVV [29, 59], C2 du TYLCV [74] (*tableau 1*), et P1b du CVYV (*Cucumber vein yellowing virus*) [75]. Enfin, le motif NLS qui inclut 4 résidus arginine $_{28}RRRR_{31}$ serait

aussi impliqué dans l'induction de nécroses chez les plantes infectées par le TYLCV [73] (*tableau 1*). Le domaine d'activation serait également nécessaire pour l'inhibition du silencing [72].

Les suppresseurs de silencing décrits ci-dessus sont tous capables d'inhiber de façon individuelle le silencing. Il existe cependant d'autres suppresseurs de silencing qui, pris individuellement, n'ont pas cette capacité. C'est le cas des protéines suppresseurs du virus de la mosaïque nécrosée du trèfle (RCNMV, *Red clover necrotic mosaic*). Le RCNMV appartient au genre *Diantovirus* et à la famille des *Tombusviridae*. C'est un virus à ARNs positif dont le génome est constitué de deux ARNs. L'ARN1 code trois protéines (deux protéines impliquées dans la réplication P27, P88 et la protéine de capsid) et l'ARN2 code la protéine de mouvement [76]. Pour supprimer le silencing, le RCNMV a besoin de plusieurs composants viraux dont l'ARN viral et la réplicase. La combinaison des protéines P27, P88 et l'extrémité 3' non traduite de l'ARN2 sont nécessaires pour supprimer le silencing [77]. Pour se répliquer, le RCNMV inhiberait l'activité des protéines DCL impliquées dans la biosynthèse des si- et miARNs [78].

De cet inventaire, il ressort que les protéines suppresseurs de silencing sont pour la plupart multifonctionnelles et très différentes tant par leur séquence que par leur structure. Leur mode d'action est aussi très variable et intervient à différents niveaux de la voie de silencing. Cette variabilité fonctionnelle existe également au niveau intraspécifique comme cela a été montré pour la protéine P1 du *Rice yellow mottle virus* [24, 79]. La caractéristique commune à la plupart de ces protéines suppresseurs est qu'elles sont des déterminants de la pathogénie et de la gamme d'hôte. Des activités de suppression ont été identifiées aussi bien chez des protéines de fonction structurale pour les capsides (CP) que chez des protéines impliquées dans d'autres fonctions virales, telles les protéines de mouvement, les réplicases et les activateurs de la transcription. Les protéines suppresseurs ciblent principalement les étapes clés de la voie de silencing (i.e DCL, production d'ARN double brin, AGO1). Certaines ont développé plusieurs activités ciblant différentes étapes de cette voie comme les protéines P38, HC-Pro, et 2b. De ce fait, les protéines suppresseurs de silencing apparaissent aussi multifonctionnelles de part l'inhibition du mécanisme de silencing, confirmant ainsi le rôle fondamental du silencing dans l'interaction entre le virus et son hôte. Ainsi récemment, il a été montré que la protéine P1 du RYMV est à la fois suppresseur de silencing et stimulateur du mouvement du signal silencing suggérant ainsi le rôle de ces protéines dans le contrôle de l'infection en maintenant un niveau de réplication compatible avec la survie de l'hôte et la multiplication [79].

Conclusion et perspectives

Depuis plusieurs années, des études ont permis d'identifier et de caractériser des protéines supprimeuses de silencing à partir des virus de plantes à ADN et à ARN. Cette caractéristique commune à presque tous les phytovirus, est également présente chez les virus infectant des animaux. Les protéines supprimeuses de silencing sont pour la plupart des protéines multifonctionnelles qui agissent à différents niveaux de la cascade d'événements conduisant au silencing, une même protéine pouvant parfois agir à différents niveaux. Cette similitude de fonction de la suppression virale chez les plantes et les animaux traduit le caractère ancestral du silencing comme mécanisme de défense. Cependant, pour la plupart, les bases moléculaires de la suppression de silencing ainsi que leur régulation demeurent encore inconnues. L'identification des différents acteurs intervenant dans le processus de silencing permettra de mieux comprendre les mécanismes de défense de la plante ainsi que les mécanismes de contre-défense mis en place par le virus via l'expression de protéine supprimeuse de silencing. Comme les supprimeuses sont souvent des déterminants de la pathogénie des virus, il serait intéressant de déterminer l'effet des supprimeuses sur la sensibilité, la tolérance et la durabilité de la résistance des plantes aux virus. Aussi, la plupart des études menées en vue de l'identification et de la caractérisation des supprimeuses de silencing l'ont été dans des modèles ne correspondant pas à l'hôte naturel des virus. Or, il semble y avoir une spécificité d'hôte dans le mécanisme de silencing. En effet, l'isolat Ci63 de la Côte d'Ivoire du virus RYMV est un supprimeur fort sur le riz mais apparaît faible sur le tabac (*C. Siré* résultat non publié). C'est aussi le cas de l'isolat de Madagascar (Mg1, [79]). Forte de ce constat, l'étude des supprimeuses dans l'hôte naturel devrait permettre de mieux comprendre leurs modes d'action et leurs rôles au cours de l'infection. Enfin, il importe d'explorer comment des facteurs environnementaux tels que la lumière et la température affectent le silencing et sa suppression et l'expression des symptômes induits par les infections virales. La réponse à toutes ces questions contribuera certainement à un meilleur contrôle des maladies virales.

Nous remercions Martine Bangratz-Reyser, Moumouni Konaté et François-Xavier Gillet pour la relecture du document. Drissa Sérémé a bénéficié d'une bourse de thèse du Département Soutien et Formation de l'IRD.

Références

1. Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 1990 ; 2 : 279-89.
2. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998 ; 391 : 806-11.
3. Hamilton AJ, Baulcombe DC. A novel species of small antisense RNA in post-transcriptional gene silencing. *Science* 1999 ; 286 : 950-2.
4. Ruiz F, Vassie L, Klotz K, Sperling L, Madeddu L. Homology-dependent gene silencing in *Paramecium*. *Mol Biol Cell* 1998 ; 9 : 931-43.
5. Romano N, Macino G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol* 1992 ; 6 : 3343-53.
6. Kennerdell JR, Carthew RW. Heritable gene silencing in drosophila using double-stranded RNA. *Nat Biotechnol* 2000 ; 18 : 896-8.
7. Bahramian MB, Zarbl H. Transcriptional and posttranscriptional silencing of rodent $\alpha 1(I)$ collagen by a homologous transcriptionally self-silenced transgene. *Mol Cell Biol* 1999 ; 19 : 274-83.
8. Brodersen P, Voinnet O. The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends in Genet* 2006 ; 22 : 268-80.
9. Chapman EJ, Carrington JC. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat Rev Genet* 2007 ; 8 : 884-96.
10. MacRae IJ, Doudna JA. Ribonuclease revisited: structural insights into ribonuclease III family enzymes. *Curr Opin Struct Biol* 2007 ; 17 : 138-45.
11. Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, Kasschau KD, Carrington JC, Voinnet O. Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 2006 ; 313 : 68-71.
12. Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD. Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 2005 ; 123 : 607-20.
13. Himber C, Dunoyer P, Moissiard G, Ritzenthaler C, Voinnet O. Transitivity-dependent and independent cell-to-cell movement in RNA silencing. *EMBO J* 2003 ; 22 : 4523-33.
14. Ding SW, Voinnet O. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 2007 ; 130 : 413-26.
15. Moissiard G, Parizotto EA, Himber C, Voinnet O. Transitivity in Arabidopsis can be primed, requires the redundant action of the antiviral Dicer-like 4 and Dicer-like 2, and is compromised by viral-encoded suppressor proteins. *RNA* 2007 ; 13 : 1268-78.
16. Navarro L, Jay F, Nomura K, He SY, Voinnet O. Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science* 2008 ; 321 : 964-7.
17. Mosher RA, Baulcombe DC. Bacterial pathogens encode suppressors of RNA-mediated silencing. *Genome Biol* 2008 ; 9 : 237.
18. Qu F, Ye X, Hou G, Sato S, Clemente TE, Morris TJ. RDR6 Has a Broad-Spectrum but Temperature-Dependent Antiviral Defense Role in *Nicotiana benthamiana*. *J Virol* 2005 ; 79 : 15209-17.
19. Levy A, Dafny-Yelin M, Tzfira T. Attacking the defenders: plant viruses fight back. *Trends in Microbiol* 2008 ; 16 : 194-7.
20. Roth BM, Pruss GJ, Vance VB. Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Res* 2004 ; 102 : 97-108.
21. Llave C, Kasschau KD, Carrington JC. Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. *Proc Natl Acad Sci* 2000 ; 97 : 13401-6.
22. Voinnet O, Lederer C, Baulcombe DC. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 2000 ; 103 : 157-67.
23. Siré C, Bangratz-Reyser M, Fargette D, Brugidou C. Genetic diversity and silencing suppression effects of *Rice yellow mottle virus* and the P1 protein. *Virology journal* 2008 ; 5 : 55.
24. Voinnet O, Pinto YM, Baulcombe DC. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci* 1999 ; 96 : 14147-52.
25. Anandalakshmi R, Pruss GJ, Ge X, et al. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci* 1998 ; 95 : 13079-84.
26. Palauqui JC, Elmayer T, Pollien JM, Vaucheret H. Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is

- transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *EMBO J* 1997 ; 16 : 4738-45.
27. Mallory AC, Mlotshwa S, Bowman LH, Vance VB. The capacity of transgenic tobacco to send a systemic RNA silencing signal depends on the nature of the inducing transgene locus. *Plant J* 2003 ; 35 : 82-92.
28. Chen J, Li W, Xie D, Peng J, Ding S. Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of microRNA in host gene expression. *Plant Cell* 2004 ; 16 : 1302-13.
29. Yelina NE, Savenkov EI, Solovyev AG, Morozov S, Valkonen JPT. Long-distance movement, virulence, and RNA silencing suppression controlled by a single protein in hordeiaid potyviruses: complementary functions between virus families. *J Virol* 2002 ; 76 : 12981-91.
30. Voinnet O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet* 2005 ; 6 : 206-20.
31. Lakatos L, Csorba T, Pantaleo V, Chapman EJ, Carrington JC, Liu YP, et al. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J* 2006 ; 25 : 2768-80.
32. Merai Z, Kerenyi Z, Kertesz S, Magna M, Lakatos L, et al. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol* 2006 ; 80 : 5747-56.
33. Dalmay T, Rubino L, Burgyan J, Kollar A, Russo M. Functional analysis of Cymbidium ringspot virus genome. *Virology* 1993 ; 194 : 697-704.
34. Scholthof HB, Scholthof KB, Kikkert M, Jackson AO. Tomato bushy stunt virus spread is regulated by two nested genes that function in cell-to-cell movement and host-dependent systemic invasion. *Virology* 1995 ; 213 : 425-38.
35. Vargason JM, Szittyá G, Burgyan J, Tanaka HTM. Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 2003 ; 115 : 799-811.
36. Qu F, Morris TJ. Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by Tomato bushy stunt virus is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. *Mol Plant-Microbe Interact* 2002 ; 15 : 193-202.
37. Chapman EJ, Prokhnevsky AI, Gopinath K, Dojia V, Carrington JC. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev* 2004 ; 18 : 1179-86.
38. Dunoyer P, Lecellier CH, Parizotto EA, Himber C, Voinnet O. Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* 2004 ; 16 : 1235-50.
39. Reed JC, Kasschau KD, Prokhnevsky AI, Gopinath K, Pogue GP, Carrington JC, et al. Suppressor of RNA silencing encoded by Beet yellows virus. *Virology* 2003 ; 306 : 203-9.
40. Ye K, Patel DJ. RNA silencing suppressor p21 of beet yellows virus forms an RNA binding octameric ring structure. *Structure (Camb)* 2005 ; 13 : 1375-84.
41. Kachroo P, Yoshioka K, Shah J, Dooner HK, Klessig DF. Resistance to Turnip crinkle virus in *Arabidopsis* is regulated by two host genes, is salicylic acid dependent but NPR1, ethylene and jasmonate independent. *Plant Cell* 2000 ; 12 : 677-90.
42. Lu R, Folimonov A, Shintaku M, et al. Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc Natl Acad Sci* 2004 ; 101 : 15742-7.
43. Satyanarayana T, Gowda S, Boyko VP, Albiach-Marti MR, Mawassi M, Navas-Castillo J, et al. An engineered closterovirus RNA replicon and analysis of heterologous terminal sequences for replication. *Proc Natl Acad Sci* 1999 ; 96 : 7433-8.
44. Falk BW, Tsai JH. Biology and molecular biology of viruses in the genus Tenuivirus. *Annu Rev Phytopathol* 1998 ; 36 : 139-63.
45. Hemmes H, Lakatos L, Goldbach R, Burgyan J, Prins M. The NS3 protein of Rice hoja blanca tenuivirus suppresses RNA silencing in plant and insect hosts by efficiently binding both siRNAs and miRNAs. *RNA* 2007 ; 13 : 1-11.
46. Lopez-Moya JJ, Canto T, Diaz-Ruiz JR, Lopez-Abella D. Transmission by aphids of a naturally non-transmissible plum pox virus isolate with the aid of potato virus Y helper component. *J Gen Virol* 1995 ; 76 : 2293-7.
47. Maia IG, Haenni AL, Bernardi F. Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. *J Gen Virol* 1996 ; 77 : 1335-41.
48. Pruss G, Ge X, Shi XM, Carrington JC, Vance VB. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broadrange pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 1997 ; 9 : 859-68.
49. Anandalakshmi R, Marathe R, Ge X, Herr JM, Mau C, Mallory A, et al. A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 2000 ; 290 : 142-4.
50. Zhang X, Du P, Lu L, et al. Contrasting effects of HC-Pro and 2b viral suppressors from Sugarcane mosaic virus and Tomato aspermy cucumovirus on the accumulation of siRNAs. *Virology* 2008 ; 374 : 351-60.
51. Bortolamiol D, Pazhouhandeh M, Marrocco K, Genschik P, Ziegler-Graff V. The polerovirus F box protein P0 targets Argonaute1 to suppress RNA silencing. *Curr Biol* 2007 ; 17 : 1615-21.
52. Glick E, Zrachya A, Levy Y, Mett A, Gidoni D, Belausov E, et al. Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proc Natl Acad Sci* 2008 ; 1 : 157-61.
53. Wang Y, Tzfira T, Gaba V, Citovsky V, Palukaitis P, Gal-On A. Functional analysis of the Cucumber mosaic virus 2b protein: pathogenicity and nuclear localization. *J Gen Virol* 2004 ; 85 : 3135-47.
54. Zhang X, Yuan YR, Pei Y, et al. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev* 2006 ; 20 : 3255-68.
55. Brigneti G, Voinnet O, Li WX, Ji LH, Ding SW, Baulcombe D. Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J* 1998 ; 17 : 6739-46.
56. Goto K, Kobori T, Kosaka Y, Natsuaki T, Masuta C. Characterization of silencing suppressor 2b of Cucumber mosaic virus based on examination of its small RNA-binding abilities. *Plant Cell Physiol* 2007 ; 48 : 1050-60.
57. Lucy AP, Guo HS, Li WX, Ding SW. Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J* 2000 ; 19 : 1672-80.
58. Sadowy E, Maasen A, Juszczuk M, et al. The ORF0 product of Potato leafroll virus is indispensable for virus accumulation. *J Gen Virol* 2001 ; 82 : 1529-32.
59. Pfeiffer S, Dunoyer P, Heim F, Richards KE, Jonard G, Ziegler-Graff V. P0 of beet western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J Virol* 2002 ; 76 : 6815-24.
60. Mangwende T, Wang ML, Borth W, Hu J, Moore HP, Mirkov ET, et al. The P0 gene of *Sugarcane yellow leaf virus* encodes an RNA silencing suppressor with unique activities. *Virology* 2009 ; 384 : 38-50.
61. Pazhouhandeh M, Dieterle M, Marrocco K, et al. F-box-like domain in the Polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc Natl Acad Sci* 2006 ; 103 : 1994-9.
62. Baumberger N, Tsai CH, Lie M, Havecker E, Baulcombe DC. The Polerovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr Biol* 2007 ; 17 : 1609-14.
63. Kong Q, Wang J, Simon AE. Satellite RNA-mediated resistance to turnip crinkle virus in *Arabidopsis* involves a reduction in virus movement. *Plant Cell* 1997 ; 9 : 2051-63.

64. Ren T, Qu F, Morris TJ. HRT gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to *Turnip crinkle virus*. *Plant Cell* 2000 ; 12 : 1917-25.
65. Qu F, Ren T, Morris TJ. The coat protein of Turnip crinkle virus suppresses post transcriptional gene silencing at an early initiation step. *J Virol* 2003 ; 77 : 511-22.
66. Qu F, Morris TJ. Suppressors of RNA silencing encoded by plant viruses and their role in viral infections. *FEBS Letters* 2005 ; 579 : 5958-64.
67. Haas G, Azevedo J, Moissiard G, le Geldreich A, Himber C, Bureau M, *et al*. Nuclear import of CaMV P6 is required for infection and suppression of the RNA silencing factor DRB4. *EMBO J* 2008 ; 27 : 2102-12.
68. Love AJ, Laird J, Holt J, Hamilton AJ, Sadanandom A, *et al*. Cauliflower mosaic virus protein P6 is a suppressor of RNA silencing. *J Gen Virol* 2007 ; 88 : 3439-44.
69. Haas M, Geldreich A, Bureau M, *et al*. The open reading frame VI product of cauliflower mosaic virus is a nucleocytoplasmic protein: its N terminus mediates its nuclear export and formation of electron-dense viroplasm. *Plant Cell* 2005 ; 17 : 927-43.
70. Zrachya A, Glick E, Levy Y, Arazi T, Citovsky V, Gafni Y. Suppressor of RNA silencing encoded by Tomato yellow leaf curl virus-Israel. *Virology* 2007 ; 358 : 159-65.
71. Sunter G, Bisaro DM. Identification of a minimal sequence required for activation of the tomato golden mosaic virus coat protein promoter in protoplasts. *Virology* 2003 ; 305 : 452-62.
72. Trinks D, Rajeswaran R, Shivaprasad PV, Akbergenov R, Oakeley EJ, Veluthambi K, *et al*. Suppression of RNA silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *J Virol* 2005 ; 79 : 2517-27.
73. Dong X, van Wezel R, Stanley J, Hong Y. Functional characterization of the nuclear localization signal for a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J Virol* 2003 ; 77 : 7026-33.
74. Van Wezel R, Liu H, Wu Z, Stanley J, Hong Y. Contribution of the zinc finger to zinc and DNA binding by a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J Virol* 2003 ; 77 : 696-700.
75. Valli A, Dujovny G, Garcia JA. Protease activity, self interaction, and small interfering RNA binding of the silencing suppressor P1b from Cucumber vein yellowing ipomovirus. *J Virol* 2008 ; 82 : 974-86.
76. Lommel SA, Xiong Z, Weston-Fina M, Lomonosoff G. The nucleotide sequence and gene organization of red clover necrotic mosaic virus RNA-2. *Nucleic Acids Res* 1988 ; 16 : 8587-602.
77. Takeda A, Tsukuda M, Mizumoto H, Okamoto K, Kaido M, Mise K, *et al*. A plant RNA virus suppresses RNA silencing through viral RNA replication. *EMBO J* 2005 ; 24 : 3147-57.
78. Shi Y, Gu M, Fan Z, Hong Y. RNA silencing suppressors: how viruses fight back. *Future Virol* 2008 ; 3 : 125-33.
79. Lacombe S, Bangratz M, Vignols F, Brugidou C. The Rice yellow mottle virus P1 exhibits dual functions to suppress and activate gene silencing. *Plant J* 2009 ; 10.1111/j.1365-313X.2009.04062.x.
80. Sarmiento C, Gomez E, Meier M, Kavanagh TA, Truve E. Cocksfoot mottle virus P1 suppresses RNA silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana tabacum*. *Virus Research* 2007 ; 123 : 95-9.
81. Merai Z, Kerenyi Z, Molnar A, Barta E, Valoczi A, Bisztray G, *et al*. Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. *J Virol* 2005 ; 79 : 7217-26.
82. Chiba M, Reed JC, Prokhnevsky AI, Chapman EJ, Mawassi M, Koonin EV, *et al*. Diverse suppressors of RNA silencing enhance agroinfection by a viral replicon. *Virology* 2006 ; 346 : 7-14.
83. Liu JZ, Blancaflor EB, Nelson RS. The Tobacco mosaic virus 126-kilodalton protein, a constituent of the virus replication complex, alone or within the complex aligns with and traffics along microfilaments. *Plant Physiology* 2005 ; 138 : 1853-65.
84. Martínez-Priego L, Donaire L, Barajas D, Llave C. Silencing suppressor activity of the Tobacco rattle virus-encoded 16-kDa protein and interference with endogenous small RNA-guided regulatory pathways. *Virology* 2008 ; 376 : 346-56.
85. Liu L, Grainger J, Canizares MC, Angell SM, Lomonosoff GP. Cowpea mosaic virus RNA-1 acts as an amplicon whose effects can be counteracted by a RNA-2-encoded suppressor of silencing. *Virology* 2004 ; 323 : 37-48.
86. Te J, Melcher U, Howard A, Verchot-Lubicz J. Soilborne wheat mosaic virus (SBWMV) 19K protein belongs to a class of cysteine rich proteins that suppress RNA silencing. *Virol J* 2005 ; 2 : 18.
87. Yaegashi H, Takahashi T, Isogai M, Kobori T, Ohki S, *et al*. Apple chlorotic leaf spot virus 50 kDa movement protein acts as a suppressor of systemic silencing without interfering with local silencing in *Nicotiana benthamiana*. *J Gen Virol* 2007 ; 88 : 316-24.
88. Bucher E, Sijen T, De Haan P, Goldbach R, Prins M. Negative-strand tospoviruses and tenuiviruses carry a gene for a suppressor of gene silencing at analogous genomic positions. *J Virol* 2003 ; 77 : 1329-36.
89. Cao X, Zhou P, Zhang X, Zhu S, Zhong X. Identification of an RNA silencing suppressor from a plant double-stranded RNA virus. *J Virol* 2005 ; 79 : 13018-27.
90. Hammond TM, Andrews MD, Roossinck MJ, Keller NP. Aspergillus mycoviruses are targets and suppressors of RNA silencing. *Eukaryotic Cell* 2008 ; 7 : 350-7.
91. Wang H, Buckley KJ, Yang X, Buchmann RC, Bisaro DM. Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *J Virol* 2005 ; 79 : 7410-8.
92. Vanitharani R, Chellappan P, Pita JS, Fauquet CM. Differential roles of AC2 and AC4 of cassava geminiviruses in mediating synergism and suppression of posttranscriptional gene silencing. *J Virol* 2004 ; 78 : 9487-98.
93. Cui X, Li G, Wang D, Hu D, Zhou XA. Begomovirus DNAbeta-encoded protein binds DNA, functions as a suppressor of RNA silencing, and targets the cell nucleus. *J Virol* 2005 ; 79 : 10764-75.
94. Kon T, Kuwabara K, Hidayat SH, Ikegami M. A begomovirus associated with ageratum yellow vein disease in Indonesia: evidence for natural recombination between tomato leaf curl Java virus and Ageratum yellow vein virus-[Java]. *Arch Virol* 2007 ; 152 : 1147-57.

CHAPITRE 2

**Caractérisation biologique et moléculaire d'un nouveau
sobémovirus au Burkina Faso (Afrique de l'Ouest)**

2.1. Introduction

Les virus sont présents chez tous les êtres vivants, des archaebactéries aux eucaryotes. Ils ont des impacts considérables sur le fonctionnement des écosystèmes et sur la santé humaine. Les virus de plantes infectent la quasi-totalité des cultures dans les écosystèmes très variés. De nouveaux virus sont constamment mis en évidence chez les plantes cultivées et constituent des menaces importantes pour l'agriculture. Ces virus évoluent au fil du temps à la faveur d'une perturbation de l'écosystème notamment l'introduction de nouvelles espèces et des changements dans les pratiques culturales, de telle sorte qu'un virus ne causant pas de dommages sur les cultures peut devenir un problème majeur. L'émergence de ces virus est liée à différents facteurs parmi lesquels on peut citer l'introduction de variétés inadaptées aux conditions agro-écologique et les modifications des pratiques culturales qui favorisent le transfert des pathogènes des plantes sauvages aux plantes cultivées notamment les céréales (Anderson *et al.*, 2004). Les plantes sauvages constituent des hôtes alternatifs qui jouent un rôle important dans l'émergence et la propagation des virus. Au regard de ces observations, la prospection, l'identification et la caractérisation de nouveaux virus est une nécessité pour contrecarrer d'éventuelles épidémies. En effet, la mise au point de toute lutte efficace est basée sur la connaissance de l'agent pathogène responsable. C'est pourquoi, comme indiqué dans l'article 2, nous avons réalisé des prospections dans plusieurs régions du Burkina Faso afin d'identifier les virus potentiellement capables d'infecter aussi bien les graminées sauvages que les plantes cultivées. Au cours de ces prospections, des plants d'*Imperata cylindrica* et de maïs ont été observés avec des symptômes de panachure jaune. Nos travaux ont ainsi permis d'identifier l'agent pathogène responsable des symptômes observés sur les deux espèces végétales. L'utilisation de technique originale combinant des adaptateurs et des amorces spécifiques (Annexe 6) a permis d'amplifier et de séquencer le génome entier de ce pathogène et de le classer par rapport aux autres virus. Il s'agit d'un virus à ARNs positif d'environ 32 nm de diamètre. Il est mécaniquement transmissible mais n'est pas transmis par les semences et appartient au genre *Sobemovirus*. Les résultats détaillés sur la caractérisation biologique et moléculaire du nouveau virus sont présentés dans l'article 2.

2.2. Article 2 : Biological and molecular characterization of a putative new sobemovirus infecting *Imperata cylindrica* and maize in Africa (Séréme *et al.*, 2008a. *Archives of Virology* 153 : 1813-1820).

Biological and molecular characterization of a putative new sobemovirus infecting *Imperata cylindrica* and maize in Africa

Drissa Sérémé · Séverine Lacombe · Moumouni Konaté · Agnès Pinel-Galzi ·
Valentin Stanislas Edgar Traoré · Eugénie Hébrard · Oumar Traoré ·
Christophe Brugidou · Denis Fargette · Gnissa Konaté

Received: 16 May 2008 / Accepted: 27 July 2008 / Published online: 8 September 2008
© Springer-Verlag 2008

Abstract A new virus was isolated from both the grass *Imperata cylindrica* and maize plants that had yellow mottle symptoms in Burkina Faso, West Africa. The virus has isometric particles ca. 32 nm in diameter. The experimental host range was restricted to *Rottboellia exaltata*. Virions were isolated from leaves of systemically infected maize plants. Koch's postulates were completed by mechanically inoculating uninfected *Imperata* or maize with either purified virus or sap from infected *Imperata* plants. Virion preparations were used to produce a specific polyclonal antiserum, and an enzyme-linked immunosorbent assay test was set up. The full genome of the virus was sequenced, and it comprised 4,547 nucleotides. Phylogenetic studies indicated that the virus is closely related to rice yellow mottle virus, a sobemovirus that infects monocotyledons in Africa, and is more distantly related to cocksfoot mottle virus, another sobemovirus that infects monocotyledons. Although the virus can infect *R. exaltata* experimentally, it differs from *Rottboellia* yellow mottle

virus, a member of a tentative species of the genus *Sobemovirus* that also infects monocotyledons in Africa. Particle morphology, serological properties, genomic organization, and phylogenetic analysis are all consistent with assignment of the new virus to the genus *Sobemovirus*. The name *Imperata* yellow mottle virus is proposed.

Introduction

In recent decades, plant viruses that originated in wild grasses or other wild plants have become increasingly important throughout the world because of their substantial impact on agricultural production. Several of the most damaging plant viruses that can cause epidemics occur in the tropics. Some of them have emerged in Africa, such as rice yellow mottle virus (RYMV), cassava mosaic geminiviruses (CMGs), maize streak virus (MSV), and banana streak virus (BSV) [8]. RYMV is a member of the genus *Sobemovirus* [15], which was first reported in 1966 in Kenya [3]. Characterized as emergent [2], RYMV causes one of the most damaging diseases in rice in Africa. Its variability in several countries of Africa has been studied [9]. Of the 15 viruses known to affect rice [13, 19], only rice stripe necrosis virus (RSNV) and RYMV occur in Africa [14]. Several viruses affect maize in Africa, and MSV (genus *Mastrevirus*, family *Geminiviridae*) is the most important one reported in tropical Africa [27] because it causes a major constraint on maize production in Africa [5].

The emergence of these viruses is associated with a range of causal factors. These factors include changes in agricultural practices that favor the transfer of pathogens from wild grasses to cultivated plants such as cereals [2, 8],

The sequence presented in this paper has been submitted to the DDBJ/EMBL/GenBank database and assigned accession number AM990928.

D. Sérémé (✉) · M. Konaté · V. S. E. Traoré · O. Traoré ·
G. Konaté

Laboratoire de virologie et de biotechnologies végétales,
Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles
(INERA), 01 BP 476 Ouagadougou 01, Burkina Faso
e-mail: sereme@gmail.com

S. Lacombe · C. Brugidou
Institut de Recherche pour le Développement (IRD)
UMR 5096/GDP, Montpellier, France

A. Pinel-Galzi · E. Hébrard · D. Fargette
Institut de Recherche pour le Développement (IRD)
UMR 186/RPB, Montpellier, France

which means that the extensive growth of grasses is one of the risk factors leading to the emergence of plant viruses.

Indeed, wild grasses ensure host continuity in time and space, which facilitates virus spread. In order to identify potential viruses that are able to infect species of wild *Poaceae*, surveys were conducted in several regions of Burkina Faso in 2000. *Imperata cylindrica* and maize plants with yellow mottle symptoms were observed in rice and maize fields, respectively. Investigations were then done to determine the causal agent of this disease. *I. cylindrica* is a perennial grass originating from Southeast Asia. Maize is one of the most important food crops of Sub-Saharan Africa. After performing inoculation studies in *Imperata* and maize, a virus was suspected to be responsible for the yellowing and mottling observed in these plants, and an isometric virus with similar size and symptoms as sobemoviruses was indeed isolated from symptomatic *Imperata* and maize plants [21]. Here, we report the purification, serological relationships and information on the biological properties of this new virus. We also report the sequencing of the complete viral genome and compare its sequence to those of other sobemoviruses. This virus is the tenth fully sequenced sobemovirus and the third sobemovirus that infects monocotyledons in Africa. We propose the name *Imperata yellow mottle virus* for this novel sobemovirus.

Materials and methods

Virus source and propagation

The original isolates were collected in 2000 from naturally infected *I. cylindrica* plants in rice fields in the southwestern region of Burkina Faso (West Africa). Infected *Imperata* leaves were ground in 0.01 M potassium phosphate buffer (pH 7.0) containing carborundum powder (600 mesh). The extract was rubbed onto the leaves of test plants. Inoculated plants were kept in an insect-proof greenhouse at 25–30°C at a relative humidity of 80–90%. To identify the natural host range of *Imperata yellow mottle virus* (IYMV), a survey was conducted in the southwest region of Burkina Faso. Fifty leaf samples with symptoms of mosaic, mottling, or necrosis were collected from *I. cylindrica*, rice, maize, sorghum plants, and wild grasses.

To determine the experimental host range, young *I. cylindrica* leaves showing severe symptoms were ground in 0.01 M potassium phosphate buffer (pH 7.0, 1 g tissue to 5 ml buffer), and the extract was used to mechanically inoculate the surface of carborundum-dusted leaves of test plants. Twenty plants, of seven species belonging to the *Poaceae* family, were inoculated as described above. The

seven species included *Zea mays*, *Sorghum bicolor*, *Penisetum glaucum*, *Oryza sativa*, and three wild grass species (*R. exaltata*, *Oryza longistaminata*, and *Echinochloa colona*). All plants were grown in 1-l plastic buckets, maintained in an insect-proof greenhouse, and observed for symptom development. In order to reproduce disease symptoms, *I. cylindrica* plantlets were also mechanically inoculated with extracts from infected test plants and/or field-infected *Imperata* plants. Inoculated leaves as well as leaves that emerged after inoculation were tested by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 3–6 weeks post-inoculation. The mean absorbance value from healthy controls plus three times the standard deviation was taken as the negative-positive threshold. The presence of virus in symptomless test plants was evaluated by back-inoculation to maize (var. FBC6).

Seed transmission

Seed transmission of IYMV was tested in seed batches collected from mechanically inoculated maize plants (var. FBC6). Infected plants were identified by the symptoms that developed and/or by ELISA. The plants were then kept until seed maturation, and collected seeds were sown in steam-sterilized soil after drying at room temperature. Seeds collected from uninfected plants were used as controls. Six weeks after sowing, seedlings were tested for IYMV. One hundred seedlings were grown, observed daily for IYMV symptoms, and assayed by ELISA.

Virus purification and viral RNA extraction

Virus was maintained in the susceptible maize cultivar (var. FBC6) by mechanical inoculation as described above. Leaves showing typical yellow mottle symptoms were harvested 4 weeks after inoculation and used to purify IYMV using the protocol developed by Bakker [3] for RYMV. Virus concentration was estimated by spectrophotometry, assuming an extinction coefficient of $E(0.1\%, 260\text{ nm}) = 6.5$, based on the value calculated for RYMV (*Sobemovirus*) particles [3]. Viral RNA was extracted from 100 μl of purified virions at 16 mg/ml. The RNeasy Plant Mini kit (QIAGEN) was used following the manufacturer's instructions, and RNA was kept at -20°C .

In vitro properties

The thermal inactivation point was tested by loading sap extracts from *Imperata* leaves into thin-walled tubes in a water bath at various temperatures for 10 min. To test aging in vitro, the infectivity of sap kept at room temperature (29°C) was determined every other day for 2 weeks. Ten young plants were inoculated with the sap. The IYMV

particles recovered from the final ultracentrifugation pellet were negatively stained with an aqueous solution of 2% (w/v) uranyl acetate. A JEOL electron microscope model 100CX II, (JEOL, Tokyo, Japan) was used at a magnification of ca. 14,000 \times to examine virion preparations.

Antiserum production and serological test

Antiserum to IYMV was obtained from a rabbit immunized with purified IYMV. A volume of 0.5 ml of freshly purified IYMV suspension at a concentration of 1 mg/ml was emulsified with 0.5 ml of Freund's incomplete adjuvant and used to immunize a rabbit. Four weekly intramuscular injections of virus preparation were given, alternately using left and right thigh muscles. One week after the fourth injection, the rabbit was bled, and the serum was collected and stored at -20°C . Tests with polyclonal antibodies were conducted in Indirect Antigen-Coated Plate-ELISA (IACP-ELISA) as described by Clark and Adams [7]. Absorbances at 405 nm were read using a Metertech Σ 960 microplate reader.

cDNA synthesis, cloning and sequencing

First-strand cDNA was synthesized with the reverse transcriptase polymerase chain reaction (First-strand RT-PCR kit, Stratagene Ltd) following the manufacturer's instructions, with 10 μl of RNA in a 50- μl volume and using the degenerate primer *sob*_{AS} 5'-RTCNCCCATNGCDATRCA CCA-3'. For the PCR step, a combination of *sob*_{AS} and the forward degenerate primer *sob*_A 5'-CCNTCNAARCCNG GNATGGG-3' was used. The primers were designed to amplify the conserved sobemovirus polymerase region [22].

This primer pair generated ca. 340-bp products that were sequenced in both directions. The sequence obtained was 356 nt long.

The small RNA-cloning protocol developed by Chappell et al. [6] was modified to sequence the remaining part of the IYMV genome on the 5' and 3' sides of the 356-nt fragment. Briefly, 200 pmol of a 5' adapter (5'-TGGG AATTCCTCACTrArArA-3') and 200 pmol of a 3' adapter (5'-PrUrUrUCTATCCATGGACTGTidT-3') were ligated independently to purified virus RNA using T4 RNA ligase, in accordance with the manufacturer's instructions (Promega). Ligated RNA was reverse transcribed with the Stratascript reverse transcription kit (Stratagene). The RT reaction on the 5' side of the 356-nt fragment was performed with the 5' adapter-ligated RNA using SDRiymv designed from the known sequence. A primer designed to anneal to the 3' adapter was used to perform RT transcription from the 3' adapter-ligated RNA. For the 5' end, PCR amplification reactions were performed using 5' adapter forward primer (5'-CATGGGAATTCCTCACT AAA-3') in combination with reverse IYMV-specific primers SDRiymv, SDR2iymv, SDR3iymv, SDR4iymv, and SDR5iymv. In total, five consecutive experiments were necessary to amplify overlapping fragments A, B, C, D, and E (Fig. 1). The 3'-end PCR amplifications were performed using forward IYMV-specific primers SDFiymv, SDF2iymv, and SDF3iymv in combination with a 3' adapter-reverse primer (5'-TACAGTGAATTCATA GAAA-3'). Each amplification generated one of the overlapping fragments G, H and I (Fig. 1). The amplification products were analyzed by electrophoresis in a 1% agarose gel. The predicted PCR fragments were excised from agarose gels using the GeneClean Turbo Kit (BIO 101

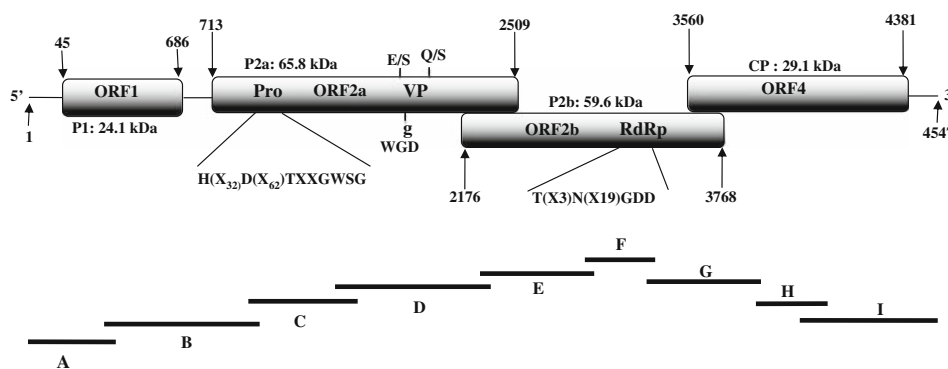


Fig. 1 Organization of the IYMV genome, together with the RT-PCR products (A–I) generated by the different primer combinations, is indicated. Grey rectangles indicate the open reading frames (ORFs) predicted for the IYMV RNA. The name and deduced size of the ORF1 to ORF4 gene products are indicated (*P1* protein coded by ORF1, *P2a* protein coded by ORF2a, *P2b* protein coded by ORF2b, *CP* putative coat protein). The nucleotide position at the beginning and end of each ORF is indicated. Important motifs in the genome and

coded proteins are shown, e.g., consensus sequences for protease (*Pro*), *VPg* in *ORF2a*, and *RdRp* in *ORF2b*. The locations of putative *VPg* cleavage sites are shown as vertical lines in the coding region, above which the peptide sequence at each site (E/S, Q/S) is indicated. Conserved motifs characteristic of a putative protease (*H(X₃₂)D(X₆₂)TXXGWSG*), *VPg* (*WGD*) and *RdRp* (*T(X₃)N(X₁₉)GDD*) are indicated

Systems, Qbiogene, Carlsbad, CA, USA), cloned into the pGEM-T-Easy vector (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions, and sequenced on an Applied Biosystems 373A sequencer.

Recombination and phylogenetic analyses of viral sequences

Viral sequences were analyzed and assembled using the VECTOR NTI Advance 10 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) program. Multiple sequence alignments and pairwise comparisons were done by CLUSTAL W with default parameters [24]. Potential recombinant sequences, likely parental sequences, and possible recombination break points were determined using a nucleotide substitution distribution method implemented in RDP3, as well as methods embedded in RDP3 (GENECONV, MAXIMUM CHI SQUARE, CHIMAERA METHOD, SISTER SCAN, 3SEQ) [17]. Phylogenetic trees were reconstructed by the maximum-likelihood method implemented in PHYML [10] using the HKY model with a gamma shape parameter. Potato leafroll virus (PLRV), whose sequence is known to be the most closely related to those of the sobemoviruses [22], was used as an outgroup. Bootstrap evaluation of the branching pattern was performed with 500 replicates. The tree was viewed with the help of TREEVIEW.

Open reading frames (ORFs) were identified using the ORF search feature within EditSeq (DNASTAR). The parameters were set at a minimum of 50 codons with "ATG" as the start codon, and each candidate ORF was translated. Complete genome sequences of the sobemoviruses used in this study were downloaded from EMBL.

Results and discussion

Symptoms and host range

Natural host search

Field-infected *I. cylindrica* plants showed yellow discoloration, mottling of leaves, and stunting. Vegetatively propagated uninfected *I. cylindrica* were inoculated with IYMV virions isolated from infected *Imperata*. The symptoms that developed on these mechanically inoculated plants were similar to those observed on the original, naturally infected *Imperata* plants. IYMV detection was confirmed by ELISA. Field leaf samples collected during the survey were tested by ELISA. Nine of 14 samples from *I. cylindrica* and two of four samples from maize reacted positively with antiserum to IYMV (Table 1). Back-inoculation to *I. cylindrica* and maize reproduced the yellow mottle symptoms. Regarding the plants negative in ELISA,

Table 1 Results of the surveys and detection of IYMV in the samples by ELISA

Host species (<i>Poaceae</i>)	Symptoms	ELISA detection
<i>Andropogon gayanus</i>	Chlorotic	0/3 ^a
<i>Brachiara lata</i>	Mottle	0/1
<i>Echinochloa colona</i>	Yellow mosaic	0/1
<i>Eleusine indica</i>	Mottle	0/2
<i>Imperata cylindrica</i>	Mottle, streak	9/14
<i>Oryza longistaminata</i>	Mottle, necrotic	0/3
<i>Panicum infestum</i>	Streak	0/2
<i>Paspallum scrobiculatum</i>	Yellow mosaic, necrotic	0/2
<i>Pennisetum pedicellatum</i>	Mottle	0/1
<i>Rottboellia exaltata</i>	Mottle, streak	0/13
<i>Setaria barbata</i>	Yellow mosaic	0/3
<i>Sorghum bicolor</i>	Mottle + mosaic	0/1
<i>Zea mays</i>	Mottle	2/4

^a Number of samples detected positive/number of samples collected during the survey

back-inoculation assays to maize and to *I. cylindrica* failed to induce symptoms. The disease was most severe in naturally infected *Imperata* in fields at Karfiguela, a village located in the southwestern region of Burkina Faso. It is not presently known if the virus occurs elsewhere in Africa. However, typical symptoms of yellowing and mottling were observed on *Imperata sp.* in Mali, Burkina Faso, and Togo [26]. Because RYMV was not detected by ELISA and is not transmissible to *Imperata sp.* [1], the yellowing and mottling observed in *Imperata sp.* in these countries may be due to infection with IYMV.

Experimental host range

Transmission of virus from *I. cylindrica* plants to the *Poaceae* host plants listed above resulted in typical symptoms of IYMV only in maize (16/20 varieties) and *R. exaltata* (20/20 plants) (Table 2). Symptoms in seedlings consisted of small yellow spots at the base of the youngest leaves and were observed 11 days and 12–30 days post-inoculation in *R. exaltata* and maize, respectively. Symptomatic areas later became elongated and occurred parallel to the veins (Fig. 2), and virus multiplication was confirmed by ELISA. No symptoms were observed in the other inoculated species: sorghum, millet, *Oryza sp.*, and *Echinochloa colona*. Back-inoculation assays to maize failed to induce symptoms. Indirect antigen coat plate ELISA did not detect IYMV in these plants.

I. cylindrica and maize are the natural hosts of IYMV, and *R. exaltata* can be infected experimentally. This narrow host range is typical of sobemoviruses. Severe symptoms developed on experimentally infected maize in

Table 2 Response of test plants to inoculation with Imperata yellow mottle virus isolates

Host species	No. of plants tested	Symptoms		ELISA detection
		No. of plants and (varieties) with symptoms	Symptom types	
Crops				
<i>Oryza sativa</i>	140	0/140 (0/7)	–	0/7 varieties
<i>Pennisetum glaucom</i>	200	0/200 (0/10)	–	0/10 varieties
<i>Sorghum bicolor</i>	260	0/260 (0/13)	–	0/13 varieties
<i>Zea mays</i>	400	320/400 (16/20)	mo, nc, st	16/20 varieties
Grasses				
<i>Oryza longistaminata</i>	20	0/20	–	0/20 plants
<i>Echinochloa colona</i>	20	0/20	–	0/20 plants
<i>Rottboellia exaltata</i>	20	20/20	mo, st	20/20 plants

mo Mottle, nc necrotic, st streak



Fig. 2 Maize leaf infected mechanically with IYMV (*left*) showing yellow mottle symptoms, compare with symptomless control leaves (*right*)

16 out of 20 highly susceptible maize varieties. IYMV could therefore be a potential threat to maize and may lead to the emergence of disease. Because *I. cylindrica* is a perennial grass, it may play a major role in IYMV survival and perpetuation in nature.

Seed transmission

No visible symptoms were observed in maize seedlings grown from seeds harvested from mechanically infected maize. None of the seedlings were infected with IYMV, as determined by ELISA, up to 6 weeks after germination. These results suggest that the virus is not seed-transmitted in maize, which is the usual indicator host. Consistently, all sobemoviruses that infect monocotyledons, i.e., RYMV, cocksfoot mottle virus (CfMV), ryegrass mottle virus (RGMoV) and IYMV, are not seed-transmitted.

In vitro properties

Sap heated to 35°C for 10 min was infective but lost most of its infectivity at 55°C and was non-infectious at 60°C. These results indicate a thermal inactivation point of 55–60°C. The infectivity of sap was greatly reduced after 2–3 days and was lost after 6 days.

Purification

Using the isolation procedures described above, highly purified virions were obtained from leaves of mechanically inoculated maize (var. FBC6) plants. The yield of purified virus was about 0.1 mg/g of infected maize leaf tissue. The $A_{260/280}$ ratio was 1.5, similar to the $A_{260/280}$ ratio of RYMV [3]. In electron microscopy, spherical isometric particles ca. 32 nm in diameter were observed in negatively stained samples from purified IYMV preparations (data not shown).

Serological properties

In ELISA tests, the reactions with IYMV antiserum were highly specific and efficient in detecting the virus, even when infected plant material was used at a dilution of 1/10 and the antiserum was used at a 1/6,400 dilution. Average IACP-ELISA values (OD_{405}) of samples from naturally infected *I. cylindrica* and mechanically inoculated maize diluted 1:10 were 0.8 ± 0.06 and 0.75 ± 0.04 , respectively. The antiserum did not cross-react with extracts from plants infected with RYMV. Conversely, purified IYMV (16 mg/ml) was not detected with RYMV antiserum in ELISA tests. Serological detection and identification of IYMV were very specific. This specificity will be useful in further epidemiological studies and the search for IYMV vectors.

Sequence analysis and genomic organization

An RT-PCR-based stepwise strategy was used to sequence and characterize IYMV. The genomic RNA of IYMV was 4,547 nt long with a base composition of 22.9% A, 23.4% U, 26.6% C, and 27.1% G. The G + C content was 53.7%. The genomic RNA contained four ORFs (Fig. 1) flanked by 5' and 3'-untranslated sequences of 44 and 166 nt, respectively. The genome organization and several amino acid motifs were typical of sobemoviruses. BLAST searches with the full genome of IYMV revealed matches with several members of the genus *Sobemovirus*. IYMV was most closely related to RYMV. IYMV ORF 1 (45–686 nt) encodes a predicted 24.1-kDa protein of 213 amino acids. ORF 1 and 2 of IYMV are separated by an intergenic region of 26 nt. IYMV ORF2 encodes the putative central polyprotein and has two overlapping ORFs. ORF2a, located between nt positions 713 and 2,509, encodes a predicted serine protease and a viral genome-linked protein (VPg). It included the two motifs H(X₃₂)D(X₆₂)TXXGWWSG and WGD (1,868–1,876 nt) together with D- and E-rich sequences, characteristic of serine proteases and of VPgs, respectively [22]. The putative cleavage sites of IYMV VPg were suggested to be E322/S323 and Q418/S419 based on similarity with RYMV VPg [12]. IYMV ORF2b (2,176–3,768 nt) encodes the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). The T(X₃)N(X₁₉)GDD motif [4] was identified. The consensus signal for a –1 nt frameshift was found at the beginning of the overlapping region between ORF2a and ORF2b. The heptanucleotide UUUAAAC (2,062–2,068 nt) with a predicted 29-nt-long stem-loop structure 7 nt downstream from the heptamer was identified. The conserved nucleotide motif ACAA (3,379–3,383 nt) was also found in the putative transcription site of the subgenomic RNA. ORF4 (3,560–4,381 nt) of IYMV overlaps with ORF2b by 208 nucleotides and encodes a putative coat protein (CP) of 29.1 kDa with 173 amino acids. The presence of the motif ACAA, characteristic of a putative site of the subgenomic RNA, suggests that IYMV CP is expressed through a subgenomic RNA. The structure of the IYMV capsid would thus be similar to that of other sobemoviruses. The residues involved in calcium binding [20] are conserved in the IYMV coat protein sequence; they correspond to D139, D142, N252, and V197. Like the RYMV capsid, the N-terminal arm of the C subunit of the IYMV capsid likely extends to the B subunit without making a “U turn”. That is because the motif PGP in the junction [20] and the arginine of the helix alpha-A [23] involved in this conformation are partially and strictly conserved at positions 60–62 and 100, respectively. The residues at positions 70, 114, 115, 190,

Table 3 Amino acid identities (in %) between IYMV ORFs and those of other sobemoviruses

Virus	ORF1	ORF2a	ORF2b	ORF4
CfMV	17.4	33.8	57.6	30.8
LTSV	6.5	23.5	44.9	21.7
RGMoV	3.9	21.3	48.2	19.9
RYMV	7.9	39.1	61.9	43.5
SBMV	6.5	24.6	45.6	24.3
SCMoV	6.5	22.9	51.9	23
SeMV	12.1	22.4	49.8	23.2
SCPMV	6.6	25.3	41.2	22.5
TRoV	8.2	22.1	47.7	21.9

and 209 in RYMV CP are recognized by anti-RYMV antibodies [11]. Interestingly, the amino acids located in these positions are not conserved between IYMV and RYMV, explaining the absence of cross-reactivity between the IYMV and RYMV antibodies.

To assess the degree of amino acid sequence identity in different genome regions, pair-wise distance comparisons were calculated between the different coding regions of IYMV and those of the other sobemoviruses. Their identities (%) are shown in Table 3. The amino acid sequence of the IYMV ORF1 protein shows less than 20% identity with the homologous sobemovirus proteins. According to this ORF, IYMV was most closely related to CfMV (17.4% identity). The IYMV ORF2a amino acid sequence is more closely related to that of RYMV, with 39.1% identity. The IYMV ORF2b shares a higher sequence identity with ORF2b of RYMV (61.9%) and CfMV (57.6%) than with that of the other sobemoviruses. The coat protein gene (ORF4) of IYMV is most closely related to the RYMV ORF4 (43.5%) and, to a lesser extent, to those of other monocotyledon-infecting viruses. Altogether, whatever the ORF considered, IYMV is most closely related to monocotyledon-infecting sobemoviruses.

Guidelines for demarcation of virus species cannot be defined exactly and have to be established for each virus genus or family [28]. Nucleotide identity shared between IYMV and RYMV (56.5%), the virus most closely related to IYMV, was lower than that between southern bean mosaic virus (SBMV) and Sesbania mosaic virus (SeMV) (71.5%) the two most closely related sobemoviruses, and also lower than that between Lucerne transient streak virus (LTSV) and subterranean clover mottle virus (SCMoV), another pair of sobemoviruses with 61.0% identity throughout their complete genomes (Table 4). IYMV and RYMV are also serologically distinct. Altogether, these data support the view that IYMV is a member of a

Table 4 Nucleotide sequence identities (in %) between IYMV and other sobemoviruses

	IYMV	CfMV	LTSV	RGMoV	SBMV	SCMoV	SeMV	SCPMV	TRoV
CfMV	45.4								
LTSV	41.8	44.1							
RGMoV	40.3	41.8	42.9						
SBMV	44.7	44.6	44.4	42.7					
SCMoV	41.7	43.7	61.0	43.1	45.1				
SeMV	44.3	45.0	46.7	44.0	71.5	46.5			
SCPMV	44.1	44.4	45.8	44.3	58.0	45.4	59.8		
TRoV	41.7	41.3	44.5	41.7	44.4	44.9	45.9	44.7	
RYMV	56.5	46	42.6	41.8	43.5	42.9	44.2	44.9	41.1

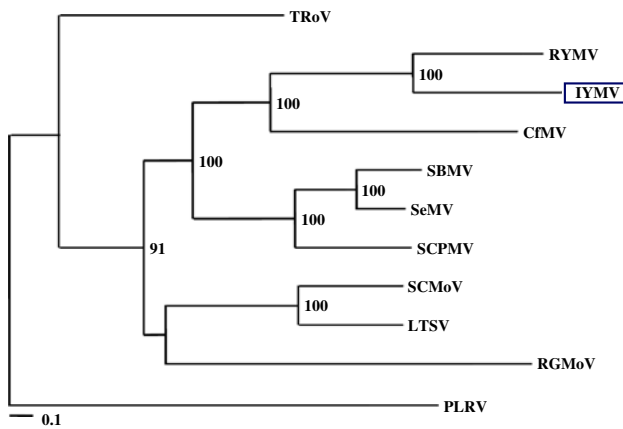


Fig. 3 Phylogenetic relationships of IYMV (boxed) and other sobemoviruses inferred by maximum likelihood from the full genome sequences. Sobemoviruses infecting monocotyledons include: cocksfoot mottle virus (CfMV, NC002618), ryegrass mottle virus (RGMoV, EF091714), rice yellow mottle virus (RYMV, AJ608218). Sobemoviruses infecting dicotyledons include: lucerne transient streak virus (LTSV, NC001696), southern bean mosaic virus (SBMV, L34672), subterranean clover mottle virus (SCMoV, NC004346), sesbania mosaic virus (SeMV, AY004291), southern cowpea mosaic virus (SCPMV, NC001625), and turnip rosette virus (TRoV, NC004553). Potato leafroll virus (PLRV, AF453394), a member of the genus *Polerovirus* was used as an outgroup. The bootstrap support of the branch nodes is given. Only bootstrap scores exceeding 75% are shown. The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site

sobemovirus species that differs from all previously described sobemoviruses.

Recombination and phylogenetic analyses

No recombination events were detected between IYMV and any of the nine other sobemoviruses. This result is consistent with earlier studies showing a lack of recombination among members of the genus *Sobemovirus* [16, 18, 29]. A maximum-likelihood tree (HKY model with estimated gamma shape parameter of 1.0) was constructed from the full-genome sequence alignment using PHYML (Fig. 3). The support of the nodes was assessed after 500

bootstrap replicates. The tree generated showed that IYMV and RYMV sequences group together with 100% bootstrap support. The two viruses form a cluster with CfMV, another sobemovirus that infects monocotyledons. The phylogenetic tree also showed a split between sobemoviruses infecting monocotyledons and those that infect dicotyledons. Our results are consistent with those of Zhou et al. [29], who argued for the separation of sobemoviruses into two groups with respect to their hosts (monocotyledonous vs dicotyledonous). The only exception is RGMoV, a sobemovirus that infects monocotyledons but groups with dicotyledon-infecting ones.

Symptoms, virion particle size, and host range showed a similarity between IYMV and Rottboellia yellow mottle virus (RoYMV). RoYMV is a member of a tentative species of the genus *Sobemovirus* that was first described by Thottappilly et al. [25] in Nigeria, and which infects maize experimentally, as does IYMV. A direct comparison of the two viruses is difficult because RoYMV has not been sequenced and because standard isolates and polyclonal anti-RoYMV antibodies are no longer available. Yellowing and mottling were observed in naturally infected *R. exaltata* (13 plants in total), but IYMV was not detected with a polyclonal anti-IYMV antibody. This result suggests that IYMV differs from RoYMV or that *R. exaltata* is infected by another virus, distinct from IYMV and RoYMV.

Based on symptomatology, particle morphology and size, physical properties and purification protocol, we propose to assign this virus to the genus *Sobemovirus*. Moreover, the differences in host range, serological reactions, and sequence data justify our decision to consider it a new sobemovirus. IYMV is named from *Imperata*, the natural host of the virus, and mottle, the most prominent symptom induced in this host.

Acknowledgments We thank J. M. Thresh for critical reading of the manuscript, S. Galzi for performing electron microscopy, and C. Desbiez for providing degenerate sobemovirus primers. We are also grateful to J. Sanou, R. Zangré, and C. P. Barro/Kondombo of INERA (Burkina Faso) for providing maize, millet, and sorghum seeds, respectively.

References

1. Abo ME, Sy AA, Alegbejo MD (1998) *Rice yellow mottle virus* (RYMV) in Africa: evolution, distribution, economic significance on sustainable rice production and management strategies. *J Sustain Agric* 11:85–111
2. Anderson P, Cunningham A, Patel N, Morales F, Epstein P, Daszak P (2004) Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol Evol* 19:535–544
3. Bakker W (1974) Characterization and ecological aspects of *Rice yellow mottle virus* in Kenya. PhD thesis, Agricultural University, Wageningen, the Netherlands, agriculture research reports, N°829, 152 p
4. Balke I, Resevecic G, Zeltins A (2007) The Ryegrass mottle virus genome codes for a sobemovirus 3C-like serine protease and RNA-dependent RNA polymerase translated via-1 ribosomal frameshifting. *Virus Genes* 35:395–398
5. Bosque-Pérez NA (2000) Eight decades of maize streak virus research. *Virus Res* 71:107–121
6. Chappell L, Baulcombe D, Molnár A (2005) Isolation and cloning of small RNAs from virus-infected plants. *Curr Protoc Microbiol Unit* 16H.2.1–16H.2.17
7. Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol* 34:475–483
8. Fargette D, Konaté G, Fauquet C, Muller E, Peterschmitt M, Thresh JM (2006) Molecular ecology and emergence of tropical plant viruses. *Ann Rev* 44:235–260
9. Fargette D, Pinel A, Abubakar Z, Traoré O, Brugidou C, Fatogoma S, Hébrard E, Choisy M, Sére Y, Fauquet C, Konaté G (2004) Inferring the evolutionary history of *Rice yellow mottle virus* from genomic, phylogenetic and phylogeographic studies. *J Virol* 78:3252–3261
10. Guindon S, Lethiec F, Duroux P, Gascuel O (2005) PHYML online—a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res* 33(web server issue): W557–W559
11. Hébrard E, Pinel-Galzi A, Catherinot V, Labesse G, Brugidou C, Fargette D (2005) Internal point mutations of the capsid modify the serotype of *Rice yellow mottle virus*. *J Virol* 79:4407–4414
12. Hébrard E, Pinel-Galzi A, Fargette D (2008) Role of the virulence domain of the RYMV genome-linked viral protein in rice *rymv1-2*-mediated resistance. *Arch Virol* 153:395–398
13. Hibino H (1989) Insect-borne viruses of rice. In: Harris KF (ed) *Advances in disease vector research*. Springer, New York, vol 6, pp 209–241
14. Hibino H (1996) Biology and epidemiology of rice viruses. *Annu Rev Phytopath* 34:249–274
15. Hull R, Fargette D (2005) *Sobemovirus*. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (eds) *Virus taxonomy: eight report of the international committee on taxonomy of viruses*. Elsevier, London, pp 885–890
16. Lokesh GL, Gopinath K, Satheshkumar PS, Savithri HS (2001) Complete nucleotide sequence of *Sesbania mosaic virus*: a new virus species of the genus *Sobemovirus*. *Arch Virol* 146:209–223
17. Martin DP, Williamson C, Posada D (2005) RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* 21:260–262
18. Meier M, Truve E (2006) Sobemoviruses possess a common CfMV-like genomic organization. *Arch Virol* 152:635–640
19. Ou SH (1985) *Rice diseases*. Commonw Mycol Inst 2nd edn. UK, 360 pp
20. Qu C, Liljas L, Opalka N, Brugidou C, Yeager M, Beachy RN, Fauquet CM, Johnson JE, Lin T (2000) 3D Domain swapping modulates the stability of members of an icosahedral virus group. *Structure* 8:1095–1103
21. Séréme D (2005) Caractérisation du virus de la panachure jaune du chiendent (*Imperata cylindrica*). DEA de biotechnologie végétale, Université Ouagadougou, Burkina Faso 68 p
22. Tamm T, Truve E (2000) Sobemoviruses. *J Virol* 74:6231–6241
23. Tars K, Zeltins A, Liljas L (2003) The three-dimensional structure of *Cocksfoot mottle virus* at 2.7 Å resolution. *Virology* 310:287–297
24. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position, specific gap penalties, and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673–4680
25. Thottappilly G, Van Lent JWM, Rossel HW, Sehgal OP (1992) *Rottboellia yellow mottle virus*, a new sobemovirus affecting *Rottboellia cochinchinensis* (Itch grass) in Nigeria. *Ann Appl Biol* 120:405–415
26. Traoré O (2006) Ecology, pathogeny and evolution of *Rice yellow mottle virus* in the Sudano-sahelian areas. D. Sc. Thesis, University of Ouagadougou, Burkina Faso
27. Traoré O, Konaté G (1997) Maize viruses and their reservoir hosts in Western and Central Africa. *Cahiers d'études et de recherches francophones/Agricultures* 6, 4:257–262
28. Van Regenmortel MH, Bishop DH, Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Calisher CH (1997) Guidelines to the demarcation of virus species. *Arch Virol* 142:1505–1518
29. Zhou H, Wang H, Huang LF, Naylor M, Clifford P (2005) Heterogeneity in codon usages of sobemovirus genes. *Arch Virol* 150:1591–1605

CHAPITRE 3

Caractérisation de la diversité interspécifique de sobémovirus et virus apparentés

3.1. Introduction

Les virus représentent un sérieux problème aussi bien pour les animaux que pour les plantes sur lesquels ils causent des dégâts très importants. De nouveaux virus émergent constamment (cas du IYMV chapitre 1) pendant que les “anciens” évoluent pour s’adapter au mieux à leur environnement. Ils peuvent aussi, par exemple dans le cas de l’introduction de nouvelles variétés développer des stratégies pour contourner les mécanismes de défense entraînant ainsi des problèmes sanitaires et d’importantes pertes économiques.

Le virus responsable de la panachure jaune du riz est un virus émergent confiné au seul continent Africain et occasionnant des dégâts très importants sur le riz. Différentes études réalisées au cours des 10 dernières années ont permis de cumuler d’importantes informations sur ce virus faisant de lui l’un des phytovirus les mieux caractérisés (biologique et moléculaire) du genre *Sobemovirus*. Aujourd’hui, de nombreuses séquences entières et partielles du génome du RYMV sont disponibles dans les banques de données. Ces données ont rendu possible une étude de diversité et permis de démontrer que le RYMV évolue aussi rapidement que les virus à ARN infectant les animaux (Fargette *et al.*, 2008a).

Le RYMV a donc été utilisé, au cours de nos travaux, pour tracer l’histoire évolutive du groupe des sobémovirus et des virus apparentés. Nous avons dans un premier temps estimé l’âge du RYMV à partir de séquences hétérochrones. Cet âge a été ensuite utilisé pour calibrer la phylogénie des sobémovirus et des virus apparentés. Nous avons pu montrer à partir de cette analyse de la diversité intra- et interspécifique que la diversification de chacun des deux groupes (sobémovirus et virus apparentés) remonte à quelques millénaires, c’est-à-dire aux premiers stades de l’agriculture au cours du Néolithique. Les résultats détaillés de cette étude sont présentés dans l’article 3.

3.2. Article 3 : Diversification of *Rice yellow mottle virus* and related viruses spans the history of agriculture from the Neolithic to the present (Fargette *et al.*, 2008b. *PloS Pathogens* 4 : e1000125).

Diversification of *Rice Yellow Mottle Virus* and Related Viruses Spans the History of Agriculture from the Neolithic to the Present

Denis Fargette^{1*}, Agnès Pinel-Galzi¹, Drissa Sérémé², Séverine Lacombe³, Eugénie Hébrard¹, Oumar Traoré², Gnissa Konaté²

1 Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMR RPB, Montpellier, France, **2** Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA), Laboratoire de Biotechnologie et de Virologie Végétale, Kamboinsé, Ouagadougou, Burkina Faso, **3** Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMR GDP, Montpellier, France

Abstract

The mechanisms of evolution of plant viruses are being unraveled, yet the timescale of their evolution remains an enigma. To address this critical issue, the divergence time of plant viruses at the intra- and inter-specific levels was assessed. The time of the most recent common ancestor (TMRCA) of *Rice yellow mottle virus* (RYMV; genus *Sobemovirus*) was calculated by a Bayesian coalescent analysis of the coat protein sequences of 253 isolates collected between 1966 and 2006 from all over Africa. It is inferred that RYMV diversified approximately 200 years ago in Africa, i.e., centuries after rice was domesticated or introduced, and decades before epidemics were reported. The divergence time of sobemoviruses and viruses of related genera was subsequently assessed using the age of RYMV under a relaxed molecular clock for calibration. The divergence time between sobemoviruses and related viruses was estimated to be approximately 9,000 years, that between sobemoviruses and poleroviruses approximately 5,000 years, and that among sobemoviruses approximately 3,000 years. The TMRCA of closely related pairs of sobemoviruses, poleroviruses, and luteoviruses was approximately 500 years, which is a measure of the time associated with plant virus speciation. It is concluded that the diversification of RYMV and related viruses has spanned the history of agriculture, from the Neolithic age to the present.

Citation: Fargette D, Pinel-Galzi A, Sérémé D, Lacombe S, Hébrard E, et al. (2008) Diversification of *Rice Yellow Mottle Virus* and Related Viruses Spans the History of Agriculture from the Neolithic to the Present. *PLoS Pathog* 4(8): e1000125. doi:10.1371/journal.ppat.1000125

Editor: Edward C. Holmes, The Pennsylvania State University, United States of America

Received: March 31, 2008; **Accepted:** July 14, 2008; **Published:** August 15, 2008

Copyright: © 2008 Fargette et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This study was funded by the ECOGER action of the French National Program ANR "Ecosphère continentale: processus, modélisation et risques environnementaux." Support by INRA is also acknowledged.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: Denis.Fargette@mpl.ird.fr

Introduction

The mechanisms of evolution of plant viruses are being progressively unraveled [1–3], yet the timescale of their evolution remains an enigma. Even the order of magnitude is unknown [4]. Several viruses showed few genetic changes between isolates separated in space and time, sometimes for centuries [5–8]. In contrast, recent evidence from statistical analyses of sequences of dated isolates of *Tomato yellow leaf curl virus* (genus *Geminivirus*) [9], *Rice yellow mottle virus* (genus *Sobemovirus*) (RYMV) [10] and *Zucchini yellow mosaic virus* (genus *Potyvirus*) [11] indicated rapid evolution, similar to that of most animal viruses. The paradox is addressed here by calculating the divergence time of plant viruses at the intra- and inter-specific levels using RYMV and related viruses.

Molecular-dating techniques provide insights into the history of lineages that have a poor or non-existent fossil record, such as viruses [12,13]. These techniques were originally based on the assumption of a strict molecular clock reflecting steady accumulation of genetic changes over time. Recently, new methods enable the incorporation of variable rates into molecular dating [13]. Here, we applied a Bayesian Markov Chain Monte-Carlo method for performing relaxed phylogenies that is able to co-estimate phylogeny and divergence times under uncorrelated relaxed-clock models [14].

RYMV causes an emergent disease that was first observed in 1966 in Kenya. Since then, it has been reported in nearly all rice-growing countries of sub-Saharan Africa. RYMV is transmitted by coleopterous insects and is also disseminated abiotically. It has a narrow host range limited to wild and cultivated rices and a few related grasses [15]. There is no evidence of recombination between RYMV isolates [16,17]. The rate of evolution of RYMV was recently evaluated using the coat protein (CP) sequences of 253 isolates collected between 1966 and 2006 from all over Africa [10]. The same group of sequences is analyzed here to assess the time of their most recent common ancestor (TMRCA), which is a measure of the divergence time of RYMV. The TMRCA was calculated by a Bayesian coalescent analysis of the sequences using several molecular clock and population genetic models [14].

Sobemoviruses infect both monocotyledonous and dicotyledonous plants, but the host range of each virus species is narrow and confined to a few plant species of the *Poaceae* or *Fabaceae*. Sobemoviruses are transmitted by beetle vectors, seeds and direct contact [18]. They share a common genomic organization, as found after re-sequencing some of the virus species [19,20]. Ten sobemovirus species have been fully sequenced, nine of them are currently registered by ICTV [18] and a tentative one, *Imperata yellow mottle virus* (IYMV), was recently isolated from *Imperata cylindrica* in Africa [56]. Their genomes contain four open reading

Author Summary

The timescale of the evolution of plant viruses is an enigma, and even its order of magnitude is unknown. This critical issue is addressed here by calculating the age of plant viruses. An accurate estimate of the age of *Rice yellow mottle virus* (RYMV) was obtained by statistical analysis of a set of dated sequences. The age of RYMV provides a reliable calibration of related viruses, applying recently developed relaxed molecular clock models. It was found that RYMV diversified approximately 200 years ago, and that inter-specific diversification ranged from 500 years to 9,000 years. Altogether, plant virus diversification has spanned the history of agriculture from the Neolithic age to the present. This suggests that the Neolithic was a period of epidemiological transition for plant virus diseases, as already proposed for infectious human diseases. Intrinsically, it is for the same reason: increased contacts between hosts, pathogens, and vectors. This is consistent with the view that RNA viruses have a recent origin, and that humans have become the world's greatest evolutionary force.

frames (ORFs). ORF1, located at the 5' end of the genome, encodes a protein involved in virus movement and gene silencing suppression. ORF2 comprises two overlapping ORFs. ORF2a encodes a serine protease and a viral-genome-linked protein. ORF2b is translated through a -1 ribosomal frameshift mechanism through a fusion protein. It encodes the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp). The coat protein gene (ORF4) is expressed by a sub-genomic RNA at the 3' end of the genome. No evidence of recombination between sobemoviruses has been found either in phylogenetic [21,56] or experimental studies [22].

The genus *Sobemovirus* is not assigned to a family. However, the RdRp of the sobemoviruses is phylogenetically related to that of the poleroviruses and enamoviruses (family *Luteoviridae*) [23], and to Poinsettia latent virus (PnLV), a putative polerovirus-sobemovirus hybrid [24]. Sobemoviruses, luteoviruses (family *Luteoviridae*) and dianthoviruses (family *Tombusviridae*) are more distantly

related. The CPs of sobemoviruses are related to those of the necroviruses (family *Tombusviridae*), and the CPs of the poleroviruses to those of the luteoviruses [18]. Recombination events between ancestors of these genera are the likely causes of the present situation [25,26]. Altogether, this led to the proposal of a "supergroup" to include these related genera [25]. The RdRp of the sobemoviruses also shows similarities with that of *Mushroom bacilliform virus* (MBV) (genus *Barnavirus*, family *Barnaviridae*) which infects mushrooms [27].

The divergence time of sobemoviruses was assessed from the full-length sequences using the age of RYMV under relaxed molecular clock models for calibration. The divergence time of the sobemoviruses with members of related genera was inferred from RdRp sequences with the same methodology. The time associated with plant virus speciation was assessed by calculating the TMRCA of closely related pairs of sobemoviruses, poleroviruses and luteoviruses. Collectively, these studies provide estimates of the diversification time of a plant virus species, the time associated with plant virus speciation, and the TMRCA of plant viruses of the same genus and of different genera. The intra- and inter-specific plant virus diversification was found to span the history of agriculture from the Neolithic age to the present.

Results

TMRCA of RYMV

The estimates of the TMRCA of RYMV inferred from the 253 dated CP sequences were dependent on both molecular clock and demographic models. Models enforcing relaxed molecular clocks performed better than the strict clock model, whatever the population genetic model selected (Table 1). The average substitution rates ranged from 5.1×10^{-4} to 12.3×10^{-4} nucleotides (nt)/site/year among the models (data not shown). The highest marginal likelihood was obtained with the model implementing the relaxed uncorrelated exponential molecular clock and the exponential growth model. The Bayes Factor (BF) gave strong support to this model when compared to other clock and population models. Under this model, the average TMRCA of RYMV was 195 years and the substitution rate was 11.7×10^{-4} nt/site/year. The median was 182 years. The highest density

Table 1. Estimates of the time of the most recent common ancestor (TMRCA) of *Rice yellow mottle virus* by Bayesian coalescent methods under several molecular clock and population genetic models implemented in BEAST

Molecular Clock Model	Population Genetic Models											
	Constant Size			Exponential			Expansion			Bayesian Skyline		
	Lower	Mean	Upper	Lower	Mean	Upper	Lower	Mean	Upper	Lower	Mean	Upper
Strict												
TMRCA (years) ^a	281	382	512	257	373	520	263	381	496	257	388	535
Marginal likelihood ^b	-8791			-8788			-8791			-8784		
Relaxed (lognormal)												
TMRCA (years)	182	342	511	166	280	408	183	312	463	167	306	483
Marginal likelihood	-8714			-8722			-8719			-8720		
Relaxed (exponential)												
TMRCA (years)	129	287	537	107	195	308	119	245	422	88	236	432
Marginal likelihood	-8704			-8697			-8709			-8702		

^a95% lower, mean, and 95% upper values of the highest posterior density (HPD) interval that contains 95% of the marginal posterior distribution.

^bMarginal likelihoods, in \log_e units, were calculated via importance sampling using the harmonic mean of the sampled likelihoods (with the posterior as the importance distribution).

doi:10.1371/journal.ppat.1000125.t001

probability (HPD) interval ranged from 107 years to 308 years, with an approximate lognormal distribution of the estimates. Subsequently, a lognormal distribution with a lognormal mean of 5.2 and a standard deviation of 0.3 was applied as the prior distribution of TMRCA of RYMV for the upward calibration of nodes of sobemoviruses and related viruses.

TMRCA of sobemoviruses and related viruses

The two most divergent RYMV isolates, Ma10 and Tz202, were collected 5,000 km apart in Mali and Tanzania, respectively, and differed by 10.5% in the full genome. They were subsequently referred to as isolates RYMV-1 and RYMV-2. The distribution of the estimates of the TMRCA of RYMV calculated from the dated CP sequences was taken as the prior of their divergence time (node 1 in all figures). The full sequences of these two RYMV isolates and of nine other sobemoviruses were considered (Table 2). A total of 4,798 characters was analyzed, 3,432 of them (72%) being parsimony-informative. The lognormal clock model performed better than the strict model (marginal likelihoods in \log_e units were -50237 and -50260 , respectively), whereas the exponential model failed to converge. The deviation from the hypothesis of a strict clock was limited (coefficient of variation = 0.23). The TMRCA and the substitution rates of the sobemoviruses under the lognormal and the strict clock models were close: 3,137 vs. 3,326 years, and 4.0×10^{-4} vs. 3.7×10^{-4} nt/site/year, respectively. The Yule speciation process and the constant population size coalescent model as tree priors yielded similar estimates. Among sobemoviruses, RYMV is most closely related to IYMV (node 2). The TMRCA of RYMV and IYMV was 1262 years (523–2248) (Figure 1). *Cocksfoot mottle virus* (CfMV, genus *Sobemovirus*) also infects monocotyledonous plants but without overlap in host or

geographical range. CfMV is the species the most closely related to RYMV and IYMV (node 3). The TMRCA of CfMV, IYMV and RYMV was 2,317 years (921–3,929). The root height of all sobemoviruses (node 4) was 3,137 years (1,133–5,295).

The divergence time of sobemoviruses and related viruses was assessed from the RdRp sequences (Table 2). Again, the distribution of the estimates of the TMRCA of RYMV calculated from the dated CP sequences was taken as the prior of the divergence time of RYMV-1 and RYMV-2 (node 1). A total of 2,199 characters were analyzed, 1,607 being parsimony-informative (73%). The model enforcing the lognormal clock model performed better than the strict model (marginal likelihoods in \log_e units were -29663 and -29677 , respectively), whereas the exponential model failed to converge. Again, the deviation from the hypothesis of strict clock was limited (coefficient of variation = 0.28) and the estimates were close. For instance, the basal root height under the lognormal and the strict clocks were 8,772 vs. 10,440 years, and the substitution rates were 3.2×10^{-4} and 2.8×10^{-4} nt/site/year, respectively. However, the HPD interval was wider with the lognormal model (2,929–15,671 years) than with the strict model (4,971–18,060 years), i.e., a 1:5.4 ratio for the lognormal model vs. a 1:3.6 ratio for the strict clock model.

The age of sobemoviruses (node 4) calculated on the full genome and on the RdRp sequences were similar (3,137 and 3,056 years, respectively) despite the difference in number of parsimony-informative characters considered (3,432 vs. 1,607 characters). The age of sobemoviruses calculated on the CP sequences was similar (2,884 years) although the dN/dS ratios of the RdRp and of the CP genes were 0.18 and 0.39, respectively, reflecting the differences in functional constraints operating on the two genes. The TMRCA of the sobemoviruses and MBV (node 5)

Table 2. Name, abbreviation, taxonomy and accession number of the virus species analyzed.

Name	Abbreviation	Genus	Family	Accession Number
<i>Cocksfoot mottle virus</i>	CfMV	<i>Sobemovirus</i>	Not assigned	DQ680848
<i>Imperata yellow mottle virus</i>	IYMV	<i>Sobemovirus</i>	Not assigned	AM990928
<i>Lucerne transient streak virus</i>	LTSV	<i>Sobemovirus</i>	Not assigned	NC001696
<i>Rice yellow mottle virus</i>	RYMV-1	<i>Sobemovirus</i>	Not assigned	AJ608208
	RYMV-2			AM883057
<i>Ryegrass mottle virus</i>	RGMoV	<i>Sobemovirus</i>	Not assigned	EF091714
<i>Sesbania mosaic virus</i>	SeMV	<i>Sobemovirus</i>	Not assigned	NC002568
<i>Southern bean mosaic virus</i>	SBMV	<i>Sobemovirus</i>	Not assigned	AFO55887
<i>Southern cowpea mosaic virus</i>	SCPMV	<i>Sobemovirus</i>	Not assigned	NC001625
<i>Subterranean clover mottle virus</i>	SCMoV	<i>Sobemovirus</i>	Not assigned	AY376451
				AY376452
<i>Turnip rosette virus</i>	TRoV	<i>Sobemovirus</i>	Not assigned	NC004553
<i>Beet chlorosis virus</i>	BChV	<i>Polerovirus</i>	<i>Luteoviridae</i>	NC002766
<i>Beet mild yellowing virus</i>	BMYV	<i>Polerovirus</i>	<i>Luteoviridae</i>	NC003491
<i>Cereal yellow dwarf virus-RPS</i>	CYDV-RPS	<i>Polerovirus</i>	<i>Luteoviridae</i>	NC002198
<i>Cereal yellow dwarf virus-RPV</i>	CYDV-RPV	<i>Polerovirus</i>	<i>Luteoviridae</i>	EF521848
<i>Potato leafroll virus</i>	PLRV	<i>Polerovirus</i>	<i>Luteoviridae</i>	AF453394
<i>Barley yellow dwarf virus-MAV</i>	BYDV-MAV	<i>Luteovirus</i>	<i>Luteoviridae</i>	D11028
<i>Barley yellow dwarf virus-PAS</i>	BYDV-PAS	<i>Luteovirus</i>	<i>Luteoviridae</i>	NC 002160
<i>Red clover necrotic mosaic virus</i>	RCNMV	<i>Dianthovirus</i>	<i>Tombusviridae</i>	JO4357
<i>Mushroom bacilliform virus</i>	MBV	<i>Barnavirus</i>	<i>Barnaviridae</i>	NC 001633

doi:10.1371/journal.ppat.1000125.t002

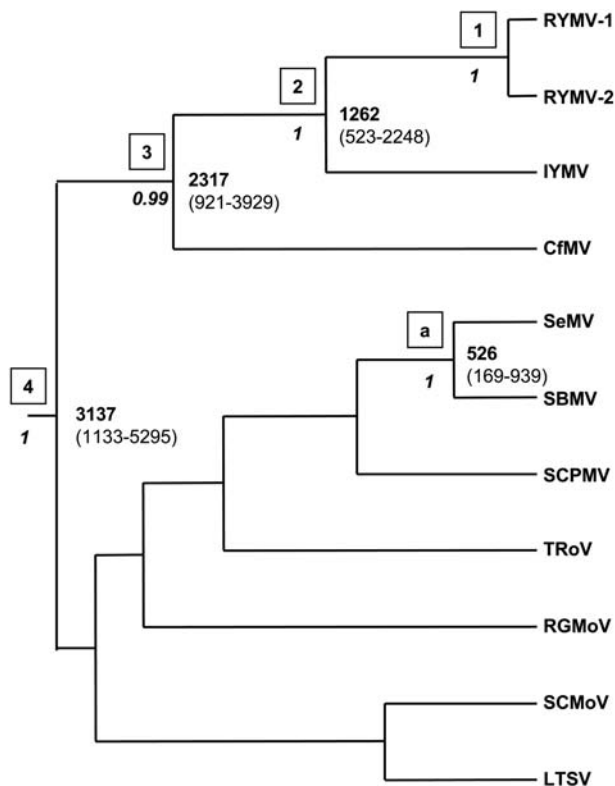


Figure 1. Divergence times of RYMV and sobemoviruses. The tree was reconstructed from the full sequences by Bayesian inference under an uncorrelated lognormal relaxed molecular clock model. The age of RYMV was used for calibration (node 1). Nodes 2–4 are associated with more internal nodes. External node “a” gathers SeMV and SBMV, the two most closely related sobemoviruses. The posterior probabilities are below the nodes (italics). The divergence times (in years) are positioned at the nodes, and the 95% HPD intervals are indicated in brackets. The species names and the sequence accession numbers are given in Table 1.
doi:10.1371/journal.ppat.1000125.g001

was 4,418 years (1,480–8,092) (Figure 2). The divergence time of sobemoviruses, poleroviruses, and MBV (node 6) was 5,118 years (1,840–9,050). The root height of sobemoviruses, MBV, poleroviruses, and luteoviruses (node 7) was 8,772 years (2,929–15,671). The TMRCA of these viruses and *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) (genus *Dianthovirus*) was 9,059 (3,370–16,260) (node 8), a value not substantially different from node 7 (Figure 3).

TMRCA of closely related virus species

Several isolates of *Subterranean clover mottle virus* (SCMoV, genus *Sobemovirus*), which caused a disease restricted to southwest Australia, were fully sequenced [28]. The highest divergence between two isolates collected in 1991 and 1996, respectively, was 1.2%. Accordingly, the divergence time of SCSMoV was estimated to be 20 years with a HPD interval of 6–44 years, indicating a date of diversification between 1952 and 1990 (Figure 3). *Southern bean mosaic virus* (SBMV, genus *Sobemovirus*) and *Sesbania mosaic virus* (SeMV, genus *Sobemovirus*) differed by 31.6% in their complete genome and thus are the two most closely related sobemoviruses (Figure 1). Their divergence time (node “a”) was 526 years (169–938). *Cereal yellow dwarf virus* CYDV-RPV and CYDV-RPS, two closely related poleroviruses, differed by 22% in their RdRp sequences (Figure 2). Their TMRCA was 531 years (180–1,018) (node “b”). *Barley yellow dwarf virus* BYDV-MAV and BYDV-PAS,

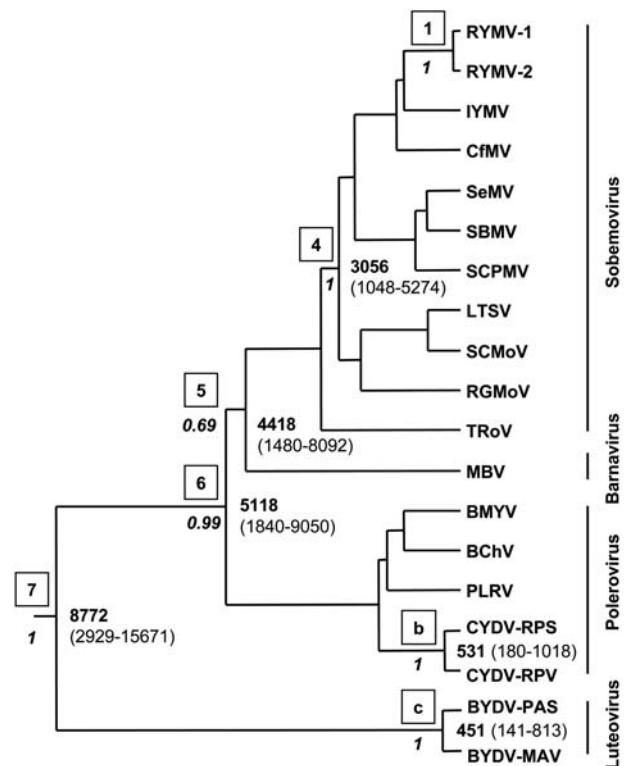


Figure 2. Divergence times of sobemoviruses and related viruses. The tree was reconstructed from the RdRp sequences by Bayesian inference under an uncorrelated lognormal relaxed molecular clock model. The age of RYMV was used for calibration (node 1). Nodes 4–7 are associated with more internal nodes. External node “b” gathers CYDV-RPS and CYDV-RPV, the two most closely related poleroviruses. External node “c” gathers BYDV-PAS and BYDV-MAV, the two most closely related luteoviruses. The posterior probabilities are below the nodes (italics). The divergence times (in years) are positioned at the nodes, and the 95% HPD intervals are indicated in brackets. The species genus is indicated alongside the vertical line. The species names and the sequence accession numbers are given in Table 1.
doi:10.1371/journal.ppat.1000125.g002

two closely related luteoviruses, differed by 21.1% in their RdRp. Their divergence time (node “c”) was 451 years (141–813). Altogether, the TMRCA of these closely related pairs of sobemoviruses, poleroviruses and luteoviruses ranged from approximately 450 to 550 years.

Discussion

The 253 RYMV isolates collected in 16 countries represent the diversity of the species [10,17]. Accordingly, the TMRCA of these 253 isolates provides a reliable estimate of the divergence time of RYMV. By contrast, the 10 sobemovirus species probably underestimate the number of sobemoviruses in cultivated and wild plants [29]. However, theoretical studies indicated that numerous samples are not necessary to date old coalescent events. It was calculated that the coalescence time of a sample of 10 taxa was 90% of the expected time of the entire population [30]. Consequently, although calculated on a limited number of species, the TMRCA of sobemoviruses and members of related genera provide reliable estimates of their divergence times.

Relaxed molecular clock models incorporate the rate variation among lineages in estimates of divergence time. Accordingly, any punctuated evolution, as might occur in species jump, should be accounted for in the relaxed clock models. Results from relaxed clocks

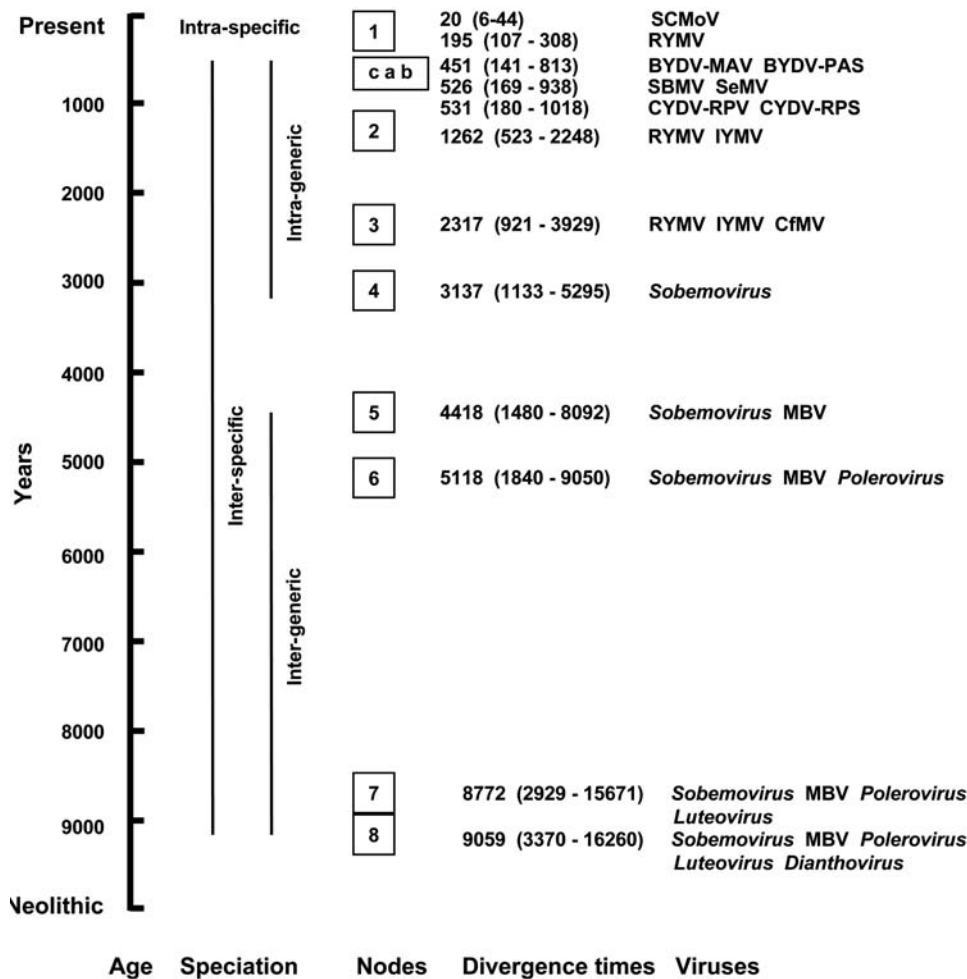


Figure 3. Divergence times of RYMV, sobemoviruses, and related viruses. The divergence times and the 95% HPD intervals are in brackets and framed. Nodes 1 to 8 encompass plant virus diversification at the intra-specific, intra- and inter-generic levels, as indicated by the vertical lines. Nodes "a," "b," and "c" gather closely related pairs of viruses. The time axis spreads from the beginning of the Neolithic period to the present. doi:10.1371/journal.ppat.1000125.g003

should be evaluated in relation to those of strict clocks [31]. In our study, the lognormal relaxed clock model performed better at the inter-specific level than the strict clock model. However, the deviation from a strict clock model was limited. This explained why the TMRCA estimates under strict and relaxed clock models were close.

There was, however, a 1:3 ratio between the lower and upper bounds of the HPD intervals of the TMRCA of RYMV (308 and 107 years, respectively). The variance of this estimate, further enlarged after relaxation of the molecular clock assumption, accounted for the large HPD intervals of divergence times at the inter-specific level. However, the HPD of RYMV divergence time is still substantially narrower than those of the other plant viruses studied with dated sequences [9,11]. This is likely to be due to the larger number of isolates used and the wider range of dates encompassed with RYMV. This could also reflect the fact that the RYMV isolates were collected, sequenced and analyzed by the same group of scientists, subsequently reducing the uncertainties associated with the use of data sets from various and heterogeneous sources.

Assessing the divergence time of RYMV from dated sequences does not suffer from the limitations of alternative approaches. Measuring RYMV evolution rate from experimental studies or from old virus specimens was previously found to be inappropriate

[10]. Applying epidemiological evidence is not adequate either. Symptoms of RYMV were first described in 1966, i.e., 40 years ago, a value inconsistent with the 107 to 308 years of the HPD interval for RYMV diversification. This means that RYMV diversified decades before the disease symptoms were reported. It also suggests that RYMV caused epidemics long before it was recognized as a disease. The first report of symptoms should better be considered as a lower bound of virus diversification, i.e., the minimum time since the virus diversified. Exceptions are viruses in localized and well-surveyed regions such as SCMoV in southwest Australia. From dated sequences, SCMoV diversification was estimated to occur between 1952 and 1990. This interval includes 1979, the year when the first symptoms were reported [32]. Biogeographical evidence to estimate divergence time can be misleading too. Madagascar was separated from mainland Africa approximately 100 millions years ago. The timescale of evolution of RYMV excludes the possibility that the divergence between isolates from Madagascar and from East Africa reflects vicariance events [33]. Altogether, the set of CP sequences of 253 dated isolates of RYMV currently provides the most reliable approach to date plant virus diversification.

The divergence time of RYMV was approximately 200±100 years, whereas symptoms were reported for the first

time in 1966 in East Africa [34] and in 1975 in West Africa [35]. The African rice *Oryza glaberrima* was domesticated in West Africa approximately 3,000 years ago, whereas the Asiatic rice *O. sativa* was introduced in the 10th and 16th centuries in East and West Africa, respectively [36,37]. Consequently, RYMV diversified centuries after rice was domesticated or introduced in Africa, and decades before epidemics were reported. The 19th century was a period of extension of the rice culture in Africa [37]. This may have favored the spread of RYMV from its primary host to rice, followed by its dissemination throughout Africa.

The divergence time between sobemoviruses and related viruses was estimated to be approximately 9,000 years, that between sobemoviruses and poleroviruses approximately 5,000 years, and that among sobemoviruses approximately 3,000 years (Figure 3). The estimates of the age of sobemovirus diversification did not depend on the sequence length or on the gene considered. Even considering their HPD, these time-scales encompassed the Neolithic “agricultural revolution.” This period was the transition from nomadic hunting and gathering communities to agriculture and settlement. It occurred independently in several prehistoric human societies between 10,000 and 4,000 years before present (BP) [38,39]. Ancient peoples completed the domestication of all major plant species upon which human survival depends ca. 4,500 years BP [40,41].

One likely consequence of agricultural expansion is the dramatic increase of opportunities for encounters between wild and cultivated plant species, between cultivated plants at various stages of domestication, and between plants and potential insect vectors. These new encounters must have facilitated the emergence of plant viruses. This is still apparent nowadays when crop species are moved from their center of origin into new regions. They are exposed to infection by indigenous viruses to which they have not previously been adapted [4,42,43]. Further crowding of plants associated with agricultural development, especially monoculture, facilitated the build-up of vector populations and the disease spread, as is still apparent at the present time [43]. Similarly, the Neolithic age was critical for the emergence of infectious human diseases, a period referred to as the first epidemiologic transition [44]. This was attributed to the increased contacts between humans and wild fauna, and among humans themselves. Our results suggest that the Neolithic age was also a period of epidemiological transition for plant pathogens such as viruses, intrinsically for the same reason: increased contacts between hosts, pathogens and vectors. The hypothesis that the emergence of plant viruses is linked to the development of agriculture is consistent with the view that RNA viruses have a recent origin [12], and also that humans have become the world's greatest evolutionary force [45].

The divergence time of the RdRp of sobemoviruses and poleroviruses bounded the dates of the recombination events between the genera. They must have occurred after the diversification of the common ancestor of the RdRp of sobemoviruses and poleroviruses approximately 5,000 years ago, and before the diversification of each of the two genera approximately 3,000 years ago. These recombination events, which necessarily involved the co-existence of different genomes in the same plant, must have been favored by the increased opportunities of co-infections associated with agricultural expansion that started during the Neolithic age. Events occurring at this period also possibly led to virus diversification outside the plant kingdom, as suggested by the divergence time of the sobemovirus and MBV estimated to be approximately 4,500 years.

Much effort has been recently devoted to the numerical taxonomy of plant viruses to set thresholds in percentage of nucleotide divergence for demarcation criteria at the intra- and

inter-specific levels [46]. In this study, nucleotide divergence illuminates the timescales associated with these demarcation criteria (Figure 3). The limited deviation from the strict clock model allowed the comparison of these timescales. The inter-generic divergence time between sobemoviruses, poleroviruses and luteoviruses exceeded approximately 3,000 years. The inter-specific divergence of sobemoviruses ranged from approximately 500 to 3,000 years. Consistent divergence times of approximately 500 years were obtained between closely related pairs of sobemoviruses, luteoviruses and poleroviruses, which were first considered as strains and later ranked as different species. This provides an estimate of the time associated with speciation of plant viruses. The intra-specific divergence time of RYMV was approximately 200 years, which is 2 to 3 times less than the speciation time of plant viruses. Overall, this range of values revealed that plant diversification at the intra- and inter-specific levels occurred within the Holocene, and has spanned the entire history of agriculture, from the Neolithic age to the present.

Materials and Methods

Sequence analyses

The CP genes (720 nucleotides) of 253 isolates from 16 countries in Africa collected over a 40-year period, and the complete genome of two isolates of RYMV were previously sequenced [10,17]. The complete sequences of the sobemoviruses, the sequences of the RdRp of the poleroviruses, luteoviruses, PnLV, and MBV were downloaded from GenBank (Table 1). The sequences were aligned using CLUSTAL W with default parameters [47]. The parameters of interest were estimated within a Bayesian coalescent framework by a Markov Chain Monte Carlo (MCMC) method using the Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees (BEAST) program (<http://beast.bio.ed.ac.uk/>) [48]. The Bayesian MCMC method estimates a parameter as the mean of its posterior distribution while simultaneously incorporating uncertainty in the underlying genealogy or phylogeny and other parameters.

The length and number of MCMC chains were chosen so that the effective sample size for the root height parameter and other parameters was >200, indicating that the parameter space was sufficiently explored. The convergence of the parameters to a stationary distribution was assessed with TRACER [49], and the statistical uncertainties were summarized in the 95% HPD intervals. Comparison of models was performed by calculating the Bayes Factor (BF), which is the ratio of the marginal likelihood of each model [50]. A value of $\log_{10}(\text{BF}) > 2.3$ was taken as evidence of a strong support for the model with the highest marginal likelihood. The coefficient of variation of the evolution rates calculated under the uncorrelated lognormal relaxed clock model was used to assess the degree of deviation from the strict molecular clock model.

TMRCAs of RYMV

In earlier studies, the evolution rate was the target parameter [10], whereas here the TMRCAs or the root height was the parameter of interest. It was taken as a measure of the divergence time of RYMV. The root height was estimated by enforcing strict and relaxed (uncorrelated lognormal and uncorrelated exponential) molecular clocks as implemented in BEAST [48]. Four demographic models were applied as coalescent priors: constant population size, exponential growth, expansion growth, and a piece-wise Bayesian skyline plot [49]. Default values were used for the other priors. The uncertainty in the TMRCAs of RYMV is summarized by the highest posterior density interval that contains 95% of the marginal posterior distribution.

TMRCAs of sobemoviruses and related viruses

The full sequences of 10 sobemoviruses were considered for the intra-generic analysis (Table 2). The RdRp sequences of related viruses were added for the inter-generic analysis. The total number of characters and the number of parsimony informative characters were calculated with PAUP [51]. The dN/dS ratios were calculated under the MG94 model [52] as implemented in HyPhy (<http://www.hyphy.org/>) [53]. The poleroviruses listed by ICTV [23], *Pea enation mosaic virus* (genus *Enamovirus*) and PnLV were screened for recombination signals. Putative recombinant genomes were searched using the RDP3 package (<http://darwin.uvigo.es/rdp/rdp.html>). It implements six recombinant detection programs: RDP, GENECONV, MaxChi, Chimera, Bootscan and Siscan [54]. The default detection thresholds were applied. Five poleroviruses showing no signals of recombination were subsequently selected: *Beet chlorosis virus* (BchV), *Beet mild yellowing virus* (BMV), *Potato leaf roll virus* (PLRV), CYDV-RPS and CYDV-RPV (Table 2). Similarly, the RdRp sequences of two luteoviruses were chosen: BYDV-PAS and BYDV-MAV.

The best-fitting nucleotide substitution model was evaluated by hierarchical likelihood ratio testing [55], as implemented in HyPhy [53]. The best-fitting model was the HKY model with gamma rate heterogeneity. The dates of isolation of the virus species were considered as contemporaneous as they differed by a few years only, whereas our study dealt with inter-specific divergence times ranging from hundreds to thousands of years. The maximum clade credibility tree was reconstructed by Bayesian inference under the relaxed molecular clock models as implemented in BEAST. A Yule

speciation process was selected as a tree prior. The distribution of the estimates of the TMRCAs of RYMV was subsequently used as the prior of the RYMV node for upward calibration of the nodes of the trees. The HPD intervals of the TMRCAs of sobemoviruses and related viruses subsequently summarized both the uncertainties of the phylogenetic signal and of the prior (the RYMV age). A uniform distribution with bounds of 5×10^{-5} and 5×10^{-3} nt/site/year was applied as the prior of the uncorrelated lognormal relaxed clock mean. A similar prior was applied for the Yule speciation process birth rate. A uniform distribution with bounds of 0.2 and 5 was applied as the prior of the gamma shape parameter. A Jeffrey prior with initial value of 1 was applied for the HYK transition-transversion parameter.

Acknowledgments

We thank J.M. Thresh, A.L. Haenni, André Fargette, and three anonymous reviewers for constructive criticisms of the manuscript; J. Berthaud, C. Brugidou, F. Fabre, A. Ghesquière, J.F. Guegan, B. Lafay, B. Moury, J.C. Pintaud, G. Serpantié, and members of the recently established Plant Virus Ecology Network for helpful discussions; and R.A.C. Jones and G.I. Dwyer for supplying dates of isolation of SCMoV.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: DF APG DS SL EH OT GK. Analyzed the data: DF APG DS SL EH OT GK. Wrote the paper: DF. Advised on epidemiological and ecological aspects of the study: APG DS SL.

References

- Duffy S, Shackelton LA, Holmes EC (2008) Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat Rev Genet* 9: 267–276.
- Elena SF, Agudelo-Romero P, Carrasco P, Codoner FM, Martin S, et al. (2008) Experimental evolution of plant viruses. *Heredity* 100: 478–483.
- Roossinck MJ (2005) Symbiosis versus competition in plant virus evolution. *Nature Rev* 3: 917–924.
- Lovisolo O, Hull R, Röslér O (2003) Coevolution of viruses with hosts and vectors and possible paleontology. *Adv Virus Res* 62: 325–379.
- García-Arenal F, Fraile A, Malpica JM (2001) Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annu Rev Phytopathol* 39: 157–186.
- Block J, Mackenzie A, Guy P, Gibbs A (1987) Nucleotide sequence comparisons of turnip yellow mosaic virus isolates from Australia and Europe. *Arch Virol* 97: 283–295.
- Fraile A, Escriu F, Aranda MA, Malpica JM, Gibbs AJ, García-Arenal F (1997) A century of tobamovirus evolution in an Australian population of *Nicotiana glauca*. *J Virol* 71: 8316–8320.
- Gibbs AJ, Keese PL, Gibbs MJ, García-Arenal F (1999) Plant virus evolution: Past, present and future. In: Domingo E, Webster R, Holland J, eds. *Origin and evolution of viruses*. London: Academic Press. pp 263–285.
- Duffy S, Holmes EC (2008) Phylogenetic evidence for rapid rates of molecular evolution in the single-stranded DNA begomovirus *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV). *J Virol* 82: 957–965.
- Fargette D, Pinel A, Rakotomalala M, Sangu E, Traoré O, et al. (2008) *Rice yellow mottle virus*, an RNA plant virus, evolves as rapidly as most RNA animal viruses. *J Virol* 82: 3584–3589.
- Simmons HE, Holmes EC, Stephenson AG (2008) Rapid evolutionary dynamics of zucchini yellow mosaic virus. *J Gen Virol* 89: 1081–1085.
- Holmes EC (2003) Molecular clock and the puzzle of RNA virus origins. *J Virol* 77: 3893–3897.
- Welch JJ, Bromham L (2005) Molecular dating when rates vary. *Trends Ecol Evol* 6: 320–327.
- Drummond AJ, Ho SY, Phillips MJ, Rambaut A (2006) Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol* 4: e88. doi:10.1371/journal.pbio.0040088.
- Kouassi N, N'Guessan P, Albar L, Fauquet C, Brugidou C (2005) Distribution and characterization of *Rice yellow mottle virus*: a threat to African farmers. *Plant Dis* 89: 124–133.
- Chare ER, Holmes EC (2006) A phylogenetic survey of recombination frequency in plant RNA viruses. *Arch Virol* 15: 933–946.
- Fargette D, Pinel A, Abubakar Z, Traoré O, Brugidou C, et al. (2004) Inferring the evolutionary history of *Rice yellow mottle virus* from genomic, phylogenetic and phylogeographic studies. *J Virol* 78: 3252–3261.
- Hull R, Fargette D (2005) *Sobemovirus*. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, eds. *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses*. Eight report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam: Elsevier/Academic Press. pp 885–890.
- Balke I, Reseiva G, Zeltins A (2007) The *Ryegrass mottle virus* genome codes for a sobemovirus 3C-like serine protease and RNA-dependent RNA polymerase translated via –1 ribosomal frameshifting. *Virus Genes* 35: 395–398.
- Meir M, Truve E (2006) Sobemoviruses possess a common CIMV-like genomic organization. *Arch Virol* 152: 635–640.
- Lokesh GL, Gopinath K, Satheshkumar PS, Savithri HS (2001) Complete nucleotide sequence of *Sesbania mosaic virus*: a new virus species of the genus *Sobemovirus*. *Arch Virol* 146: 209–223.
- Meer M, Truve E (2006) An attempt to identify recombinants between two sobemoviruses in doubly infected oat plants. *Environ Biosaf Res* 5: 47–56.
- D'Arcy CJ, Dommier LL (2005) *Luteoviridae*. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, eds. *Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses*. Eight report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam: Elsevier/Academic Press. pp 891–900.
- Siepen M, Pohl JO, Koo BJ, Wege C, Jeske H (2005) *Poinsettia latent virus* is not a cryptic virus, but a natural polerovirus-sobemovirus hybrid. *Virology* 336: 240–250.
- Gibbs M (1995) The luteovirus supergroup: rampant recombination and persistent partnerships. In: Gibbs AJ, Calisher CH, García-Arenal F, eds. *Molecular basis of virus evolution*. Cambridge: Cambridge University Press. pp 351–368.
- Miller WA, Liu S, Beckett R (2002) *Barley yellow dwarf virus: Luteoviridae or Tombusviridae?* *Mol Plant Pathol* 3: 177–183.
- Wright P, Revill P (2005) Family *Barnaviridae*. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA, eds. *Classification and nomenclature of viruses*. Eight report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam: Elsevier/Academic Press. pp 1125–1128.
- Dwyer GI, Njeru R, Williamson S, Fosu-Nyarko J, Hopkins R, et al. (2003) The complete nucleotide sequence of *Subterranean clover mottle virus*. *Arch Virol* 148: 2237–2247.
- Wren JD, Roossinck MJ, Nelson RS, Scheets K, Palmer MW, et al. (2006) Plant virus biodiversity and ecology. *PLoS Biol* 4: e80. doi:10.1371/journal.pbio.0040080.
- Templeton AR (2006) Population genetics and microevolutionary theory. Hoboken: Wiley-Liss. 705 p.
- Renner SS (2005) Relaxed molecular clocks for dating historical plant dispersal events. *Trends Plant Sci* 10: 550–558.
- Jones R, Fosu-Nyarko J, Jones M, Dwyer G (2001) Subterranean clover mottle virus. *AAB Description of Plant Viruses*, No. 387. www.dpvweb.net/dpv.
- Abubakar Z, Ali F, Pinel A, Traoré O, N'Guessan P, et al. (2003) Phylogeography of *Rice yellow mottle virus* in Africa. *J Gen Virol* 84: 733–743.
- Bakker W (1974) Characterization and ecological aspects of rice yellow mottle virus in Kenya. Agricultural research report no. 829. Wageningen Agricultural University, Wageningen. The Netherlands.

35. Fauquet C, Thouvenel JC (1977) Isolation of the rice yellow mottle virus in Ivory Coast. *Plant Dis Reporter* 61: 443–446.
36. Chang TT (1976) The origin, evolution, cultivation, dissemination and diversification of Asian and African rices. *Euphytica* 25: 425–441.
37. Porteres R (1950) Vieilles agricultures de l'Afrique intertropicale. *Agron Afr* 9: 489–507.
38. Diamond J (2002) Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature* 418: 700–707.
39. Mazoyer M, Roudart L (2006) A history of world agriculture; from the Neolithic age to the current crisis. New-York: New York University Press. 480 p.
40. Doebley JF, Gaut BS, Smith BD (2006) The molecular genetics of crop domestication. *Cell* 127: 1309–1321.
41. Harlan JR (1992) *Crops and Man*. 2nd edition. American Society of Agronomy. 284 p.
42. Buddenhagen IW (1977) Resistance and vulnerability of tropical crops in relation to their evolution and breeding. *Ann New York Acad Sci* 287: 309–326.
43. Thresh JM (1982) Cropping practices and virus spread. *Annu Rev Phytopathol* 20: 193–218.
44. Barret R, Kuzawa CW, McDade T, Armelagos GJ (1998) Emerging and re-emerging infectious diseases: the third epidemiologic transition. *Annu Rev Anthropol* 27: 247–271.
45. Palumbi SR (2001) Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science* 293: 1786–1790.
46. Van Regenmortel MHV (2007) Virus species and virus identification: past and current controversies. *Infect Genet Evol* 7: 133–144.
47. Thompson JD, Higgins DJ, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W. Improving the sensitivity of the progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673–4680.
48. Drummond AJ, Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol* 7: 214. doi:biomedcentral.com/1471-2148/7/214.
49. Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol* 22: 1185–1192.
50. Suchard MA, Weiss RE, Sinsheimer JS (2001) Bayesian selection of continuous time Markov chain evolutionary models. *Mol Biol Evol* 18: 1001–1013.
51. Swofford DL (2000) PAUP: phylogenetic analysis using parsimony, version 4. Sunderland: Sinauer Associates.
52. Yang Z (2006) *Computational molecular evolution*. Oxford: Oxford University Press. 357 p.
53. Kosakovsky Pond SLK, Frost SDW, Muse SV (2005) HyPhy: hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics* 21: 676–679.
54. Martin DP, Williamson C, Posada D (2005) RDP2: recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* 21: 260–262.
55. Posada D, Crandall K (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14: 817–818.
56. Sérémé D, Lacombe S, Konaté M, Pinel-Galzi A, Traoré E, et al. (2008) Biological and molecular characterization of a putative new sobemovirus infecting *Imperata cylindrica* and maize in Africa. *Arch Virol*. In press.

Note Added in Proof

Reference [56] is cited out of order, as it was accepted for publication while this article was in press.

CHAPITRE 4

Diversité du virus de la panachure jaune du riz et contrainte fonctionnelle de sa protéine P1 sur la suppression de silencing*

* Une partie des résultats de ce chapitre a été publié dans la revue "*Plos Pathogens*" (Pinel-Galzi *et al.*, 2007; voir Annexe 7)

4.1. Introduction

Les études de la variabilité intra- ou interspécifique virale sont nécessaires pour obtenir des informations concernant l'épidémiologie et l'évolution des virus de plantes. La collecte de données informe sur la structure et la distribution spatiale des populations virales. L'interprétation de ces données permet de jeter un regard en arrière et à reconstituer les événements évolutifs ayant conduit à la situation observée puis parfois à prédire leur évolution. La description de la variabilité virale repose sur la mise au point d'outils performants, capables de détecter de très faibles variations génétiques qui ont parfois des conséquences importantes sur un plan épidémiologique ou évolutif. La plupart des études disponibles portent sur la variabilité génétique et sur les relations phylogénétiques entre les différents virus. Cependant, l'origine de cette variabilité et les processus qui modulent son évolution (sélection naturelle ou dérive génétique, entre autres) sont très peu étudiés.

Le RYMV est responsable de la maladie de la panachure jaune du riz et il est l'une des principales contraintes biotiques du riz en Afrique où l'intensification de la riziculture est une priorité pour répondre aux besoins sans cesse croissants des populations. Les méthodes de lutte préconisées, pour faire face à ce pathogène, sont de type intégrés reposant essentiellement sur l'utilisation de variétés résistantes accompagnées de mesures prophylactiques.

L'impact de cette maladie sur les rendements est tel qu'une attention particulière a été accordée à ce virus et a fait l'objet jusqu'aujourd'hui d'intenses études. Ainsi, une meilleure connaissance a été acquise principalement sur la transmission, l'écologie et l'épidémiologie de la maladie, sur l'organisation génomique, la structure et la diversité du virus (Traoré *et al.*, 2009). Cependant, en raison de ses nombreux modes de propagation, l'épidémiologie de la maladie reste complexe, l'apparition de la maladie imprévisible et son contrôle jusque là difficile. Récemment, il a été mis en évidence l'existence de plusieurs pathotypes virulents dans plusieurs sérogroupes de RYMV. Ces pathotypes ont également des distributions géographiques contrastées (Sorho *et al.*, 2005 ; Traoré *et al.*, 2005). Enfin, les études portant sur les mécanismes d'émergence des pathotypes virulents ont permis de montrer en laboratoire qu'un isolat avirulent peut devenir virulent après plusieurs passages successifs sur une variété résistante (Fargette *et al.*, 2002a). Des contournements au champ ont aussi été observés (Konaté *et al.*, 1997). Par comparaison des séquences, une différence codante dans la VPg où l'arginine est remplacée par isoleucine en position 48 a été mise en évidence et son rôle, dans l'émergence de pathotypes virulents a été validé par mutagenèse dirigée d'un clone infectieux

(Hébrard *et al.*, 2005). De récentes études ont également permis de mettre en évidence des changements d'acides aminés (positions 38, 42, 43, 48, 52) associés à la virulence au niveau de la VPg (Pinel-Galzi *et al.*, 2007).

Cette étude sur la diversité du RYMV a été rendu possible grâce à l'existence d'une collection d'isolats de référence, qui est l'une des collections de phytovirus les plus complètes et les mieux étudiées (Fargette, communication personnelle). La comparaison des séquences d'isolats prélevés au cours des quarante six dernières années (1966-2006), à l'aide de méthodes phylogénétiques, nous a permis de dater la diversification du RYMV ainsi que celle des virus apparentés et d'établir une relation entre l'histoire de la domestication du riz et la diversification du RYMV (Fargette *et al.*, 2008b). L'étude en relation avec la suppression de silencing et la pathogénie tire également parti de la connaissance de la diversité du RYMV. La protéine P1 du RYMV est un suppresseur de silencing (Voinnet *et al.*, 1999) et la force de la suppression est fonction de l'isolat utilisé (Siré *et al.*, 2008). Cette capacité à inhiber le silencing ouvre de nouvelles pistes de recherches sur le rôle qu'a joué la suppression au cours de l'évolution du RYMV ou sur la durabilité des résistances. Enfin, en ajoutant le fait que cette protéine est susceptible d'avoir des implications dans le domaine des biotechnologies, l'ensemble justifie une étude approfondie de la diversité du RYMV.

En somme, grâce aux connaissances cumulées sur la diversité du RYMV, il est apparu clairement que le virus évolue et se diversifie constamment avec l'apparition d'isolats contournant la résistance élevée de Giganté et d'un nouveau sérotype sahélien Ser-sa (Traoré *et al.*, 2005). L'objectif de cette étude (Chapitre 3) est d'évaluer la diversité (sérologique, pathogénique et moléculaire) d'isolats de RYMV prélevés sur des graminées sauvages et cultivés. Dans ce cadre, nous nous intéresserons à l'effet des sites sous sélection positive sur la suppression de silencing ainsi qu'aux implications de cette suppression sur la pathogénie et ses applications dans le domaine des biotechnologies.

4.2. Caractérisation de la diversité sérologique et moléculaire du RYMV

Les résultats de cette caractérisation sont présentés dans le tableau 1 de l'article 4. Vingt isolats provenant de trois pays d'Afrique de l'Ouest (Burkina Faso, Mali, Niger) et d'un pays d'Afrique Central (Tchad) ont fait l'objet d'une caractérisation sérologique au cours de cette thèse. Parmi les 20 isolats, 15 ont été choisis dans la collection de l'INERA sur la base de la spécificité de leurs hôtes d'origine (pour la plupart des graminées sauvages) et de leur capacité à infecter l'hôte différentiel, *Dactyloctenium aegyptium* (isolats : Ma208, Ng155 et Tc77). Les cinq autres isolats ont été collectés au cours d'une prospection réalisée au Mali, et

au Burkina Faso en 2007. Des anticorps monoclonaux, préparés à l'IRD de Montpellier (Pinel *et al.*, 2000), ont été utilisés comme anticorps pour la détection du virus dans les échantillons. Le corpus d'isolats utilisé dans cette étude présente donc trois profils sérologiques Ser1, Ser2 et Ser-sa.

Par ailleurs, l'analyse des séquences de la protéine de capsid, marqueur de la diversité du RYMV (Abubakar *et al.*, 2003), a permis de mettre en évidence une bonne correspondance entre les typages moléculaire et sérologique. Ces résultats confirment ceux déjà obtenus par Fargette *et al.* (2002b) dans une précédente étude et montrent que les isolats qui ont fait l'objet de cette étude couvrent toute la diversité du RYMV présente en Afrique de l'Ouest. On dénombre ainsi neuf isolats appartenant au sérotype Ser1, quatre au sérotype Ser2 et sept au sérotype Ser-sa. Les trois sérotypes (Ser1, Ser2 et Ser-sa) ont été identifiés en Afrique de l'ouest (Burkina Faso, Mali, Niger) tandis que seul le sérotype Ser1 était présent en Afrique centrale (Tchad).

4.3. Caractérisation de la diversité pathogénique du RYMV

La caractérisation de la pathogénie des populations virales est une composante indispensable pour la compréhension des interactions plante/virus. L'étude des propriétés pathogéniques de chaque isolat a été réalisée en inoculant les variétés résistantes Giganté (Albar *et al.*, 2006) et sensibles IR64 avec chaque isolat, puis à observer l'apparition des symptômes. Un test ELISA a aussi été réalisé afin de détecter la présence du RYMV dans les plantes qui ne présentaient pas de symptômes (isolats asymptomatiques). La VPg des isolats ayant contournés la résistance élevée de la variété Giganté (test Elisa positif) a été séquencée avant et après le contournement et les séquences ont été comparées.

Des 20 isolats utilisés, six (Ma202, Ma203, Ma204, Ma206, Ng155 et Tc77, tableau 1, article 4) ont pu infecter la variété résistante Giganté, soit un taux de contournement de 30 %. En effet, des symptômes typiques de panachure jaune ont été observés sur les feuilles des plantes à partir du 15^e jour après inoculation. Ces résultats ont été confirmés par ELISA. Ce test a aussi permis de constater des variations importantes dans la concentration de certains isolats dans les plantes, de même il a permis d'identifier des plantes qui ne présentaient pas de symptômes (isolats asymptomatiques) mais qui contenaient le virus. Des isolats capables de contourner la résistance sont identifiés dans chaque sérotype décrit dans cette étude. En effet, parmi les isolats contournants, trois appartiennent au sérotype sahélien Ser-sa, deux au sérotype Ser1 et un au sérotype Ser2. Ainsi, pour la première fois, notre étude a permis de montrer qu'un isolat appartenant au sérotype Ser2 peut contourner la résistance élevée de

Giganté (Pinel-Galzi *et al.*, 2007). Ce résultat constitue donc un point important dans la gestion de la durabilité des résistances et devra être pris en compte dans le déploiement de nouvelles variétés résistantes au RYMV en Afrique de l'Ouest.

Chez le RYMV, une substitution non synonyme en position 48 responsable du changement d'une Arginine en Isoleucine dans la Vpg est responsable du contournement (Hébrard *et al.*, 2006) de la résistance de Giganté. Le séquençage et l'analyse des séquences de la VPg des isolats ayant contournés la résistance élevée de Giganté ont permis de mettre en évidence un nouveau schéma mutationnel (Pinel-Galzi *et al.*, 2007). En effet, des six isolats capables de contourner la résistance de Giganté, Ma202 et Ma203 ont muté à la position 48 de la VPg, Ma204 à la position 42 de la VPg tandis qu'aucune mutation n'a été observée chez Ma206 et cela, 3 mois après inoculation (Figure 8). Les isolats contournant Ng155 et Tc77 se trouvaient déjà maintenus au laboratoire sur la variété Giganté, ce qui n'a pas permis d'avoir la séquence de leur VPg avant leur passage sur Giganté. Par conséquent, ces deux isolats n'ont pas pu être comparés avant et après le contournement de la résistance de Giganté. Par ailleurs, chez l'isolat Ma203 (Ser2), l'arginine (acide aminé chargé positivement, polaire et très hydrophile) a été remplacé par le tryptophane (acide aminé neutre, polaire et hydrophile). Ce schéma mutationnel n'avait jamais été observé jusque là dans le contournement de la résistance ; il constitue un nouveau (le troisième) schéma mutationnel mis en évidence dans le contournement de la résistance de Giganté au RYMV (Pinel-Galzi *et al.*, 2007).

L'insertion, par mutagenèse dirigée en position 48 de la VPg, du tryptophane à la place de l'arginine dans le clone infectieux (Brugidou *et al.*, 1995) n'a pas permis d'infecter la variété résistante Giganté. Ces résultats suggèrent l'implication, en plus de la VPg, d'autres gènes dans le contournement de la résistance.

L'implication de tels sites dans la virulence a été rapportée au niveau de la VPg du PVA (*Potato virus A*) et du RYMV (Moury *et al.*, 2004 ; Pinel-Galzi *et al.*, 2007). Cependant, aucune étude portant sur le rôle des sites sous sélection positive dans la suppression de silencing n'a été réalisée à ce jour. L'objectif de notre étude était de mettre en évidence des acides aminés clés ou des domaines, dans la séquence de la P1, responsables de la diversité fonctionnelle des P1 observée chez le RYMV. Cela devra permettre de mettre en évidence le rôle joué par les protéines supprimeurs au cours de l'évolution du virus, et aussi, d'améliorer "artificiellement" par mutagenèse, la force de suppression d'une protéine P1 donnée en vue de son utilisation en biotechnologie, notamment dans la production de protéines recombinantes (Siré *et al.*, 2006 ; Sérémé *et al.*, 2008b). Pour atteindre cet objectif, nous avons procédé (i) à l'analyse de la diversité de la protéine P1 et à l'identification des sites sous sélection positive ; (ii) par mutagenèse dirigée nous avons déterminé le rôle biologique de chaque site dans la suppression de silencing. Ainsi, les analyses bioinformatiques réalisées, à partir d'un corpus de 44 séquences P1, nous ont permis de confirmer que le gène codant la protéine P1 est le gène le plus variable du génome du RYMV et que ce gène est fortement sous sélection positive. Une signification biologique a également pu être établie entre sites sous sélection positive et suppression de silencing. Pour la première fois nous avons montré, par mutagenèse, qu'il est possible d'augmenter ou de réduire la capacité de suppression de la protéine P1 du RYMV. En effet, dans trois cas sur quatre, on parvient à améliorer significativement la force de suppression de silencing et à la réduire dans un cas sur quatre. Les résultats détaillés de cette étude sont rapportés dans l'article 4.

4.4.2. Article 4 : Implications of sites under positive selection in the RNA silencing suppressor activity of *Rice yellow mottle virus* movement protein P1 (Sérémé *et al.*, A soumettre)

Diversity and implications of sites under positive selection in the RNA silencing suppressor activity of Rice yellow mottle virus movement protein P1

Drissa Sérémé¹, Martine Bangratz², Agnès Pinel-Galzi³, Moumouni Konaté¹, Séverine Lacombe², Denis Fargette³, Alfred S. Traoré⁴, Christophe Brugidou², Gnissa Konaté¹

¹ : Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA), Laboratoire de virologie et de biotechnologies végétales, 01 BP 476 Ouagadougou 01, Burkina Faso

² : Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMR 5096/GDP, Montpellier, France

³ : Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMR 186/RPB, Montpellier, France

⁴ : Université de Ouagadougou, UFR SVT, 03 BP 7021 Ouagadougou 03, Burkina Faso

Summary

To evaluate the genetic diversity and to determinate the selection pressure exerted on *Rice yellow mottle virus* silencing suppressor, sequencing was carried out of the P1 and coat protein of 44 isolates from different geographical origins, hosts, and collecting times. Positive selection has been an exciting topic to evolutionary biologists, because adaptive changes in genes and genomes are ultimately responsible for evolutionary innovations and species differences. However, studies examining positive selection on viruses RNA silencing suppressor proteins are rare, although these proteins play an important role in pathogenesis. Moreover, despite the biological relevance of analyses of molecular adaptation, the issue is still poorly studied. Since then, the selection pressure acting along the movement protein P1 gene of *Rice yellow mottle virus* isolated from isolates representative of the geographic and genetic diversity of the virus was evaluated using two web servers, SELECTON and HYPHY. We showed that the P1 gene is not a reliable typing tool to assign the *Rice yellow mottle virus* isolate to the main clades and that assessing phylogenetic relationships using this gene is not recommended. We also present evidence that RYMV RNA silencing suppressor, which is also involved in replication and cell-to-cell movement, is subjected to positive selective forces. This suggests that this protein gene is under adaptive evolution. We report the effect of the sites under positive selection in the RNA silencing suppressor activity by functional analysis using mutagenesis. All together, these studies outline a computational approach that may be broadly applicable for studying gene adaptation and functional sites in other coding gene. The role of sites positively selected in pathogenesis (symptom expression) remains to be resolved.

Key words : *Rice yellow mottle virus*, diversity, movement protein P1, coat protein silencing suppressor, positive selection

INTRODUCTION

Posttranscriptional gene silencing termed RNA silencing is a highly conserved mechanism in eukaryotes, and has important roles in antiviral defense, genome integrity and development (Baulcombe, 2004). This process involves 21- to 24-nucleotides (nt) RNA molecules produced from longer double-stranded RNA (dsRNA) precursors through the action of RNase III-like enzymes in the Dicer family. Then, small RNAs are incorporated into Argonaute (AGO)-containing RNA-induced silencing complex (RISC) and serves as a guide for sequence-specific cleavage or translational repression of a target RNA. RNA silencing is known to be a natural antiviral defense mechanism (Voinnet, 2001) as well as antibacterial defense (Navarro *et al.*, 2008).

Plant viruses are strong inducers and targets of RNA silencing, and many viruses encode silencing suppressors to counteract the antiviral effect of RNA silencing (Kasschau and Carrington, 1998 ; Voinnet *et al.*, 1999 ; Vance and Vaucheret, 2001). In recent years, numerous RNA silencing suppressors have been identified in many plant viruses and some animal viruses (Anandalakshmi *et al.*, 1998 ; Brigneti *et al.*, 1998 ; Kasschau and Carrington, 1998 ; Li and Ding, 2006 ; Voinnet, 2005). They are extremely diverse in sequence, structure, and mechanism of action. Among the known suppressors, potyvirus HCPro, Cucumber mosaic virus (CMV) 2b and tombusvirus p19 have been studied most extensively (Roth *et al.*, 2004). In sobemoviruses, *Rice yellow mottle virus* (RYMV) 18-19 kDa protein (Voinnet *et al.*, 1999 ; Siré *et al.*, 2008), *Cocksfoot mottle virus* (CfMV) 12 kDa protein (Sarmiento *et al.*, 2008), and *Imperata yellow mottle virus* (IYMV) 24.1 kDa protein (Séréme, unpublished data) were found to possess an ability to suppress RNA silencing.

P1 protein from RYMV that acts as non-autonomous cell silencing suppressor (Voinnet *et al.*, 1999 ; Himber *et al.*, 2003) is one of these described proteins. RYMV is the major pathogen of irrigated rice and is endemic in Africa (Bakker, 1974 ; Abo *et al.*, 1998). Properties of the genome of RYMV and its particle structure have been well described (Ngon *et al.*, 1994 ; Qu *et al.*, 2000, Brugidou *et al.*, 2002) as well as genetic diversity and phylogeny of the virus (Fargette *et al.*, 2002b ; 2004). The P1 is an 18-19 kDa protein encoded by the first open reading frame (ORF) of RYMV. Such protein is dispensable for viral replication but is closely related to virus infectivity and also to virus spread (Bonneau *et al.*, 1998). The P1 protein coded by ORF1 is more variable than the 3 others ORFs of RYMV genome with 8.0 to 9.3 % divergence in nt (Fargette *et al.*, 2002b). In a P1 diversity silencing suppression

study, it was shown that the P1 protein of the Tanzanian isolate (Tz3) is the strongest silencing suppressor and the Madagascan isolate (Mg1) the weakest ones (Siré *et al.*, 2008).

In a protein molecule, different amino acid sites usually have different biochemical functions, indicating that the types and strengths of natural selection vary among amino acid sites. It is therefore interesting to detect natural selection at single amino acid sites. In a recent work, Sawyer *et al.* (2005) described a remarkable study in which phylogenetic sequence comparison identified a small segment of the primate TRIM5 α protein to be under positive selection, and functional analysis using mutagenesis confirmed the importance of the segment in species-specific retroviral inhibition. Recently, point mutations effect on different RNA silencing suppressors proteins, including HC-Pro protein (Gonzalez-Jara *et al.*, 2005; Yambao *et al.*, 2008 ; Torres-Barcelo *et al.*, 2008) and RYMV P1 protein (Siré *et al.*, 2008), have been reported. However, studies have not yet resolved the effects of sites under positive selection on the RNA silencing suppressor activity. Since then and because RYMV, experimentally, adapts rapidly to alternative hosts through accumulation of point mutations in VPg, the protein involved in resistance breaking (Hébrard *et al.*, 2006 ; Pinel-Galzi *et al.*, 2007), we used its P1 suppressor protein to identify amino acids sites that are under positive selection.

Positive, diversifying selection is an important evolutionary force that accelerates divergence between homologous proteins (Swanson *et al.*, 2001). A useful follow-up to the codon-substitution analyses is to experimentally manipulate putative positively selected codons and perform subsequent protein or organism level assays to determine the functional significance of variation at these sites.

Selection at the protein level can be measured by ω (dN/dS), in which dN = nonsynonymous substitution rate (nonsynonymous changes per nonsynonymous site) and dS = synonymous substitution rate (synonymous changes per synonymous site). If amino acid changes provide better fitness, the mutations will be fixed at a higher rate than synonymous mutations. This results in dN>dS and $\omega>1$. When ω equals 1 or is lower than 1, neutral evolution and purifying selection can be inferred, respectively. Originally, ω was calculated as an average for the whole gene, which does not allow sensitive detection of individual amino acid residue under positive selection. Subsequently codon-based models that allow the ω ratio to vary amongst sites were developed (Nielsen and Yang, 1998 ; Yang and Nielsen, 2000). These models describe ω ratio distribution amongst sites : M0 assumes one constant ω for all sites ; M3 classifies sites into discrete classes with different ω ; M7 allows ω to vary according to a distribution that represents negative or neutral selection ; M8 adds on top of M7 a discrete ω class for sites with positive selection ($\omega>1$). Likelihood ratio test is used as a

statistical test of goodness-of-fit to compare the two models and test whether the more complex model, e.g. M8 or M3, fits the dataset significantly better than the simpler model, e.g. M7 or M0. An empirical Bayes approach is then used to calculate the posterior probability that each site is from a particular site class, and sites with high posterior probabilities coming from the class with $\omega > 1$ are inferred to be under positive selection (Yang *et al.*, 2005). These types of analyses have thus far only rarely been performed across RNA silencing suppressor gene. In the present paper, we will also use this criterion to detect selective forces exerted on the RYMV suppressor protein P1.

To detect sites under positive selection, we used two servers, SELECTON version 2.4 (Stern-Ginossar *et al.*, 2007) and HYPHY (Pond *et al.*, 2005). SELECTON server automatically calculate the ratio between nonsynonymous (Ka) and synonymous (Ks) substitutions at each site of the protein and perform statistical tests to determine whether $Ka \neq Ks$.

Then, we performed biological tests by using mutagenesis to evaluate the effect of these sites in the RNA silencing suppression of P1-Tz3, the strongest silencing suppressor. Analyses were conducted with the purpose to identify amino acid residues under positive selection and to test the biological significance of adaptive evolution of P1 suppressor protein. We identified, using both HYPHY and SELECTON servers, 18 sites were positively selected among which four are strongly under positive selection and have particular localization in P1 sequence. This paper provides the first evolutionary analysis of RNA silencing suppressor protein from a virus.

MATERIALS AND METHODS

Viral isolates :

The viruses used in this study were from our virus collection, one of the largest collections for a plant virus, and originated from four countries of West (Burkina Faso, Mali and Niger) and Central Africa (Chad) (Table 1). RYMV diversity in these areas was taken into account and the isolates were chosen in relation to the original host, the serotype and pathotype they belong to. Serotypes were differentiated by using anti-RYMV monoclonal antibodies according to N'Guessan *et al.*, (2000). RYMV pathotypes were defined according to the ability of isolates to break resistance or not of highly resistant cultivars *Oryza sativa indica* cv. Gigante. A total of 17 isolates was used. These isolates were originated from *Poaceae* species including the wild rice species *Oryza longistaminata*, *Echinochloa colona*,

Eragrostis atrovirens and *Dactyloctenium aegyptium*, a differential host plant for RYMV (Table 1). The isolates from the original plants were multiplied in the susceptible rice *Oryza sativa indica* cv. IR64 by mechanical inoculation, and the viral population was recovered from this infected material.

Table 1 : Origin and properties of RYMV isolates used in this study

Isolate code	Region	Country of origin	Original host plant*	Year of isolation	serotype	Pathogenicity
BF701	West Africa	Burkina Faso	<i>O. longistaminata</i>	1997	Ser-sa	nRB
BF702	West Africa	Burkina Faso	<i>O. longistaminata</i>	1997	Ser 1	nRB
BF703	West Africa	Burkina Faso	<i>O. sativa</i>	1997	Ser 1	nRB
Ma201	West Africa	Mali	<i>O. longistaminata</i>	1997	Ser-sa	nRB
Ma202	West Africa	Mali	<i>Pycnus spicatus</i>	1997	Ser-sa	RB
Ma203	West Africa	Mali	<i>F. littoralis</i>	1997	Ser 2	RB
Ma204	West Africa	Mali	<i>E. atrovirens</i>	1997	Ser 2	RB
Ma205	West Africa	Mali	<i>E. indica</i>	1997	Ser-sa	RB
Ma207	West Africa	Mali	<i>P. subalbidum</i>	1997	Ser 1	nRB
Ma208	West Africa	Mali	<i>D. aegyptium</i>	1997	Ser 2	nRB
Ma209	West Africa	Mali	<i>Bambusa sp</i>	1997	Ser 2	nRB
Ma210	West Africa	Mali	<i>E. colona</i>	1997	Ser-sa	nRB
Ma211	West Africa	Mali	<i>O. sativa</i>	2007	Ser 2	nRB
Ma212	West Africa	Mali	<i>O. sativa</i>	2007	Ser 1	nRB
Ma213	West Africa	Mali	<i>O. sativa</i>	2007	Ser 2	nRB
Ma214	West Africa	Mali	<i>O. sativa</i>	2007	Ser 1	nRB
Ma215	West Africa	Mali	<i>O. sativa</i>	2007	Ser 1	nRB
Ng155	West Africa	Niger	<i>O. sativa</i>	2005	Ser 1	RB
Tc77	Central Africa	Chad	<i>O. sativa</i>	2005	Ser 1	RB

* Isolates originated from *O. sativa* cultivars (*O. sativa*), or from the wild Poaceae species *Oryza longistaminata* (*O. longistaminata*), *Dactyloctenium aegyptium* (*D. aegyptium*), *Echinochloa colona* (*E. colona*), *Fimbristylis littoralis* (*E. littoralis*), *Eleusine indica* (*E. indica*) or *Eragrostis atrovirens* (*E. atrovirens*). RB = resistance-breaking isolates, nRB = non resistance-breaking isolates

Isolation of RNA, RT-PCR and sequencing :

Total RNA isolation was performed on leaves with an RNeasy plant mini-kit (Qiagen). Total RNA preparations were used as templates for reverse transcription (RT) reactions with

Superscript II-RT (Invitrogen). RT products were PCR amplified with a high Fidelity PCR system. The resulting RT-PCR products were separated by electrophoresis in 1 % agarose gels, eluted and sequenced. Sequencing was carried out with the Taq terminator sequencing kit (Applied Biosystems, Inc.) and analyzed on an Applied Biosystems 373 A sequencer.

Sequence analyses :

The P1 and coat protein (CP) genes without 5' UTR (474 nt 723 nt, respectively) of 44 isolates from nine countries in Africa (17 isolates collected in this study and 27 isolates in earlier studies) were sequenced. The 17 isolates are representative of RYMV diversity in West Africa, the second RYMV's center of diversification. Of the 27 previously sequenced isolates, 18 are representative of the geographic and genetic diversity of RYMV in Africa (Fargette *et al.*, 2004) and the rest (i.e 9 isolates) have shown variable pathogenicity assessed through symptom intensity, but low sequence diversity (Siré *et al.*, 2008). The P1 and CP sequences from earlier studies were downloaded from GenBank. The nomenclature of the isolates, their country of origin and their suppliers are listed in Table 2. The following analyses were conducted on the 44 sequences.

(i) **Sequence alignment** : Sequences data were analyzed using Lasergene 7 software by DNASTAR. The sequences were aligned using CLUSTAL W with default parameters (Thompson *et al.*, 1994), followed by manual inspection and analysis.

(ii) **Sequence diversity** : The nucleotide diversity index (π), which is the average number of nucleotide differences per site between two sequences (Nei, 1987), was calculated using DnaSP 4.90.1 software (Rozas *et al.*, 2003). The distribution of genetic diversity along RYMV P1 and CP genes was investigated using the sliding window method calculating π on a sliding window of 50 nt moved by steps of 10 nt. The P1 and CP genes were used in the diversity study based on the fact that they are the most variable regions of RYMV genome.

(iii) **Protein secondary structure** : Secondary structure prediction for the RYMV P1 protein was made by using the PSIPRED (McGuffin *et al.*, 2000) protein structure prediction server (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred>).

(iv) **Phylogenetic analyses** : Phylogenetic reconstructions were obtained by two complementary methods : (i) maximum parsimony (MP) using PAUP 4.0 (Swofford, 2000). (ii) maximum-likelihood (ML) implemented in PHYML using the HKY model with a gamma shape parameter (Guindon *et al.*, 2005). Tanzanian isolate Tz3, which is known to be the most basal RYMV isolate based on its complete genome sequence (Fargette *et al.*, 2004), was used

as an outgroup. Bootstrap evaluation of the branching pattern was performed with 500 replicates. Trees were viewed with the help of TREEVIEW version 1.6.6.

(v) ***Selection pressure analyses*** : A search for positive selection was performed on P1 sequences. The pattern of selection was inferred through ω values corresponding, respectively, to negative selection ($\omega < 1$), neutral evolution ($\omega = 1$), and positive selection ($\omega > 1$) (Yang and Bielawski, 2000). To determine if codon sites in the P1 sequences of RYMV are a subject of positive selection, analyses were performed by two maximum likelihood methods, Random Effect Likelihood (REL) and Internal Fixed Effect Likelihood (IFEL), as implemented in HYPHY package (Pond *et al.*, 2005) and by an empirical Bayesian method as implemented in SELECTON (Stern *et al.*, 2007). REL is an improved variant of the Nielsen-Yang approach, which allows both dS and dN to vary independently across sites. IFEL is a new likelihood method to fit an independent dN and dS to every site in the context of codon substitution and test whether $dN \neq dS$. SELECTON server automatically calculate the ratio between nonsynonymous (K_a) and synonymous (K_s) substitutions at each site of the protein and perform statistical tests to determine whether $K_a \neq K_s$. HYPHY was run on a computer cluster through the web-based interface, which is available at <http://www.datamonkey.org>. SELECTON is available at <http://selecton.bioinfo.tau.ac.il>. Once positively selected sites have been shown to exist, the second step uses Bayesian methods to locate their position. Sites with high posterior probability above 95 % coming from the class with $\omega > 1$ are inferred to be under positive selection.

Table 2 : Name, country of origin, region, strain, reference and accession no. of the 44 P1 sequenced isolates of *Rice yellow mottle virus*.

Isolate code	Country of origin	Region	Strain	Sequence accession no.	Reference
BF701	Burkina Faso	West Africa	Sa		This study
BF702	Burkina Faso	West Africa	S1		This study
BF703	Burkina Faso	West Africa	S1		This study
Ma201	Mali	West Africa	Sa		This study
Ma202	Mali	West Africa	Sa		This study
Ma204	Mali	West Africa	Sa		This study
Ma207	Mali	West Africa	S1		This study
Ma208	Mali	West Africa	S2		This study
Ma209	Mali	West Africa	Sa		This study
Ma210	Mali	West Africa	Sa		This study
Ma211	Mali	West Africa	S2		This study
Ma212	Mali	West Africa	S1		This study
Ma213	Mali	West Africa	S2		This study
Ma214	Mali	West Africa	S1		This study
Ma215	Mali	West Africa	S1		This study
Ng155	Niger	West Africa	S1		This study
Tc77	Chad	Central Africa	S1		This study
Ci110	Côte d'Ivoire	West Africa	S2		This study
Ci111	Côte d'Ivoire	West Africa	S2		This study
Ci112	Côte d'Ivoire	West Africa	S2		This study
Ci113	Côte d'Ivoire	West Africa	S2		This study
Ci114	Côte d'Ivoire	West Africa	S2		This study
Ci115	Côte d'Ivoire	West Africa	S2		This study
Ci116	Côte d'Ivoire	West Africa	S2		This study
Ci121	Côte d'Ivoire	West Africa	S2		This study
Ci138	Côte d'Ivoire	West Africa	S2		This study
Cia	Côte d'Ivoire	West Africa	S3	AJ608206	Fargette <i>et al.</i> (2004)
Ci4	Côte d'Ivoire	West Africa	S3	AJ608207	Fargette <i>et al.</i> (2004)
Cib	Côte d'Ivoire	West Africa	S2	L20893	Fargette <i>et al.</i> (2004)
Ci63	Côte d'Ivoire	West Africa	S1	AJ608208	Fargette <i>et al.</i> (2004)
Ma10	Mali	West Africa	S1	AJ608209	Fargette <i>et al.</i> (2004)
Ma77	Mali	West Africa	Sa	AJ608210	Fargette <i>et al.</i> (2004)
Nia	Nigeria	West/Central Africa	S1-ca	U23142	Direct submission
Ni1	Nigeria	West/Central Africa	S1-ca	AJ608213	Fargette <i>et al.</i> (2004)
Ni2	Nigeria	West/Central Africa	S1-ca	AJ608214	Fargette <i>et al.</i> (2004)
SL4	Sierra Leone	West Africa	S3	AJ608215	Fargette <i>et al.</i> (2004)
Mg1	Madagascar	East Africa	S4	AJ608211	Fargette <i>et al.</i> (2004)
Mg2	Madagascar	East Africa	S4	AJ608212	Fargette <i>et al.</i> (2004)
Tz3	Tanzania	East Africa	S5	AJ608216	Fargette <i>et al.</i> (2004)
Tz5	Tanzania	East Africa	S4	AJ608217	Fargette <i>et al.</i> (2004)
Tz8	Tanzania	East Africa	S4	AJ608218	Fargette <i>et al.</i> (2004)
Tz11	Tanzania	East Africa	S6	AJ608219	Fargette <i>et al.</i> (2004)
Tz18	Tanzania	East Africa	S6	AJ877020	Traoré <i>et al.</i> (2005)
Tz127	Tanzania	East Africa	S6	AJ876793	Traoré <i>et al.</i> (2005)

cDNA modification and plasmid constructs.

pCambia 1300 plasmid was modified by cloning into its *SmaI* site the 35S cassette (Siré *et al.*, 2008). This construct named pCaK7. GUS coding DNA was inserted between the 35S cassette *XbaI/HindIII* sites and termed pCaK7-Gus. The P1 protein sequence was PCR amplified from the cDNA using forward primer MSP1S (5'-GGAAGCTTACAATTGAAG-3') contains a *HindIII* site (underline) and reverse primer MSP1R (5'-GGTCTAGATCAGAAATTGAGGTATTTGT-3') contains a *XbaI* site underline. To generate 35S-P1, the product with adapted ends was digested with *XbaI* and *HindIII* for directional cloning into *XbaI/HindIII* digested plasmid pCaK7, using standard molecular biology techniques.

Mutagenesis.

Mutants in the P1 sequence were generated by site-directed mutagenesis using the Quickchange II XL kit (Stratagene) following the indications of the manufacturer. Plasmid carrying the P1 of Tanzanian isolate Tz3, the reference hypersuppressor (Siré *et al.*, 2008), was used as a source of wild type virus and template for site-directed mutagenesis. All the mutants were sequenced with an Applied Biosystems PRISM DNA sequencer 3100, and the correctness of mutations verified. Oligonucleotide sequences used for mutagenesis are available upon request.

Agroinfiltration

pCaK7-P1 and pCaK7-GUS plasmids were electroporated into *A. tumefaciens* strain GV3101 and cultured, set to an optical density at 600 nm of 0,5 ; and used to infiltrate small leaves of 3-week-old *N. benthamiana* wild type plants with a 5 ml, needleless syringe. The co-infiltration mixture contained two parts *Agrobacterium* carrying an empty vector, or a plasmid encoding a suppressor and one part *Agrobacterium* carrying reporter gene *uidA*, which induces local silencing. Previously strong (P1-Tz3) and weak (P1-Mg1) RYMV silencing suppressor (Siré *et al.*, 2008), and a binary vector pCaK7 bearing no insert, were used as positive and negative controls, respectively. For each P1 tested, 2 uppermost, fully expanded leaves per plant were co-infiltrated. 35 plants per treatment were used and the GUS expression was monitored during seven days. To assess the reproducibility of the agroinfiltration results gained, we conducted the experiment three times. Furthermore, to increase the validity of comparing data, all plant materials used were grown under the same environmental conditions. Infiltrated plants were maintained in a growth chamber at 22°C-

24°C with 16h of light and a dark period of 8h. For each treatment, 10 leaves from five plants were harvested at the same hour every day.

Protein extraction and quantification of GUS activity by fluorimetry

Quantitative assay for β -glucuronidase (GUS) activity was carried out as described by Jefferson *et al.* (1987) with 4-methylumbelliferone-glucuronide (4-MUG) as substrate. Total soluble proteins were extracted from rice leaves in a sodium phosphate buffer (50 mM NaHPO₄, 10 mM Na₂EDTA, 1 mg.ml⁻¹ N-Laurylsarcosine, 0.1 % v/v triton X100) by two successive centrifugation performed at 20 000 g at 4°C. The supernatant was used as crude extracts. Protein concentration in crude extracts was determined with Bradford reagent (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) using bovine serum albumin as the standard. Fluorescence was measured with a Fluoroskan fluorimeter (Labsystem) at excitation and emission wavelengths of 365 and 455 nm, respectively. Calibration was performed with quantification of fluorescence of soluble 4-methylumbelliferone (MU, Sigma[®]). The enzymatic activity was expressed as picomolar concentration of the fluorescent product 4-methylumbelliferone (MU) per minute and per microgram of total plant protein (pmol MU/mn/ μ g protein). Each GUS activity presented here is mean \pm standard error from different sets of plants of the same experiment.

RESULTS

Nucleotide variability of RYMV CP and P1

Genome fragments of 471 and 720 nt corresponding to the coding gene of RYMV ORF1 and ORF4, respectively were retro-transcribed and amplified for each RYMV isolate listed in Table 1. The resulting DNA fragments were sequenced in both directions. Sequences from the previously studies (Fargette *et al.*, 2004 ; Siré *et al.*, 2008) were also incorporated into the analyses, adding thus up to 44 sequences. We assessed the molecular variability of P1 and CP, which is commonly used as markers of genetic relatedness of RYMV. Then, we used π , the average number of substitutions between any two sequences, to estimate diversity for the P1 and CP genes. Nucleotide diversity was variable among the two genes. P1 sequences were more variable than CP ones. The averages nucleotide diversity among the 44 isolates of RYMV P1 and CP genes were 9.7 % ($\pi = 0.977$) and 7.1 ($\pi = 0.718$), respectively. Peaks of variability of up to 10 % were apparent along the P1 gene (Figure 1A) but were localized in the central part of the CP gene (Figure 1B). For P1, among the 471 nt sites analyzed using

DnaSP, 296 sites were monomorphic, 175 polymorphic and 137 were parsimony informative. In CP genes, 513 sites were monomorphic, 204 polymorphic, and 155 were parsimony informative. The nonsynonymous diversity ($\pi_a = 0.04$) was 6.5 times less than the synonymous diversity ($\pi_s = 0.26$) in P1 and 10 times less than the synonymous ones in CP ($\pi_a = 0.02$; $\pi_s = 0.20$).

To assess the degree of amino acid sequence diversity in P1, pairwise distance comparisons were calculated between the 44 P1 sequences. The predicted amino acid sequences consist of 157 amino acid residues of which 37 (23.6 %) are polymorphic (Figure 2). All the cystein residues are completely conserved including the cysteine of the putative eukaryotic zinc finger motif (C64(x)2C67(x)24C92(x)2C95) which is known to be conserved across the RYMV phylogeny (Siré *et al.*, 2008).

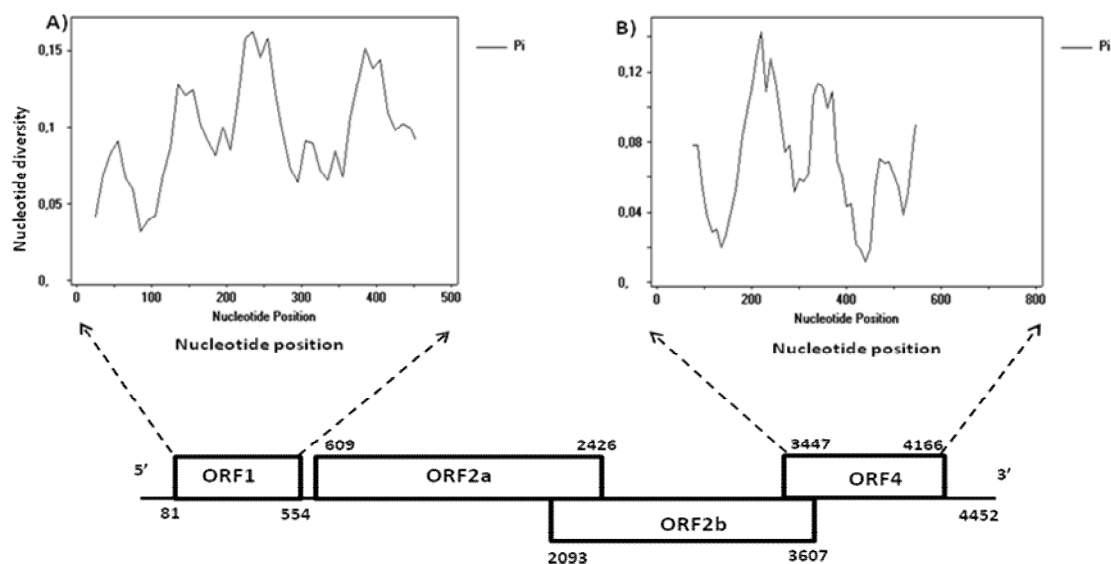


Figure 1 : The nucleotide diversity index (P_i), the average number of nucleotide differences per site, was calculated along the genes using a sliding window of 50 nt moved by steps of 10 nt after alignment of P1 (A), CP (B) of 44 sequences. Genomic organization of RYMV showing P1, and CP genes is represented below the graphs A, and B.

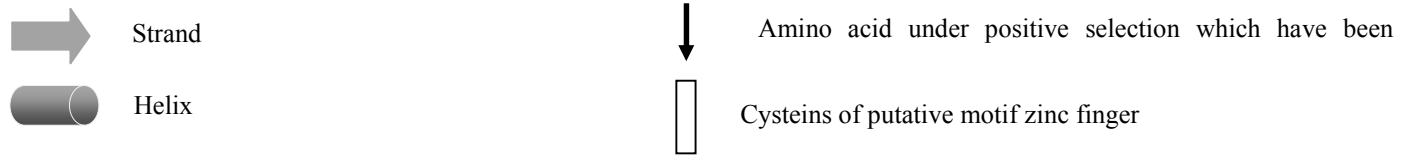


Figure 2. Representation of predicted secondary structure, putative motif Zinc finger and amino acids under positive selection mapped onto multiple alignments of *Rice yellow mottle virus* P1 proteins. Arrows indicate the position of positively selected sites which were mutated in this study. A dash (-) indicates identity with the consensus sequence

Phylogenetic studies : To avoid any misleading conclusions due to the choice of phylogenetic reconstruction method, P1 and CP genes of 44 isolates were analysed by two complementary approaches, the MP and the ML. In a previous study, it was shown that Tanzanian isolate Tz3 is the most basal RYMV isolates (Fargette *et al.*, 2004). Then, we used this isolate as the out-group for the phylogenetic analyses with the P1 and CP sequences. The grouping and bootstrap values were similar using the methods based on maximum likelihood (Figure 3) or maximum parsimony (data not shown).

Phylogenetic analysis of the P1 differed from that of the CP (Figure 3), as it showed a lack of robust resolution of some nodes. Groups separated in the CP sequences analysis were collapsed within the same group. Some incongruence, which broke the relation between the branching order and the east to west origins of the isolates were observed in P1 sequences. With the CP sequence (Figure 3), isolates Ma201, Ma210, BF701, and BF703 from Burkina Faso and Mali in West Africa grouped with other isolates from West Africa. By contrast, with the P1 sequence, these isolates formed a sister group of East Africa isolates Tz18, Tz11, and Tz127 within the paraphyletic group (((Tz18, Tz11), Tz127), ((Ma201, Ma210), (BF701, BF703))). Add to this, isolates Mg1 and Mg2 from Madagascar in East Africa branched with West Africa isolates. Altogether, P1 and CP diversity pattern were different and phylogenetic analyses of P1 not allowed to distinguish the East-African isolate from the West-African ones.

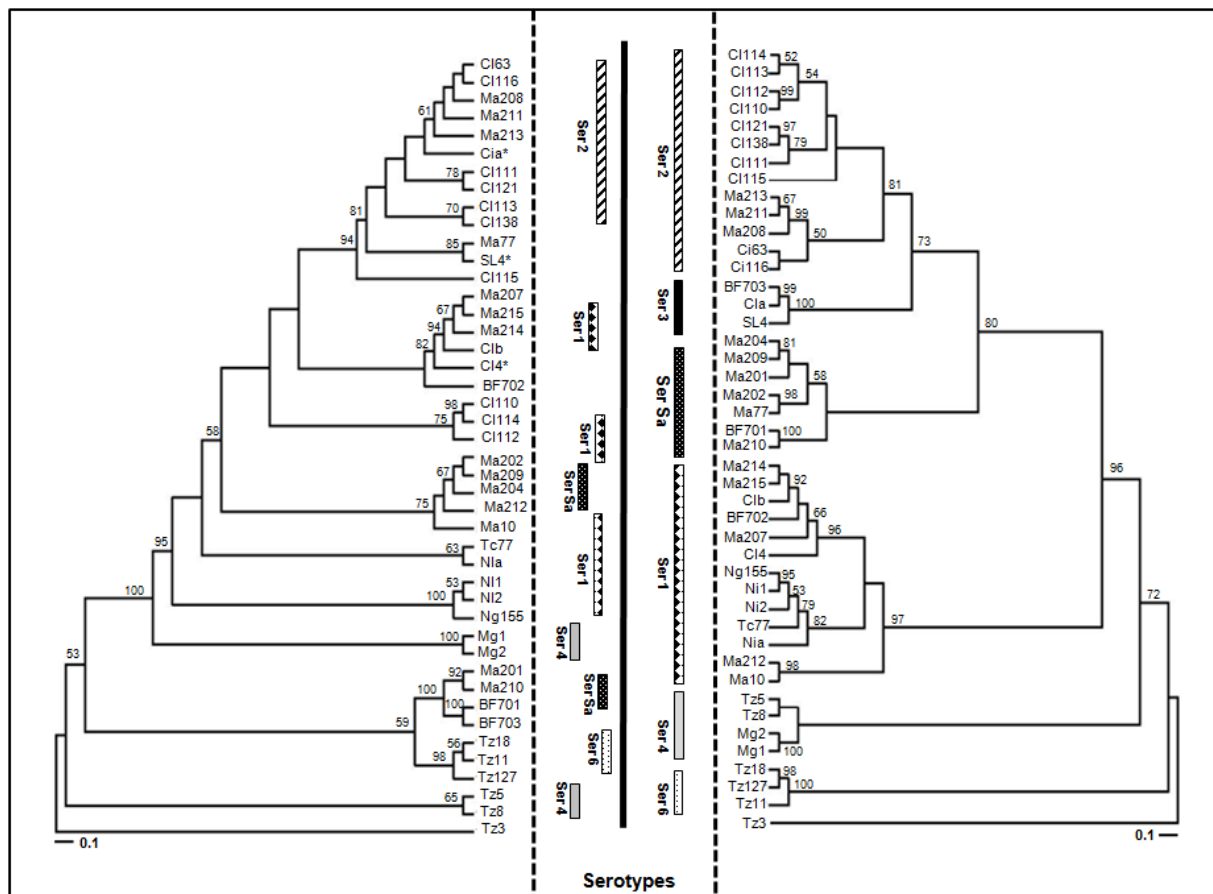


Figure 3. Phylogenetic trees inferred by maximum likelihood from the nucleotide sequences of P1 (left) and CP (right) of 44 *Rice yellow mottle virus* isolates originating from Burkina Faso (BF), Côte d’Ivoire (CI), Madagascar (Mg), Mali (Ma), Niger (Ng), Nigeria (Ni), Sierra-Leone (SL), Chad (Tc), and Tanzania (Tz). Isolate Tz3 was used as the outgroup. The bootstrap support of the branch nodes is given. Only bootstrap values $\geq 50\%$ are indicated at the nodes (500 replicates). The scale bar represents the number of nucleotide substitutions per site. The serotypes of the isolates are indicated vertically in the middle of the figure.

Amino acids sites under positive selection

In order to better understand the role of the P1 in RNA silencing suppression, we investigated its sequence diversity and estimated the selective pressure exerted on it using a significant number of sequences (i.e 44 sequences). Analysis of the selective pressure exerted on proteins is a complementary approach to functional analyses, and was previously applied to proteins involved in parasite-host interactions (Moury *et al.*, 2002 ; Stotz *et al.*, 2000). Here, such an analysis can reveal if changes in the P1 sequence are more probably involved in RNA silencing suppression. Moreover, in case amino acid changes are the silencing inhibition

determinant, this analysis can reveal which of these amino acid changes could be preferably involved in RNA silencing suppression.

Positive selection is detected statistically as a nonsynonymous-to-synonymous nucleotide substitution rate ratio (ω) significantly greater than 1. When $\omega > 1$ for some codons, the likelihood ratio of the two nested models to be compared (M3 versus M0, M3 versus M1 or M8 versus M7) permits testing of whether the positive selection model fits the data significantly better than the null hypothesis corresponding to neutral and/or deleterious substitutions only (Yang, 1997 ; Yang *et al.*, 2000). Then, an empirical Bayesian approach was used to infer to which category (neutral, deleterious or advantageous) each amino acid most likely belongs. Codons with posterior probabilities above 95 % were considered significant.

With HYPHY REL method, 10 codons were under positive selection with a Bayes factor for positive selection higher than 50 (Table 3). Codon 20 appears to be the strongest site under positive selection with a Bayes factor of 879.01 (posterior probability of 0.99). Codon 110 was under high diversifying selection as apparent from both the REL (posterior probability of 0.98) and IFEL (p-value of 0,003) methods (Table 3). The contribution of this site to adaptive evolution may, therefore, be particularly strong. The IFEL procedure revealed a substantially lower number of positions to be evolving under positive selection. Indeed, only four positions were positively selected by this method (Table 3). Nevertheless, most of these positions detected using IFEL were also obtained with both HYPHY REL and SELECTON methods.

We also investigated the signature of positive selection based on the Ka/Ks ratio by applying the empirical Bayesian method as implemented in SELECTON (Stern *et al.*, 2007). Results from SELECTON server show good agreement with those obtained using HYPHY. However, more sites (14 in total) were identified as positively selected with SELECTON than HYPHY (Figure 4). Since codon sites under positive selection were shown to evolve on many virus functions (Rajamäki and Valkonen 1999, 2002 ; Puustinen *et al.*, 2002), mutations at the amino acid positions subjected to positive selection in the P1 of RYMV can be expected to play a role in RNA silencing suppression.

In total, 18 sites were identified to be positively selected by both HYPHY and SELECTON. These amino acid positions were targeted for mutagenesis analysis to test whether or not they are involved in RYMV P1 protein silencing suppression activity. To achieve this, four P1 protein mutants (codons 20, 54, 66, and 110), each having a single mutated amino acid, were produced (Table 4) and their biological effects on RNA silencing

suppression were evaluated. These four positions mutated were chosen because of their strongly identification by both SELECTON and HYPHY IFEL, an appropriate method for identifying sites having biologic relevance to the fitness of the host (Cavatorta *et al.*, 2008). This choice was also based on their specific position in the P1 sequence. Indeed, the positively selected site 66 is located between the two first cysteins of the putative zinc finger motif (Figure 2) which kind of motif has been reported to be crucial for silencing suppression activity (van Wezel *et al.*, 2003). Codon 20, 110 are located at the 3' end of a helix, 66 and 54 are them located at the coil (Figure 2).

Table 3 : Positively selected sites detected using HYPHY server in RYMV P1 sequences

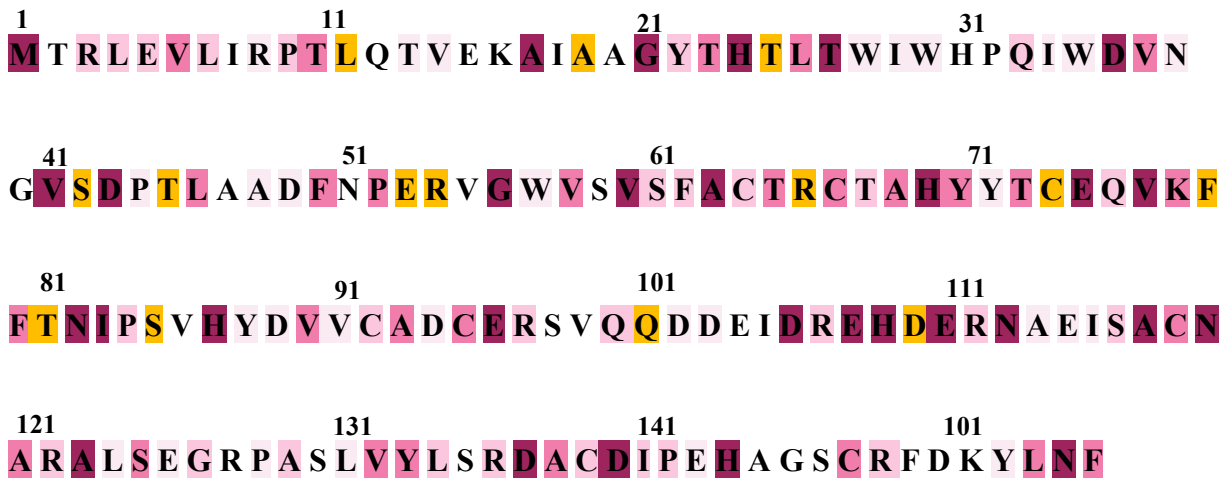
Codon position in P1 sequences	IFEL	REL	
	p value	Bayes factor	Posterior probability
12	0.073		
20		879.01	0.99
21		109.62	0.93
45		143.84	0.95
51		103.86	0.93
54		55.26	0.87
66	0.065	80.44	0.91
74		67.59	0.9
98	0.099	86.02	0.91
99		241.18	0.97
110	0.003	398.44	0.98

Table 4 : Description of RYMV P1 mutants and their suppressor activity

Mutants label	codon		Amino acid*		Suppressor activity**
	Wild type	changed	Wild type	changed	
P1-A20T	GCC	ACC	Ala (HNP)	Thr (HPU)	Increased
P1-K54G	AAG	GGG	Lys (HPC)	Gly (HPU)	Increased
P1-Q66R	CAG	AGG	Gln (NHPU)	Arg (NHPC)	Increased
P1-Q110D	CAA	GAC	Gln (NHPU)	Asp (NHPC)	decreased

* : the chemical nature of each amino acid is indicated in parenthesis. HNP, Hydrophobic non polar ; HPU, Hydrophobic polar uncharged ; HPC, Hydrophobic polar charged ; NHPU, Non hydrophobic polar uncharged ; NHPC, Non hydrophobic polar charged.

** : relative to wild type P1 suppressor activity



The selection scale :



Positive selection Purifying selection

Figure 4 : Color Coded Selecton results for RYMV P1 Sequences. Nonsynonymous : synonymous (dN :dS) ratios using the output from the Selecton program. Shades of yellow (1 and 2) indicate a dN :dS ratio of > 1 or positive selection. Any shade of bordeaux (3-7) indicates a dN :dS ratio of < 1 or purifying selection.

Effect of P1 mutation on RNA silencing suppression

Point mutations corresponding to amino acid positions 20 (Ala to thr), 54 (Lys to Gly), 66 (Glu to Arg), and 110 (Glu to Asp) were introduced in the P1 sequence of the Tanzanian isolate TZ3, the strongest suppressor identified by Siré *et al.* (2008). Each wild-type amino acid was changed into an amino acid existing naturally in at least one wild-type isolate and having different properties including charge, and hydrophobicity. This was to avoid possible alteration of the P1 protein structure due to the replacement of an amino acid which not exists naturally. The resulting genomic-length plasmids containing the amino acid substitutions were named P1-A20T, P1-K54G, P1-Q66R, and P1-Q110D (Table 4). The effect of P1 mutations A20T, K54G, Q66R, and Q110D on RNA silencing suppression was assessed. The location of each mutation, its nature, and the effect on silencing suppression are summarized in table. Expression of GUS activity after infiltration of *Agrobacterium* containing the dual constructs with each P1 mutant was tested in *N. benthamiana* wild type plants. Gus activity was quantitated by fluorimetry and compared relative to that of P1 from tissue expressing the wild

type RYMV P1 construct (TZ3) (Figure 5). To identify the optimal time to monitor PTGS suppression in the transient infiltration system, a time-course analysis was done. Leaves of wild type *N. benthamiana* plants were infiltrated with combination of Agrobacterium containing empty vector (mock), single GUS, and dual GUS + P1 expression vectors. Leaves were collected every day until the seventh day postinfiltration (dpi).

GUS mRNA was silenced after co-infiltration in the absence of a suppressor activity, whereas in the presence of empty vector. The silencing suppression profiles of the reference suppressor P1-Tz3 and P1-Mg1 the strongest and the weakest, respectively, are depicted in figure 5A. The mutational effects of P1 on RNA silencing suppression activity is shown in Figure 5B. GUS expression was detectable 2 dpi. For each reference suppressor (P1-Tz3 and P1-Mg1), two GUS activity peaks were observed, one at 2 dpi and a second one at 4 dpi for P1-Tz3 (Figure 5A). However, for the weak suppressor P1-Mg1 the second peak appears at 5 dpi. The mutants, P1-A20T, P1-K54G, and P1-Q66R, exhibited more RNA silencing suppression activity than that of wild type. As shown in Figure 5B, co-infiltration of each of these mutants increased accumulation of GUS activity relative to wild type. The different types of P1 were ranked in order of RNA silencing suppression activity as follows : Q66R > K54G > A20T > WT≈P1Tz3 > Q110D. These results indicate that the mutations affect the RNA silencing suppression activity of the P1 protein. For mutants P1-A20T and P1-K54G, the time-course experiment indicated that GUS activity increased until days 4 and 5 respectively after which there was little or decrease. In contrast, co-infiltration of pCaK7-GUS with P1-Q66R resulted in continuous increase in GUS activity over 7 days. Mutation Q110D induced a significant reduction in GUS activity over the 7 days (Figure 5B). Taken together, our data demonstrate that mutations on the site under positive selection change the profile, and the capacity of RNA silencing suppression.

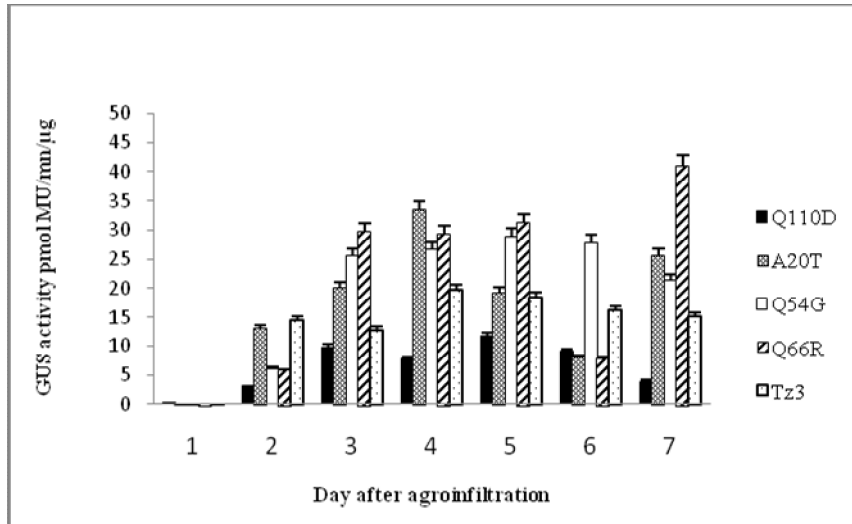


Figure 5. Effect of RYMV (isolate Tz3) P1 mutants on accumulation of β -glucuronidase (GUS) activity after *Agrobacterium*-mediated, transient expression of the GUS product. The means and standard deviations are shown. The values of GUS activity are the averages of values obtained from more than eight independent *N. benthamiana* leaves, which two leaves per plants were used, for each tested treatment (28 plants per treatment). Mo = mock, is the control with empty vector ; GUS = GUS activity due to GUS construct only. GUS activity of the controls Tz3 (strongest suppressor) P1 proteins A20T, K54G, Q66R, Q110D represent GUS activity after co-infiltration of GUS construct + each mutant, respectively.

DISCUSSION

To gain insights into the molecular variability of RYMV P1 protein, the sequences of RYMV P1 and CP (the most variable region of RYMV genome) of 44 isolates have been compared. Our result showed that the P1 gene was more variable than CP ones which is in agreement with results of an earlier study (Fargette *et al.*, 2002). RYMV P1 is a multifunctional protein which is involved in virus replication and cell-to-cell movement (Bonneau *et al.*, 1998), and in silencing suppression (Voinnet *et al.*, 1999 ; Siré *et al.*, 2008). This is consistent with the correlation of sequence variability with host adaptation, as shown by Siré *et al.* (2008) for P1. Indeed, according to P1 diversity, they found considerable diversity in their ability to suppress RNA silencing. The high diversity observed in the suppressor P1, might explain its suspected multi mode of action on silencing pathway. However, adaptation to particular hosts, agro-ecologies, different modes of transmission may affect sequence variability differently in P1 and CP.

For the tree obtained from the P1 sequences, the clustering of isolates did not correlate with the geographical origin. The lack of congruence between CP and P1 might be explained not only by the restricted length of the P1 (low phylogenetic signal) but also by the difference in selection pressure between the two genes. However, within most virus genera, different genes usually have the same phylogenies, indicating that their evolution has been linked, that they have experienced the same speciation events and have co-diverged (Gibbs *et al.*, 1997). In contrast to earlier study, where it was showed that the phylogenetic trees based on RYMV P1 and CP genes displayed a similar pattern (Fargette *et al.*, 2002), our results demonstrated that the topology of these genes are different. This can be due to positive selection events. This was supported by analyses of the P1 sequences which showed that 18 amino acids were under positive selection. Considering these results, we can conclude that adaptation played a major role in RYMV evolution. Our results are in contradiction with those obtained by Fargette *et al.* (2004), and the fact these authors found no amino acid sites under positive selection in full-genome analyses, reinforced our hypothesis. Our results also indicated that, in contrast to CP, the P1 gene is not a reliable typing tool to assign the RYMV isolates to main clades. Also assessing phylogenetic relationships of RYMV isolates with the P1 sequence is not recommended.

In this study, we showed that the multifunctional P1 protein of RYMV is under positive selection based on statistical analyses that consider the rate of accumulation of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions across an alignment. Positive selection on a RNA silencing suppressor gene has never before been documented. Hence, we investigated the role of positively selected amino acids in RNA silencing suppression. We demonstrated that the four amino acid sites under positive selection, identified in this study, exert a strong effect on the P1 suppression activity. Mutational effects on suppressor activity, measured in a transient expression assay, ranged from negative effect (decreasing of the GUS activity relative to the wild type) to positive one. Three single mutations induced a significant increase in suppression activity and only one mutation (Q110D) induced a significant decrease activity. Among them, none point mutation has been able to abolish the RNA silencing suppressor activity of P1. Our results are consistent with those obtained by Siré *et al.*, (2008) but contrasts with *Tomato bushy stunt virus* suppressor p19 where a single mutation (G72) has been sufficient to abolish RNA silencing suppressor activity (Qiu *et al.*, 2002). This confirmed the hypothesis that RNA silencing suppression involved several sites or domains in P1 as well as identified for PVX p25 suppressor protein (Bayne *et al.*, 2005).

This work provided evidence that, sites of RYMV P1 under positive selection, is directly involved in P1 RNA silencing suppression efficiency because mutagenesis at these positions resulted in increase or decrease of RNA suppressor activities. Our results are consistent with those reported by Torres-Barcelo *et al.* (2008) who identified hypo – and hypersuppressors by amino acid substitution in the HC-Pro RNA silencing suppressor protein.

In several previous studies, authors examining biological effect of an amino acid substitution before determining whether this site or motif is subject to positive selection. Indeed, codons 116 and 118 of the VPg of *Potato virus A* (PVA) identified by Moury and coworkers (2004) as under positive selection, correspond to major virulence determinants (Rajamäki and Valkonen 1999, 2002). The codon at position 185 of the VPg of PVA also affects its systemic movement in *S. commersonii* (Rajamäki and Valkonen 2002), which is associated with alterations in phosphorylation of the VPg (Puustinen *et al.*, 2002). Interestingly, our finding demonstrated that, on the basis of bioinformatics analysis ; it is possible to assign a biological significance to a molecule site.

In a similar study, Siré *et al.* (2008) created single amino acids substitution mutants of RYMV P1 based on difference between the strong suppressor (Tz3) and the weak one (Mg1). Each mutant was evaluated for its ability to suppress RNA silencing using agroinfiltration test. They found that the conserved cystein at position 95 belonging to the putative zing finger domain is essential for the cell-to-cell movement. They also demonstrated that the conserved cystein at position 64 and phenylalanine at position 88 involved in the efficiency of silencing suppression activities of the Tanzanian P1 protein. However, the non conserved site 88 was not detected by positive selection analyses, which suggests that variations at this site confer too large fitness penalties in natural population of RYMV. Similar results were found by Moury *et al.* (2004) where amino acids whose variation drastically affect aphid transmission (Liu *et al.*, 2002) were not identified to be under positive selection.

In this study we provided evidence that several amino acid sites in the RYMV movement protein P1 are under Darwinian evolution. By synthetically changing the residues at sites predicted to be under positive selection, which are the sites most likely to be of functional importance, it is possible to modify the RNA silencing activity of these molecules and gain insight into their mechanism of activity and theirs used in biotechnology.

As biotechnological applications, our results could be very useful. For example, mutants A20T, Q54G, and Q66R increase the GUS activity until day 4, 5, and 7 respectively. At this state, the activity of the GUS is at its maximum and this can be exploited when these RNA suppressors, improved by mutation, will be used to produce recombinant proteins. Indeed, recent studies showed that it is possible to increase the level of anti-*leishmania* vaccine expression in tobacco and rice by using an amplicon system based on the RYMV and its appropriate P1 RNA silencing suppressor protein (Siré *et al.*, 2006 ; Sérémé *et al.*, 2008b). Also, leaves co-expressing HC-Pro from TEV (*Tobacco etch virus*) and a PVX (*Potato virus X*)/Gus amplicon accumulate GUS to about 3 % of total proteins (Mallory *et al.*, 2002a). The effect of p19, in a similar transient expression system, was estimated to enhance 50-fold enhancement the abundance of the protein (Voinnet *et al.*, 2003). In our case, mutants P1-A20T, P1-Q54G, and P1-Q66R could be used in the production of recombinant protein. In this case, leaves for protein of interest extraction must be harvested at the date where the suppressor is at its maximum activity in order to improve protein product.

CONCLUSION

Plant genomic studies have produced large quantities of sequence information that await functional analysis. The recent discoveries of RNA silencing and RNA silencing suppressors have provided new avenues for high-throughput reverse genetics approaches to determine the functions of plant and virus genes. Through our work, we provided strong evidence that is possible by sequence analysis as well as site under positive selection identification, to detect molecular adaptation in generating interesting hypotheses to be verified through laboratory experiment. In addition, we showed the use of improved RNA silencing suppressor in biotechnology as well as recombinant protein production. In a future, additional effect due to the combination of different suppressors may be explored using transient expression assay in order to improve recombinant protein product. Indeed, it is possible that a combination of several suppressors, in recombinant protein production, had an enhancement effect more than either alone.

REFERENCES

- Abo, M.E., Sy, A. A., and Alegbejo, M.D. (1998). *Rice yellow mottle virus* (RYMV) in Africa : evolution, distribution, economic significance on sustainable rice production and management strategies. *J. Sustain. Agr.* 11(2/3) : 85-111.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G. J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A. C., Smith, T. H., and Vance, V. B. (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95 : 13079-13084.
- Bakker, W. (1974). Characterization and ecological aspects of *Rice yellow mottle virus* in Kenya. Thèse de doctorat, Université de Wageningen, Pays-Bas.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. *Nature* 431 : 356-363.
- Bayne, E. H., Rakitina, D. V., Morozov, S. Y., and Baulcombe, D. C. (2005). Cell-to-cell movement of potato potexvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *Plant J.* 44 : 471-482.
- Bonneau, C., Brugidou, C., Chen, L., Beachy, R. N., and Fauquet, C. (1998). Expression of the *Rice yellow mottle virus* P1 Protein in Vitro and in Vivo and Its Involvement in Virus Spread. *Virology* 244 : 79-86.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W.-X., Ji, L.-H., Ding, S.-W., and Baulcombe, D. C. (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *The EMBO J.* 17 : 6739-6746.
- Brugidou, C., Opalka, N., Yeager, M., Beachy, R. N., and Fauquet, C. (2002). Stability of *Rice yellow mottle virus* and Cellular Compartmentalization during the Infection Process in *Oryza sativa* (L.). *Virology* 297 : 98-108.
- Cavatorta, J. R., Savage, A. E., Yeam, I., Gray, S. M., and Jahn, M. M. (2008). Positive Darwinian Selection at Single Amino Acid Sites Conferring Plant Virus Resistance. *J. Mol. Evol.* 67 : 551-559.
- Fargette, D., Pinel, A., Halimi, H., Brugidou, C., Fauquet, C., and van Regenmortel, M. (2002). Comparison of molecular and immunological typing of isolates of *Rice yellow mottle virus*. *Arch. Virol.* 147 : 5863-5896.
- Fargette, D., Pinel, A., Abubakar, Z., Traore, O., Brugidou, C., Fatogoma, S., Hebrard, E., Choisy, M., Sere, Y., Fauquet, C., and Konate, G. (2004). Inferring the Evolutionary History of Rice Yellow Mottle Virus from Genomic, Phylogenetic, and Phylogeographic Studies. *J. Virol.* 78 : 3252-3261.
- Gibbs, M. J., Armstrong, J., Weiller, G. F., and Gibbs, A. J. (1997). Virus evolution : the past, a window on the future ? In *Virus Resistant Transgenic Plants : Potential Ecological Impact*, pp. 1±19. Edited by M. Tepfer, and E. Balazs. Versailles and Heidelberg : INRA and Springer-Verlag.
- González-Jara, P., F.A. Atencio, B. Martínez-García, D. Barajas, F., Tenllado *et al.* (2005). A Single Amino Acid Mutation In : The *Plum Pox Virus* Helper component-proteinase gene abolishes both synergistic and RNA silencing suppression activities. *Phytopathology* 95 : 894-901.

- Guindon, S., Lethiec, F., Duroux, P., and Gascuel, O. (2005). PHYML online-a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Res* 33 (web server issue) : W557-W559.
- Hébrard, E., Pinel-Galzi, A., Bersoult, A., Siré, C., and Fargette, D. (2006). Emergence of a resistance-breaking isolate of Rice yellow mottle virus during serial inoculations is due to a single substitution in the genome-linked viral protein VPg. *J. Gen. Virol.* 87 : 1369-1373.
- Himber, C., Dunoyer, P., Moissiard, G., Ritzenthaler, C., and Voinnet, O. (2003). Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J.* 22 : 4523-4533.
- Jefferson, R., Kavanagh, T., and Bevan, M. (1987). GUS fusions : β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6 : 3901-3907.
- Kasschau, K. D., and Carrington, J. C. (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses : Suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95 : 461-470.
- Li, F., and Ding, S. W. (2006). Virus counterdefense : Diverse strategies for evading the RNA-silencing immunity. *Annu. Rev. Microbiol.* 60 : 503-531.
- Liu, Y., Schiff, M., and Dinesh-Kumar, S. P. (2002). Virus-induced gene silencing in tomato. *Plant J.* 31 : 777-786.
- Mallory, A. C., Ely, L., Smith, T. H., Marathe, R., Anandalakshmi, R., Fagard, M., Vaucheret, H., Pruss, G., Bowman, L., and Vance, V. B. (2001). HC-Pro Suppression of Transgene Silencing Eliminates the Small RNAs but Not Transgene Methylation or the Mobile Signal. *Plant Cell* 13 : 571-583.
- McGuffin, L. J., Bryson, K., and Jones, D. T. (2000). *Bioinformatics* 16 : 404-405.
- Moury, B., Morel, C., Johansen, E., Guilbaud, L., Souche, S., Ayme, V., Caranta, C., Palloix, A., and Jacquemond, M. (2004). Mutations in *Potato virus Y* genome-linked protein determine virulence toward recessive resistances in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17 : 322-329.
- Moury, B., Morel, C., Johansen, E., and Jacquemond M. (2002). Evidence for diversifying selection in *Potato virus Y* and in the coat protein of other potyviruses. *J. Gen. Virol.* 83 : 2563-2573.
- Navarro, L., Jay, F., Nomura, K., He, S. Y., and Voinnet O. (2008). Suppression of the MicroRNA Pathway by Bacterial Effector Proteins. *Science* 321 : 964-967.
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York : Columbia University Press.
- Ngon A Yassi, M. N., Ritzenthaler, C., Brugidou, C., Fauquet, C., and Beachy, R. N. (1994). Nucleotide sequence and genome characterization of rice yellow mottle virus RNA. *J. Gen. Virol.* 75 : 249-257.
- Nielsen, R., and Yang, Z. (1998). Likelihood models for detecting positively selected amino acid sites and applications to the HIV-1 envelope gene. *Genetics* 148 : 929-936.
- Pinel-Galzi, A., Rakotomalala, M., Sangu, E., Sorho, F., Kanyeka, Z., Traoré, O., Sérémé, D., Poulicard, N., Rabenantoandro, Y., Séré, Y., Konaté, G., Ghesquière, A., Hébrard, E., and Fargette, D. (2007). Theme and variations in the evolutionary pathways to virulence of an RNA plant virus species. *PLoS Pathog.* 3 : e180.
- Pond, S. L., Frost S.D., and Muse, S. V. (2005). HyPhy : hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics* 21 : 676-679.

- Puustinen, P., Rajamäki, M.-L., Ivanov, K. I., Valkonen, J. P. T., and Mäkinen, K. (2002). Detection of the potyviral genome-linked protein VPg in virions and its phosphorylation by host kinases. *J. Virol.* 76 : 12703-12711.
- Qiu, W. P., Park, J.-W., and Scholthof, H. B. (2002). Tombusvirus P19-mediated suppression of virus induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15 : 269-280.
- Qu, C., Liljas, L., Opalka, N., Brugidou, C., Yeager, M., Beachy, R. N., and Fauquet, C. M. (2000). 3D Domain Swapping Modulates the Stability of Members of an Icosahedral Virus Group. *Structure* 80 : 1095-1103.
- Rajamäki, M., and Valkonen, J. P. T. (1999). The 6K2 protein and the VPg of *Potato virus A* are determinants of systemic infection in *Nicandra physaloides*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 12 : 1074-1081.
- Rajamäki, M., and Valkonen, J. P. T. 2002. Viral genome-linked protein (VPg) controls accumulation and phloem-loading of a potyvirus in inoculated potato leaves. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15 : 138-149.
- Roth, B. M., Pruss, G. J., and Vance, V. B. (2004). Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Res.* 102 : 97-108.
- Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J.C., Messeguer, X., and Rozas, R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19 : 2496-2497.
- Sarmiento, C., Gomez, E., Meier, M., Kavanagh, T. A., and Truve, E. (2007). Cocksfoot mottle virus P1 suppresses RNA silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana tabacum*. *Virus Res.* 123 : 95-99.
- Sawyer, S. L., Wu, L. I., Emerman, M., and Malik, H. S. (2005). Positive selection of primate TRIM5 α identifies a critical species-specific retroviral restriction domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102 : 2832-2837.
- Séréme, D., Lacombe, S., Konaté, M., Pinel-Galzi, A., Traoré, V. S. E., Hébrard, E., Traoré, O., Brugidou, C., Fargette, D., and Konaté, G. (2008). Biological and molecular characterization of a new putative sobemovirus infecting *Imperata cylindrica* and maize in Africa. *Arch. Virol.* 153 : 1813-1820.
- Siré, C., Piron, F., Bangratz-Reyser, M., Lemesre, J.-L., and Brugidou, C. (2006). *Molecular Biology for Tropical Plants*. ISBN 81-308-0138-8.
- Siré, C., Bangratz-Reyser, M., Fargette, D., and Brugidou, C. (2008). Genetic diversity and silencing suppression effects of *Rice yellow mottle virus* and the P1 protein. *Virol. J.* 5 : 55.
- Stern-Ginossar, N., Elefant, N., Zimmerman, A., Wolf, D. G., Salen, N., Biton, M., Horwitz, E., Prokocimer, Z., Prichard, M., Hahn, G., Goldman-Wool, D., Greenfield, C., Yagel, S., Hengel, H., Altuvia, Y., Margalit, H., and Mandelboim, O. (2007). Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science* 317 : 376-381.
- Stotz, H. U., Bishop, J. G., Bergmann, C. W., Koch, M., Albersheim, P., Darvill, A. G., and Labavitch, J. M. (2000). Identification of target amino acids that affect interactions of fungal polygalacturonases and their plant inhibitors. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 56 : 117-130.
- Swanson, W. J., Clark, A. G., Waldrip-Dail, H. M., Wolfner, M. F., and Aquadro, C. F. (2001) Evolutionary EST analysis identifies rapidly evolving male reproductive proteins in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98 : 7375-7379.

- Swofford, D. L. (2000). PAUP* : Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods) (Sinauer, Sunderland, MA), Version 4.0.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22 : 4673-4680.
- Torres-Barceló, C., Martín, S., Daròs, J. A., and Elena, S. F. (2008). From Hypo- to Hypersuppression : Effect of Amino Acid Substitutions on the RNA-Silencing Suppressor Activity of the Tobacco etch potyvirus HC-Pro. *Genetics* 180 : 1039-1049.
- van Wezel, R., Liu, H., Wu, Z., Stanley, J., and Hong, Y. (2003). Contribution of the Zinc Finger to Zinc and DNA Binding by a Suppressor of Posttranscriptional Gene Silencing. *J. Virol.* 77 : 696-700.
- Vance, V., and Vaucheret, H. (2001). RNA Silencing in Plants-Defense and Counterdefense. *Science* 292 : 2277-2280.
- Voinnet, O., Pinto, Y. M., and Baulcombe, D. C. (1999). Suppression of gene silencing : A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96 : 14147-14152.
- Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P., and 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*. *Plant J.* 33 : 949-956.
- Voinnet, O. (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics* 17 : 449-459.
- Voinnet, O. (2005). Induction and suppression of RNA silencing : Insights from viral infections. *Nature* 6 : 206-221.
- Yambao, M. L. M., Yagihashi, H., Sekiguchi, T., Sasaki, T., Sato, M. *et al.* (2008). Point mutations in helper component protease of Clover yellow vein virus are associated with the attenuation of RNA silencing suppression activity and symptom expression in broad bean. *Arch. Virol.* 153 : 105-115.
- Yang, Z., and Nielsen, R. (2000). Estimating synonymous and nonsynonymous substitution rates under realistic evolutionary models. *Mol. Biol. Evol.* 17 : 32-43.
- Yang, Z., and Bielawski, J. P. (2000) Statistical methods for detecting molecular adaptation. *Trends Ecol. Evol.* 15 : 496-503.
- Yang, Z., Nielsen, R., Goldman, N., and Pedersen, A. M., (2000). Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites. *Genetics* 155 : 431-49.
- Yang, Z., Wong, W. S., and Nielsen, R. (2005). Bayes empirical bayes inference of amino acid sites under positive selection. *Mol. Biol. Evol.* 22 : 1107-1118.
- Yang, Z. (1997). PAML : a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Comput. Appl. Biosci.* 13 : 555-556.

CHAPITRE 5

Etude de la suppression de silencing par les protéines P1 des virus de la panachure jaune du riz et d'*Imperata cylindrica* : applications en biotechnologies

5.1. La protéine P1 de *Imperata yellow mottle virus* supprime le silencing dans *N. benthamiana*

Résumé

Le génome des sobémovirus est constitué de quatre cadres de lecture ou ORFs conservant entre eux la même organisation génomique. L'extrémité 5' du premier ORF code la protéine P1 qui est la protéine la plus variable. A ce jour, seules les protéines P1 de deux sobémovirus, *Rice yellow mottle virus* (RYMV) et *Cocksfoot mottle virus* (CfMV), ont été caractérisées comme des supprimeurs de silencing. Aucune fonction n'a été attribuée à la protéine P1 du *Imperata yellow mottle virus* (IYMV). En utilisant la technique d'expression transitoire, nous avons montré chez *Nicotiana benthamiana* sauvage et transgénique 16c, une plante non hôte, que cette protéine est un supprimeur de silencing. Elle interfère avec le silencing local et systémique. Cependant, son mode d'action reste inconnu. La suppression de silencing local de la protéine P1 du IYMV (isolat Burkinabé) est plus forte comparée à P1-Tz3 du RYMV. Le supprimeur IYMV est un hypersupprimeur par rapport à la protéine P1-Tz3 du RYMV.

Mots clés : sobémovirus, P1, *Imperata yellow mottle virus*, supprimeur, silencing

Introduction

Le silencing est un mécanisme hautement conservé entre espèces. Il permet d'éteindre l'expression d'un gène de manière séquence-spécifique en utilisant l'ARN double brin (db) pour induire la dégradation de l'ARN messager homologue. Dans les cellules eucaryotes, le silencing joue un rôle dans la défense contre les virus (Ding et Voinnet, 2007), les éléments mobiles (Wu-Scharf *et al.*, 2000), et dans la régulation du développement (Hutvagner *et al.*, 2001 ; Ketting *et al.*, 2001). Le silencing s'opère selon diverses voies, mais elle dépend d'une cascade d'évènements communs qui est activée par des molécules d'ARNdb. Ces ARNdb sont clivés en ARNs duplexes de 21 à 24 nt par l'enzyme Dicer et ses homologues. L'un des deux brins de siARNs est alors incorporé dans le complexe RISC (Baumberger et Baulcombe, 2005). Ce complexe va dégrader les molécules d'ARNsb cellulaires qui présentent une séquence nucléotidique identique à celle des siARN comme le génome d'un virus infectant une plante transgénique ou son transcrite (Voinnet, 2001 ; Waterhouse et Fusaro, 2006).

La plupart des virus de plantes ont un génome constitué d'ARNsb (Hull, 2002). Ils passent alors par un intermédiaire ARNdb au cours de leur réplication et sont de ce fait les cibles et les inducteurs du silencing. Cependant, les virus ont à leur tour évolué et certaines de leurs protéines sont capables de supprimer le silencing (Voinnet, 2005). Ces protéines, bien qu'elles ne partagent pas de similitudes au niveau de leur séquence et de leur structure interfèrent avec le silencing à différents niveaux (Roth *et al.*, 2004). La plupart des supresseurs de silencing agissent en séquestrant les petits ARNs (siARN) qui ne sont plus alors disponibles pour le complexe RISC (Lakatos *et al.*, 2004 ; Silhavy *et al.*, 2002 ; Lakatos *et al.*, 2006 ; Merai *et al.*, 2005). Cependant, des supresseurs de silencing agissant selon différents mécanismes ont également été décrits (Baumberger *et al.*, 2007 ; Trinks *et al.*, 2005 ; Wang *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2006). L'identification et la caractérisation des supresseurs de silencing sont donc importantes pour comprendre les mécanismes de silencing.

Le génome des sobémovirus est constitué d'ARN simple brin positif (Tamm et Truve, 2000) arborant quatre cadres de lecture ouverte dont deux sont chevauchants (Meier et Truve, 2006 ; Balke *et al.*, 2007). A ce jour, les séquences complètes de 10 sobémovirus sont disponibles dans les bases de données parmi lesquels neuf sont reconnus par l'ICTV et un, le virus de la panachure jaune du chiendent (*Imperata cylindrica*) (IYMV) a été récemment identifié (Séréme *et al.*, 2008a). Ce nouveau virus, à l'image des autres sobémovirus, a un génome constitué de quatre cadres de lecture ouverte et possède une gamme d'hôte restreinte aux monocotylédones (Séréme *et al.*, 2008a). L'ORF1 des sobémovirus code une protéine P1 qui est requise pour le mouvement systémique chez le RYMV et le CfMV (Bonneau *et al.*, 1998 ; Meier *et al.*, 2006). Malgré l'absence d'homologie entre les protéines P1 des sobémovirus, elles pourraient avoir la même fonction. C'est le cas des protéines P1 du RYMV et du CfMV qui sont tous deux capables de supprimer le silencing (Voinnet *et al.*, 1999 ; Sarmiento *et al.*, 2007 ; Siré *et al.*, 2008). A ce jour, aucune fonction n'a été définie pour la protéine P1 du IYMV. Cependant, comme l'organisation génomique est similaire chez tous les sobémovirus et qu'il existe une très grande diversité fonctionnelle pour la suppression de silencing, il est probable que la P1 du IYMV puisse également jouer un rôle dans la suppression du silencing. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons investigué la capacité de suppression de la protéine P1 de ce nouveau sobémovirus chez *Nicotiana benthamiana*, plante non hôte, mais qui est la plante modèle pour évaluer la capacité de suppression de silencing d'une protéine. Les applications biotechnologiques qu'offrent les supresseurs de silencing constituent une autre raison pour étudier l'effet de la protéine P1 du IYMV sur la

suppression. En effet, la recherche de protéines supprimeurs à forte capacité de suppression est primordiale pour produire des protéines d'intérêts industriels dans les plantes. C'est ainsi que l'ORF1 du IYMV a été cloné dans un plasmide binaire et sa capacité à supprimer le silencing a été testée dans le tabac *N. benthamiana* à l'aide de la technique d'expression transitoire par co-infiltration.

Nous présentons ici des données qui montrent que la P1 du IYMV est un supprimeur de silencing capable d'interférer avec le silencing local et systémique, puis nous discutons de ses implications en biotechnologies.

Matériel et méthodes

Matériel végétal

La mise en place de l'activité de suppression associée à un virus donné peut se faire de différentes façons. Pour notre étude, nous avons utilisé deux lignées de tabac : La lignée *N. benthamiana* sauvage et la lignée *N. benthamiana* 16c provenant du laboratoire de D. Baulcombe qui exprime constitutivement le transgène GFP (Ruiz *et al.*, 1998). Les plantes de cette lignée apparaissent donc verte sous lumière UV, tandis qu'une plante sauvage apparaît rouge à cause de l'autofluorescence de la chlorophylle. On peut induire le silencing du transgène GFP dans ces plantes en infiltrant une suspension d'agro-bactéries renfermant un plasmide recombinant pBin-GFP où le gène GFP est cloné en aval du promoteur 35S (Voinnet *et al.*, 1998). Suite à cette infiltration, le T-DNA portant la construction GFP va s'insérer au hasard dans le génome de la plante et il y aura expression de la GFP à la fois à partir de ce dernier et du transgène intégré de façon stable dans la plante.

Méthodes

Les constructions de plasmides

L'ARN total extrait de feuilles de *I. cylindrica* infectées par IYMV a été utilisé pour l'amplification de la P1. L'ORF1 a été amplifié par transcription inverse suivie de PCR (RT-PCR) avec les amorces spécifiques 5'-SDiymvH (5'-GGAAGCTTGATTTTGAGCCTACTTCCAC-3') et 3'-SDRiymvX (5'-GGTCTAGATCAGTCCGAGTCCGACCTATC-3') contenant les sites de restriction appropriés *Hind*III et *Xba*I. Le fragment ainsi généré a été cloné dans le plasmide pGEMT-easy (Promega) et appelé pGEMT-P1. L'ORF1 a ensuite été digéré du plasmide pGEMT-P1

par les enzymes de restriction *Hind*III et *Xba*I et cloné dans le plasmide binaire pCaK7 (Séréme *et al.*, à soumettre) pour générer la cassette de clonage placée sous le contrôle du promoteur 35S et du terminateur Nos pour donner pCaK7-P1. Chaque construction binaire (pCaK7-P1, pCaK7-P1RYMV et pCaK7-GUS) a été utilisée pour transformer, par électroporation, la souche GV301 d'*A. tumefaciens* puis sélectionné sur le milieu de culture LB contenant 50 mg kanamycine. ml⁻¹. *Agrobacterium* portant la P1 du IYMV est appelée 35S-I-P1, celle portant la P1 de l'isolat Tz3 du RYMV, un supprimeur bien caractérisé, est nommée 35S-R-P1 et est utilisée comme témoin positif. 35S-GUS désigne *A. tumefaciens* portant le gène *GUS*. La souche C58C1 d'*A. tumefaciens* contenant le plasmide pBin61-GFP, appelé 35S-GFP, a été gracieusement fournie par Dr D. Baulcombe (Sainsbury Laboratory, John Innes Centre, Norwich). Toutes les constructions ont été vérifiées par séquençage nucléotidique.

Agroinfiltration des plantes

Pour tester si la P1 du IYMV est capable de supprimer le silencing, nous avons d'abord co-infiltré les feuilles de tabac de la lignée sauvage *N. benthamiana* avec 35S-I-P1 et 35S-GUS. Parallèlement, 35S-GUS a été co-infiltré avec le vecteur vide et a servi de témoin négatif. Afin de comparer la capacité de suppression de la protéine P1 du IYMV à celle du sobémovirus RYMV, 35S-R-P1 été co-infiltré avec 35S-GUS. La co-infiltration a été réalisée comme décrit par Siré *et al.* (2008). La méthode de Bradford (1987) a été utilisée pour la quantification des protéines. Le dosage de l'activité enzymatique GUS a été faite par fluorimétrie (Siré *et al.*, 2008).

Afin de confirmer les résultats obtenus avec les lignées sauvages *N. benthamiana* les feuilles de tabac de la lignée transgénique 16c (Ruiz *et al.*, 1998) ont ensuite été co infiltrées avec 35S-I-P1 et 35S-GFP. La capacité de suppression de la protéine P1 du IYMV a été comparée à celle du RYMV. La fluorescence de la GFP a été mesurée sous lumière UV à l'aide d'une lampe UV (Black Ray B-100AP High Intensity UV) et photographiée avec un appareil photo numérique (Olympus C-5050 zoom digital).

Résultats

La P1 du IYMV supprime le silencing local

IYMV a été testé afin d'identifier des supprimeurs de silencing par le test agro infiltration sur des plants de tabac sauvages et transgéniques 16c, *N. benthamiana*. La

séquence codant la protéine P1 a été clonée dans un vecteur binaire sous le contrôle d'un promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV) et exprimée dans les feuilles de tabac par infiltration avec *A. tumefaciens*. Le mélange d'une souche d'*Agrobacterium* portant différents ORF (ORF1-IYMV, ORF1-RYMV) avec une autre souche exprimant l'inducteur de silencing 35S-GUS ou 35S-GFP a été co-infiltré dans les feuilles de *N. benthamiana* sauvage et transgénique 16c et la cinétique de la suppression du silencing a été suivie durant 7 jours.

Avec les plantes de tabac sauvages, l'analyse des feuilles infiltrées, à partir du deuxième jour après infiltration (jai), montre que dans les tissus co-infiltrés avec 35S-GUS et le vecteur vide, l'expression de la protéine GUS est très faible car il est soumis au gène silencing. Par contre, dans les feuilles co-infiltrées avec 35S-GUS en présence du suppresseur de silencing P1 de l'isolat Tz3 du RYMV (35S-R-P1) ou de la P1 du IYMV (35S-I-P1), l'expression de la protéine GUS augmente fortement, traduisant une inhibition du silencing en présence de ces deux protéines P1. Ce résultat démontre que la protéine P1 du IYMV est un suppresseur de silencing capable d'inhiber le silencing local. Ces expériences ont été répétées au moins trois fois sur 10 différents plants de *N. benthamiana*.

P1 est la protéine la plus divergente du genre *Sobemovirus* et ne ressemble à aucune autre protéine connue (Tamm et Truve, 2000). Des 10 sobémovirus entièrement séquencés, la protéine P1 du IYMV présente la plus faible identité de séquence (3,9 %) avec la P1 du *Ryegrass mottle virus* (RGMoV) tandis que la protéine P1 du *Lucerne transient streak virus* (LTSV) a la plus forte identité de séquence (24,3 % max) avec la plupart des séquences protéiques alignées (Figure 1). Afin de comparer la suppression de silencing de la protéine P1 du IYMV avec celle d'un autre sobémovirus, le plasmide contenant la protéine P1 de l'isolat Tanzanien Tz3 du RYMV (35S-R-P1) a été co-infiltré. L'analyse des tabacs sauvages co-infiltrés avec 35S-GUS en présence de 35S-R-P1 et de 35S-I-P1 montre un profil de suppression différent entre les protéines P1 du RYMV et IYMV. En effet, avec la P1 du RYMV on observe 2 pics de suppression ; le premier à 2 jai et le second à 4 jai. Par contre pour le IYMV, on note un pic unique de suppression à 4 jai. Ainsi, à 2 jai, l'activité enzymatique du gène *GUS* est plus forte avec 35S-R-P1 comparativement à 35S-I-P1. Par contre à 4 jai, l'activité enzymatique du gène *GUS* est maximale avec 35S-I-P1 (Figure 2). A ce stade, la production de la protéine GUS due à la présence de la P1 du IYMV a été multipliée par 12.

La capacité de suppression de la protéine P1 du IYMV a été confirmée par une autre méthode utilisant l'agro-infiltration des plants de tabac transgénique 16c (Figure 3). Le

silencing de la GFP a été observé à 4 jai, sous la lumière UV, par une coloration rouge au niveau des feuilles co-infiltrées avec 35S-GFP et le vecteur vide marquant ainsi la non-expression de la protéine GFP. Par contre, à la même date, les feuilles co-infiltrées avec 35S-GFP en présence du 35S-I-P1 ou 35S-R-P1, présentent une coloration verte due à l'expression de la GFP (Figure 3). La différence d'intensité de la coloration verte observée au niveau des feuilles infiltrées (ou patch) indique que la P1 du IYMV supprime fortement le silencing dirigé contre le transgène GFP dans la lignée *N. benthamiana* 16c.

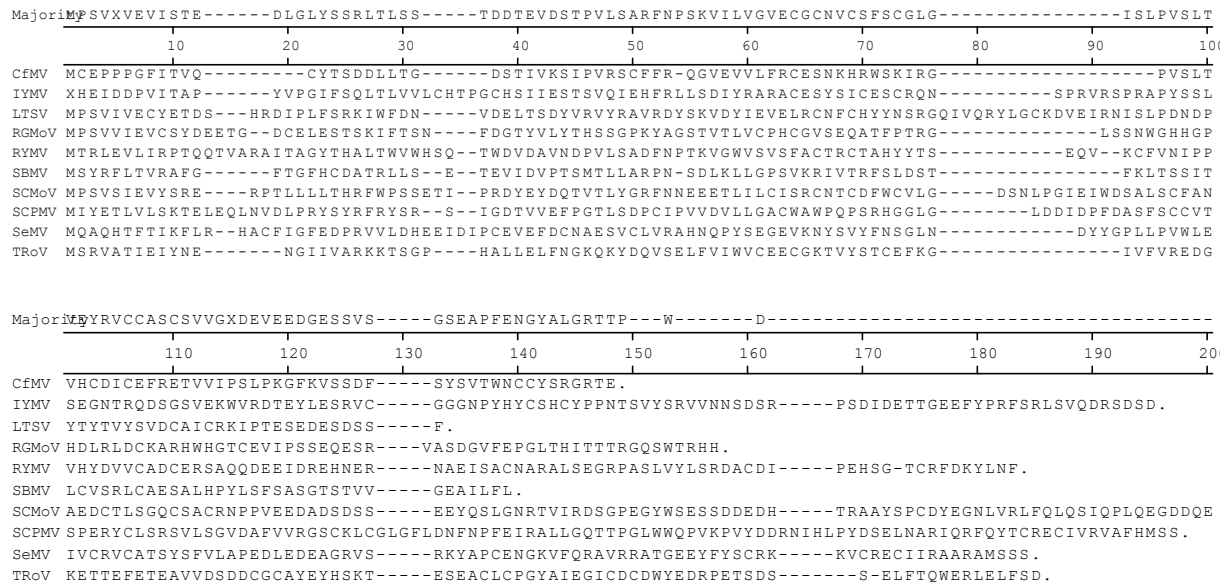


Figure 1 : Alignement de la séquence protéique des P1 de différents sobémovirus montrant les différences d'acides aminés dans les séquences. Les sobémovirus comprennent : *Cocksfoot mottle virus* (CfmV, NC002618), *ryegrass mottle virus* (RGMoV, EF091714), *rice yellow mottle virus* (RYMV, AJ608218), *lucerne transient streak virus* (LTSV, NC001696), *southern bean mosaic virus* (SBMV, L34672), *subterranean clover mottle virus* (SCMoV, NC004346), *sesbania mosaic virus* (SeMV, AY004291), *southern cowpea mosaic virus* (SCPMV, NC001625), *turnip rosette virus* (TRoV, NC004553) et *Imperata yellow mottle virus* (IYMV, AM990928).

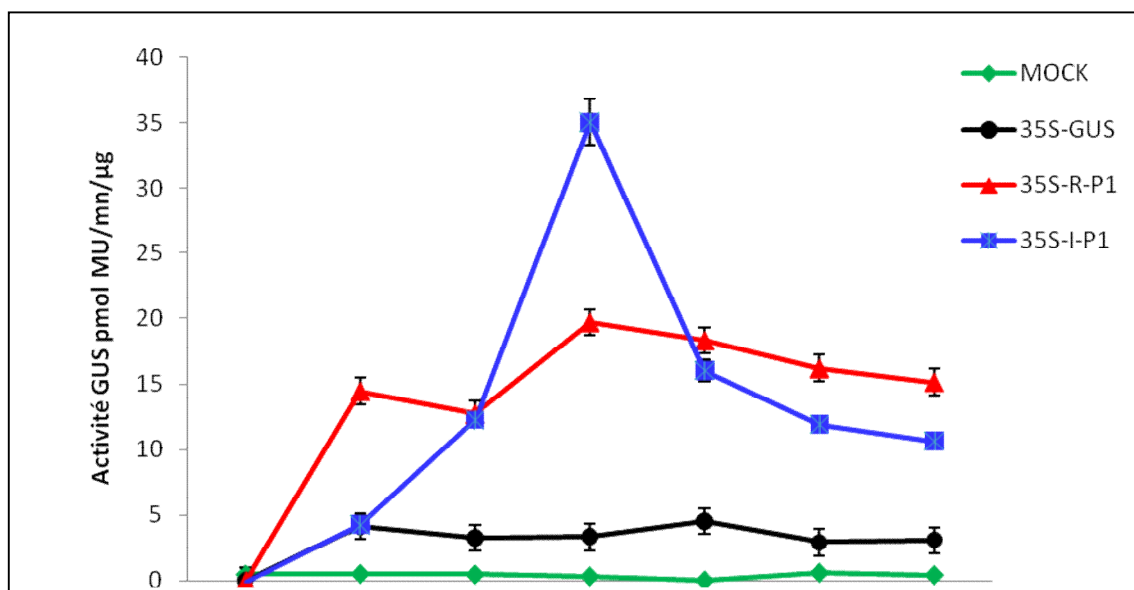


Figure 2 : Effet de la protéine P1 du IYMV sur l'accumulation de l'activité de la β -glucuronidase (GUS) après agro-infiltration. La déviation standard est indiquée. Les valeurs de l'activité du GUS sont les moyennes des valeurs obtenues à partir de 10 feuilles indépendantes de *N. benthamiana*. MOCK : témoin avec le vecteur vide ; 35S-GUS : activité GUS issue de la co-infiltration du vecteur 35S-GUS et du vecteur vide ; 35S-R-P1 et 35S-I-P1 : activité du GUS obtenue après co-infiltration des vecteurs P1-RYMV ou P1-IYMV en présence du vecteur 35S-GUS.

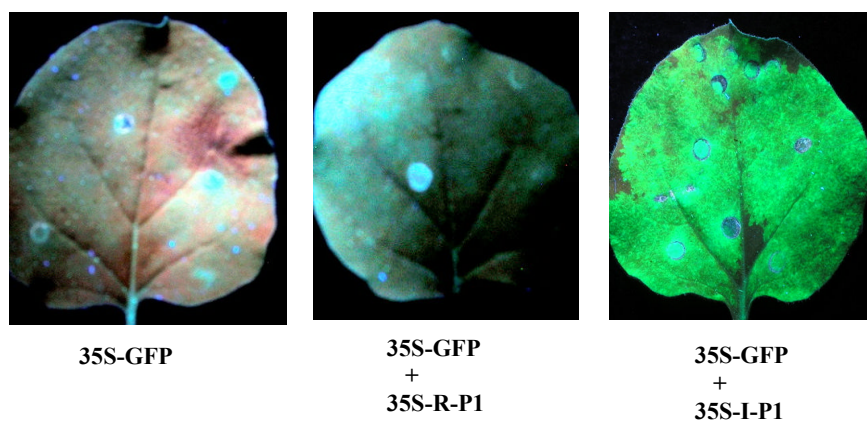


Figure 3 : Effet de la protéine P1 du IYMV sur le silencing local chez *Nicotiana benthamiana* 16C. Agro-infiltration avec les vecteurs 35S-GFP en présence des vecteurs P1-RYMV ou P1-IYMV. Les plantes sont éclairées avec une lampe UV (Black Ray B-100AP High Intensity UV) et photographiées à l'aide d'un appareil photo numérique (Olympus C-5050 zoom digital) à 4 jai.

La P1 du IYMV interfère avec le silencing systémique

Nous avons ensuite étudié l'effet de la P1 du IYMV sur le silencing systémique. Les feuilles de la lignée 16c ont été infiltrées et la progression du silencing a été observée pendant 21 jours. Chez les plantes infiltrées avec 35S-I-P1, le silencing systémique caractérisé par la perte de la fluorescence au niveau des jeunes feuilles émergentes, est absent chez les plantes observées à 15 jai (Figure 4). En revanche, le silencing systémique se développe très rapidement chez les plantes infiltrées seulement avec 35S-GFP, elles apparaissent rouge sous lumière UV (Figure 12). Ces résultats, bien que qualitatifs et préliminaires, démontrent que la protéine P1 codée par l'ORF1 du IYMV est capable d'interférer avec le silencing systémique en supprimant sa progression.

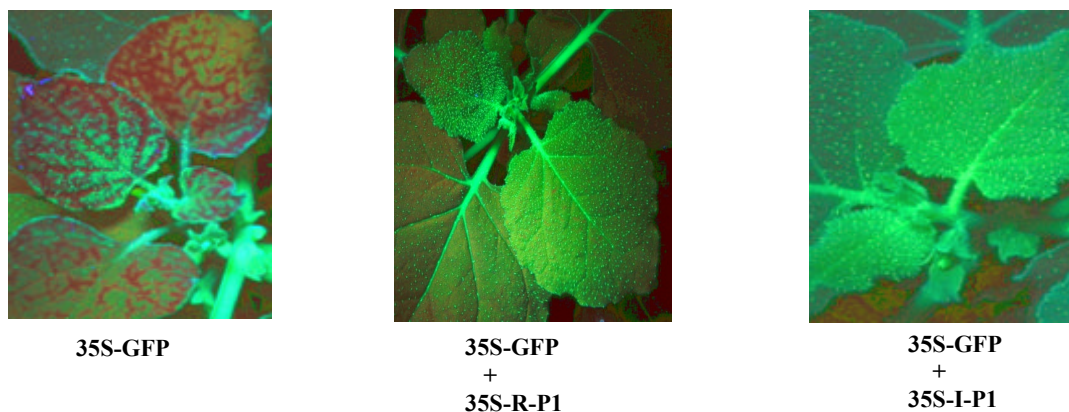


Figure 4 : Effet de la protéine P1 du IYMV sur le silencing systémique chez *Nicotiana benthamiana* 16C. Agroinfiltration avec les vecteurs 35S-GFP en présence des vecteurs P1-RYMV ou P1-IYMV. Les plantes sont éclairées avec une lampe UV (Black Ray (B-100ap High Intensity UV) et photographiées à l'aide d'un appareil photo numérique (Olympus C-5050 zoom digital) à 15 jai.

Discussion

Dans cette étude, la protéine P1 du sobémovirus IYMV a été testée pour sa capacité à inhiber le silencing. Le test de co-infiltration de lignées sauvages et transgéniques 16c de tabac a montré que la P1 est capable de supprimer le silencing local et systémique induit par un gène rapporteur *GUS* ou *GFP*. Nous avons également démontré que les sobémovirus IYMV et RYMV présentent des profils spécifiques dans la suppression de silencing (Figure 2). Ces résultats et ceux rapportés par Sarmiento *et al.* (2007) qui ont montré que la P1 du CfMV est un suppresseur de silencing moins efficace que celui du RYMV suggèrent

fortement que la protéine P1 des sobémovirus a une fonction conservée qui est la suppression de silencing. Des protéines homologues codées par des virus appartenant à d'autres genres, tels que la P19 des tombusvirus et la HC-Pro des potyvirus, ont également été identifiées comme des supprimeurs de silencing (Ye *et al.*, 2003 ; Vargason *et al.*, 2003 ; Johansen et Carrington, 2001 ; Mallory *et al.*, 2002b). Cependant, ce qui est révélé ici chez les sobémovirus, c'est que malgré l'absence d'homologie entre les P1 du CfMV, du RYMV et du IYMV, elles partagent la même fonction à savoir la capacité de leur protéine P1 à supprimer le silencing. C'est aussi le cas des protéines P0 codées par les polerovirus, lesquelles ne partagent aucune homologie ni entre elles, ni avec d'autres protéines supprimeurs codées par des virus (Mayo et Miller, 1999 ; Tamm et Truve, 2000, Mangwende *et al.*, 2009) et pourtant, elles sont capables de supprimer le silencing (Pfeffer *et al.*, 2002). Les protéines P0 de trois polerovirus testés (*Beet western yellows virus*, *Potato leaf roll virus*, *Cucurbit aphid-borne yellows virus*) sont des supprimeurs de silencing. La protéine P0 d'un quatrième polerovirus (*Sugarcane yellow leaf virus*) vient d'être récemment caractérisée comme supprimeur de silencing (Mangwende *et al.*, 2009). Il est probable que cette divergence des séquences traduise des mécanismes moléculaires de suppression différents. A travers cette étude nous avons montré qu'il existe une grande variabilité dans la suppression de silencing par les protéines P1 du IYMV et du RYMV. Sarmiento *et al.* (2007) avaient aussi mis en évidence une différence significative dans la force de suppression de silencing par les protéines P1 du RYMV et du CfMV. Une variabilité dans la suppression de silencing par différents isolats de RYMV a également été rapportée (Siré *et al.*, 2008). Cette variabilité intra- (cas du RYMV) et inter-spécifique (cas des sobémovirus) constatée dans l'activité de suppression de silencing pourrait s'expliquer par la forte diversité de la protéine P1 des sobémovirus (seulement 3,9 % d'identité max). Les résultats récents obtenus par Senshu *et al.* (2009) avec les protéines TGBp1s du PIAMV (*Plantago asiatica mosaic virus*, *Potexvirus*) et du TVX (*Tulip virus X*, *Potexvirus*), renforcent cette hypothèse. En effet, les protéines TGBp1s de ces deux potexvirus présentent une forte homologie de séquences de l'ordre de 69 % d'identité et ont un niveau d'activité de suppression similaire.

En somme, nos résultats suggèrent que la suppression de silencing est un mécanisme vital qui a été mis en place de façon indépendante chez les virus appartenant au même genre et qui existerait probablement chez tous les virus.

Par ailleurs, le fait que le profil de suppression présente 2 pics pour la P1 du RYMV et un seul pic pour IYMV suggère aussi un mode d'action différent pour ces deux supprimeurs. Cette activité qui apparaît sous forme de deux pics est une caractéristique de P1-RYMV et a

déjà été observé dans une précédente étude (Séréme *et al.*, 2008b). Sur le plan des applications en biotechnologie, le supprimeur de silencing codé par IYMV est un nouvel outil qui permettra d'améliorer la production d'une protéine d'intérêt. En effet, lorsque le gène codant la protéine GUS est exprimé en l'absence de supprimeurs, l'expression est très faible à 4 jai tandis qu'en présence du supprimeur P1 du IYMV l'expression du gène est multipliée par un facteur 12. La sur-expression de protéines d'intérêts induit par l'utilisation de supprimeurs de silencing a déjà été rapportée. C'est le cas du RYMV (Siré *et al.*, 2006 ; Séréme *et al.*, 2008b) où l'utilisation de sa protéine supprimeur P1 a permis d'améliorer de façon significative l'expression de protéines recombinantes. Il en est de même pour d'autres protéines supprimeurs HC-Pro du TEV (*Tobacco etch virus*) et P19 du TBSV (*Tomato bushy stunt virus*) avec une augmentation de la production protéique de 3 et 50 % respectivement (Mallory *et al.*, 2002a ; Voinnet *et al.*, 2003). Cependant, dans ces cas, les protéines ont été exprimées dans un système amplicon en présence des supprimeurs ce qui suggère que l'utilisation de la P1 du IYMV dans un tel système améliorerait davantage la production d'une protéine recombinante. Un travail similaire pourra être réalisé à l'INERA en utilisant l'amplicon disponible du RYMV (partie répliquative) ou en mettant au point d'autres vecteurs viraux comme celui basé sur le IYMV pour améliorer la production de protéines recombinantes d'intérêts vaccinales.

Conclusion

Notre étude a permis de mettre en évidence au niveau de la protéine P1 du sobémovirus IYMV, une activité de suppression de silencing, une propriété partagée par la protéine P1 de deux autres sobémovirus. Avec l'identification de ce troisième supprimeur de silencing dans le genre *Sobemovirus*, nous établissons un lien fort entre les protéines P1 des sobémovirus et leur fonction dans la suppression de silencing. La caractérisation des autres P1 par rapport à cette fonction devrait confirmer l'importance de la suppression de silencing dans l'évolution des sobémovirus. Aussi, comme ce genre (*Sobemovirus*) est connu pour avoir des espèces inféodées à une gamme d'hôte réduite, il est probable que la diversité structurale et fonctionnelle observées chez les protéines P1 soit le reflet de cette gamme d'hôte différente. Cela restera à confirmer en produisant des clones chimériques, par exemple en utilisant le clone infectieux du RYMV FL5 (Brugidou *et al.*, 1995) portant la P1 du IYMV et tester sa capacité à infecter le maïs. Enfin, des études complémentaires devront être menées afin de confirmer et d'identifier les mécanismes moléculaires en jeu dans la suppression locale et

systemique. Dans ce but, l'effet de la P1 du IYMV sur l'accumulation des petits ARNs de 21-24 nt devra être évalué et comparé à celui de la P1 du RYMV (isolat Tz3) où son effet vient d'être récemment mis à jour (Lacombe *et al.*, 2009). Enfin, les partenaires qui interagissent avec la P1 du IYMV devront être aussi déterminés en utilisant le système double hybride par exemple.

Références bibliographiques

- Balke I., Resevica G., Zeltins A. 2007. The *Ryegrass mottle virus* genome codes for a sobemovirus 3C-like serine protease and RNA-dependent RNA polymerase translated *via* -1 ribosomal frameshifting. *Virus Genes* 35, 395-398.
- Baumberger N., Baulcombe D. C. 2005. Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 11928-11933.
- Baumberger N., Tsai C. H., Lie M., Havecker E., Baulcombe D. C. 2007. The Polerovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr. Biol.* 17, 1609-1614.
- Bonneau C., Brugidou C., Chen L., Beachy R. N., Fauquet C. 1998. Expression of the Rice yellow mottle virus P1 protein in vitro and in vivo and its involvement in virus spread. *Virology* 244, 79-86.
- Ding S. W., Voinnet O. 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130, 413-426.
- Hull R. 2002. *Matthew's Plant Virology*, fourth ed. Academic Press, London.
- Hutvagner G., McLachlan J., Pasquinelli A. E., Balint E., Tuschl T., Zamore P. D. 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. *Science* 293, 834-838.
- Johansen L. K., Carrington J. C. 2001. Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the Agrobacterium-mediated transient expression system. *Plant Physiol.* 126, 930-938.
- Ketting R. F., Fischer S. E., Bernstein E., Sijen T., Hannon G. J., Plasterk R. H. A. 2001. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* 15, 2654-2659.
- Lacombe S., Bangratz M., Vignols F., Brugidou C. 2009. The Rice yellow mottle virus P1 exhibits dual functions to suppress and activate gene silencing. *Plant J.* 10.1111/j.1365-313X.2009.04062.x.
- Lakatos L., Csorba T., Pantaleo V., Chapman E. J., Carrington J. C., Liu Y. P., Dolja V. V., Calvino L. F., Lopez-Moya J. J., Burgyan J. 2006. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J.* 25, 2768-2780.
- Lakatos L., Szittyá G., Silhavy D., Burgyan J. 2004. Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO J.* 23, 876-884.

- Mallory A. C., Reinhart B. J., Bartel D., Vance V. B., Bowman L. H. 2002. A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 15228-15233.
- Mangwende T., Wang M. L., Borth W., Hu J., Moore H. P., Mirkov E. T., Albert H. H. 2009. The P0 gene of *Sugarcane yellow leaf virus* encodes an RNA silencing suppressor with unique activities. *Virology* 384, 38-50.
- Mayo M.A., Miller W. A. 1999. The structure and expression of luteovirus genomes. In : Smith, H.G., Barker, H. (Eds.). *The Luteoviridae*. CABI Publishing, Wallingford, Connecticut, 23-42.
- Meier M., Paves H., Olsper A., Tamm T., Truve E. 2006. P1 protein of *Cocksfoot mottle virus* is indispensable for the systemic spread of the virus. *Virus Genes* 32, 321-326.
- Merai Z., Kerényi Z., Molnar A., Barta E., Valoczi A., Bisztray G., Havelda Z., Burgyan J., Silhavy D. 2005. Aureusvirus P14 is an efficient RNA silencing suppressor that binds double-stranded RNAs without size specificity. *J. Virol.* 79, 7217-7226.
- Pfeffer S., Dunoyer P., Heim F., Richards K. E., Jonard G., Ziegler-Graff V. 2002. P0 of *Beet western yellows virus* is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* 76, 6815-6824.
- Roth B. M., Pruss G. J., Vance V. B. 2004. Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Res.* 102, 97-108.
- Ruiz F., Vassie L., Klotz K., Sperling L., Madeddu L. 1998. Homology-dependent gene silencing in *Paramecium*. *Mol. Biol. Cell* 9, 931-943.
- Sarmiento C., Gomez E., Meier M., Kavanagh T. A., Truve E. 2007. Cocksfoot mottle virus P1 suppresses RNA silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana tabacum*. *Virus Res.* 123, 95-99.
- Senshu H., Ozeki J., Komatsu K., Hashimoto M., Hatada K., Aoyama M., Kagiwada S., Yamaji Y., Namba S. 2009. Variability in the level of RNA silencing suppression caused by triple gene block protein 1 (*TGBp1*) from various potexviruses during infection. *J. Gen. Virol.* 90, 1014-1024.
- Séréme D., Bangratz M., Lemesre J. L., Fargette D., Brugidou C., Konaté G. 2008b. Le virus de la panachure jaune du riz, un outil prometteur pour la production de protéines recombinantes d'intérêt. *Applied Biology and Biotechnology* 1, 17-20.
- Séréme D., Lacombe S., Konaté M., Pinel-Galzi A., Traoré V. S. E., Hébrard E., Traoré O., Brugidou C., Fargette D., Konaté G. 2008a. Biological and molecular characterization of a new putative sobemovirus infecting *Imperata cylindrica* and maize in Africa. *Arch. Virol.* 153, 1813-1820.
- Silhavy D., Molnar A., Lucioli A., Szittyá G., Hornyik C., Tavazza M., Burgyan J. 2002. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J.* 21, 3070-3080.
- Siré C., Bangratz-Reyser M., Fargette D., Brugidou C. 2008. Genetic diversity and silencing suppression effects of *Rice yellow mottle virus* and the P1 protein. *Virology journal* 5, 55.
- Tamm T., Truve E. 2000. Sobemoviruses. *J. Virol.* 74, 6231-6241.
- Thottappilly G., Rossel H. W. 1993. Evaluation of resistance to *Rice yellow mottle virus* in *Oryza* species. *Indian J. Virol.* 9, 65-73.

- Trinks D., Rajeswaran R., Shivaprasad P. V., Akbergenov R., Oakeley E. J., Veluthambi K., Hohn T., Pooggin M. M. 2005. Suppression of silencing by a geminivirus nuclear protein, AC2, correlates with transactivation of host genes. *J. Virol.* 79, 2517-2527.
- Vargason J. M., Szittyá G., Burgyan J., Hall T. M. 2003. Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 115, 799-811.
- Voinnet O. 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* 17, 449-459.
- Voinnet O. 2005. Induction and suppression of RNA silencing : Insights from viral infections. *Nat. Rev. Genet.* 6, 206-220.
- Voinnet O., Pinto Y. M., Baulcombe D. C. 1999. Suppression of gene silencing : A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96, 14147-14152.
- Voinnet O., Rivas S., Mestre P., Baulcombe D.C. 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of *Tomato bushy stunt virus*. *Plant J.* 33, 949-956.
- Voinnet O., Vain P., Angell S., Baulcombe D. C. 1998. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA *Cell* 95, 177-187.
- Wang H., Buckley K. J., Yang X. J., Buchmann R. C., Bisaro D. M. 2005. Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *J. Virol.* 79, 7410-7418.
- Waterhouse P. M., Fusaro A. F. 2006. Viruses face a double defense by plant small RNAs. *Science* 313, 54-55.
- Wu-Scharf D., Jeong B.-r., Zhang C., Cerutti H. 2000. Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-box RNA helicase. *Science* 290, 1159-1162.
- Ye K., Malinina L., Patel D. J. 2003. Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* 426, 874-878.
- Zhang X., Yuan Y.-R., Pei Y., Lin S.-S., Tuschl T., Patel D. J., Chua N.-H. 2006. Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev.* 20, 3255-3268.

5.2. Etude de la suppression de silencing par la P1 du RYMV et utilisations en biotechnologie

La protéine P1 du RYMV a été décrite, pour la première fois, comme un suppresseur de silencing par Voinnet *et al.* (1999) puis récemment par Siré *et al.* (2008). Dans cette dernière étude, les auteurs ont mis en évidence une diversité fonctionnelle dans la suppression de silencing par différents isolats de RYMV. Cependant, cette étude n'a porté que sur un nombre réduit d'isolats appartenant pour l'essentiel au sérotype Ser2. L'un des objectifs de ma thèse et partant de cette étude étant d'identifier des forts et faibles suppresseurs de silencing en vue de leur utilisation comme outils pour la sur-expression de protéines recombinantes, nous avons évalué la force de suppression d'un nombre important d'isolats prenant en compte toute la diversité du RYMV présente en Afrique de l'Ouest. Pour ce faire, l'ORF1 de chacun des isolats de RYMV (20) a été cloné dans un plasmide binaire et testé pour leur capacité à supprimer le silencing dans le tabac sauvage *N. benthamiana* à l'aide de la technique d'expression transitoire par co-infiltration ou « patch ». Cette étude nous a permis d'identifier des forts et des faibles suppresseurs de silencing du RYMV et d'investiguer sur leurs utilisations dans la sur-expression de protéines recombinantes. Les résultats de cette étude sont rapportés dans l'article présenté ci-dessous et publié dans la revue *Applied Biology and Biotechnology* (Séréme *et al.*, 2008b).

Le virus de la panachure jaune du riz, un outil prometteur pour la production de protéines recombinantes d'intérêt

DRISSA SEREME¹, MARTINE BANGRATZ², JEAN LOUP LEMESRE³, DENIS FARGETTE⁴, CHRISTOPHE BRUGIDOU², GNISSA KONATE¹

¹ : Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA), Laboratoire de virologie et de biotechnologies végétales, 01 BP 476 Ouagadougou 01, BURKINA FASO. Tél. +226 50 31 92 08 Fax. +226 50 34 02 71 sereme@mpl.ird.fr; gnessa.konate@liptinfor.bf

² : UMR GDP, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), 911, av. Agropolis BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France ; Tel: +33 (0) 467 416 239 fax: +33 (0)4 67 41 61 81 ; brugidou@mpl.ird.fr; bangratz@mpl.ird.fr

³ : UMR 177, IRD Montpellier ; 911, av. Agropolis BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France ; Tel : +33 (0)4-67-41-62-20 ; Fax: +33 (0)4-67-41-61-81 ; J-Loup.Lemesre@mpl.ird.fr

⁴ : UMR RPB, IRD Montpellier 911, av. Agropolis BP 64501, 34394 Montpellier Cedex 5, France Tel: +33 (0) 467 416 291 fax: +33 (0)4 67 41 62 83 Email : denis.fargette@mpl.ird.fr

ABSTRACT

L'inactivation épigénétique post-transcriptionnelle (PTGS) est un mécanisme de régulation de l'expression des gènes et de défense reposant sur la dégradation spécifique des ARN transcrits. Les virus ont développé des protéines suppresseurs de PTGS pour contourner ce mécanisme de défense, qui bloquent les étapes intracellulaires ou de signalisation du PTGS. L'objectif de nos travaux est d'exploiter le virus responsable de la panachure jaune du riz (RYMV, *Rice Yellow Mottle Virus*) et une de ses protéines suppresseurs de PTGS, pour produire des protéines recombinantes d'intérêts chez le riz ou le tabac. Nos résultats montrent que l'expression transitoire d'un gène rapporteur Gus associé à un fort suppresseur permet d'amplifier son expression. Par ailleurs, l'utilisation de l'amplicon devrait encore augmenter son expression. Nos résultats offrent des perspectives intéressantes notamment pour la production de protéines vaccinales comme la PSA (*Promastigote Surface Antigen*) qui génère une immunité protectrice contre la leishmaniose.

Mots clés : PTGS, Suppresseurs, RYMV, protéines recombinantes, PSA

The post-transcriptional gene silencing (PTGS) is a mechanism involved in regulation of gene expression and defence based on the specific degradation of the transcribed ARN. To circumvent this mechanism, viruses developed proteins suppressors of PTGS which block the intracellular or signal stages of PTGS. The objective of our work is to exploit the virus responsible of rice yellow mottle disease (RYMV, *Rice yellow mottle virus*) and one of its proteins suppressors of PTGS, the P1 protein to produce recombinant proteins on rice or tobacco. Our results show that the transient expression of a gene reporter as *uidA* associated with a strong suppressor makes it possible to amplify its expression. In addition, the use of the amplicon should further increase its expression. Our results offer prospects interesting in particular for the production of vaccine proteins as the PSA (*Promastigote Surface Antigen*) which generates a protective immunity against *leishmania*.

Keywords: PTGS, Suppressors, RYMV, recombinant proteins, PSA

I. INTRODUCTION

La production de protéines à base thérapeutiques est de plus en plus envisagée. Ces protéines incluent des anticorps et des dérivés d'anticorps mais également des protéines sérum-dérivées (cytokines, hormones de croissance, interleukines, interférons, etc.). Plusieurs outils sont actuellement disponibles pour la production de ces protéines hétérologues, telles que les systèmes de bactéries, de champignons, de mammifères et d'insectes. Ces techniques de production, bien que très sophistiquées et bien caractérisées présentent des inconvénients qui sont inhérents aux systèmes de production respectifs : coût de production élevé, faible rendement, pertes de fonctions. Pour cela, d'autres systèmes ont été développés pour surmonter ces contraintes. Ainsi, actuellement des plantes sont utilisées pour la production de protéines d'intérêt (Giddings et al.,

2000). De plus, des études récentes sur les virus ont montré d'une part leur utilité en tant que vecteur d'expression et d'autre part l'existence de protéines suppresseur permettant d'améliorer le système de production. En effet, les protéines suppresseur de virus ont été utilisées pour contrecarrer le PTGS (Inactivation épigénétique post-transcriptionnelle) induit par un transgène et permettre une meilleure expression transitoire de la protéine d'intérêt. Notre étude est basée sur l'étude et l'exploitation du pathosystème plante/RYMV pour la production de protéines recombinantes. Le RYMV (*Rice yellow mottle virus*) est l'agent pathogène responsable de la maladie de la panachure jaune dans les rizières irriguées africaines. Cette maladie, endémique à l'Afrique, a été décrite pour la première fois en 1966 au Kenya (Bakker, 1974). Son génome est constitué de 4 cadres ouverts de lecture (ORF) (Figure 1).

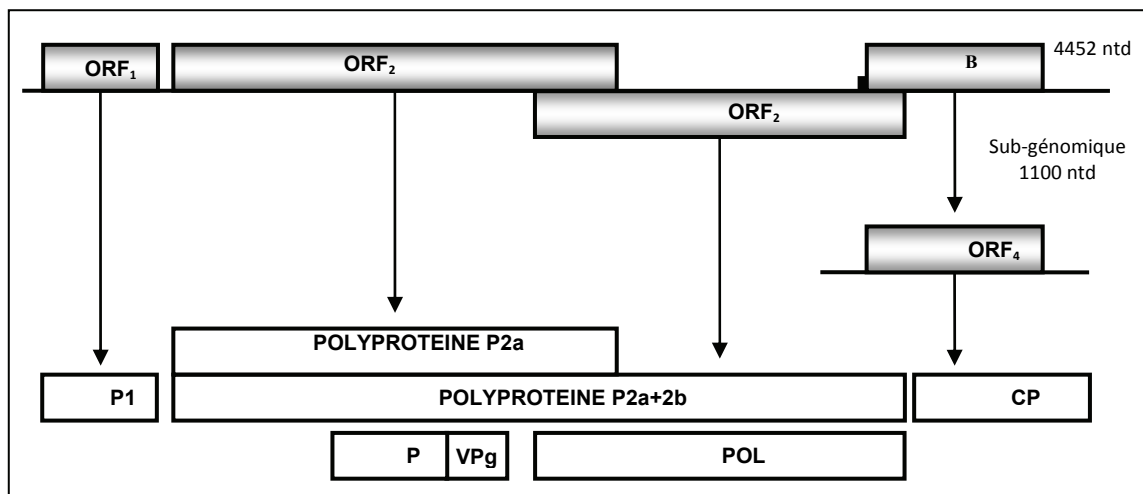


Figure 1 : Organisation génomique du virus de la panachure jaune du riz (RYMV). P1 : protéine P1 ; PRO : Protéase ; VP : VPg ; POL : Polymérase ; CP : Protéine de capsid

L'objectif de notre étude est d'utiliser cet ennemi des cultures rizicoles comme un puissant outil de biotechnologies en exploitant sa forte capacité de réplication dans toutes les cellules associées à sa capacité à inhiber le PTGS. Cet objectif est possible grâce aux connaissances accumulées sur la diversité biologique et moléculaire et sur la disponibilité de clones infectieux (Brugidou et al. 1995). Enfin, la simplicité de son génome pour les manipulations moléculaires et la transmission mécanique sont des atouts essentiels.

II. MATERIELS ET METHODES

Le matériel utilisé pour l'expression transitoire est constitué de plants de *Nicotiana benthamiana*. Les protéines P1 proviennent d'une vingtaine d'isolats représentatifs de la diversité du RYMV. L'ORF2 (ORF_{2a} et ORF_{2b}) composent l'amplicon (Figures 1 et 5).

Application en biotechnologies : L'amplicon du RYMV de par ses capacités de multiplication et de traduction élevées dans la plante hôte a été utilisé comme un vecteur d'expression transitoire pour produire des protéines complexes fonctionnelles dans un système eucaryote (Siré et al. 2006). Cependant, un tel amplicon présent dans une cellule végétale sera la cible du PTGS, qui va entraîner sa destruction. Pour cette raison, l'amplicon doit être accompagné d'une protéine suppresseur de PTGS ; pour le RYMV nous avons utilisé sa protéine P1. Pour tester la fonctionnalité de cette construction, une protéine rapporteur Gus (β -D glucuronidase) codée par le gène *uidA* a été utilisée.

Pour réaliser le vecteur viral (amplicon) dérivé du RYMV, l'ORF 2 responsable de la réplication a été dissociée des autres ORF puis clonée dans le plasmide pCambia1300 à partir du clone infectieux FL5 (Brugidou et al. 1995) sous le contrôle d'un promoteur fort 35S du virus de la mosaïque du chou fleur CaMV et un terminateur T35S (Figure 5). Le gène rapporteur Gus a été cloné en aval de l'amplicon à la place de l'ORF4 en fusion avec la partie N- terminal de la

protéine de capsid codée par l'ORF4 (22 acides aminés). Ces différentes constructions ont été co-agroinfiltrées dans des feuilles de tabac puis l'activité enzymatique de la protéine produite par le gène rapporteur a été évaluée.

Etude de la diversité de suppression de silencing par la protéine P1 : La protéine P1 du RYMV a été caractérisée comme suppresseur de silencing par Voinnet et al. (1999) puis par Siré et al. (soumis). L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet propre de la protéine P1 des isolats de RYMV représentatifs de la diversité de l'Afrique.

La protéine P1 de chaque isolat a été transcrite et amplifiée par RT-PCR puis clonée dans le plasmide binaire pCAMBIA1300 sous le contrôle du promoteur P35S et du terminateur T35S du CaMV (Figure 2).

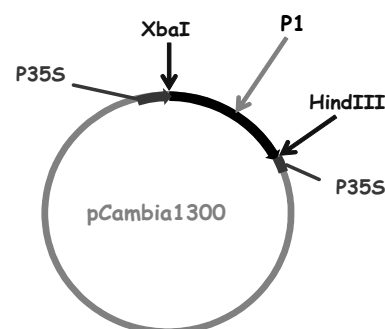


Figure 2 : Représentation schématique des constructions générées pour l'étude de la suppression de PTGS par différentes protéines P1

Les constructions ainsi générées ont été utilisées en co-infiltration avec le plasmide pCAMBIA 1305.1 contenant le gène rapporteur codant pour la protéine Gus dans les feuilles de tabac *Nicotiana benthamiana*. La technique d'expression transitoire décrite par Voinnet et al. (2000) a été utilisée pour évaluer la capacité de suppression de chaque protéine P1. Un test fluorimétrique de l'activité enzymatique de la protéine Gus a été réalisé sur les protéines hydrosolubles extraites des feuilles agro-infiltrées

pour évaluer la quantité de protéine d'intérêt produite (GUS dans notre cas) toutes les 24H pendant 1 semaine.

Exemple de protéine d'intérêt : la PSA (*Promastigote Surface Antigen*): Les leishmanioses sont un groupe d'infections parasitaires endémiques infectant les mammifères dont l'homme. Une protéine de surface de l'antigène appelée PSA a été identifiée et a permis d'élaborer un vaccin canin contre la leishmaniose viscérale ce qui représente un espoir de mise au point d'un vaccin humain. Cependant, sa production, actuellement assurée par l'extraction de protéines natives à partir de cultures de protozoaires, est sujette à des contraintes : coût de production élevé, faible rendement. En outre, son expression dans un système bactérien d'*Escherischia coli* se traduit par des rendements encore plus faibles et par une perte de fonctionnalité des PSA et donc incapables d'induire une réponse immunitaire. Au regard de toutes ces contraintes, la production de la PSA dans les cellules végétales a été envisagée. Pour cela, l'amplicon du RYMV a été utilisé et le gène rapporteur Gus a été remplacé par le gène codant la PSA. Ce système de production transitoire offre un potentiel important pour la production de protéines recombinantes car il est économique, rapide et reproductible. Il permet aussi d'assurer un taux de production élevé et ne comporte pas de risques de contamination avec un pathogène humain.

III. RESULTATS-DISCUSSION

Diversité fonctionnelle de protéines suppresseurs P1 : Nos résultats obtenus à partir de différentes P1 montrent une forte variabilité potentielle d'intensité de suppression du PTGS (Figure 3a). En effet, si toutes ces protéines suppriment le PTGS, les protéines P1 des isolats n°11 ; 12 (provenant du Mali) et Tz3 provenant de la Tanzanie se distinguent par leur forte capacité à inhiber le PTGS. On constate que la quantité de protéines Gus sans la présence d'un suppresseur (agro-infiltrée seule) reste faible. Par

contre, lorsque l'agro-infiltration est réalisée en présence d'un suppresseur fort, la quantité de protéines produites a triplé, 2 jours après l'agro-infiltration et multipliée par 24, 6 jours après (Figure 3b). Cette production doit être théoriquement améliorée en présence de l'amplicon lorsque celui-ci sera pleinement fonctionnel (Figure 4). L'utilisation de l'amplicon et des différentes protéines P1 pour améliorer la production du gène rapporteur Gus a fait l'objet de deux Brevets déposé par l'IRD (PCT/FR05/002626, PCT/FR06/000017).

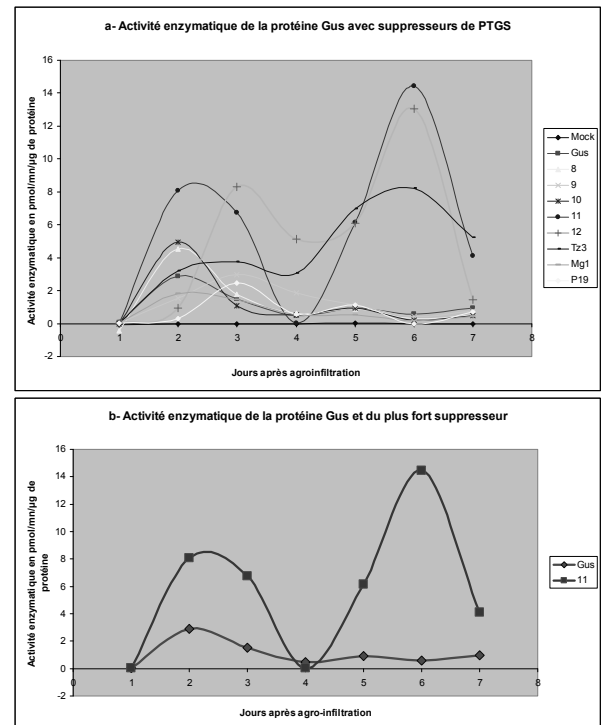


Figure 3 : Dosage de l'activité enzymatique de la protéine Gus produite au cours du temps en présence ou non (courbe Gus) d'un suppresseur de silencing.

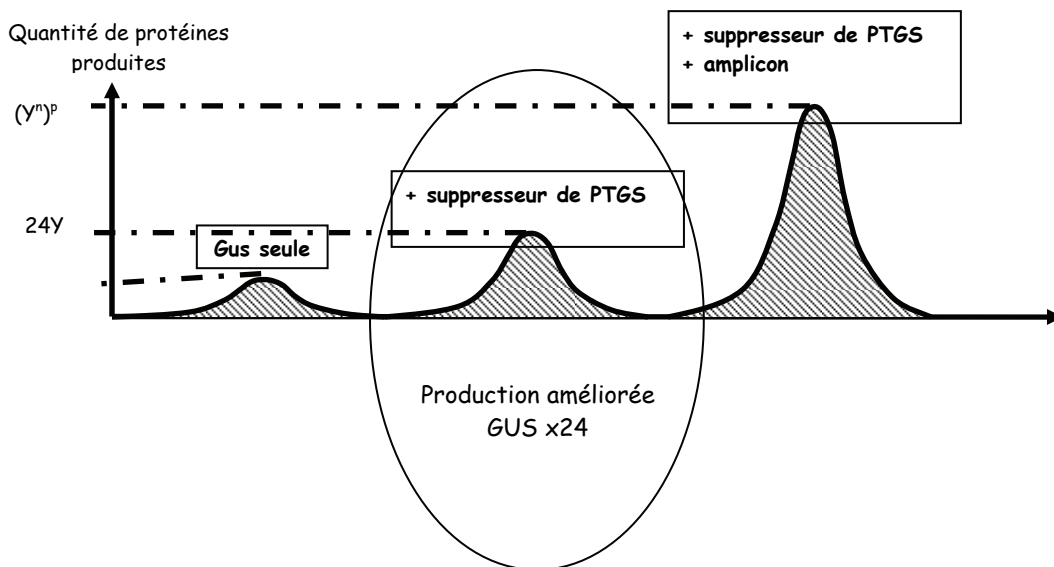


Figure 4 : Production de la protéine Gus seule, en présence de suppresseur de PTGS et en présence de suppresseur et d'amplicon

Amplicon et production de protéines d'intérêt : Cas de la PSA : Les forts supresseurs de PTGS précédemment identifiés ont été utilisés pour améliorer le vecteur d'expression disponible. Pour cela, la construction portant la protéine P1 et celle portant l'amplicon seront co-groinfiltrées au tabac. La protéine P1 de l'isolat Tz3, un

des forts supresseurs de PTGS sera utilisée. Le gène codant pour la PSA a été cloné dans le vecteur d'expression en lieu et place du gène rapporteur Gus (Figure 5). Cet amplicon est en cours de validation pour son expression dans le tabac.



Figure 5 : Représentation schématique du vecteur viral utilisé pour la production de la protéine PSA.

IV. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Les résultats obtenus avec le gène rapporteur sont encourageants. En effet, l'utilisation de système d'expression efficace associé aux supresseurs de PTGS permet une augmentation significative de la quantité de protéine produite. Le gène d'intérêt, la PSA, a été cloné dans le vecteur d'expression. Les travaux sont en cours pour la production du candidat anti-leishmaniose. Pour la purification de la protéine produite, des améliorations comme une séquence His-tag en N ou C-terminal de la PSA et des séquences d'adressage pour différents compartiments cellulaire sont en cours. Une fois la PSA produite, il faudra vérifier la séquence et sa structure et surtout tester ses propriétés immunologiques pour s'assurer qu'elles sont identiques à la protéine native.

REFERENCES

1. Bakker W., 1974. Thèse de Doctorat, *Université de Wageningen*, pp. 152.
2. Ding, S.-W., Li, H., Lu, R., Li, F. and Li, W.-X. 2004. *Virus Research* 102, 109-115.
3. Voinnet, O., Lederer, C., Baulcombe, D.C., 2000. *Cell* 103, 157-167.
4. Voinnet, O., Pinto, Y. M., and Baulcombe, D. C. 1999. *PNAS* 96:14147-14152 Yao, M.-C., Fuller, P. and Xi, X. 2003. *Science* 300, 1581-1584.
5. Brugidou, C., Holt, C., Yassi, M.N., Beachy, R.N., and Fauquet, C. 1995, *Virology*, 206, 108.
6. Giddings, G., Allison G., Brooks D. and Carter A.. 2000. *Nat. Biotech.* 18: 1151-1155.
7. Siré C., Piron F., Bangratz-Reyser M., Lemesre J-L. and Brugidou C. 2006. *Molecular Biology for Tropical Plants*. ISBN 81-308-0138-8.

Quatrième Partie:

DISCUSSION GENERALE

1. Introduction

Au cours de ce travail, nous avons caractérisé deux sobémovirus en relation avec la suppression de silencing ainsi que les applications biotechnologiques qui en découlent. Le présent document étant une thèse par insertion d'articles, les résultats sont discutés dans les différents articles insérés. Dans ce chapitre, nous discuterons succinctement de la synthèse des résultats obtenus au cours de ces années de thèse.

2. Synthèse des résultats

L'objectif de notre thèse était d'explorer la diversité intra- et interspécifique du RYMV en Afrique de l'Ouest, au Burkina Faso et au Mali, afin d'identifier des protéines ayant de très forte capacité de suppression de silencing en vue de les utiliser comme outils de biotechnologie dans la production de protéines recombinantes. La recherche de ce but nous a d'abord conduit à évaluer la diversité interspécifique à travers la caractérisation d'un nouveau virus et l'étude de la diversification des sobémovirus et virus apparentés. Ensuite, la caractérisation intraspécifique a consisté en l'évaluation de la diversité sérologique, pathologique et moléculaire du RYMV ainsi qu'en l'identification des contraintes fonctionnelles de sa protéine P1 sur la suppression de silencing. Une fois la caractérisation de la diversité terminée, nous avons déterminé les forts supprimeurs de silencing et nous les avons testés dans un système de production de protéines recombinantes.

2.1. Caractérisation d'un nouveau virus et l'étude de la diversification des sobémovirus et des virus apparentés

Les travaux réalisés nous ont permis de déterminer les caractéristiques biologique et moléculaire d'un nouveau sobémovirus que nous avons proposé d'appeler virus de la panachure jaune du riz (IYMV pour *Imperata yellow mottle virus*) en rapport avec les symptômes de panachure jaune qu'il cause aux plantes infectées. Du fait de son appartenance au genre *Sobemovirus*, IYMV n'est assigné à aucune famille de virus.

Sur le plan de la défense des cultures, IYMV infecte une culture d'une grande importance économique à savoir le maïs, deuxième céréale la plus consommée dans le monde après le riz. N'étant pas décrit par ailleurs, ce nouveau virus présente les caractéristiques d'un virus émergent et donc constitue une menace certaine pour la culture du maïs en Afrique. D'ores et déjà, au Burkina Faso, des symptômes sévères ont été observés sur la plupart des

variétés de maïs testées, ce qui confirme nos craintes sur les conséquences désastreuses d'une éventuelle épidémie due à ce virus. En effet, sur 20 variétés de maïs sélectionnées par les généticiens de l'INERA, IYMV a été capable d'infecter 16 soit un taux d'infection de 80 %. Sachant que ces variétés ont été sélectionnées pour leur rendement élevé et surtout pour leur résistance aux différents pathogènes (virus, insectes, les bactéries...), il apparaît clairement que nous sommes en face d'une souche virulente de virus attaquant une céréale d'une grande importance économique qu'il faut prendre avec le plus grand sérieux. Des données obtenues au cours de cette thèse sont en cela, d'une importante contribution à la lutte contre ce pathogène.

Les études que nous avons menées sur la caractérisation moléculaire et pathogénique du IYMV nous ont permis de développer des marqueurs d'identification du pathogène. En effet, nous avons produit des anticorps polyclonaux anti-IYMV ce qui a permis de développer un kit de détection du virus par ELISA. Ce succès s'expliquerait sans doute par le fait que le IYMV est un virus très immunogène. Ces résultats sont conformes à ceux rapportés par van Regenmortel (1986) selon lesquels la plupart des virus phytovirus sont de bons immunogènes. C'est également le cas du RYMV (Bakker, 1974; Fauquet et Thouvenel, 1977). Avec ce kit de détection, le diagnostic du IYMV est maintenant possible. L'identification et la caractérisation étant à la base de la mise au point de toute méthode de lutte efficace, il apparaît clairement que nos résultats sont d'une grande contribution à la lutte contre ce nouveau phytopathogène.

Par ailleurs, l'application de la méthode ELISA ayant montrée des limites dans les cas d'existence d'une grande variabilité de virus (Traoré, 2006), le typage moléculaire basé sur la détermination de la séquence de la protéine de capsid permettra de lever cette contrainte. Ainsi, cette méthode pourra être utilisée dans le cadre de l'étude de la variabilité du IYMV comme c'est le cas avec le RYMV (Fargette *et al.*, 2002b).

Toujours dans le cadre de l'étude de la diversité, nous avons estimé l'âge du RYMV à partir de séquences hétérochrones. Cet âge a été utilisé pour calibrer la phylogénie des sobémovirus et des virus apparentés. Nous sommes parvenus à la conclusion que la diversification des sobémovirus et des virus apparentés remonte aux premiers stades de l'agriculture.

2.2. Diversité du RYMV et contrainte fonctionnelle de sa protéine P1 sur la suppression de silencing

Le silencing étant un mécanisme basal de défense contre les virus (Jones et Dangl, 2006 ; Navarro *et al.*, 2008), l'objectif de cette étude était d'évaluer la diversité intraspécifique du RYMV et de mettre en évidence une relation entre cette diversité et la suppression de silencing.

Si l'existence d'une variabilité chez le RYMV a été rapportée par plusieurs auteurs sur la base d'analyses sérologique et moléculaire (Fauquet et Thouvenel, 1977; Fargette *et al.*, 2002b) nous avons confirmé à travers cette étude, en utilisant des isolats atypiques, la forte diversité sérologique du RYMV en Afrique occidentale. En effet, les échantillons de RYMV testés renfermaient les trois sérotypes (Ser1, Ser2 et Ser-sa) rapportés en Afrique de l'Ouest, le second centre de diversification du virus (Traoré *et al.*, 2005).

En outre, si d'importantes données sur la pathogénie du RYMV ont été obtenues par différentes études (Pinel *et al.*, 2000 ; Sorho *et al.*, 2005 ; Traoré *et al.*, 2005 ; Hébrard *et al.*, 2006 ;), aucune d'elles n'a permis de mettre en évidence des isolats appartenant au sérotype Ser2 capables de contourner la résistance élevée. L'identification au cours de notre travail de ces variants (Ser2) contournant la résistance élevée indique que la diversité pathogénique du RYMV est loin d'être épuisée et qu'il faudrait continuer à l'explorer. Par ailleurs, ces nouveaux résultats confirment que le mécanisme de contournement est probablement plus varié qu'on ne pouvait le prévoir au départ et qu'il faudrait en tenir compte dans la gestion de la durabilité des résistances, particulièrement dans le déploiement de nouvelles variétés résistantes au RYMV en Afrique de l'Ouest où est rencontrée cette souche.

La protéine P1 du RYMV semble être un bon candidat pour comprendre l'émergence et la propagation du virus. Le fait qu'elle soit une protéine multifonctionnelle impliquée dans le mouvement (Bonneau *et al.*, 1998), dans le silencing (Lacombe *et al.*, 2009), dans la suppression de silencing (Voinnet *et al.*, 1999) et dans la diversité de suppression (Siré *et al.*, 2008) conforte cette hypothèse. Si c'est le cas, il doit exister des signatures moléculaires, au niveau de la protéine P1 acquises au cours de son évolution, qui modulent ces fonctions notamment la suppression de silencing. Pour donc identifier ces signatures, un nombre important de séquences P1 couvrant l'ensemble de la diversité du RYMV (44 au total) a été soumis à différentes analyses bioinformatiques. Ainsi, il a pu être identifié plusieurs sites qui sont sous sélection positive dont quatre se sont révélés être très fortement sous sélection positive. A travers cette étude, il a été montré, par mutagenèse, que dans trois cas sur quatre, on augmentait de façon significative la suppression de silencing et que dans un cas on

diminuait la force de suppression. Torres-Barcelo *et al.* (2008) ont obtenu des résultats similaires avec la protéine suppresseur HC-Pro du *Tobacco etch potyvirus*. Ces auteurs par substitution d'acides aminés ont mis en évidence des hypo- et des hypersuppresseurs de silencing. Contrairement à cette étude où les substitutions ont été réalisées de façon ponctuelle, dans notre cas, le choix des sites à muter a été effectué à l'aide de méthodes phylogénétiques en utilisant différents modèles d'évolution moléculaire. Les résultats obtenus montrent que les quatre sites modulent la suppression de silencing et suggèrent un rôle de la protéine P1 du RYMV dans l'évolution du virus. Hormis l'intérêt fondamental de la suppression dans l'évolution virale, cette découverte qui permet d'améliorer "artificiellement" la force de suppression de silencing trouve son application en biotechnologie dans la mesure où les forts suppresseurs sont recherchés pour la production transitoire de protéines recombinantes (Siré *et al.*, 2006; Sérémé *et al.*, 2008b).

Récemment, Allarangaye *et al.* (2007) ont montré que la graminée sauvage *D. aegyptium* est un hôte différentiel du RYMV qui est infecté par certains isolats mais pas par d'autres. Cependant, le mécanisme par lequel cette espèce est infectée ou non par le virus reste méconnu jusque là. La diversité de la protéine P1 ainsi que son rôle dans la capacité du virus à infecter son hôte à travers la suppression de silencing pourrait expliquer pourquoi certains isolats seulement parviennent à infecter *D. aegyptium* suggérant ainsi un rôle des suppresseurs de silencing dans les relations hôtes-pathogènes

2.3. Identification de forts suppresseurs de silencing et applications en biotechnologie

La découverte du mécanisme d'extinction des gènes et récemment de la suppression de silencing chez les plantes puis chez les animaux est l'une des avancées les plus prometteuses de ces dernières années dans le monde de la biologie moléculaire. Les implications et les perspectives ouvertes par l'ARNi et les suppresseurs de silencing sont immenses et pourraient révéler des aspects encore insoupçonnés dans de nombreux domaines de la biologie. L'objectif principal de notre travail étant la recherche de forts suppresseurs de silencing, nous avons testé 20 isolats atypiques de RYMV pour leur capacité à supprimer le silencing. Cette étude a permis d'identifier deux protéines P1 ayant de très forte capacité de suppression *in planta* (Sérémé *et al.*, 2008b) et qui permettent d'augmenter, d'un facteur 24, la quantité de protéine GUS produite faisant ainsi d'elles des adjuvants prometteurs pour la production de protéines d'intérêt par les plantes.

Outre la possibilité offerte par la mutagenèse d'améliorer la force de suppression de silencing, nous avons jugé nécessaire de tester la capacité de la protéine P1 du nouveau virus

à supprimer le silencing d'autant plus que cette fonction semble être une caractéristique commune à la protéine P1 des sobémovirus. Nous avons montré que cette protéine, jusque là sans fonction connue, supprime le silencing local et systémique chez les plants transgéniques et sauvages de *N. benthamiana* et que sa capacité à supprimer le silencing est plus forte que celle de la P1 du RYMV. Par ailleurs, le profil de suppression de la protéine P1 du IYMV diffère de celui de la protéine P1 du RYMV (2 pics de suppression pour RYMV contre 1 seul à 4 jai pour IYMV) ce qui suggère un mode d'action différent pour ces deux supresseurs. Cela pourrait s'expliquer par la diversité des protéines P1 des deux virus. En effet, selon Anandalakshmi *et al.* (1998) la divergence, tant en séquence qu'en structure, des protéines impliquées dans la suppression de silencing se traduit par une diversité de mécanisme d'action et de molécules ciblées.

Les applications de la découverte du nouveau supresseur chez IYMV, en terme de biotechnologie, sont énormes et prometteuses. En effet, de la même manière que chez le RYMV, la protéine P1 du IYMV permet d'augmenter d'un facteur 30 l'expression de la protéine GUS. De plus, nos résultats indiquent qu'il est possible d'améliorer davantage cette production en modifiant artificiellement par mutagénèse certains sites clés dans la séquence protéique de la P1.

Ainsi, à travers l'identification d'un nouveau supresseur de silencing, (i) nous apportons une contribution à la compréhension du mécanisme de suppression de silencing et (ii) nous avons identifié un fort supresseur de silencing dont les applications en biotechnologies ont été mises en évidence. IYMV est le troisième sobémovirus après le RYMV et le CfMV dont le génome code pour un supresseur de silencing. Nos résultats confortent ainsi l'hypothèse selon laquelle la suppression de silencing serait une propriété partagée par la protéine P1 des sobémovirus et particulièrement des sobémovirus infectant les monocotylédones.

CONCLUSION GENERALE

PERSPECTIVES

Cette partie présente brièvement les résultats majeurs obtenus au cours de nos travaux tout en proposant des pistes pour développer ce travail et approfondir nos résultats du point de vue technique et scientifique.

Ainsi, notre travail a contribué à une meilleure exploitation du mécanisme de suppression de silencing chez deux sobémovirus : les virus de la panachure jaune du riz et du Chiendent (*Imperata cylindrica*). En effet, à travers cette étude, un nouveau phytovirus a été isolé d'une culture majeure (*Zea mays*) et d'une graminée sauvage (*I. cylindrica*). Ses caractéristiques biophysiques, biologiques et moléculaires ont pu être déterminées. Toutes ces données ont permis de mettre en évidence ou de confirmer le rôle des graminées sauvages dans l'émergence de nouveaux virus sur les cultures.

Pris dans leur ensemble, les résultats ont permis d'identifier de forts supprimeurs de silencing (RYMV et IYMV) et mieux, de mettre en évidence des voies (techniques) permettant d'améliorer davantage cette force de suppression. Des résultats encourageants quant à l'utilisation de ces supprimeurs de silencing comme outils dans la production de protéines recombinantes ont été obtenus et ne demandent qu'à être améliorés pour une production plus efficiente de ces protéines. En cela, ces travaux présentent un réel intérêt fondamental pour l'étude des supprimeurs de silencing, mais revêtent également un réel intérêt appliqué (i) pour la protection des cultures en général et du maïs en particulier contre le IYMV et (ii) pour l'espoir que procure l'utilisation des forts supprimeurs de silencing identifiés dans la production de protéines d'intérêt par les plantes. Contrairement aux systèmes de production de protéines hétérologues existants (bactéries, champignons, mammifères et insectes), le système transitoire utilisant les supprimeurs de silencing présente des avantages qui sont entre autres le faible coût de production, le rendement élevé et la conservation des fonctions. Cependant, une fois la protéine d'intérêt produite, il sera nécessaire de vérifier sa séquence et sa structure et surtout de tester ses propriétés pour s'assurer qu'elles sont identiques à la protéine native et qu'elle est fonctionnelle.

De nombreuses perspectives se dégagent de cette étude dont les plus intéressantes se déclinent en ses points qui suivent :

A l'exemple des études réalisées sur le RYMV, le typage moléculaire, en utilisant la séquence de la CP, permettra d'étudier la variabilité du virus et de caractériser plus finement les différents isolats de IYMV. D'ores et déjà, la virulence de la nouvelle souche de IYMV étant révélée par notre étude, elle doit être prise en compte dans les programmes d'amélioration génétique du maïs et les programmes intégrés de protection des cultures de maïs (pratique culturale- plantes réservoirs etc). Les différents cultivars de maïs doivent être

sélectionnés pour leur résistance à ce nouveau pathogène afin de prévenir l'expansion de cette maladie en Afrique comme cela a été le cas pour le RYMV (Traoré *et al.*, 2009). Etant établi que les plantes sauvages, à l'image de *I. cylindrica*, favorisent l'émergence et le maintien des virus (Anderson *et al.*, 2004 ; Fargette *et al.*, 2006), il s'avère nécessaire de prendre les précautions qui s'imposent afin de pallier à un éventuel passage du IYMV de *I. cylindrica* sur une plante cultivée telle que le riz, une autre céréale d'une très grande importance économique. Sur le riz par exemple, il pourrait se recombinaison avec le RYMV, comme c'est le cas entre ce virus et d'autres sobémovirus (Fargette *et al.*, 2009) et générer un nouveau virus virulent pour les deux cultures. Les connaissances sur la biologie et l'épidémiologie du IYMV sont donc nécessaires et passent par les prospections et la collecte d'échantillons de IYMV dans différentes régions du Burkina Faso, voire dans d'autres pays. Cela devrait conduire à une meilleure caractérisation (sérologique, pathogénie et moléculaire) de ce nouveau virus.

La présente étude a permis d'identifier un isolat de RYMV (Ma204) capable de se multiplier très activement sur la variété de riz résistante Giganté sans pour autant muter au niveau de la VPg, ce qui suggère qu'en plus de la VPg, un ou plusieurs autres gènes viraux seraient impliqués dans le contournement de la résistance du riz au RYMV. Des études sont en cours au niveau du laboratoire de virologie et de biotechnologies végétales de l'INERA en collaboration avec l'IRD de Montpellier (France), pour identifier les bases moléculaires de ce nouveau contournement de résistance. Ces études permettront de mettre en évidence d'autres protéines virales avec des acides aminés ou des motifs impliqués dans le contournement. Dans ce but, la protéine suppresseur P1 issus d'isolats qui contournent la résistance sans mutée dans la VPg a été testée en l'introduisant dans le clone infectieux (Brugidou *et al.*, 1995). Cette expérimentation devrait permettre, dans un avenir proche, d'évaluer le clone chimérique généré pour sa capacité à contourner la résistance de Giganté. Ainsi, il sera possible de mettre en évidence une éventuelle implication de la protéine suppresseur P1 dans la pathogénie du RYMV.

Un nouveau suppresseur codé par IYMV a été identifié au cours de la présente étude. Cependant, le mode d'action n'a pas été déterminé, il s'avère également nécessaire de comprendre le mécanisme d'action de ce suppresseur de silencing. Dans cette optique, une première approche similaire à celle de la P1 du RYMV (Lacombe *et al.*, 2009) pourrait être engagée. Aussi, une recherche des cibles en système double hybride de levure pourrait être privilégiée. Cela devra permettre d'identifier les partenaires de la P1 et de voir si malgré les différences de séquences, de comportement pour la suppression, ils partagent les mêmes cibles.

Nous avons enfin montré qu'il est possible d'améliorer la force de suppression de silencing par mutagenèse en différentes positions de la protéine P1. Ces résultats encourageants, nous ont amené à nous poser la question de savoir si ces mutations, introduites dans une seule protéine P1, pouvaient avoir des effets cumulatifs. En d'autres termes, quels seront les effets d'une double ou triple mutation sur la suppression de silencing et par là sur la sur-expression de protéines d'intérêt ? Les études sont en cours et permettront de répondre à cette question et de tester de tels mutants dans un système de production de protéines recombinantes.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abad-Zapatero C, Abdel-Meguid SS, Johnson JE, Leslie AGW, Rayment I, Rossmann MG, Suck D, Tsukihara T (1980).** Structure of *Southern bean mosaic virus* at 2.8 Å resolution. *Nature Biotechnology* 286 : 33-39.
- Abel PP, Nelson RS, De B, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT, Beachy RN (1986).** Delay of disease development in transgenic plants that express the *Tobacco mosaic virus* coat protein gene. *Science* 232 : 738-743.
- Abubakar Z, Ali F, Pinel A, Traoré O, N'Guessan P, Notteghem JL, Kimmins F, Konaté G, Fargette D (2003).** Phylogeography of *Rice yellow mottle virus* in Africa. *Journal of General Virology* 84 : 733-743.
- Al-Anouti F, Ananvoranich S (2002).** Comparative analysis of antisense RNA, doublestranded RNA, and delta ribozyme-mediated gene regulation in *Toxoplasma gondii*. *Antisense and Nucleic Acid Drug Development* 12 : 275-281.
- Albar L, Bangratz-Reyser M, Hébrard E, Ndjiondjop MN, Jones M, Ghesquière A (2006).** Mutations in the eIF(iso) 4G translation initiation factor confer high resistance of rice to *Rice yellow mottle virus*. *Plant Journal* 47 : 417-426.
- Allarangaye M, Traoré O, Traoré E, Millogo R, Guinko S, Konaté G (2007).** Host range of *Rice yellow mottle virus* in Sudano-Sahelian savannahs. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 10 : 1414-1421.
- Anandalakshmi R, Pruss GJ, Ge X, Marathe R, Mallory AC, Smith TH, Vance VB (1998).** A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 : 13079-13084.
- Anderson P, Cunningham A, Patel N, Morales F, Epstein P, Daszak P (2004).** Emerging infectious diseases of plants : Pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology and Evolution* 19 : 535-544.
- Anonymous (2003).** Whither RNAi ? *Nature Cell Biology* 5 : 489-490.
- Aoki Y, Cioca DP, Oidaira H, Kamiya J, Kiyosawa K (2003).** RNA interference may be more potent than antisense RNA in human cancer cell lines. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 30 : 96-102.

- Astier S, Albouy J, Maury Y, Lecoq H (2001).** Principes de virologie végétale : Génome, Pouvoir pathogène, Ecologie des virus. INRA edn. Paris, France, 444 p.
- Awoderu VA (1991).** *Rice yellow mottle virus* in West Africa. *Tropical Pest Management* 37 : 356-362.
- Bakker W (1970).** *Rice yellow mottle virus*. A mechanically transmissible virus disease of rice in Kenya. *Netherland Journal of Plant Pathology* 76 : 53-63.
- Bakker W (1974).** Characterization and ecological aspects of *Rice yellow mottle virus* in Kenya. Thesis Wageningen University, The Netherlands, 152 p.
- Balke I, Resevica G, Zeltins A (2007).** The *Ryegrass mottle virus* genome codes for a sobemovirus 3C-like serine protease and RNA-dependent RNA polymerase translated *via* -1 ribosomal frameshifting. *Virus Genes* 35 : 395-398.
- Baulcombe DC (2004).** RNA silencing in plants. *Nature* 431 : 356-363.
- Baulcombe DC (2007).** Molecular biology. Amplified silencing. *Science* 315 : 199-200.
- Beachy RN (1997).** Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* 8 : 215-220.
- Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001).** Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409 : 363-366.
- Bevan MW (1984).** Binary *Agrobacterium* vector for plant transformation. *Nucleic Acids Research* 12 : 8711-8722.
- Bhuvaneshwari M, Subramanya HS, Gopinath K, Savithri HS, Nayudu MV Murthy MRN (1995).** Structure of *Sesbania mosaic virus* at 3 Angstrom resolution. *Structure* 3 : 1021-1030.
- Bisaro DM (2006).** Silencing suppression by geminivirus proteins. *Virology* 344 : 158-168.
- Bonneau C (1998).** Etude cytologique et moléculaire du mouvement du virus de la panachure jaune du riz (RYMV). Thèse de Doctorat, Université Paris XI, France, 114 p.
- Bonneau C, Brugidou C, Chen L, Beachy RN, Fauquet C (1998).** Expression of the *Rice yellow mottle virus* P1 protein *in vitro* and *in vivo* and its involvement in virus spread. *Virology* 244 : 79-86.

- Bonnemain JL, Chollet JF (2003).** L'arsenal phytosanitaire face aux ennemis des plantes. Considérations générales. *Comptes Rendus Biologies* 326 : 1-7.
- Borsani O, Zhu J, Verslues PE, Sunkar R, Zhu JK (2005).** Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in Arabidopsis. *Cell* 123 : 1279-1291.
- Bosher JM, Labouesse M (2000).** RNA interference : Genetic wand and genetic watchdog. *Nature Cell Biology* 2 : E31-E36.
- Bradford MM (1976).** A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Analytical Biochemistry* 72 : 248-254.
- Brigneti G, Voinnet O, Li WX, Ji LH, Ding SW, Baulcombe DC (1998).** Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *The EMBO Journal* 17 : 6739-6746.
- Brosnan CA, Mitter N, Christie M, Smith NA, Waterhouse PM, Carroll BJ (2007).** Nuclear gene silencing directs reception of long-distance mRNA silencing in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 : 14741-14746.
- Brugidou C, Holt C, Yassi MN, Zhang S, Beachy R, Fauquet C (1995).** Synthesis of an infectious full-length cDNA clone of *Rice yellow mottle virus* and mutagenesis of the coat protein. *Virology* 206 : 108-115.
- Brugidou C, Opalka N, Yeager M, Beachy RN, Fauquet C (2002).** Stability of *Rice yellow mottle virus* and cellular compartmentalization during the infection process in *Oryza sativa* (L.). *Virology* 297 : 98-108.
- Brunt AA, Crabtree K, Dallwitz MJ, Gibbs AJ, Watson L, Zurcher EJ (1996).** Plant viruses online : Descriptions and lists from the VIDE Database. Version : 20th August 1996. URL <http://biology.anu.edu.au/Groups/MES/vide/> visited 2008/09/22.
- Bucher E (2006).** Antiviral RNA silencing and viral counter defense in plants. Thesis Wageningen University, The Netherlands, 115 p.
- Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR (2004).** Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 10 : 1957-1966.

- Campbell AW, Guy PL (2001).** *Cocksfoot mottle virus* spreads to the South Island of New Zealand. *Australasian Plant Pathology* 30 : 217-220.
- Caranta C, Ruffel S, Dussault MH (2003).** Gènes naturels de résistance aux virus chez les plantes : Relations entre structure et fonction. *Virologie* 7 : 165-175.
- Chauchereau A, Harel-Bellan A (2004).** Inactivation fonctionnelle des gènes par ARN interférence. *Hématologie* 10 :68-79.
- Chi JT, Chang HY, Wang NN, Chang DS, Dunphy N, Brown PO (2003).** Genome wide view of gene silencing by small interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 : 6343-6346.
- Chien A, Edgar DB, Trela JM (1976).** Deoxyribonucleic acid polymerase from the extreme thermophile *Thermus aquaticus*. *Journal of Bacteriology* 127 : 1550-1557.
- Clark MF, Adams AN (1977).** Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of general virology* 34 : 475-483.
- Cogoni C, Irelan JT, Schumacher M, Schmidhauser TJ, Selker EU, Macino G (1996).** Transgene silencing of the *al-1* gene in vegetative cells of *Neurospora* is mediated by a cytoplasmic effector and does not depend on DNA-DNA interactions or DNA methylation. *The Embo Journal* 15 : 3153-3163.
- Cogoni C, Macino G (1999).** Gene silencing in *Neurospora crassa* requires a protein homologous to RNA-dependent RNA polymerase. *Nature* 399 : 166-169.
- Cogoni C, Macino G (2000).** Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Current Opinion in Genetics and Development* 10 : 638-643.
- Czech B, Malone CD, Zhou R, Stark A, Schlingehayde C, Dus M, Perrimon N, Kellis M, Wohlschlegel JA, Sachidanandam R, Hannon GJ, Brennecke J (2008).** An endogenous small interfering RNA pathway in *Drosophila*. *Nature* 453 : 798-802.
- Dall DJ, Graddon DJ, Randles JW, Francki RIB (1990).** Isolation of a *Subterranean clover mottle virus*-like satellite RNA from lucerne infected with *Lucerne transient streak virus*. *Journal of General Virology* 71 : 1873-1875.

- Dalmay T, Hamilton A, Rudd S, Angell S Baulcombe DC (2000).** An RNA Dependent RNA Polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101 : 543-553.
- Dangl JL, McDowell JM (2006).** Two modes of pathogen recognition by plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 : 8575-8576.
- Deckers H, Moloney M, Baum, A (1999).** The case for recombinant production of pharmaceutical proteins in plants. *Annual Reports in Medicinal Chemistry* 34 : 237-245.
- Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, Kasschau KD, Carrington JC, Voinnet O (2006).** Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313 : 68-71.
- Ding SW, Voinnet O (2007).** Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130 : 413-426.
- Drummond AJ, Rambaut A (2007).** BEAST : Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7 : 214.
- Dunoyer P, Himber C, Voinnet O (2005).** DICER-LIKE 4 is required for RNA interference and produces the 21-nucleotide small interfering RNA component of the plant cell-to-cell silencing signal. *Nature Genetics* 37 : 1356-1360.
- Dunoyer P, Himber C, Ruiz-Ferrer V, Alioua A, Voinnet O (2007).** Intra- and intercellular RNA interference in *Arabidopsis thaliana* requires components of the microRNA and heterochromatic silencing pathways. *Nature Genetics* 39 : 848-856.
- Efron Y, Kim SK, Fajemisin JM, Mareck JH, Tang CY, Dabrowski ZT, Rossel HW, Thottappilly G (1989).** Breeding for resistance to *Maize streak virus* : A multidisciplinary team approach. *Plant Breeding* 103 : 1-36.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001).** RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Development* 15 : 188-200.
- El-Shami M, Pontier D, Lahmy S, Braun L, Picart C, Vega D, Hakimi MA, Jacobsen SE, Cooke R, Lagrange T (2007).** Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components. *Genes and Development* 21 : 2539-2544.

- Erickson JW, Silva AM, Murthy MR, Fita I, Rossmann MG (1985).** The structure of a T = 1 icosahedral empty particle from *Southern bean mosaic virus*. *Science* 229 : 625-629.
- Fagard M, Vaucheret H (2000).** (Trans) gene silencing in plants : How Many Mechanisms ? *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51 : 167-194.
- Fagard M, Boutet S, Morel JB, Bellini C, Vaucheret H (2000).** AGO1, QDE-2, and RDE-1 are related proteins required for post-transcriptional gene silencing in plants, quelling in fungi, and RNA interference in animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 : 11650-11654.
- Fahlgren N, Montgomery TA, Howell MD, Allen E, Dvorak SK, Alexander AL, Carrington JC (2006).** Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA affects developmental timing and patterning in *Arabidopsis*. *Current Biology* 16 : 939-944.
- Fargette D, Pinel A, Traoré O, Ghesquière A, Konaté G (2002a).** Emergence of resistance-breaking isolates of *Rice yellow mottle virus* during serial inoculations. *European Journal of Plant Pathology* 108 : 585-591.
- Fargette D, Pinel A, Halimi H, Brugidou C, Fauquet C, van Regenmortel M (2002b).** Comparison of molecular and immunological typing of isolates of *Rice yellow mottle virus*. *Archives of Virology* 147 : 583-596.
- Fargette D, Pinel A, Abubakar Z, Traoré O, Brugidou C, Sorho F, Hébrard E, Choisy M, Séré Y, Fauquet C, Konaté G (2004).** Inferring the evolutionary history of *Rice yellow mottle virus* from genomic, phylogenetic, and phylogeographic studies. *Journal of Virology* 78 : 3252-3261.
- Fargette D, Pinel-Galzi A, Rakotomalala M, Sangu E, Traoré O, Sérémé D, Sorho F, Issaka S, Hébrard E, Séré Y, Kanyeka Z, Konaté G (2008a).** *Rice yellow mottle virus*, an RNA plant virus, evolves as rapidly as most RNA animal viruses. *Journal of Virology* 82 : 3584-3589.
- Fargette D, Pinel-Galzi A, Sérémé D, Lacombe S, Hébrard E, Traoré O, Konaté G (2008b).** Diversification of *Rice yellow mottle virus* and related viruses spans the history of agriculture from the neolithic to the present. *PLoS Pathogens* 4 : e1000125
- Fauquet C, Thouvenel JC (1977).** Isolation of the *Rice yellow mottle virus* in Ivory Coast. *Plant Disease Reporter* 61 : 443-446.

- Fauquet MC, Mayo MA (1999).** Abbreviations for plant virus names. *Archives of Virology* 144 : 1249-1273.
- Ferris DG, Jones RAC, Wroth JM (1996).** Determining the effectiveness of resistance to *Subterranean clover mottle sobemovirus* in different genotypes of subterranean clover in the field using the grazing animal as virus vector. *Annals of Applied Biology* 128 : 303-315.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998).** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391 : 806-811.
- Fischer R, Liao YC, Hoffmann K, Schillberg S, Emans N (1999).** Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Biological Chemistry* 380 : 825-839.
- Fomba SN (1988).** Screening for seedling resistance to *Rice yellow mottle* in some rice cultivars in Sierra Leone. *Plant Disease* 72 : 641-642.
- Forster RSL, Jones AT (1979).** Properties of *Lucerne transient streak virus*, and evidence of its affinity to *Southern bean mosaic virus*. *Annals of Applied Biology* 93 : 181-189.
- Francki RIB, Randles JW, Hatta T, Davies C, Chu PWG, McLean GD (1983).** *Subterranean clover mottle virus* : Another virus from Australia with encapsidated viroid-like RNA. *Plant Pathology* 32 : 47-59.
- Fraser AG, Kamath RS, Zipperlen P, Martinez-Campos M, Sohrmann M, Ahringer J (2000).** Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature* 408 : 325-330.
- Fuchs M, Gonsalves D (2007).** Safety of virus-resistant transgenic plants two decades after their introduction : Lessons from realistic field risk assessment studies. *Annual Review of Phytopathology* 45 : 173-202.
- Fusaro AF, Matthew L, Smith NA, Curtin SJ, Dedic-Hagan J, Ellacott GA, Watson JM, Wang MB, Brosnan C, Carroll BJ, Waterhouse PM (2006).** RNA interference-inducing hairpin RNAs in plants act through the viral defence pathway. *The EMBO journal* 7 : 1168-1175.
- Gascioli V, Mallory AC, Bartel DP, Vaucheret H (2005).** Partially redundant functions of Arabidopsis DICER-like enzymes and a role for DCL4 in producing trans-acting siRNAs. *Current Biology* 15 : 1494-1500.

- Ghildiyal M, Seitz H, Horwich MD, Li C, Du T, Lee S, Xu J, Kittler EL, Zapp ML, Weng Z, Zamore PD (2008).** Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science* 320 : 1077-1081.
- Giddings G (2001).** Transgenic plants as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology* 12 : 450-454.
- Gonsalves D (1998).** Control of *Papaya ringspot virus* in papaya : A case study. *Annual Review of Phytopathology* 36 : 415-437.
- Gonsalves D, Ferreira S, Manshardt R, Fitch M, Slightom J (1998).** Transgenic virus resistant papaya : New hope for control of *Papaya ringspot virus* in Hawaii. <http://www.apsnet.org/education/feature/papaya/Top.htm> visited 2009/01/13.
- Gonsalves D, Gonsalves C, Ferreira S, Pitz K, Fitch M, Manshardt R, Slightom J (2004).** Transgenic virus resistant papaya : From hope to reality for controlling of *Papaya ringspot virus* in Hawaii. *Plant Pathology Online* <http://www.apsnet.org/online/feature/ringspot/> visited 2009/01/13.
- Gonsalves D (2006).** Transgenic papaya : Development, release, impact, and challenges. *Advances in Virus Research* 67 : 317-354.
- Gonsalves D, Vegas A, Prasartsee V, Drew R, Suzuki J, Tripathi S (2006).** Developing papaya to control *Papaya ringspot virus* by transgenic resistance, intergeneric hybridization, and tolerance breeding. *Plant Breeding Reviews* 26 : 35-78.
- Gorbalenya AE, Koonin EV, Blinov VM, Donchenko AP (1988).** Sobemovirus genome appears to encode a serine protease related to cysteine proteases of picornaviruses. *FEBS Letter* 236 : 287-290.
- Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC (2001).** Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 106 : 23-34.
- Guindon S, Lethiec F, Duroux P, Gascuel O (2005).** PHYML online-a web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Research* 33(web server issue) : W557-W559.
- Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, Baulcombe D (2002).** Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *The EMBO Journal* 21 : 4671-4679.

- Hansen ER, Petracek ME, Dickey LF, Thompson WF (2001).** The 5' end of the pea ferredoxin-1 mRNA mediates rapid and reversible light-directed changes in translation in tobacco. *Plant Physiology* 125 : 770-778.
- Haseloff J, Siemering 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 Sciences* 94 : 2122-2127.
- Havelda Z, Szittyá G, Burgyan J (1998).** Characterization of the molecular mechanism of defective interfering RNA-mediated symptom attenuation in tombusvirus-infected plants. *Journal of Virology* 72 : 6251-6256.
- Hébrard E, Pinel-Galzi A, Catherinot V, Labesse G, Brugidou B, Fargette D (2005).** Internal point mutations of the capsid modify the serotype of *Rice Yellow Mottle Virus*. *Journal of Virology* 79 : 4407-4414.
- Hébrard E, Pinel-Galzi A, Bersoult A, Siré C, Fargette D (2006).** Emergence of a resistance-breaking isolate of *Rice yellow mottle virus* during serial inoculations is due to a single substitution in the genome-linked viral protein VPg. *Journal of General Virology* 87 : 1369-1373.
- Hébrard E, Bessin Y, Michon T, Longhi S, Uversky VN, Delalande F, Dorselaer AV, Romero P, Walter J, Declerk N, Fargette D (2009).** Intrinsic disorder in viral proteins genome-linked : Experimental and predictive analyses. *Virology Journal* 6 : 23.
- Hull R (1977).** The grouping of small spherical plant viruses with single RNA components. *Journal of General Virology* 36 : 289-295.
- Hull R, Fauquet CM, Gergerich RC, Lommel SA, Thottapilly G (2000).** Sobemovirus. In "Virus Taxonomy, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses" (van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL, Cartens E, Estes MK, Lemon S, Maniloff J, Mayo MA, McGeoch D, Pringle CR, Wickner RB, Eds.) Academic Press, London/San Diego, USA, 1014 p.
- Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Balint E, Tuschl T, Zamore PD (2001).** A cellular function for the RNA interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293 : 834-838.

- Hutvagner G, Simard MJ (2008).** Argonaute proteins : Key players in RNA silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9 : 22-32.
- ICTV (2005).** Virus taxonomy : Classification and nomenclature of viruses. Eight report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam : Elsevier/Academic Press. pp 885-890.
- Jackson AL, Bartz SR, Schelter J, Kobayashi SV, Burchard J, Mao M, Li B, Cavet G, Linsley PS (2003).** Expression profiling reveals off-target gene regulation by RNAi. *Nature Biotechnology* 21 : 635-637.
- Jacque JM, Triques K, Stevenson M (2002).** Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* 418 : 435-438.
- Jacquemond M, Tepfer M (1998).** Satellite-RNA-mediated resistance to plant viruses : are the ecological risks well assessed *In* : Khetarpal RK, Kohanezawa H, Hadidi A eds. *Control of plant virus diseases*. St Paul, MN USA : APS Press, 94-120.
- Johansen LK, Carrington JC (2001).** Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the Agrobacterium-mediated transient expression system. *Plant Physiology* 126 : 930-938.
- Jones JDG, Dangl JL (2006).** The Plant Immune System. *Nature* 444 : 323-329.
- Jones-Rhoades MW, Bartel DP (2004).** Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell* 14 : 787-799.
- Kaboré I (2002).** Etiologie de la panachure jaune du chiendent (*Imperata cylindrica*). Mémoire d'ingénieur agronome, Université Polytechnique Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, 49 p.
- Kamer G, Argos P (1984).** Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacteria viruses. *Nucleic Acids Research* 12 : 7269-7282.
- Katiyar-Agarwal S, Morgan R, Dahlbeck D, Borsani O, Villegas AJr, Zhu JK, Staskawicz BJ, Jin H (2006).** A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 : 18002-18007.
- Kawamura Y, Saito K, Kin T, Ono Y, Asai K, Sunohara T, Okada TN, Siomi MC, Siomi H (2008).** Drosophila endogenous small RNAs bind to Argonaute 2 in somatic cells. *Nature* 453 : 793-797.

- Ketting RF, Haverkamp THA, van Luenen HGA, Plasterk RH (1999).** *mut-7* of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNase D. *Cell* 99 : 133-141
- Ketting RF, Fischer SE, Bernstein E, Sijen T, Hannon GJ, Plasterk RH (2001).** Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes and Development* 15 : 2654-2659.
- Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD (2003).** Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115 : 209-216.
- Kiberstis PA, Zimmern D (1984).** Translational strategy of *Solanum nodiflorum mottle virus* RNA : Synthesis of a coat protein precursor *in vitro* and *in vivo*. *Nucleic Acids Research* 12 : 933-943.
- Kim VN (2005).** Small RNAs : Classification, biogenesis, and function. *Molecules and Cells* 19 : 1-15.
- Kim VN (2008).** Sorting out small RNAs. *Cell* 133 : 25-26.
- Klarzynski O, Fritig B (2001).** Stimulation des défenses naturelles des plantes. *Comptes Rendus de l'Académie des sciences Paris* 324 : 953-963.
- Konaté G, Traoré O, Coulibaly MM (1997).** Characterization of *Rice yellow mottle virus* isolates in Sudano-Sahelian areas. *Archives of Virology* 142 : 1117-1124.
- Koncz C, Schell J (1986).** The promoter of the T_L-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. *Molecular Genetics and Genomics* 204 : 383-396.
- Koonin EV (1991).** The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology* 72 : 2197-2206.
- Lacombe S, Bangratz M, Vignols F, Brugidou C (2009).** The *Rice yellow mottle virus* P1 exhibits dual functions to suppress and activate gene silencing. *The Plant Journal*, DOI : 10.1111/j.1365-3113X.2009.04062.x.
- Lam E, Kato N, Lawton M (2001).** Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* 411 : 848-853.
- Lee L, Anderson EJ (1998).** Nucleotide sequence of a resistance breaking mutant of *Southern bean mosaic virus*. *Archives of Virology* 143 : 2189-2201.

- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, Kim VN (2004).** MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal* 23 : 4051-4060.
- Léonard B (2005).** Etude de la P70S6 kinase chez *Arabidopsis thaliana*. Thèse Institut National Agronomique Paris-Grignon, France, 152 p.
- Lindbo JA, Dougherty WG (1992).** Untranslatable transcripts of the *Tobacco etch virus* coat protein gene sequence can interfere with *Tobacco etch virus* replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* 189 : 725-733.
- Liu HH, Tian X, Li YJ, Wu CA, Zheng CC (2008).** Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA* 14 : 836-843.
- Llave C, Kasschau KD, Rector MA, Carrington JC (2002).** Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* 14 : 1605-1619.
- Lo HL, Chang T, Yam P, Marcovecchio PM, Li S, Zaia JA, Yee JK (2007).** Inhibition of HIV-1 replication with designed miRNAs expressed from RNA polymerase II promoters. *Gene Therapy* 14 : 1503-1512.
- Lobbes D, Rallapalli G, Schmidt DD, Martin C, Clarke J (2006).** SERRATE : A new player on the plant microRNA scene. *EMBO Reports* 7 : 1052-1058.
- Lokesh GL, Gopinath K, Satheshkumar PS, Savithri HS (2001).** Complete nucleotide sequence of *Sesbania mosaic virus* : A new virus species of the genus *Sobemovirus*. *Archives of Virology* 146 : 209-223.
- Lu R, Folimonov A, Shintaku M, Li WX, Falk BW, Dawson WO, Ding SW (2004).** Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 : 15742-15747.
- MacRae IJ, Doudna JA (2007).** Ribonuclease revisited : Structural insights into ribonuclease III family enzymes. *Current Opinion in Structural Biology* 17 : 138-145.
- Maiti M, Lee HC, Liu Y (2007).** QIP, a putative exonuclease, interacts with the *Neurospora* Argonaute protein and facilitates conversion of duplex siRNA into single strands. *Genes Development* 21 : 590-600.
- Mäkinen K, Tamm T, Naess V, Truve E, Puurand U, Munthe T, Saarma M (1995).** Characterization of *Cocksfoot mottle sobemovirus* genomic RNA and sequence comparison with related viruses. *Journal of General Virology* 76 : 2817-2825.

- Mäkinen K, Makelainen K, Arshava N, Tamm T, Merits A, Truve E, Zavriev S, Saarma M (2000).** Characterisation of VPg and the polyprotein processing of *Cocksfoot mottle virus* (genus *Sobemovirus*). *Journal of General Virology* 81 : 2783-2788.
- Malhotra PP, Dasaradhi PVN, Kumar A, Mohammed A, Agrawal N, Bhatnagar RK, Chauhan VS (2002).** Double-stranded RNA-mediated gene silencing of cysteine proteases (falcipain-1 and -2) of *Plasmodium falciparum*. *Molecular Microbiology* 45 : 1245-1254.
- Mallory AC, Parks G, Endres MN, Baulcombe DC, Bowman LH, Pruss GJ, Vance VB (2002a).** The amplicon-plus system for high-level expression of transgenes. *Nature Biotechnology* 20 : 622-625.
- Mallory AC, Reinhart BJ, Bartel D, Vance VB, Bowman LH (2002b).** A viral suppressor of RNA silencing differentially regulates the accumulation of short interfering RNAs and micro-RNAs in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 : 15228-15233.
- Mang KQ, Ghosh A, Kaesberg P (1982).** A comparative study of the cowpea and bean strains of *Southern bean mosaic virus*. *Virology* 116 : 264-274.
- Martin DP, Williamson C, Posada D (2005).** RDP2 : Recombination detection and analysis from sequence alignments. *Bioinformatics* 21 : 260-262.
- Matranga C, Tomari Y, Shin C, Bartel DP, Zamore PD (2005).** Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123 : 607-620.
- McGavin WJ, MacFarlane SA (2009).** *Rubus chlorotic mottle virus*, a new sobemovirus infecting raspberry and bramble. *Virus Research* 139 : 10-13.
- McRobert L, McConkey GA (2002).** RNA interference (RNAi) inhibits growth of *Plasmodium falciparum*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 119 : 273-278.
- Meier M, Paves H, Olsper A, Tamm T, Truve E (2006).** P1 protein of *Cocksfoot mottle virus* is indispensable for the systemic spread of the virus. *Virus Genes* 32 : 321-326.
- Meins F Jr, Kunz C (1995).** Gene silencing in transgenic plants : A heuristic autoregulation model. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 197 : 105-120.

- Meins FJr (2000).** RNA degradation and models for post-transcriptional gene-silencing. *Plant Molecular Biology* 43 : 261-273.
- Meir M, Truve E (2006).** Sobemoviruses possess a common CfMV-like genomic organization. *Archives of Virology* 152 : 635-640.
- Merai Z, Kerenyi Z, Kertesz S, Magna M, Lakatos L, Silhavy D (2006).** Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *Journal of Virology* 80 : 5747-5756.
- Mette MF, Aufsatz W, van der Winden J, Matzke M A, Matzke AJ (2000).** Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *The EMBO Journal* 19 : 5194-5201.
- Mohamed NA, Mossop DW, Bath JE (1981).** Cynosurus and Cocksfoot mottle viruses : A comparison. *Journal of General Virology* 74 : 55-63
- Moissiard G, Parizotto EA, Himber C, Voinnet O (2007).** Transitivity in *Arabidopsis* can be primed, requires the redundant action of the antiviral Dicer-like 4 and Dicer-like 2, and is compromised by viral-encoded suppressor proteins. *RNA* 13 : 1268-1278.
- Molnar A, Csorba T, Lakatos L, Varallyay E, Lacomme C, Burgyan J (2005).** Plant virus derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *Journal of Virology* 79 : 7812-7818.
- Morris-Krsinich BAM, Forster RLS (1983).** *Lucerne transient streak virus* RNA and its translation in rabbit reticulocyte lysate and wheat germ extract. *Virology* 128 : 176-185.
- Morris-Krsinich BAM, Hull R (1981).** Translation of *Turnip rosette virus* RNA in rabbit reticulocyte lysates. *Virology* 114 : 98-112.
- Mourrain P, Beclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel J.B, Jouette D, Lacombe AM, Nikic S, Picault N, Remoue K, Sanial MVoTA, Vaucheret H (2000).** *Arabidopsis* SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101 : 533-542.
- Moury B, Morel C, Johansen E, Guilbaud L, Souche S, Ayme V, Caranta C, Palloix A, Jacquemond M (2004).** Mutations in *Potato virus Y* genome-linked protein determine virulence toward recessive resistances in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17 : 322-329.

- Murthy M. R, Bhuvanewari M, Subramanya H S, Gopinath K, Savithri H S (1997).** Structure of *Sesbania mosaic virus* at 3 Å resolution. *Biophysical Chemistry* 68 : 33-42.
- N'Guessan P, Pinel A, Caruana M, Frutos R, Sy A, Ghesquière A, Fargette D (2000).** Evidence of the presence of two serotypes of *Rice yellow mottle sobemovirus* in Côte d'Ivoire. *European Journal of Plant Pathology* 106 : 167-178.
- Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R (1990).** Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2 : 279-289.
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JD (2006).** A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* 312 : 436-439.
- Navarro L, Jay F, Nomura K, He SY, Voinnet O (2008).** Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins. *Science* 321 : 964-967.
- Ngô H, Tschudi C, Gull K, Ullu E (1998).** Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanozoma brucei*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 : 14687-14692.
- Ngon AYM, Ritzenthaler C, Brugidou C, Fauquet C, Beachy RN (1994).** Nucleotide sequence and genome characterization of *Rice yellow mottle virus* RNA. *Journal of General Virology* 75 : 249-257.
- Okamura K, Chung WJ, Ruby JG, Guo H, Bartel DP, Lai EC (2008).** The *Drosophila* hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs. *Nature* 453 : 803-806.
- Opalka N, Brugidou C, Bonneau CN, Beachy M, Yeager RNM, Fauquet C (1998).** Movement of *Rice yellow mottle virus* between xylem cells through pit membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 : 3323-3328.
- Opalka N, Tihova M, Brugidou C, Kumar A, Beachy RN, Fauquet CM, Yeager M (2000).** Structure of native and expanded sobemoviruses by electron cryo-microscopy and image reconstruction. *Journal of Molecular Biology* 303 : 197-211.
- Othman Y, Hull R (1995).** Nucleotide sequence of the bean strain of *Southern bean mosaic virus*. *Virology* 206 : 287-297.

- Pal-Bhadra M, Bhadra U, Birchler JA (1997).** Cosuppression in *Drosophila*: Gene silencing of alcohol dehydrogenase by white-Adh transgenes is Polycomb dependent. *Cell* 90 : 479-90.
- Parrella G, Ruffel S, Moretti A, Morel C, Palloix A, Caranta C (2002).** Recessive resistance genes against potyviruses are localized in colinear genomic regions of the tomato (*Lycopersicon spp.*) and pepper (*Capsicum spp.*) genomes. *Theoretical and Applied Genetics* 105 : 855-861.
- Pinel A, N'Guessan P, Bousalem M, Fargette D (2000).** Molecular variability of geographically distinct isolates of *Rice yellow mottle virus* in Africa. *Archives of Virology* 145 : 1621-1638.
- Pinel A, Abubakar Z, Traore O, Konaté G, Fargette D (2003).** Molecular epidemiology of the RNA satellite of *Rice yellow mottle virus* in Africa. *Archives of virology* 148 : 1721-1733.
- Pinel-Galzi A, Rakotomalala M, Sangu E, Sorho F, Kanyeka Z, Traoré O, Sérémé D, Poulicard N, Rabenantoandro Y, Séré Y, Konaté G, Ghesquière A, Hébrard E, Fargette D (2007).** Theme and variations in the evolutionary pathways to virulence of an RNA plant virus species. *PLoS Pathogens* 3 : e180.
- Pinel-Galzi A, Mpunami A, Sangu E, Rakotomalala M, Traoré O, Sérémé D, Sorho F, Séré Y, Kanyeka Z, Konaté G, Fargette D (2009).** Recombination, selection and clock-like evolution of *Rice yellow mottle virus*. *Virology* 394 : 164-172.
- Plasterk RH (2006).** Micro RNAs in animal development. *Cell* 124 : 877-881.
- Pond SL, Frost SD, Muse SV (2005).** HyPhy: Hypothesis testing using phylogenies. *Bioinformatics* 21 : 676-679.
- Qu CX, Liljas L, Opalka N, Brugidou C, Yeager M, Beachy RN, Fauquet CM, Johnson JE, Lin TW (2000).** 3D domain swapping modulates the stability of members of an icosahedral virus group. *Structure* 8 : 1095-1103.
- Rana TM (2007).** Illuminating the silence : Understanding the structure and function of small RNAs. *Nature reviews* 8 : 23-36.
- Rand TA, Petersen S, Du F, Wang X (2005).** Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* 123 : 621-629.

- Ren JL, Pan JS, Cheng T, Dong J, Lu YP, Huang SJ, Shi HX, Wang L, Lian YM (2006).** RNA interference inhibits *Hepatitis B virus* gene expression and replication in HepG2-N10 cells. *Journal of Digestive Diseases* 7 : 230-236.
- Robaglia C, Caranta C (2006).** Translation initiation factors : A weak link in plant RNA virus infection. *Trends in Plant Science* 11 : 40-45.
- Robinson KA, Beverley SM (2003).** Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology* 128 : 217-228.
- Rossmann MG, Abad-Zapatero C, Hermodson MA, Erickson JW (1983).** Subunit interaction in *Southern bean mosaic virus*. *Journal of Molecular Biology* 166 : 37-73.
- Roth BM, Pruss GJ, Vance VB (2004).** Plant viral suppressors of RNA silencing. *Virus Research* 102 : 97-108.
- Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas, R (2003).** DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19 : 2496-2497.
- Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC (1998).** Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* 10 : 937-946.
- Salerno-Rife T, Rutgers T, Kaesberg P (1980).** Translation of *Southern bean mosaic virus* RNA in wheat embryo and rabbit reticulocyte extracts. *Journal of Virology* 34 : 51-58.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989).** Molecular cloning : A laboratory manual, second edition. Cold Spring Harbor New-York, USA, ISBN 0-87969-309-6, 1659 p.
- Sanford JC, Johnston SA (1985).** The concept of parasite-derived resistance deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology* 113 : 395-405.
- Sarmiento C, Gomez E, Meier M, Kavanagh TA, Truve E (2007).** *Cocksfoot mottle virus* P1 suppresses RNA silencing in *Nicotiana benthamiana* and *Nicotiana tabacum*. *Virus Research* 123 : 95-99.
- Sarra S, Peters D (2003).** *Rice yellow mottle virus* is transmitted by cows, donkeys, and grass rats in irrigated rice crops. *Plant Disease* 87 : 804-808.

- Sarra S, Oevering P, Guindo S, Peters D (2004).** Wind-mediated spread of *Rice yellow mottle virus* (RYMV) in irrigated rice crops. *Plant Pathology* 53 : 148-153.
- Scandalios J G (1990).** Response of plant antioxidant defense genes to environmental stress. *Advances in Genetics* 28 : 1-41.
- Schauer SE, Jacobsen SE, Meinke DW, Ray A (2002).** DICER-LIKE1 : Blind men and elephants in Arabidopsis development. *Trends in Plant Science* 7 : 487-491.
- Schwach F, Vaistij FE, Jones L, Baulcombe DC (2005).** An RNA-dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by *Potato virus X* and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiology* 138 : 1842-1852.
- Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD (2003).** Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115 : 199-208.
- Semizarov D, Frost L, Sarthy A, Kroeger P, Halbert DN, Fesik SW (2003).** Specificity of short interfering RNA determined through gene expression signatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 : 6347-6352.
- Séréme D (2005).** Caractérisation du virus de la panachure jaune du chiendent (*Imperata cylindrica*). DEA de biotechnologie végétale, Université Ouagadougou, Burkina Faso, 68 p.
- Séréme D, Lacombe S, Konaté M, Pinel-Galzi A, Traoré V, Hébrard E, Traoré O, Brugidou, C, Fargette D, Konaté G (2008a).** Biological and molecular characterization of a new putative sobemovirus infecting *Imperata cylindrica* and maize in Africa. *Archives of Virology* 153 : 1813-1820.
- Séréme D, Bangratz M, Lemesre JL, Fargette D, Brugidou C, Konaté G (2008b).** Le virus de la panachure jaune du riz, un outil prometteur pour la production de protéines recombinantes d'intérêt. *Applied Biology and Biotechnology* 1, 17-20.
- Séréme D, Lacombe S, Vignols F, Konaté G, Traoré AS, Brugidou C (2009).** Les supresseurs du RNA silencing des phytovirus. *Virologie*, DOI : 10.1684/vir.2009.0278.
- Shepherd DN, Martin DP, Thomson JA (2009).** Transgenic strategies for developing crops resistant to geminiviruses. *Plant Science* 176 : 1-11.

- Sijen T, Fleenor J, Simmer F, Thijssen KL, Parrish S, Timmons L, Plasterk RH, Fire A (2001).** On the role of RNA amplification in dsRNA-triggered gene silencing. *Cell* 107 : 465-476.
- Sijen T, Plasterk RHA (2003).** Transposon silencing in the *Caenorhabditis elegans* germ line by natural RNAi. *Nature* 426 : 310-314.
- Sijen T, Steiner FA, Thijssen KL, Plasterk RH (2007).** Secondary siRNAs result from unprimed RNA synthesis and form a distinct class. *Science* 315 : 244-247.
- Siomi CM (2009).** Short interfering RNA-mediated gene silencing ; towards successful application in human patients. *Advanced Drug Delivery Reviews* 61 : 668-671.
- Siré C, Piron F, Bangratz-Reyser M, Lemesre JL, Brugidou C (2006).** Rice and virus biotechnology : Applications for the expression of an anti-leishmania vaccine. *Molecular Biology for Tropical Plants*. ISBN 81-308-0138-8, 1-23.
- Siré C, Bangratz-Reyser M, Fargette D, Brugidou C (2008).** Genetic diversity and silencing suppression effects of *Rice yellow mottle virus* and the P1 protein. *Virology journal* 5 : 55.
- Sivakumaran K, Fowler BC, Hacker DL (1998).** Identification of viral genes required for cell-to-cell movement of *Southern bean mosaic virus*. *Virology* 252 : 376-386.
- Smardon A, Spoerke JM, Stacey SC, Klein ME, Mackin N, Maine EM (2000).** EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Current Biology* 10 : 169-178.
- Stern-Ginossar N, Elefant N, Zimmerman A, Wolf DG, Salen N, Biton M, Horwitz E, Prokocimer Z, Prichard M, Hahn G, Goldman-Wool D, Greenfield C, Yagel S, Hengel H, Altuvia Y, Margalit H, Mandelboim O (2007).** Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science* 317 : 376-381.
- Subramanya H, Gopinath K, Nayudu M, Savithri H, Murthy M (1993).** Structure of *Sesbania mosaic virus* at 4.7 Å resolution and partial sequence of the coat protein. *Journal of Molecular Biology* 229 : 20-25.
- Sunkar R, Kapoor A, Zhu JK (2006).** Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by down regulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell* 18 : 2051-2065.

- Swofford DL (2000).** PAUP* : Phylogenetic analysis using parsimony (*and Other Methods) (Sinauer, Sunderland, MA) Version 4.0, 179 p.
- Tam OH, Aravin AA, Stein P, Girard A, Murchison EP, Cheloufi S, Hodges E, Anger M, Sachidanandam R, Schultz RM, Hannon GJ (2008).** Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature* 453 : 534-538.
- Tamm T, Truve E (2000).** RNA-binding activities of *Cocksfoot mottle sobemovirus* proteins. *Virus Research* 66 : 197-207.
- Tang G, Reinhart BJ, Bartel DP, Zamore PD (2003).** A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes and Development* 17 : 49-63.
- Taylor DR (1989).** Resistance of upland rice varieties to *Pale yellow mottle virus* disease in Sierra Leone. *International Rice Research Newsletter* 14 : 11.
- Theisen M (1997).** Les plantes comme bioréacteurs. *Biofutur* 168 : 47-51.
- Traoré M, Traoré V, Pinel-Galzi A, Fargette D, Konaté G, Traoré A, Traoré O (2008).** Abiotic transmission of *Rice yellow mottle virus* through soil and contact between plants. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11 : 900-904.
- Traoré O, Pinel A, Fargette D, Konaté G (2001).** First report and characterization of *Rice yellow mottle virus* in Central Africa. *Plant Disease* 85 : 920.
- Traoré O, Sorho F, Pinel A, Abubakar Z, Banwo O, Maley J, Hébrard E, Winter S, Séré Y, Konaté G, Fargette D (2005).** Processes of diversification and dispersion of *Rice yellow mottle virus* inferred from large-scale and high-resolution phylogeographic studies. *Molecular Ecology* 14 : 2097-2110.
- Traoré O (2006).** Ecologie, pathogénie et évolution du virus de la panachure jaune du riz en zone soudanosahélienne. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Ouagadougou, Burkina Faso, 310 p.
- Traoré O, Pinel A, Hébrard E, Gumedzoé Y, Fargette D, Traoré A, Konaté G (2006).** Occurrence of resistance-breaking isolates of *Rice yellow mottle virus* in West and Central Africa. *Plant Disease* 90 : 256-263.
- Traoré O, Pinel-Galzi A, Sorho F, Sarra S, Rakotomalala M, Sangu E, Kanyeka Z, Séré Y, Konaté G, Fargette D (2009).** A reassessment of the epidemiology of *Rice yellow*

mottle virus following recent advances in field and molecular studies. *Virus Research* 141 : 258-267.

Tremaine JG, Hamilton RI (1983). *Southern bean mosaic virus*. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses No. 274, <http://www.dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=274>, visited 2008/07/14.

Van Blokland R, Van der Geest N, Mol JNM, Kooter JM (1994). Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia Hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant Journal* 6 : 861-877.

van der Biezen EA, Jones JDG (1998). Plant disease resistance proteins and the "gene-for-gene" concept. *Trends in Biochemical Sciences* 23 : 454-456.

van der Krol AR, Mur LA, Beld M, Mol JN, Stuitje AR (1990). Flavonoid genes in *Petunia* : Addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* 2 : 291-299.

van Regenmortel MHV (1986). The potential for using monoclonal antibodies in the detection of plant viruses. *In*: Jones RAC, Torrance L (eds). Developments and applications in virus testing. *Association of applied biology* 89-101.

Vaucheret H, Beclin C, Fagard M (2001). Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of Cell Science* 114 : 3083-3091.

Vaucheret H (2008). Plant ARGONAUTES. *Trends in Biochemical Sciences* 13 : 350-358.

Voinnet O, Vain P, Angell S, Baulcombe DC (1998). Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* 95 : 177-187.

Voinnet O, Pinto YM, Baulcombe DC (1999). Suppression of gene silencing : A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 : 14147-14152.

Voinnet O (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends in Genetics* 17 : 449-459.

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.

- Voinnet O (2008).** Use, tolerance and avoidance of amplified RNA silencing by plants. *Trends in Biochemical Sciences* 13 : 317-328.
- Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A, Kaned, M, Kuramochi-Miyagawa S, Obata Y, Chiba H, Kohara Y, Kono T, Nakano T, Surani MA, Sakaki Y, Sasaki H (2008).** Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature* 453 : 539-543.
- Weiner M, Costa G, Schoettlin W, Cline J, Mathur E, Bauer J (1994).** Site directed mutagenesis of double-stranded DNA by the polymerase chain reaction. *Gene* 151 : 119-123.
- Wesley SV, Helliwell CA, Smith NA, Wang M, Rouse DT, Liu Q, Gooding PS, Singh SP, Abbot D, Stoutjesdijk PA, Robinson SP, Gleave AP, Green AG, Waterhouse PM (2001).** Constrcut design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal* 27 : 581-590.
- Whitelam GC, Cockburn B, Gandecha AR, Owen MR (1993).** Heterologous protein production in transgenic plants. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews* 11 : 1-29.
- Wianny F, Zernicka-Goetz M (2000).** Specific interference with gene function by double stranded RNA in early mouse development. *Nature Cell Biology* 2 : 70-75.
- Wilda M, Fuchs U, Wossmann W, Borkhardt A (2002).** Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi). *Oncogene* 37 : 5716-5724.
- Wingard SA (1928).** Hosts and symptoms of ring spot, a virus disease of plants. *Journal of Agricultural Research* 37 : 127-153.
- Wu-Scharf D, Jeong Br, Zhang C, Cerutti H (2000).** Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-box RNA helicase. *Science* 290 : 1159-1162.
- Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, Zilberman D, Jacobsen SE, Carrington JC (2004).** Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biology* e104 : 642-652.
- Xie Z, Allen E, Wilken A, Carrington JC (2005).** DICER-LIKE 4 functions in trans-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 : 12984-12989.

- Yang L, Liu Z, Lu F, Dong A, Huang H (2006).** SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 47 : 841-850.
- Yigit E, Batista PJ, Bei Y, Pang KM, Chen CC, Tolia NH, Joshua-Tor L, Mitani S, Simard MJ, Mello CC (2006).** Analysis of the *C. elegans* Argonaute family reveals that distinct Argonautes act sequentially during RNAi. *Cell* 127 : 747-757.
- Yokota T, Sakamoto N, Enomoto N, Tanabe Y, Miyagishi M, Maekawa S, Yi L, Kurosaki M, Taira K, Watanabe M, Mizusawa H (2003).** Inhibition of intracellular *Hepatitis C virus* replication by synthetic and vector-derived small interfering RNAs. *EMBO Reports* 6 : 602-608.

ANNEXES

Annexe 1 : Milieux de culture bactérienne

Milieu LB (Luria Bertani) liquide (pH 7) (Sambrook *et al.*, 1989) :

10 g/l NaCl

10 g/l tryptone

5 g/l extrait de levure

Le milieu est stérilisé par autoclavage

Milieu LB/agar/IPTG/X-Gal (pH 7) (Sambrook *et al.*, 1989) :

10 g/l NaCl

10 g/l Bacto-tryptone

5 g/l extrait de levure

15 g/l agar

Après stérilisation par autoclavage, sont ajoutés :

0,5 mM IPTG (solution-stock à 0,1 mM)

80 µg/ml X-Gal (solution-stock à 50 mg/ml dans du DMF)

100 µg/ml Ampicilline (solution-stock à 100 mg/ml)

Annexe 2 : Tampons utilisés (quantités pour un litre de tampon)

- **Tampon d'inoculation du RYMV et du IYMV** (Tampon phosphate 100 mM pH 7,0) : 4,8 g de KH_2PO_4 ; 10,8 g de K_2HPO_4 .

-Tampons utilisés pour les tests ELISA (Clark et Adams, 1977)

- **Tampon de "coating"** pour la fixation des anticorps sur les plaques de microtitration (Tampon carbonate 0,05 M pH 9,6) : 1,59 g de Na_2CO_3 ; 2,93 g de NaCO_3 .
- **Tampon PBST** (pH 7,4) : 8 g de NaCl , 0,2 g de KH_2PO_4 ; 1,44 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$; 0,2 g de KCl ; 0,5 ml de Tween 20.
- **Tampon "Antigène"** : PBST contenant 2 % de Polyvinylpyrrolidone (PVP40).
- **Tampon "Anticorps"** : Tampon antigène contenant 1 % de lait écrémé.
- **Tampon substrat** (pH 9,8) : 97 ml de diéthanolamine; 800 ml de H_2O ; ajuster le pH avec HCl .

- **TAE 50X** : 242 g de Tris base, 57,1 ml d'acide acétique glacial, 100 ml de EDTA 0,5 M pH 8.

- **EDTA 0,5 M (pH 8)** : 186,1 g de EDTA, $2\text{H}_2\text{O}$.

- **Tampon d'extraction de protéines** : 20 ml de Na_2EDTA 0,5 M pH 8 ; 1 g de N-Laurylsarcosine ; 1 ml de Triton pur ; qsp 1000 ml de NaHPO_4 , 50 mM, pH 7.

- **NaHPO_4 , 50 mM (pH 7)** : 97,5ml de $\text{NaH}_2\text{PO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ à 0,2 M ; 152,5 ml de $\text{Na}_2\text{HPO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ à 0,2 M.

Annexe 3 : Préparation d'agrobactéries électrocompétentes

(Protocole adapté de Sambrook *et al.*, 1989)

Matériel nécessaire :

- ✓ *Cure dent autoclavée*
- ✓ *Milieu LB solide et liquide + antibiotiques (rifampicine pour sélectionner les souches)*
- ✓ *Agrobactéries à rendre compétentes*
- ✓ *Glycérol 10 % stérile et froid*

1. Prélever en grattant, à l'aide d'une pipette Pasteur boutonnée, un peu de bactéries (dans du glycérol 50 % ou 15 % à -80°C)
2. Etaler sur une boîte LB + Rifampicine qui permet de sélectionner les souches agrobactéries
3. Incuber à 28°C pendant 2 à 3 jours jusqu'à l'obtention de colonies isolées
4. Inoculer à l'aide d'une cure dent une colonie dans 3 ml de LB + Rifampicine
5. Laisser pousser 2 jours à 28°C sous agitation (240 rpm)
6. Préparer un erlen de 2l contenant 250 ml de LB + antibiotiques puis autoclaver
7. Inoculer 100 μl de la culture dans ces 250 ml de milieu LB
8. Incuber sous agitation pendant 1 nuit et demie à 28°C
9. Prendre la DO à 600 nm, qui doit être situé entre 0,5 et 0,7
10. Transvaser la culture dans des tubes stériles de 50 ml et les mettre dans la glace 15 min
11. Centrifuger à 2°C pendant 10 min à Vmax (4000 rpm) puis jeter le surnageant
12. Resuspendre le culot dans 6 ml d' H_2O froide puis remplir le tube d' H_2O froide
13. Mélanger par inversion
14. Répéter 2 fois les étapes 11 à 13
15. Centrifuger à 2°C pendant 10 min à Vmax (4000 rpm) puis jeter le surnageant
16. Ajouter 2 ml de glycérol 10 % stérile et froid
17. Agiter pour resuspendre et réunir les tubes en un seul
18. Compléter le tube avec du glycérol 10 % froid et stérile et mélanger
19. Centrifuger à 2°C pendant 15 min à 4500 rpm
20. Jeter le surnageant en faisant attention au culot
21. Ajouter 2 ml de glycérol 10 % froid et stérile et mélanger en tourbillonnant
22. Faire des aliquotes de 40 μl et les mettre immédiatement dans l'azote liquide

Annexe 4 : Test ELISA sandwich direct (Pinel *et al.*, 2000)

1. Coating des plaques

- Diluer l'anticorps (Ac) dans le tampon coating (carbonate) pH 9,6, déposer 100 µl par puits (dans les 60 puits du milieu) ; dans notre cas l'Ac = IgGs anti RYMV Mg purifiées au 1/1000
- Incuber 2 heures à 37 °C dans un environnement humide.

2. Lavages

- Ne laver que les puits du milieu de la plaque.
- Faire un lavage de 3 min avec du PBST X 1 puis sécher les plaques

3. Blocage des sites non occupés

- Déposer 200 µl par puits de lait écrémé à 3 % dans du PBST x1 dans toute la plaque
- Incuber 1 h à 37 °C

4. Lavages

- Laver toute la plaque
- Faire un lavage de 3 min avec du PBST X 1 puis sécher les plaques

5. Dépôt des antigènes

- Déposer 100 µl par puits (dans les 60 puits du milieu). Dans notre cas les antigènes sont les broyats de plantes dans du PBST x1 au 1/10
- Incuber 2 h à 37 °C ou 1 nuit à 4 °C

6. Lavages

- Ne laver que les puits du milieu
- Faire un lavage de 3 min avec du PBST X 1 puis sécher les plaques

7. Dépôt de l'anticorps conjugué

- Déposer 100 µl d'Ac conjugué dilué dans du PBST x1 par puits (dans les 60 puits du milieu)
- (Dans notre cas, l'Ac conjugué est l'Ac RYMV (isolat Mg) conjugué à la phosphatase alcaline dilué au 1/500)
- Incuber 2 h à 37 °C ou 1 nuit à 4 °C

8. Lavages

- Laver les puits du milieu plus la ligne du haut
- Faire un lavage de 3 min avec du PBST X 1 puis sécher les plaques

9. Dépôt du substrat

- Dissoudre les tablettes de pNPP dans du tampon diéthanolamine pH 9,8 (1 tablette de 5 mg pour 5 ml de tampon).
- Déposer 100 μ l par puits dans les 60 puits du milieu et la ligne entière du haut
- Incuber à l'obscurité et à température ambiante pendant 1 h voire plus
- Lire la DO à 405 nm.

Annexe 5 : Test ELISA Sandwich Indirect (Pinel *et al.*, 2000)

1. Coating des plaques

- Diluer l'anticorps (Ac) dans le tampon coating (carbonate) pH 9,6 ; déposer 100 µl par puits (dans les 60 puits du milieu) ; dans notre cas l'Ac = IgGs anti RYMV Mg purifiées au 1/1000
- Incuber 2 h à 37 °C dans un environnement humide.

2. Lavages

- Ne laver que les puits du milieu de la plaque.
- Faire un lavage rapide puis 3 lavages de 3 mn avec du PBST x1 puis sécher les plaques

3. Blocage des sites non occupés

- Déposer 200 µl par puits de lait écrémé à 3 % dans du PBST x1 dans toute la plaque
- Incuber 1heure à 37°C

4. Lavages

- Laver toute la plaque
- Faire un lavage de 3 min avec du PBST X 1 puis sécher les plaques

5. Dépôt des antigènes

- Déposer 100 µl par puits (dans les 60 puits du milieu). Dans notre cas les antigènes sont les broyats de plantes dans du PBST x1 au 1/10
- Incuber 2 h à 37 °C ou 1 nuit à 4 °C

6. Lavages

- Ne laver que les puits du milieu
- Faire un lavage de 3 min avec du PBST X 1 puis sécher les plaques

7- Dépôt de l'anticorps

- Déposer 100 µl d'anticorps (surnageant) dilué dans du PBST par puits (Dans notre cas, les anticorps = ac monoclonal anti RYMV (isolat Mg) à différentes dilutions)
- Incuber 2 h à 37 °C ou 1 nuit à 4 °C.

8. Lavages

- Laver les puits du milieu
- Faire un lavage de 3 min avec du PBST X 1 puis sécher les plaques

9. Dépôt du conjugué

- Déposer 100 µl d'anticorps conjugué dilué dans du PBST par puits
(Dans notre cas l'ac conjugué = IgGs anti souris diluées au 1/8000)
- Incuber 2 h à 37 °C ou 1 nuit à 4 °C

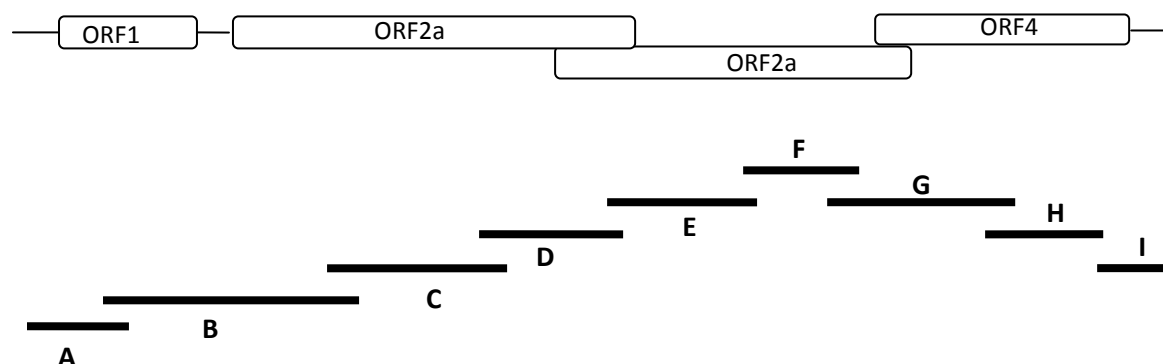
10. Lavages

- Laver les puits du milieu
- Faire un lavage de 3 min avec du PBST X 1 puis sécher les plaques

11. Dépôt du substrat

- Dissoudre les tablettes de pNPP dans du tampon diéthanolamine pH 9,8 (1 tablette de 5 mg pour 5 ml de tampon).
- Déposer 100 µl par puits dans les 60 puits du milieu et la ligne entière du haut
- Incuber à l'obscurité et à température ambiante pendant 1 h voire plus
- Lire la DO à 405 nm.

Annexe 6 : Amorces et adaptateurs utilisés pour le séquençage du génome du IYMV. L'organisation génomique du IYMV ainsi que les produits RT-PCR générés par les différentes combinaisons d'amorces et d'adaptateurs sont indiqués.



Produits/Amorces	Séquence nucléotidique 5'-3'	Observations	
A	AdapF	CATGGGAATTCCTCACTAAA	Adaptateur 5'
	SDR5iymv	GAGGAATAGGGAGCACGGG	Amorce spécifique IYMV
B	AdapF	CATGGGAATTCCTCACTAAA	Adaptateur 5'
	SDR4iymv	CAACAGTCCATCCTTTGATC	Amorce spécifique IYMV
C	AdapF	CATGGGAATTCCTCACTAAA	Adaptateur 5'
	SDR3iymv	GAGATGACGCTGATTGTAGG	Amorce spécifique IYMV
D	AdapF	CATGGGAATTCCTCACTAAA	Adaptateur 5'
	SDR2iymv	GGCGTTGACTGCTTCCTGGAG	Amorce spécifique IYMV
E	AdapF	CATGGGAATTCCTCACTAAA	Adaptateur 5'
	SDRiymv	CGATAAGCTCAGCCATAATGG	Amorce spécifique IYMV
F	SobA	CCNTCNAARCCNGGNATGGG	Amorce dégénérée sens
	SobAS	RTCNCCCATNGCDATRCACCA	Amorce dégénérée anti sens
G	AdapR	TACAGTGAATTCATAGAAA	Adapter complémentaire 3'
	SDFiymv	TGCACTCCAAGTCAAGTAG	Amorce spécifique IYMV
H	AdapR	TACAGTGAATTCATAGAAA	Adaptateur complémentaire 3'
	SDF2iymv	GGCCCTTCTCGGAGTCTTGG	Amorce spécifique IYMV
I	AdapR	TACAGTGAATTCATAGAAA	Adaptateur complémentaire 3'
	SDF3iymv	CTCCCATCTACGGAAGACAC	Amorce spécifique IYMV

Annexe 7 : Theme and variations in the evolutionary pathways to virulence of an RNA plant virus species (*Pinel et al., 2007*)

Theme and Variations in the Evolutionary Pathways to Virulence of an RNA Plant Virus Species

Agnès Pinel-Galzi¹, Mbolarinosy Rakotomalala², Emmanuel Sangu³, Fatogoma Sorho⁴, Zakaria Kanyeka³, Oumar Traoré⁵, Drissa Sérémé⁵, Nils Poulicard¹, Yvonne Rabenantoandro⁶, Yacouba Séré⁴, Gnissa Konaté⁵, Alain Ghesquière⁷, Eugénie Hébrard¹, Denis Fargette^{1*}

1 Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMR RPB, Montpellier, France, **2** Centre National de la Recherche Appliquée au Développement Rural (FOFIFA), Mahajanga, Madagascar, **3** Botany Department, Dar es Salaam University, Dar es Salaam, Tanzania, **4** Africa Rice Center (WARDA), Cotonou, Bénin, **5** Institut de l'Environnement et de Recherches Agricoles (INERA), Laboratoire de Biotechnologie et de Virologie Végétale, Kamboinsé, Ouagadougou, Burkina Faso, **6** Centre National de la Recherche Appliquée au Développement Rural (FOFIFA), Antananarivo, Madagascar, **7** Institut de Recherche pour le Développement (IRD), UMR GDP, Montpellier, France

The diversity of a highly variable RNA plant virus was considered to determine the range of virulence substitutions, the evolutionary pathways to virulence, and whether intraspecific diversity modulates virulence pathways and propensity. In all, 114 isolates representative of the genetic and geographic diversity of *Rice yellow mottle virus* (RYMV) in Africa were inoculated to several cultivars with eIF(iso)4G-mediated *Rymv1–2* resistance. Altogether, 41 virulent variants generated from ten wild isolates were analyzed. Nonconservative amino acid replacements at five positions located within a stretch of 15 codons in the central region of the 79-aa-long protein VPg were associated with virulence. Virulence substitutions were fixed predominantly at codon 48 in most strains, whatever the host genetic background or the experimental conditions. There were one major and two isolate-specific mutational pathways conferring virulence at codon 48. In the prevalent mutational pathway I, arginine (AGA) was successively displaced by glycine (GGA) and glutamic acid (GAA). Substitutions in the other virulence codons were displaced when E48 was fixed. In the isolate-specific mutational pathway II, isoleucine (ATA) emerged and often later coexisted with valine (GTA). In mutational pathway III, arginine, with the specific S2/S3 strain codon usage AGG, was displaced by tryptophane (TGG). Mutational pathway I never arose in the widely spread West African S2/S3 strain because G48 was not infectious in the S2/S3 genetic context. Strain S2/S3 least frequently overcame resistance, whereas two geographically localized variants of the strain S4 had a high propensity to virulence. Codons 49 and 26 of the VPg, under diversifying selection, are candidate positions in modulating the genetic barriers to virulence. The theme and variations in the evolutionary pathways to virulence of RYMV illustrates the extent of parallel evolution within a highly variable RNA plant virus species.

Citation: Pinel-Galzi A, Rakotomalala M, Sangu E, Sorho F, Kanyeka Z, et al. (2007) Theme and variations in the evolutionary pathways to virulence of an RNA plant virus species. *PLoS Pathog* 3(11): e180. doi:10.1371/journal.ppat.0030180

Introduction

Parallel evolution is the evolution of similar or identical features independently in related lineages when subjected to similar selection pressures [1,2]. Parallel evolution has been reported extensively both in natural isolates and in experimental populations of many microbes, most often viruses [2–4], but also bacteria [5], yeast [6], and protozoa [7]. With viruses, similar amino acid replacements often occurred in immune or antiviral escape variants. This is usually interpreted as the fixation of a mutation with a beneficial effect. However, differences in founding genotypes may result in divergent evolutionary trajectories [5]. So, patterns of adaptation to selective constraints may also be dependent on intraspecific polymorphisms. This is well documented for HIV resistance to antiretroviral agents, where pathways of viral evolution towards drug resistance may proceed through distinct steps and at different rates among different HIV subtypes [8,9]. The objective of this article is to assess the extent of parallel evolution in a highly variable RNA plant virus species. Then, the diversity of *Rice yellow mottle virus* (RYMV) was considered to determine the range of virulence

substitutions, to reconstruct the evolutionary pathways to virulence, and to test whether intraspecific diversity modulates virulence pathways and propensity.

The breakdown of host plant resistance is a well-documented case of virus adaptation [10]. Translation initiation factors of the eIF4E and eIF4G families are major determinants of recessive resistance to plant viruses [11,12]. Several studies showed that one or a few amino acid substitutions in the genome-linked viral protein VPg are independently responsible for virulence (see [12] for a recent review). In

Editor: Edward C. Holmes, The Pennsylvania State University, United States of America

Received: June 11, 2007; **Accepted:** October 12, 2007; **Published:** November 23, 2007

Copyright: © 2007 Pinel-Galzi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abbreviations: NIL, nearly isogenic line; ORF, open reading frame; PI, protease inhibitor; RYMV, Rice yellow mottle virus

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: Denis.Fargette@mpl.ird.fr

Author Summary

Parallel changes in independently evolving lineages are important, but their contribution to pathogen evolution has not been assessed at the species level. We investigated the extent of phenotypic and genotypic parallel evolution in a highly variable RNA plant virus species, *Rice yellow mottle virus* (RYMV). Isolates representative of the genetic and geographic diversity of RYMV in Africa were inoculated to several rice cultivars with eIF(iso)4G-mediated *Rymv1–2* resistance. The theme and variations in the evolutionary pathways to gain virulence found in the VPg of RYMV illustrate the frequency of parallel evolution. The repeated occurrence of the R48E substitution in the VPg of most strains, whatever the *Rymv1–2* background and plant growth conditions, showed the specificity of parallel evolution that operated through the same pathway, locus, and mutation. The frequency and specificity of parallel mutations indicate, respectively, that RYMV is able to rapidly explore the adaptive landscape, fixing favorable mutations to virulence, and that there are a limited number of pathways across the adaptive landscape. Our results provide insights into the ways an RNA virus species explores the adaptive landscape and into the constraints restricting the number of mutational pathways.

none of these studies however, was the diversity of the virus species considered. Furthermore, no longitudinal studies (samples collected from the same host plant at sequential times) have been conducted to unravel the accumulation and interplay of mutations associated with virulence over time. RYMV is an appropriate model to address these issues: RYMV is a highly variable virus species (up to 11% in nucleotide [nt] difference in the full genome) [13], an eIF(iso)4G-mediated resistance was identified in rice [14], and the viral genome-linked protein (VPg) of RYMV was determined as the virulence factor [15].

RYMV of the genus *Sobemovirus* [16] occurs in all rice-growing African countries, where it causes heavy yield losses [17]. Its genome harbors four open reading frames (ORFs) [18]. ORF1, which is located at the 5' end of the genome, encodes the protein P1 involved in virus movement and gene silencing. ORF2, which encodes the central polyprotein, has two overlapping ORFs. ORF2a encodes a serine protease and the VPg. ORF2b, which is translated through a –1 ribosomal frameshift mechanism as a fusion protein, encodes the RNA-dependent RNA polymerase. The coat protein is expressed by a subgenomic RNA at the 3' end of the genome. RYMV is transmitted by contact during cultural practices and by animal vectors, mainly beetle species (Coleoptera) of the Chrysomelidae family.

Very few rice varieties are resistant to RYMV. The highest level of resistance, characterized by an undetectable virus titer in ELISA tests and the absence of symptoms, is provided by *Oryza sativa indica* cv Gigante and a few *Oryza glaberrima* cultivars of the Tog series [19,20]. Recently, another highly resistant *indica* cultivar, named Bekarosaka, was found in Madagascar [21]. Resistance is controlled by the recessive gene *Rymv1* [19], which maps on chromosome 4 [22] and encodes the translation initiation factor eIF(iso)4G [14]. Three alleles of *Rymv1* were identified, one in the *O. sativa* cvs Gigante and Bekarosaka (allele *Rymv1–2*), and two in the *O. glaberrima* accessions Tog5681 (*Rymv1–3*) and Tog5672 (*Rymv1–4*). Compared to susceptible varieties (allele *Rymv1–1*), the *Rymv1–2* resistance allele is characterized by one

amino acid substitution in the central domain of the eIF(iso)4G gene [14]. *Rymv1–2* was introgressed into widely grown *indica* cultivars that are now propagated in the fields.

In this paper, we defined virulence as the genetic ability of a pathogen to overcome genetically determined resistance and to cause a compatible interaction leading to disease [23,24]. Avirulence is the antonym of virulence. With RYMV, virulence is characterized by pronounced and generalized symptoms, full systemicity, high virus titer, and high mechanical transmissibility to resistant plants. The high resistance of cv Gigante was effective against a range of isolates of different RYMV strains [19]. Recently, however, the resistance of Gigante was overcome by isolates of several geographic origins [25–27]. Sequencing one such isolate revealed that a single substitution in the VPg specifically differentiated the wild avirulent type from the evolved virulent variant. Directed mutagenesis indicated that this substitution conferred the virulence [15]. This work, carried out with a single isolate, is extended here to a range of isolates of the main strains. Isolates representative of the genetic and geographic diversity of RYMV in Africa were inoculated to *Rymv1–2*-resistant accessions made of cultivars Gigante and Bekarosaka and of four nearly isogenic lines (NILs). The accumulation and the interplay over time of mutations associated with virulence were followed. Altogether, we found one theme, yet several isolate- or strain-specific variations, in the evolutionary pathways to virulence of RYMV.

Results

A Narrow Spectrum of Substitutions Associated with Virulence

A total of 22 isolates representative of the geographic and genetic diversity of RYMV was fully sequenced. The dN/dS value of the VPg was lower than that of the P1 and of the coat protein (0.05 versus 0.15 and 0.14, respectively) and similar to that of ORF2b coding the polymerase (0.04). We sequenced the VPg of an additional set of 37 wild avirulent isolates collected in the fields. Analysis of the 59 wild isolates revealed that 17 of the 79 amino acids of the VPg (22%) varied naturally in wild-type isolates (both within and between strains). A total of 29 codons was under conservative selection pressure, most of them in the N-terminal half of the VPg (Figure 1). Only three codons were under positive selection with a Bayes factor for positive selection higher than 100. Codon 49 was under high diversifying selection as apparent from both the REL and IFEL methods, with dN/dS = 20. Codon 26, and codon 62 adjacent to the sobemovirus WAD conserved motif at positions 64–68, were under moderate diversifying selection with dN/dS = 2.8 and 1.8, respectively, and only significant with the less conservative method REL.

In all, 114 isolates representative of the main strains of RYMV were inoculated to *Rymv1–2*-resistant accessions. Ten of them (c. 9%) became virulent (Table 1). By large-scale inoculation, we generated several virulent variants from isolates C14, Mg16, and Tz209, and we analyzed, respectively, 12, 19, and three of them. From each of the seven other isolates, only one virulent variant was studied. Altogether, 41 virulent variants were analyzed. Amino acid changes associated with virulence were deduced from comparison between the sequences of the VPg of the wild avirulent and of the evolved virulent forms of each isolate. With three isolates

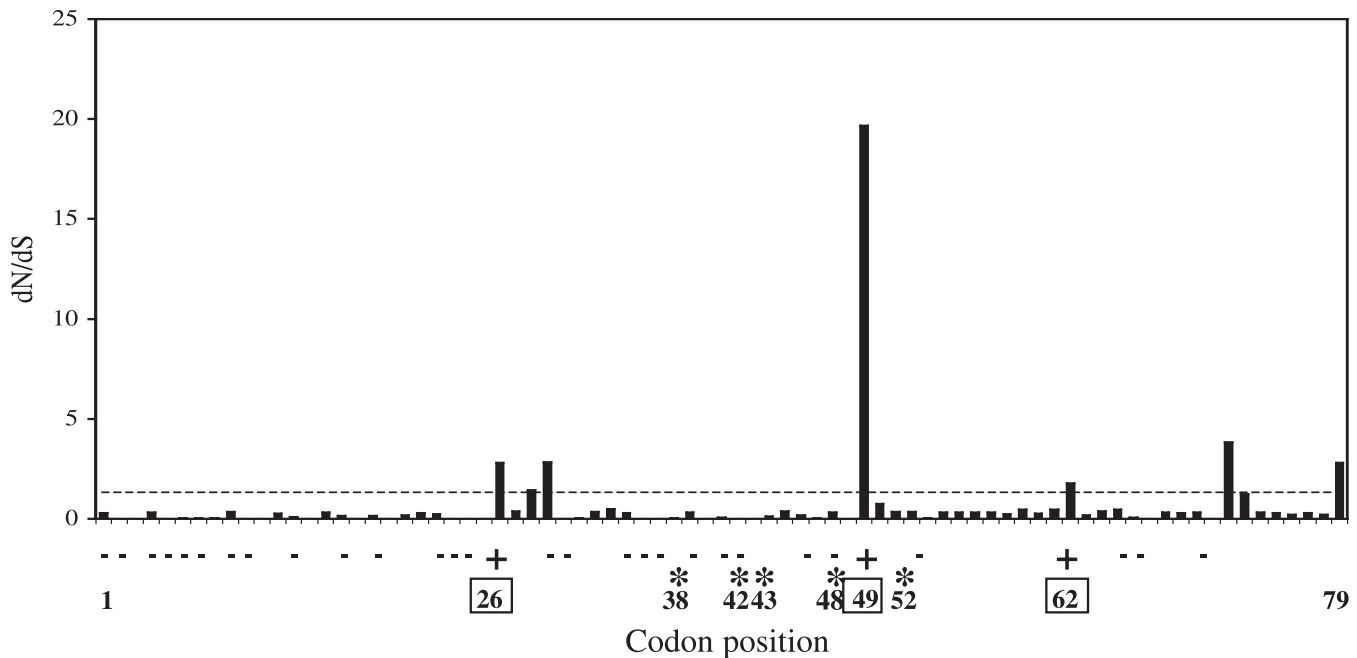


Figure 1. dN/dS at Each Codon of the VPg

The dN/dS ratio at each of the 79 codons of the VPg was estimated from a corpus of 59 isolates representative of the genetic and geographic diversity of RYMV. The dotted line indicates the value dN/dS = 1. Codons under diversifying selection (dN/dS > 1) are indicated with a “+” and the codon position is boxed. Codons under negative selection pressure (dN/dS < 1) are underlined with a “-”. Amino acid changes associated with *Rymv1-2* virulence are indicated with a “*” above the codon position. doi:10.1371/journal.ppat.0030180.g001

(Ma145, Tz225, and Tz230), however, only the VPg of the evolved virulent form was sequenced, and putative changes associated with virulence were assessed by comparison with the range of sequences of the wild avirulent isolates. Virulence was always associated with non-synonymous changes. They were located within a stretch of 15 codons in the central domain of the 79-aa-long VPg at codons 38, 42, 43, 48, and 52 (Figure 2). The amino acids associated with virulence were never found in the 59 wild avirulent isolates. Codon 43 was under neutral evolution, and codons 42 and 48

were under conservative selection, whereas codons 38 and 52 were strictly conserved in the avirulent wild isolates (Figure 1). Substitutions associated with virulence always involved a change of biochemical class (Figure 3). Most substitutions were transitions (Table 2). The transversion/transition ratio of 0.15 calculated from the changes associated with virulence was similar to that of 0.13 (+/- 0.03) estimated by maximum likelihood from the corpus of 59 wild isolates.

Substitutions associated with virulence were fixed mostly at codon 48 (33/41), and to a lesser extent at codons 52 (6/41) and 42 (2/41) (Table 2). Changes at codon 48 occurred in all strains, and changes at codon 52 and 42 were found in several strains (Figure 2). Variation was polymorphic at codon 48 with six types of substitutions of the wild arginine (Figure 3). Glycine and glutamic acid substitutions were the most frequent, isoleucine and tryptophane were isolate-specific, and valine and threonine were transient (Table 2). At codon 42, the wild asparagine was displaced by tyrosine and also transiently by isoleucine. Changes at the other codons were monomorphic. Overall, this indicated that despite the large diversity of isolates assessed, virulence was associated with a restricted number of substitutions within the central region of the VPg, codon 48 being overrepresented, and amino acids G48 and E48 the most frequent.

Three Mutational Pathways to Virulence at Codon 48

The ultimate sequencing of the VPg of 14 of the 19 virulent variants of isolate Mg16 revealed a glutamic acid (Table 2). The time needed for E48 to emerge ranged from 3 to 7 mo after inoculation (Table S1). Once fixed, E48 remained stable over time. Before E48 fixation, there was either the wild arginine, an R/G mixture, a glycine, or a G/E mixture (Table

Table 1. Origin of the Isolates and Number of Virulent Variants Generated by Inoculation on *Rymv1-2* Resistant Accessions

Strain	Geographical Origin	Nb Isolates Tested	Names of the Virulent Isolates	Nb of Virulent Variants Analyzed
S1	West Africa	12	BF5	1
			Cl4	12
S2/S3	West Africa	70	Ma203	1
Sa	West Africa	9	Ma145	1
			Ma202	1
			Ma206	1
S4	East Africa	17	Mg16	19
			Tz225	1
			Tz230	1
S5/S6	East Africa	6	Tz209	3
Total		114	10	41

Rymv1-2 resistant accessions were cultivars Gigante and Bekarosaka and four nearly-isogenic lines introgressed with the *Rymv1-2* allele of resistance. doi:10.1371/journal.ppat.0030180.t001

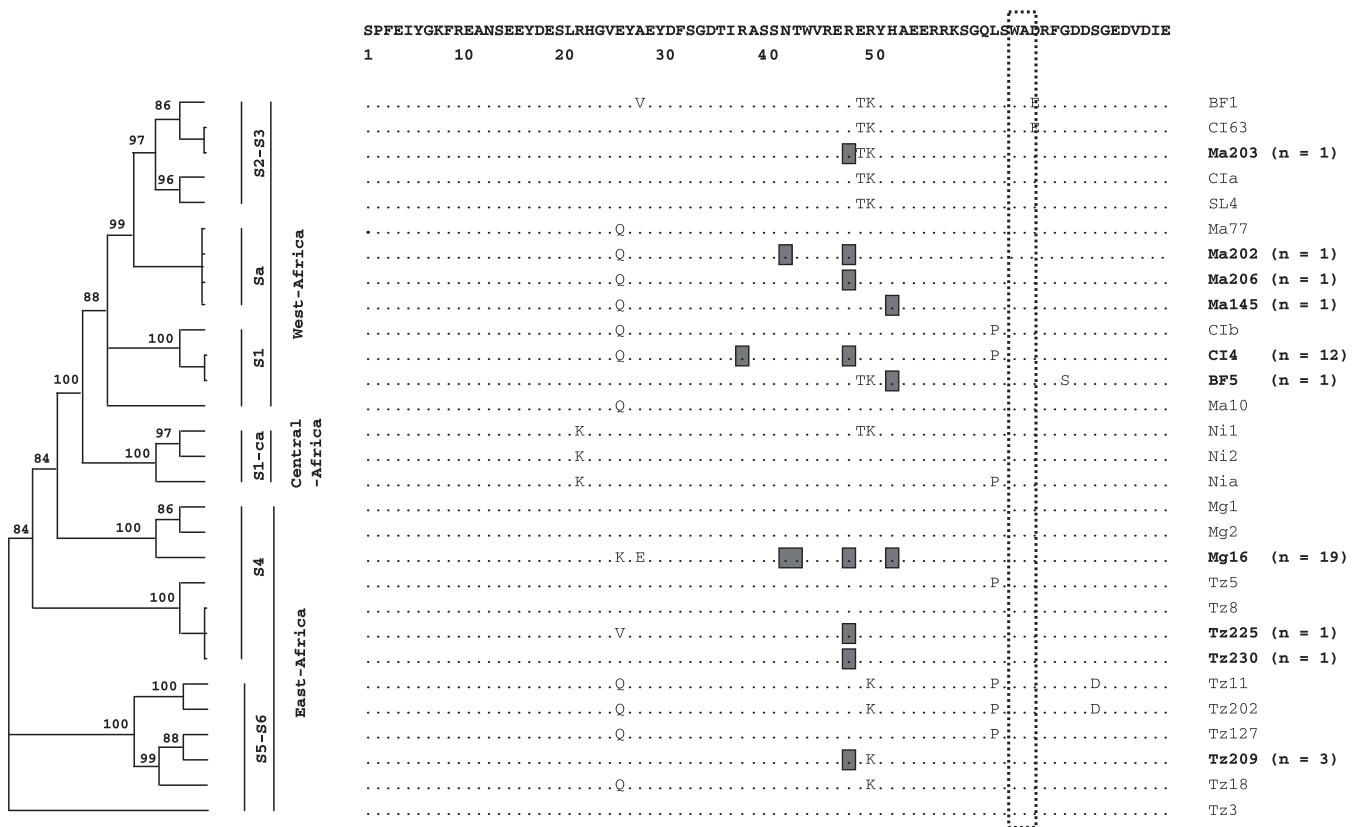


Figure 2. Positions of the Amino Acid Changes Associated with Virulence in the VPg

A total of 41 virulent variants generated by inoculating ten wild isolates (names in bold characters) was analyzed. The number of virulent variants analyzed from each of the ten wild isolates is indicated in brackets after the isolate name (right). The amino acid differences between the sequences of the wild isolates of the VPg and the consensus sequence (at the top) are indicated in plain letters. Positions of the amino acid changes associated with virulence are boxed (in black). They were deduced from comparison between the sequences of the VPg of the wild avirulent and the derived virulent forms of each isolate. The large dotted rectangle indicates the conserved WAD motif of the sobemoviruses. The taxonomic positions of the isolates are inferred from the cladogram of 22 reference isolates reconstructed by maximum likelihood from their full sequence with bootstrap support of the nodes, strain, and geographical origins indicated (left). The seven additional isolates were assigned to the closest reference isolate after phylogenetic analyses of their coat protein.
doi:10.1371/journal.ppat.0030180.g002

S1). Changes in codon 48 occurred alongside substitutions in other codons five times, twice with codon 42, twice with codon 52, and once with both (Table S1). In four instances, the changes occurred first in the “alternative” codons 42 or 52, but ultimately E48 was fixed and the alternative substitution was displaced. Overall with isolate Mg16, E48 was the most prevalent virulent variant, and most often emerged after G48 and displaced the other mutants. Similarly, one CI4 virulent variant had a glycine at position 48 and a glutamic acid at a later stage of infection (unpublished data). Altogether, this suggested two successive transitions—from R to G, then G to E—at codon 48 to gain virulence (Figure 4). Glycine and glutamic acid were found in 29 of the 41 virulent variants generated from isolates of all strains with the notable exception of strain S2/S3 (Table 2). Glycine and glutamic acid at codon 48 were fixed in resistant cultivars Gigante and Bekarosaka, and in the four NILs containing the *Rymv1-2* resistance gene. G48 and E48 were generated both in growth chambers and in greenhouse conditions in West and East Africa. Altogether, the two-step R/G/E mutational pathway at codon 48 (named mutational pathway I) was the most prevalent, and occurred in most strains, whatever the genetic background and the experimental conditions.

The two other mutational pathways at codon 48 were isolate-specific. Earlier experiments revealed that the resistance breakdown of cv Gigante after inoculation with isolate CI4 was caused by a R48I substitution in the VPg [15]. Isoleucine emerged three additional times in the present experiments, again after inoculation of isolate CI4 to cv Gigante. The virulent variant CI4 with isoleucine was reinoculated to Gigante. In several instances, sequencing the VPg 5 mo after infection revealed a mixture of isoleucine (ATA) and valine (GTA). The isoleucine-valine mixture was still apparent after re-inoculation of resistant plants. This indicated that valine was stable after emergence, but did not displace isoleucine. The successive R/I/V amino acid emergence suggested a second mutational pathway at codon 48 (named mutational pathway II) gained by two transversions. In all, 70 S2/S3 isolates were inoculated to *Rymv1-2* accessions and more than 1,000 plants were tested. Only one virulent variant emerged from isolate Ma203. Arginine at codon 48, coded by AGG as in most S2/S3 isolates versus AGA in the other strains, was displaced by tryptophane (TGG) (Table 2). This amino acid was never observed in any wild-type isolates or in any of the 40 other virulent isolates. There was no substitution elsewhere on the genome. This one-step muta-

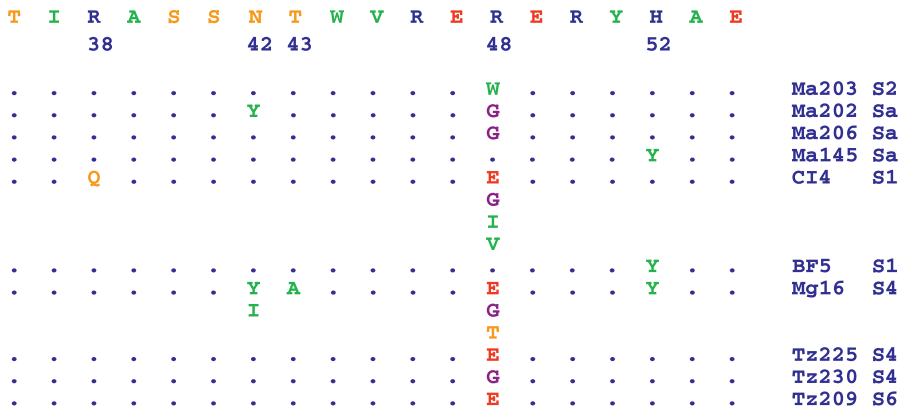


Figure 3. Amino Acid Polymorphism Associated with Virulence in the VPg

The consensus sequence of the wild isolates and the positions of the variable codons are indicated at the top of the figure. Amino acid changes associated with virulence were deduced from comparison between the sequences of the VPg of the wild avirulent and the evolved forms of each isolate. The class of the amino acids is indicated with colors: acidic (red), basic (blue), hydrophobic (green), polar (orange), and small (purple). doi:10.1371/journal.ppat.0030180.g003

tional pathway (named mutational pathway III) involved a single nucleotide transversion.

Contrasted Genetic Barriers to Virulence between Strains

The genetic barrier to virulence was defined, by analogy to viral drug resistance [28], as the propensity for the virus to overcome the resistance by developing virulence mutations. Marked differences in virulence propensity were found among isolates and strains of RYMV. Only one isolate of the 70 S2/S3 isolates (1.4%) tested gained virulence. This percentage was significantly lower than that of the other strains ($\chi^2 = 9.8$, $df = 1$, $p = 0.001$ in the Yates corrected χ^2

test), where nine of the 44 isolates (20.5%) overcame the *Rymv1-2* resistance, a percentage similar to the 17.5% estimated earlier using a collection of 280 S1 and Sa isolates from the Sudano-savannah zone [27]. Considering that more large-scale experiments were conducted with S2/S3 isolates (over 1,000 plants were tested in total), the difference between S2/S3 and other strains was still underestimated. Accordingly, the genetic barrier to virulence was higher in S2/S3 than in any other strain.

Failure of the S2/S3 strain to follow mutational pathway I did not reflect its specific codon usage at codon 48, as glycine (GGG) and glutamic acid (GAG) could also be coded by two

Table 2. Substitutions Associated to Virulence in the VPg of 41 Virulent Variants Generated by Inoculation of Ten Wild Isolates to *Rymv1-2*-Resistant Cultivars

Isolate	Strain	Nb of Variants (Total = 41)	Codon	Amino Acid ^a	
				Avirulent	Virulent
Ma203	S2/S3	1/1	48	Arg	Trp
Ma202	Sa	1/1	42	His	Tyr ^b
Ma206	Sa	1/1	48	Arg	Gly
Ma145	Sa	1/1	52	His	Tyr
CI4	S1	3/12	48	Arg	Isol ^c
		3/12	48	Arg	Glu
		5/12	48	Arg	Gly
		1/12	48	Arg	Gly
			38	Arg	Gln
BF5	S1	1/1	52	His	Tyr
Mg16	S4	2/19	42	Asn	Tyr
		14/19	48	Arg	Glu ^d
		2/19	52	His	Tyr ^e
		1/19	52	His	Tyr
			43	Thr	Ala
Tz225	S4	1/1	48	Arg	Gly
Tz230	S4	1/1	48	Arg	Glu
Tz209	S6	3/3	48	Arg	Glu

^aCodons of the amino-acids: Ala (GCC), Arg (AGA), Arg(AGG) for isolate Ma203, Asn (AAC), Gly (GGA), Gln (CAG), Glu (GAA), His (CAC), Ile (ATA), Thr (ACC), Trp (TGG), Tyr (TAC).

^bThere was a transient glycine at codon 48 that was displaced when Y42 was fixed.

^cIn several instances, a stable mixture of isoleucine and valine was obtained after reinoculation of the variant with isoleucine on the resistant cultivars.

^dIn one instance, there was a transient Ile at codon 42.

^eIn one instance, there was a transient mixture of arginine and threonine at codon 48.

doi:10.1371/journal.ppat.0030180.t002

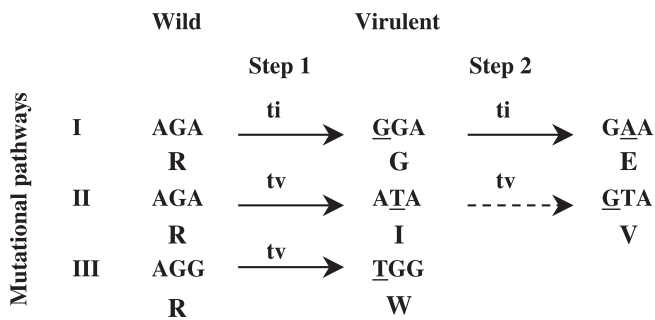


Figure 4. Mutational Pathways to Virulence within Codon 48 of the VPg. Mutational pathway I was shared by all strains with the notable exception of strain S2/S3. It involved two successive transitions (ti) from the wild arginine coded by codon AGA. Mutational pathway II was isolate-specific (CI4) and involved two successive transversions (tv). The dotted arrow indicates that V48 arose but did not replace I48. Mutational pathway III was specific for isolate Ma203 of the S2/S3 strain, with the wild arginine coded by codon AGG. It involved a single transversion. doi:10.1371/journal.ppat.0030180.g004

successive transitions from arginine (AGG). However, strain S2/S3 was the only strain with the motif TK at codons 49 and 50. Other strains had the motifs ER or EK, except some variants of the S1 and S1-ca strains (Figure S1). Three substitutions distinguished the two motifs, two non-synonymous substitutions at codon 49 (nt 145 and 146), and one at codon 50 (nt 149) (Figure S1). (AGG)48 was found when (ACG)49 was fixed, which itself occurred only with (AAG)50. The Pagel correlation test indicated that these changes were coordinated ($p < 0.01$), and the highly conservative concentration changes test further suggested that the changes were concentrated ($p = 0.07$). Altogether, failure of the S2/S3 strain to follow mutational pathway I was associated with the presence of T49. Interestingly, codon 49 was under diversifying selection.

Isolate Mg16 (strain S4), which originated from the northwest of Madagascar, overcame *Rymv1-2* resistance at the exceptional rate of 80%, whereas only 1%–20% of the plants gained virulence in the other isolates, a percentage consistent with that estimated earlier [27]. In one additional survey, 13 other isolates from Madagascar were inoculated to resistant plants. Only isolates Mg11 and Mg35 broke the resistance at a rate as high as that of Mg16 (8/20 and 9/20 infected resistant plants, respectively). As isolate Mg16, they originated from the northwest of Madagascar in the region of Marovoay and had the same genetic determinism of virulence (E48 was fixed in Mg35, whereas there was a G/E mixture at codon 48 or a Y52 substitution in Mg11). Isolates Mg11, Mg16, and Mg35 differed from any other isolates in their VPg by a lysine at codon 26 and a glutamic acid at codon 28 (Figure 1). In another survey, seven out of 54 isolates from 16 sites of eastern Tanzania readily overcome the resistance (unpublished data). Six of them belonged to the S4 strain, and like isolate Tz225, originated from the north of Lake Malawi and had fixed a G48 or E48. They all shared a valine at codon 26, an amino acid never found in any wild or resistance-breaking isolates. Altogether, high virulence propensity in two geographically localized variants of the S4 strain was associated with lysine and valine at codon 26. Interestingly, codon 26 was under diversifying selection.

Full Sequencing and Directed Mutagenesis

The virulence substitution R48I in the VPg had been identified by comparison of the full sequences of the evolved and the wild isolate CI4, and validated by mutation of the infectious clone CIa [15]. Similarly, a virulent variant from isolate CI4 with G48 was fully sequenced and compared to the wild CI4 isolate. The virulent mutant differed specifically from the wild CI4 by only one substitution in the VPg: R(AGA)48G(GGA). The four other changes, three synonymous (C1547T, T2464C, T3223C) and one non-synonymous (C3395T) substitutions, all located outside the VPg, were frequent in wild avirulent isolates. Full sequencing of this virulent variant at a later stage of infection revealed an E48 in the VPg instead of a G48 and no changes elsewhere in the genome. Subsequently, G48 and E48 were the only candidate substitutions to virulence. The substitutions A1728G and G1729A were introduced by directed mutagenesis into the VPg of the infectious CIa clone to produce a non-synonymous R48E substitution in order to validate the role of E48 in resistance breaking. The mutated clone CIa with E48 was fully infectious in the resistant cultivars Gigante and Bekarosaka. This indicated that E48 caused virulence and that the S2/S3 genetic background of the CIa clone did not interfere with infection. The substitution A1728G was also introduced into the VPg of the infectious clone to produce a non-synonymous R48G. By contrast, the mutated clone with G48 was not infectious either in the susceptible cv IR64 or in the resistant cv Gigante. Doubling the amount of transcript at inoculation failed to induce successful infection. Another attempt, where the infectious clone was mutated to produce G48 with the alternative codon GGA (instead of GGG), also failed to infect either the susceptible cv IR64 or the resistant cv Gigante. At codon 52, the causal role of substitution H52Y in resistance breaking was successfully validated by introduction of the T1740C into the CIa infectious clone.

Discussion

The theme and variations found in the evolutionary pathways to virulence of RYMV illustrate the extent of parallel evolution within a widely variable RNA plant virus species. In particular, the independent and repeated occurrence of E48 to gain virulence in most strains of RYMV, whatever the *Rymv1-2* genetic background and plant growth conditions, showed a high degree of parallel evolution. The high frequency of parallel mutations during intervals of virulence acquisition indicates both that RYMV is able to rapidly explore the adaptive landscape, fixing favorable mutations to virulence, and that there are a limited number of pathways across the adaptive landscape. Our results provide insights into the ways RYMV explores the adaptive landscape and into the constraints restricting the number of mutational pathways.

RYMV most often gained virulence through two-step mutational pathways between adjacent states: R(AGA) to G(GGA) to E(GAA) (mutational pathway I), and R(AGA) to I(ATA) to V(GTA) (mutational pathway II). In mutational pathway I, glutamic acid arose and replaced glycine, whereas in mutational pathway II valine arose but co-existed with isoleucine. Competitive exclusion of emerging variants also occurred between codons, with substitution E48 displacing alternative virulence substitutions. In a few plant viruses,

creation of chimeric viruses or directed mutagenesis of infectious clones showed that two mutations in two different codons were necessary to gain virulence [29]. However, host-plant adaptation, such as virulence through an ordered succession of substitutions, moreover within the same codon, had never been reported. These results suggest that virulence was most often gained through a process of stepwise competitive exclusion of emerging variants. This stepwise and ordered accumulation of substitutions between adjacent states did not support the alternative scenario of a selection of pre-existing virulent isolates within a pool of variants. Consistently, work with cloned infectious proviruses of the simian immunodeficiency virus showed that the *env* gene evolved along similar paths in different individual hosts and that the parallel mutations were generated de novo rather than selected from viral quasispecies [30].

The critical role of virus polymorphism in shaping evolutionary pathways was most apparent with strain S2/S3. Virulence mutational pathway III with tryptophane at codon 48 was specific to isolate Ma203 of the S2/S3 strain. In isolate Ma203, as in most S2/S3 isolates, arginine at position 48 was coded by AGG instead of AGA in the other strains. Then, tryptophane (TGG) can be coded by a single substitution from AGG codon, whereas two substitutions are necessary from AGA. This difference in codon usage likely explains why mutational pathway III was not followed except in strain S2/S3. Moreover, strain S2/S3 did not follow the major mutational pathway I. G48 was never observed experimentally in S2/S3 isolates. The S3 clone Cl_A mutated with G48 was not infectious. As G48 conferred virulence to *Rymv1-2*-resistant lines in isolates of any other strains, G48 may be unfit in the S2/S3 genetic context. This possibly blocked the major mutational pathway to virulence as simultaneous double mutation from arginine (AGG) to glutamic acid (GAG) was most unlikely. Similarly, PVX variants with single mutations, intermediate in production of doubly-mutated resistance-breaking isolates, were counter-selected, explaining the durability of the Rx1 resistance [31]. Consistently, from a given influenza A virus hemagglutinin (HA) sequence, several mutations were required to yield an antigenically distinct HA, but little or no fitness advantage was conferred by any subset of these mutations [4].

The extent of parallel evolution to gain virulence reflects the specificity of the VPg-eIF(iso)4G relationship and the restricted number of ways to restore compatible interactions between RYMV and the *Rymv1-2* resistance gene. Although the diversity of the highly variable RYMV was considered, the substitutions conferring virulence were localized within a 15-aa-long stretch within the central domain of the VPg. This suggested that this domain (aa 38 to 52), especially position 48, played a critical role in the interaction with the eIF(iso)4G protein involved in *Rymv1-2* resistance. Similarly, the central domain of the VPg of several potyviruses was involved in the interaction with host translation initiation factors [32]. Glutamic acid substitution at codon 48 was the final stage of the prevalent mutational pathway I. An E/K substitution at codon 309 of the eIF(iso)4G gene in rice conferred resistance to RYMV [14]. Arginine and lysine are basic amino acids, whereas glutamic acid is acidic. Accordingly, the E48-K309 interaction between the virulent isolate and the resistant rice would restore more efficiently than any other variants the charge complementarity of the R48-E309 interaction be-

tween the avirulent isolate and the susceptible rice. This coordinated pattern of substitutions between the resistance gene and the virulence determinant suggested a direct binding between position 48 of the VPg and position 309 of the eIF(iso)4G that should be tested experimentally.

A high genetic barrier to virulence of strain S2/S3 was associated with threonine at position 49. High propensity to virulence of localized geographical S4 variants in northwestern Madagascar and western Tanzania was linked, respectively, to lysine and valine at position 26. Codons 49 and 26 of the VPg, candidate positions in modulating the genetic barrier to virulence, were both under diversifying selection. Then, they played a critical role in virus evolution, possibly through virulence. Similarly, with the human rhinovirus, a large proportion of diversifying residues was found in the vicinity of domains influencing the RNA/VPg primer binding [33], and sites of the VPg of some plant viruses under positive selection were also involved in virulence [34,35]. Possibly, the adjacent T49 in the S2/S3 strain, instead of E49 in the other strains, altered the ability of G48 to bind site 309 of the eIF(iso)4G gene. This functional dependency between adjacent codons, a possible case of sign epistasy [36], was also observed with HIV-1 [37].

Control of RYMV in Africa through propagation of *Rymv1-2* resistance was initiated recently. Our results suggest that this strategy is most likely to be successful in the forested parts of West Africa where isolates of the S2/S3 strain with a high genetic barrier to virulence exclusively occurred. By contrast, in several other regions, the resistance is likely to be challenged. In savannah and sahelian regions of West Africa, the proportion of isolates able to overcome the resistance of cv Gigante reached 15% [27]. The proportion of virulent isolates was higher in Central than in West Africa. Our results further introduced the idea of a contrasted geographical distribution of localized variants with a high propensity to virulence in regions with a majority of isolates with a high genetic barrier to virulence. The risk of selection and spread of these variants after propagation of *Rymv1-2* resistance should be assessed.

The strategy of an RNA plant virus such as RYMV to gain virulence against host resistance showed striking parallels with HIV resistance against antiviral treatments. (i) When antiviral therapy fails to be fully suppressive, viral variants with decreased susceptibility to protease inhibitors (PIs) can emerge [38]. Similarly, emergence of virulent RYMV isolates by mutation assumed residual multiplication of the wild isolate in the *Rymv1-2* accessions. Accordingly, low but significant multiplication of wild isolates in resistant rice cultivars was detected in Q-RT-PCR (N. Poulicard, A. Pinel, and E. Hébrard, unpublished results). Subsequently, the combination of a small amount of replication of the wild-type isolate and the strong selection pressure imposed by host plant resistance allows the virulent variant to emerge and to displace the wild type. (ii) The development of resistance to PIs is usually a gradual process, and the development of high levels of resistance usually requires an ordered accumulation of multiple mutations in the viral protein [39]. With RYMV, the stepwise R/G/E and R/I/V substitutions at codon 48 and the displacement of other changes in alternative codons over time also illustrate the gradual process leading to virulence. (iii) Upon PI treatment, differences in baseline polymorphism between HIV-1 subtypes may result in the evolution of drug

resistance along distinct mutational pathways, or in differences in the incidence of these specific pathways [8,9,28,40]. Interestingly, synonymous genetic polymorphism between HIV-1 subtypes at key resistance mutations also influenced mutational routes to drug resistance [41]. Similarly, genetic diversity of RYMV—including synonymous polymorphism—affected the mutational pathways and the virulence propensity. (iv) The primary mutations against PIs did not occur in wild-type polymorphism, but developed during the course of antiviral treatment failure [8]. Consistently, RYMV virulence mutations were not found in wild isolates but emerged throughout the process of infection in resistant plants. (v) Additional (novel, minor, secondary) mutations, some of them in the close environment of key virulence mutations, modulated the genetic barrier to the development of drug resistance [38,40,42]. Similarly, amino acids at codons 49 and 26 in the VPg of RYMV were candidate positions to modulate the genetic barrier to virulence among strains and variants. The similarities in the processes of evolutionary changes between RYMV and HIV-1 to gain, respectively, virulence against a host plant resistance and resistance to antiviral treatments illustrate that common mechanisms operate in RNA virus evolution and that similar forces shape the genetic structure of their populations [43].

Materials and Methods

Plant material. The response to RYMV of the *Rymv1-2* allele of resistance was tested in six genetic backgrounds made of two cultivars and four NILs. Cultivars Gigante and Bekarosaka are two *indica* cultivars that share the *Rymv1-2* allele of resistance [21]. Cultivar Bekarosaka originated from Madagascar, whereas cv Gigante is assumed to be from Mozambique. *Rymv1-2* was introgressed into three widely grown susceptible *indica* cultivars (BG90-2, Bouaké189, and IR64), and into one partially resistant *japonica* cultivar (Nipponbare) to derive NILs. Cultivars Gigante and Bekarosaka were challenged with isolates of the major strains, whereas the NILs were inoculated only with isolate CI4 of strain S1. The plants were kept in a growth chamber under 12-h illumination at 120 μ Em-2s-1 of PAR at 28 °C and 90% humidity.

Virus isolates. In all, 114 isolates representative of the main strains of RYMV and originating from various regions of Africa were collected on susceptible plants in the fields and inoculated to the *Rymv1-2* accessions: West Africa (strain S1 from savannah, S2/S3 from forest, and Sa from sahelian regions), East Africa (S4, S5/S6), and Madagascar (S4) (Table 1). Strains S2 and S3, earlier considered as distinct, were gathered together (referred to as S2/S3 strain), as more intensive survey revealed a continuum between the two strains. In each experiment, the isolate was inoculated to ten to 20 plants per *Rymv1-2* accession. Larger scale experiments with inoculations of 50–200 plants were also conducted either to generate a virulent isolate from a recalcitrant strain (S2/S3), or to obtain several virulent variants from the same wild isolate (CI4, Mg16, Tz209) in order to assess the intra-isolate spectrum of substitutions associated with virulence. Inoculum was prepared by grinding infected frozen leaves in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) (0.1g/ml). Extracts were mixed with 600-mesh carborundum and rubbed on leaves of 14-d-old rice seedlings. Symptoms were monitored weekly and virus content was assessed by ELISA over time. Plants were kept up to 13 mo after inoculation. Such a length of time is biologically realistic, even for annual cultivated rice with a growing season of c. 3 mo, as regrowth of infected rice stubble is frequent after harvesting. Isolates that induced high virus content and/or generalized symptoms on *Rymv1-2* accessions were collected.

Virus sequencing and directed mutagenesis. A total of 59 isolates from the different geographical regions in Africa and all of the strains of RYMV were collected in the fields (referred to as the wild type) and analyzed, usually after multiplication in the susceptible *indica* cultivar IR64, in greenhouses in order to increase virus content (Table S2). Twenty-two of the 59 isolates were fully sequenced as described previously [18]. The VPg and its 5' and 3' neighboring regions of the 37 other isolates were sequenced as done earlier [15].

For phylogenetic purposes, the coat protein of these isolates was also sequenced as described elsewhere [44]. The VPg of virulent variants generated by infection of *Rymv1-2*-resistant accessions (referred to as the evolved virulent variant) from seven of these 59 isolates was sequenced. Complementarily, the VPg of three virulent isolates generated in greenhouse conditions at the experimental sites of the INERA research station of Kamboinsé near Ouagadougou (Burkina Faso, West Africa) and of the Dar Es Salaam University Department of Botany (Tanzania, East Africa)—where temperature, light, and humidity were less controlled than in growth chamber, but closer to field conditions—was studied. The same plants were tested before and after resistance breakdown. The last fully developed leaf was sampled. Altogether, 41 virulent variants were analyzed. Multiple peaks at the same position in a sequencing electrophoregram are currently interpreted as reflecting nucleotide polymorphism [45]. In our experiments, electrophoregrams with distinct double peaks at a position were regarded as indicating a mixture of two nucleotides. Displacement was further suggested if one nucleotide was identified singly at an early stage and the other at a later stage of infection. Full sequence comparison and directed mutagenesis were done as described elsewhere [15,18,46] to validate the role of the major substitutions to virulence.

Sequence analysis. The phylogeny of the 22 fully sequenced isolates representative of the geographic and genetic diversity of RYMV was reconstructed by maximum likelihood method with the HKY model [47] using an heuristic search implementing a tree bisection and reconnection swapping algorithm applied in PAUP [48]. The transition/transition (tv/ti) ratio and the alpha parameter of the gamma distribution of the among-site variation were estimated by maximum likelihood. The bootstrap support of the nodes was estimated by 100 replicates with the full heuristic search. Analysis of the genetic diversity of the VPg was based on 59 isolates collected in the fields representative of the geographic and genetic diversity of RYMV, including the 22 fully sequenced reference isolates. The ratio of non-synonymous (dN) versus synonymous (dS) substitutions of the VPg of the 22 reference isolates was calculated as implemented in DnaSP [49] and compared to ORF1, ORF2a, ORF2a+b, VPg, and ORF4. The dN/dS ratio at individual codons in the VPg was calculated on the corpus of 59 isolates using two maximum likelihood methods, Random Effect Likelihood (REL) and Internal Fixed Effect Likelihood (IFEL) [50,51], to determine on each of the 79 codons whether the selection pressure was conservative (negative) ($w < 1$), neutral ($w = 1$), or diversifying (positive) ($w > 1$). REL is an improved variant of the Nielsen-Yang approach, which allows both dS and dN to vary independently across sites. IFEL is a new likelihood method to fit an independent dN and dS to every site in the context of codon substitution and test whether $dN \neq dS$. The analyses were conducted with the VPg sequence (nt 1587–1823; 237 nt), and with the VPg and the flanking regions (nt 1526–2065; 540 nt) in order to increase the statistical power of the tests. The tv/ti ratio in the VPg was estimated from the corpus of 59 isolates by maximum likelihood as implemented in HYPHY. Evidence for correlated evolutionary change in two characters (i.e., nucleotides or amino acids at different positions) was tested by the Pagel correlation test [52] as implemented in Mesquite [53]. The concentration changes test [54] as implemented in MacClade [55] was applied to determine whether changes in one character (the dependent character) are concentrated on branches of a tree that have a particular state of a second character (the independent character).

Supporting Information

Figure S1. Polymorphism at Codons 48-49-50 of the VPg

Top: Distribution of the nucleotides at codons 48-49-50 in the VPg of 59 RYMV isolates representative of the genetic and geographic diversity of RYMV. The E/T substitution in codon 49 is coded by two nucleotide changes at positions 145 (G to A) and 146 (A to C). The R/K substitution at codon 49 is coded by one nucleotide change at position 149 (G to A). The strains and the variants with the TK motif at codons 49 and 50 (instead of the ER motif) are indicated at the top of the figure. Bottom: most parsimonious reconstruction of the change of nucleotides at position 146 of codon 49 along the phylogeny of RYMV.

Found at doi:10.1371/journal.ppat.0030180.sg001 (76 KB PPT).

Table S1. Substitutions over Time Associated to Virulence in the VPg of Isolate Mg16 (S6) Inoculated to *Rymv1-2*-Resistant Cultivars
A total of 19 virulent variants generated from isolate Mg16 and

labeled Mg16–1 to Mg16–19 was analyzed. They were inoculated to cv Bekarosaka or Gigante. The last developed leaves of the plants were collected. The VPg of the virulent variants was sequenced at different times, up to 13 months after inoculation. Differences with the VPg of the avirulent wild isolate Mg16 are underlined.

Found at doi:10.1371/journal.ppat.0030180.st001 (24 KB XLS).

Table S2. Name, Geographical origin, Strain, and Accession Numbers of the Isolates of *Rice yellow mottle virus* Whose VPg Was Sequenced

In all, 62 isolates were fully or partly sequenced. A total of 59 were wild avirulent isolates collected in the fields. Twenty-two of them were fully sequenced. The VPg of virulent variants derived from seven of them was sequenced. Three evolved virulent isolates generated by inoculation on resistant plants in greenhouses were also studied.

Found at doi:10.1371/journal.ppat.0030180.st002 (26 KB XLS).

References

1. Futuyma D (1997) Evolutionary biology. 3rd edition. Sunderland (Massachusetts): Sinauer Associates. 763 p.
2. Wichman H, Badgett M, Scott L, Bouliane C, Bull J (1999) Different trajectories of parallel evolution during viral adaptation. *Science* 285: 422–424.
3. Novella I, Zarate S, Metzgar D, Ebendick-Corpus B (2004) Positive selection of synonymous mutations in vesicular stomatitis virus. *J Mol Biol* 342: 1415–1421.
4. Wolf YI, Viboud C, Holmes EC, Koonin EV, Lipman DJ (2006) Long intervals of stasis punctuated by burst of positive selection in the seasonal evolution of influenza A virus. *Biol Direct* 1: 34. doi:10.1186/1745-6150-1-34
5. Woods R, Schneider D, Winkworth C, Riley M, Lenski R (2006) Tests of parallel molecular evolution in a long-term experiment with *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 9107–9112.
6. Bazykin GA, Kondrashov FA, Brudno M, Poliakov A, Dubchak I, et al. (2007) Extensive parallelism in protein evolution. *Biol Direct* 2: 20. doi:10.1186/1745-6150-2-20
7. Musset L, Le Bras J, Clain J (2007) Parallel evolution of adaptive mutations in *Plasmodium falciparum* mitochondrial DNA during atovaquone-proguanil treatment. *Mol Biol Evol* 24: 1582–1585.
8. Nkengasong J, Adje-Toure C, Weidle P (2004) HIV antiretroviral drug resistance in Africa. *AIDS Rev* 6: 4–12.
9. Wainberg M (2004) HIV-1 subtype distribution and the problem of resistance. *AIDS* 18: S63–S68.
10. Hull R (2001) Plant virology. San Diego: Academic Press. 1,001 p.
11. Maule A, Caranta C, Boulton M (2007) Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. *Mol Plant Path* 8: 223–231.
12. Robaglia C, Caranta C (2006) Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends Plant Sci* 11: 40–45.
13. Traoré O, Sorho F, Pinel A, Abubakar Z, Banwo O, et al. (2005) Processes of diversification and dispersion of *Rice yellow mottle virus* inferred from large-scale and high-resolution phylogeographic studies. *Mol Ecol* 14: 2097–2110.
14. Albar L, Bangratz-Reyser M, Hebrard E, Ndjioudjop M, Jones M, et al. (2006) Mutations in the eIF(iso)4G translation initiation factor confer high resistance to *Rice yellow mottle virus*. *Plant J* 47: 417–426.
15. Hébrard E, Pinel-Galzi A, Bersoult A, Siré C, Fargette D (2006) Emergence of a resistance-breaking isolate of *Rice yellow mottle virus* during serial inoculations is due to a single substitution in the genome-linked viral protein VPg. *J Gen Virol* 87: 1369–1373.
16. Hull R, Fargette D (2005) Sobemovirus. In: Fauquet C, Mayo M, Maniloff J, Desselberger U, Ball L, editors. Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses. Eighth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Amsterdam: Elsevier/Academic Press. pp. 883–888.
17. Kouassi N, N'Guessan P, Albar L, Fauquet C, Brugidou C (2005) Distribution and characterization of *Rice yellow mottle virus*: a threat to African farmers. *Plant Dis* 89: 124–133.
18. Fargette D, Pinel A, Abubakar Z, Traoré O, Brugidou C, et al. (2004) Inferring the evolutionary history of *Rice yellow mottle virus* from genomic, phylogenetic and phylogeographic studies. *J Virol* 78: 3252–3261.
19. Ndjioudjop M, Albar L, Fargette D, Fauquet C, Ghesquière A (1999) The genetic basis of high resistance to rice yellow mottle virus (RYMV) in cultivars of two cultivated rice species. *Plant Dis* 83: 931–935.
20. Thottappilly G, Rossel H (1993) Evaluation of resistance to rice yellow mottle virus in *Oryza* species. *Indian J Virol* 9: 65–73.
21. Albar L, Rakotomalala M, Fargette D, Ghesquière A (2007) Molecular characterization of resistance to *Rice yellow mottle virus* in Bekarosaka, an *indica* variety from Madagascar. *Rice Genet News* 23: 84–88.
22. Albar L, Ndjioudjop M, Eshak Z, Berger A, Pinel A, et al. (2003) Fine mapping of a gene required for *Rice yellow mottle virus* cell-to-cell movement. *Theor Appl Genet* 107: 371–378.
23. Fraser R (1985) Genes for resistance to plant viruses. *CRC Crit Rev Plant Sci* 3: 257–294.
24. Shaner G, Stromberg E, Lacy G, Barker K, Pirone T (1992) Nomenclature

Acknowledgments

We thank J. Aribi for technical assistance, B. D. Harrison, J. M. Thresh, and three anonymous reviewers for constructive criticisms of the manuscript, and L. Albar, C. Brugidou, C. Chevillon, O. Gascuel, J. F. Guegan, B. Lafay, S. Morand, T. de Meeus, B. Moury, M. Peeters, and F. Renaud for helpful discussions.

Author contributions. APG, EH, and DF conceived and designed the experiments. APG, MR, ES, FS, ZK, OT, DS, and NP performed the experiments. ZK, YR, YS, GK, and AG contributed viruses, plant materials, and information. DF wrote the paper.

Funding. Funding by the ECOGER action of the French National Program ANR “Ecosphère continentale: processus, modélisation et risques environnementaux” supported by INRA is acknowledged.

Competing interests. The authors have declared that no competing interests exist.

and concepts of pathogenicity and virulence. *Annu Rev Phytopathol* 30: 47–66.

25. Fargette D, Pinel A, Traoré O, Ghesquière A, Konaté G (2002) Emergence of resistance-breaking isolates of *Rice yellow mottle virus* during serial inoculations. *Europ J Plant Pathol* 108: 585–591.
26. Sorho F, Pinel A, Traoré O, Bersoult A, Ghesquière A, et al. (2005) Durability of natural and transgenic resistances in rice to *Rice yellow mottle virus*. *Eur J Plant Pathol* 112: 349–359.
27. Traoré O, Pinel A, Hébrard E, Gumedzoé Y, Fargette D, et al. (2006) Occurrence of resistance-breaking isolates of *Rice yellow mottle virus* in West and Central Africa. *Plant Dis* 90: 256–263.
28. Beerenwinkel N, Daumer M, Sing T, Rahnenfuhrer J, Lengauer T, et al. (2005) Estimating HIV evolutionary pathways and the genetic barrier to drug resistance. *J Infect Dis* 191: 1953–1960.
29. Harrison BD (2002) Virus variation in relation to resistance-breaking in plants. *Euphytica* 124: 181–192.
30. Buckley K, Pei-Lin L, Khimani A, Hofmann-Lehmann R, Liska V, et al. (2003) Convergent evolution of SIV *env* after independent inoculation of rhesus macaques with infectious proviral DNA. *Virology* 312: 470–480.
31. Goulden M, Kohm B, Santa Cruz S, Kavanagh T, Baulcombe D (1993) A feature of the coat protein of potato virus X affects both induced virus resistance in potato and viral fitness. *Virology* 197: 293–302.
32. Roudet-Tavert G, Michon T, Walter J, Delaunay T, Redondo E, et al. (2007) Central domain of a potyvirus VPg is involved in the interaction with the host translation initiation factor eIF4E and the viral protein HcPro. *J Gen Virol* 88: 1029–1033.
33. Kistler A, Webster D, Rouskin S, Magrini V, Credle J, et al. (2007) Genome-wide diversity and selective pressure in the human rhinovirus. *Virol J* 4: 40. doi:10.1186/1743-422X-4-40
34. Moury B, Morel C, Johansen E, Guilbaud L, Souche S, et al. (2004) Mutations in *Potato virus Y* genome-linked protein determine virulence towards recessive resistance in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. *Mol Plant-Microbe Interact* 3: 322–329.
35. Schirmer A, Link D, Cognat V, Moury B, Beuve M, et al. (2005) Phylogenetic analysis of isolates of *Beet necrotic yellow vein virus* collected worldwide. *J Gen Virol* 86: 2897–2911.
36. Weinreich D, Watson R, Chao L (2005) Sign epistasis and genetic constraint on evolutionary trajectories. *Evolution* 59: 1165–1174.
37. Rhee SY, Liu TF, Holmes SP, Shafer RW (2007) HIV-1 subtype B protease and reverse transcriptase amino acid covariation. *PLoS Comput Biol* 3: e87. doi:10.1371/journal.pcbi.0030087
38. Perno C, Svicher V, Ceccherini-Silberstein F (2006) Novel drug resistance mutations in HIV: recognition and clinical relevance. *AIDS Rev* 8: 179–190.
39. Molla A, Korneyeva M, Gao Q, Vasavanonda S, Schipper P, et al. (1996) Ordered accumulation of mutations in HIV protease confers resistance to ritonavir. *Nature Med* 2: 760–766.
40. Grossman Z, Paxinos E, Averbuch D, Maayan S, Parkin N, et al. (2004) Mutation D30N is not preferentially selected by human immunodeficiency virus type 1 subtype C in the development of resistance to nelfinavir. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 2159–2165.
41. Dumans A, Soares M, Machado E, Hue S, Brindeiro R, et al. (2004) Synonymous genetic polymorphism within Brazilian human immunodeficiency virus type 1 subtypes may influence mutational routes to drug resistance. *J Infect Dis* 189: 1232–1238.
42. Brenner B, Oliveira M, Doualla-Bell F, Moisi D, Ntemgwa M, et al. (2006) HIV-1 subtype C viruses rapidly develop K65R resistance to tenofovir in cell culture. *AIDS* 20: F9–F13.
43. Moya A, Holmes E, Gonzales-Candelas F (2004) The population genetics and evolutionary epidemiology of RNA viruses. *Nature Rev Microbiol* 2: 279–288.
44. Pinel A, N'Guessan P, Bousalem M, Fargette D (2000) Molecular variability of geographically distinct isolates of *Rice yellow mottle virus* in Africa. *Arch Virol* 145: 1621–1638.
45. Poon AF, Kosakovsky Pond SL, Bennet P, Richman DD, et al. (2007) Adaptation to human populations is revealed by within-host polymor-

- phisms in HIV-1 and hepatitis C virus. *PLoS Pathog* 3: e45. doi:10.1371/journal.ppat.0030045
46. Brugidou C, Holt C, A Yassi M, Zhang S, Beachy R, et al. (1995). Synthesis of an infectious full-length cDNA clone of rice yellow mottle virus and mutagenesis of the coat protein. *Virology* 206: 108–115.
 47. Felsenstein J (2004) *Inferring phylogenies*. Sunderland (Massachusetts): Sinauer Associates. 664 p.
 48. Swofford D (2003) *PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods)*, version 4. Sunderland (Massachusetts): Sinauer Associates.
 49. Rozas J, Sánchez-DelBarrio J, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496–2497.
 50. Kosakovsky Pond SL, Frost SD (2005) Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics* 21: 2531–2533.
 51. Kosakovsky Pond S, Frost S (2005) Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acids sites under selection. *Mol Biol Evol* 22: 1208–1222.
 52. Pagel M (1994) Detecting correlated evolution on phylogenies: a general method for the comparative analysis of discrete characters. *Proc R Soc Lond B* 255: 37–45.
 53. Maddison W, Maddison D (2006) *MESQUITE: a modular system for evolutionary analysis*, version 1.12. Available: <http://www.mesquiteproject.org/>. Accessed 17 October 2007.
 54. Maddison W (1990) A method for testing the correlated evolution of two binary characters: are gains or losses concentrated on certain branches of a phylogenetic tree? *Evolution* 44: 539–557.
 55. Maddison W, Maddison D (2005) *MacClade: analysis of phylogeny and character evolution*, version 4.08. Sunderland (Massachusetts): Sinauer Associates.

Résumé

Les sobémovirus regroupent des phytovirus capables d'infecter de nombreuses plantes d'intérêt agronomique en occasionnant d'énormes pertes de récoltes. Leur génome est constitué d'ARN simple brin positif dont l'ORF, situé à l'extrémité 5', code la protéine P1, un suppresseur de l'extinction post-transcriptionnelle des gènes (PTGS) connu comme un mécanisme sophistiqué de défense de la plante. Afin d'identifier des suppresseurs forts du PTGS utilisables en biotechnologie, nous avons procédé (i) à la caractérisation interspécifique de sobémovirus à travers l'identification et la détermination des caractéristiques biologiques et moléculaires d'un nouveau sobémovirus et à travers l'étude de la diversification des sobémovirus et des virus apparentés; (ii) à la caractérisation intraspécifique *via* la détermination des caractéristiques biologiques, sérologiques et moléculaires d'isolats du virus de la panachure jaune du riz (RYMV, *Rice yellow mottle virus*).

Ainsi, nous avons identifié un nouveau virus chez le chiendent (*Imperata cylindrica*) et le maïs (*Zea mays*) sur lesquels il provoque des symptômes de panachure jaune. Ses particules virales sont icosaédriques d'environ 32 nm de diamètre. Des anticorps polyclonaux dirigés contre ce virus ont été produits pour développer un kit de détection fiable et utilisable pour étudier sa gamme d'hôtes. Ses hôtes naturels sont limités au chiendent et à certaines variétés de maïs tandis que ceux expérimentaux sont restreints à *Rottboellia exaltata*, une autre graminée sauvage. Le génome entier du virus a été séquencé. Il est composé de 4547 nucléotides avec quatre cadres ouverts de lecture (ORFs) codant quatre protéines majeures : la P1, la polyprotéine, la polymérase et la protéine de capsid. L'analyse phylogénétique de ce nouveau virus à partir du génome entier a montré qu'il est proche du RYMV et appartient au groupe des sobémovirus. Il a été nommé virus de la panachure jaune du chiendent (IYMV, *Imperata yellow mottle virus*).

L'étude de la diversification des sobémovirus et virus apparentés, basée sur l'utilisation des séquences nucléotidiques disponibles pour différents isolats de diverses espèces de virus phytopathogènes, a permis de montrer que la diversification du RYMV, est assez récente (environ 200 ans) comparé à d'autres virus plus anciens dont l'origine remonterait à 3000-9000 ans avant notre ère ce qui correspondrait à la révolution agricole du néolithique.

La caractérisation pathogénique d'isolats de RYMV, prélevés sur des graminées sauvages et le riz, par test ELISA a permis de mettre en évidence, pour la première fois, des isolats appartenant au sérotype Ser2 et qui sont capables de contourner la résistance élevée de la variété Giganté de riz. Le typage moléculaire basé sur la séquence du gène (VPg) impliqué dans la virulence du RYMV a révélé des isolats capables de contourner la résistance élevée du riz sans mutation dans la VPg, suggérant ainsi l'implication d'un gène viral autre que la VPg dans le contournement de résistance.

L'analyse bioinformatique de la diversité de la protéine P1 du RYMV, en utilisant 44 séquences nucléotidiques disponibles, a permis d'identifier des sites sous sélection positive dont quatre sites avec un score élevé. Leur lien avec l'activité de suppression de silencing a été étudié par mutagenèse dirigée. Ainsi, les quatre sites mutés sont capables de moduler l'activité de suppression ont pu être identifiées.

L'étude de la protéine suppresseur P1 du IYMV, par des tests d'agro-infiltration, a révélé sa capacité à interférer aussi bien avec le silencing local que systémique et celle à supprimer le silencing est beaucoup plus forte que celle de la protéine P1 de l'isolat Tanzanien de RYMV (P1-Tz3), le plus fort suppresseur des isolats de RYMV identifié de nos jours.

Enfin, l'évaluation de l'activité de suppression de silencing de la protéine P1 d'une vingtaine d'isolats de RYMV a permis de montrer, dans un système hétérologue de production, que certains (deux) permettent d'augmenter d'un facteur 24 la quantité de protéine GUS produite et ce, 6 jours après agro-infiltration ce qui fait d'eux des adjuvants prometteurs pour la production de protéines recombinantes *in planta*.

Mots clés : sobémovirus, biotechnologie, IYMV, RYMV, bioinformatique, suppresseur de PTGS, protéine P1, protéines recombinantes.

Abstract

Sobemoviruses constitute an important genus of plant viruses assimilated as a destructive pest for agronomy since they infect a wide host range and cause important yield losses. Their genome is composed of a single-stranded plus-sense RNA. The 5'-terminal ORF encodes the protein P1, a suppressor of Post-Transcriptional Gene Silencing (RNA silencing), known to be an important antiviral defence system in plants. The aim of our study was (i) an interspecific analysis (biological and molecular diversification) of sobemovirus P1 proteins through the identification and the deep characterization of a new virus; and (ii) an intraspecific characterization of *Rice yellow mottle virus* (RYMV) isolates through the determination of their biological, serological and molecular characteristics.

Thus we identified a new virus from the grass *Imperata cylindrica* species and corn (*Zea mays*), on which it displays yellow mottle symptoms. This so-called *Imperata yellow mottle virus* (IYMV) virus consists in isometric particles ca. 32 nm in diameter. The production of specific polyclonal antibodies raised against IYMV virus allowed us to detect and study its host range. We showed that its natural hosts are limited to *I. cylindrica*, and to some corn varieties, while experimental host range analysis restricted IYMV to *Rottboellia exaltata*, another wild *Poaceae*.

We next present the full IYMV genome sequence, which is composed of 4,547 nucleotides harboring four reading frame encoding four major proteins : P1, polyprotein, polymerase and coat protein. Our phylogenetic analyses suggest that this new virus is closely related to RYMV, within the *Sobemovirus* genus.

Inferring sobemoviruses and related viruses sequence diversity, shows that RYMV diversified rather recently (200 years ago) while the divergence time between sobemoviruses and related viruses was estimated to be 9,000 years, that between sobemoviruses and poleroviruses approximately 5,000 years, and that among sobemoviruses approximately 3,000 years. Altogether, we concluded that the diversification of plant viruses has spanned the history of agriculture, from the Neolithic age to the present.

We evaluate the silencing suppression activity of the newly identified IYMV using agro-infiltration assays in *Nicotiana benthamiana*. We showed that this protein interferes with local as well as with systemic silencing, with a stronger efficiency than that observed for the well-characterized Tanzanian RYMV isolate (P1-Tz3), the strongest suppressor identified among RYMV isolates up to now.

The pathogenicity characterization by ELISA test allowed us to highlight for the first time that RYMV isolates belong to serotype Ser2 are able to overcome the high resistance of Gigante variety. The molecular typing based on the variation of VPg sequence involved in resistance breaking revealed the capacity of RYMV isolates to break the high resistance without change in VPg, suggesting the involvement of another viral gene in resistance breaking mechanism.

Bioinformatic analyses of RYMV P1 protein diversity inferring on 44 sequences allowed us to identify sites under positive selection and to study their roles on silencing suppression activity using a site-directed mutagenesis strategy. Four point mutations responsible for modulating the P1 activity have been identified.

Silencing suppression activity of twenty RYMV isolates was evaluated using transient expression assay and we identify at least 2 isolates with a 24-fold enhanced P1 activity. This makes them promising additives for recombinant proteins production *in planta* (Molecular farming).

In final, we discussed the opportunity to develop biotechnological strategies that take benefit of the hypersuppressor activity to identify strong RNA silencing suppressors usable in biotechnology.

Key words: sobemovirus, IYMV, RYMV, bioinformatic, RNA silencing suppressor, P1 protein, recombinant proteins, biotechnology.