Université Victor Segalen Bordeaux 2

Année 2004

Thèse n°1191

THESE

Pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITE BORDEAUX 2

Mention :Sciences Biologiques et MédicalesOption :Biologie – Santé

Présentée et soutenue publiquement le :

22 Décembre 2004

Par

GUIRAUD Thomas

Né le 21 mars 1977

LES FACTEURS VIRAUX RESTAURANT LA COMPATIBILITE ENTRE UN POTYVIRUS ET UNE PLANTE DONT L'EIF4E EST NON-PERMISSIF

Membres du Jury

M. BLANCHARD A.	Professeur, Université de Bordeaux 2	Président
Mme JACQUEMOND M.	Directeur de recherche, INRA	Rapporteur
M. GILMER D.	Maître de Conférence, Université de Strasbourg 1	Rapporteur
Mme BADAOUI S.	Maître de Conférence, Université de Clermont-Ferrand	Examinateur
M. LE GALL O.	Directeur de recherche, INRA	Directeur de thèse

Remerciements

Ce travail a été effectué au centre INRA de Villenave d'Ornon au sein de l'équipe « Interactions Plantes Pathogènes » du laboratoire de Virologie Végétale (UMR « Génomique et Développement du Pouvoir Pathogène ») et a été co-financé par le Conseil Régional d'Aquitaine et par l'INRA.

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma gratitude envers Monsieur Olivier Le Gall qui m'a encadré durant toutes ces années. Je le remercie pour sa disponibilité à mon égard, pour son soutien, que ce soit du point de vue scientifique bien entendu, mais aussi du point de vu moral. Il a su m'aiguillonner et me guider aux bons moments sans pour autant m'imposer une pression qui aurait été rédhibitoire...

Je voudrais aussi remercier les membres du jury : Monsieur Alain Blanchard qui m'a fait l'honneur de présider ce jury, Madame Mireille Jacquemond et Monsieur David Gilmer, les rapporteurs, et enfin Madame Saloua Badaoui en tant qu'examinatrice. Je les remercie tous pour leur disponibilité en une période de l'année qui ne fut pas évidente et pour leurs analyses et remarques avisées qui m'ont été bien utiles pour les corrections finales de ce manuscrit.

Au sein du laboratoire, je voudrais remercier Thierry Candresse qui dirige le laboratoire de Virologie Végétale, qui m'a accueillit d'abord pour mon DEA puis pour mon doctorat et qui m'a apporté les critiques constructives et décisives qui ont fait de mon exposé de soutenance ce qu'il était le jour J.

Je remercie aussi toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin aux travaux présentés ici et en particulier Mesdames Martine Peypelut et Sylvie German-Retana qui m'ont beaucoup aidé quand le besoin s'en faisait ressentir (loin de moi l'idée de m'approprier tout le travail...) et qui reprennent désormais le flambeau.

Un grand merci à toutes les personnes du laboratoire (mais aussi d'autres se terrant dans divers recoins de l'IBVM...) qui, si elles n'ont pas effectivement mis la main à la pâte, m'ont porté un soutien sans faille dans mes moments les plus « hésitants » ou au contraire pour entretenir ma motivation dans ceux où j'obtenais plus de succès que je ne l'avais escompté.

Je ne peux malheureusement pas citer tout le monde... Que ce soit au laboratoire de virologie ou dans le reste de l'IBVM (ou au Québec !), que ce soit du point de vue scientifique ou psychologique, pendant toutes ces années, j'ai vraiment apprécié la présence et le soutien de chacun même si ces derniers temps je le montrais moins qu'auparavant. Je souhaite à tous les docteurs en devenir de passer leur thèse dans ces conditions.

Enfin, je remercie tous les membres de mon entourage que ce soit ma famille (à Bordeaux ou ailleurs), mes amis (virtuels ou non) et tout particulièrement mon Gaëtan. Tous ceux qui eux aussi m'ont soutenu à leur manière, qui ont toujours eu confiance en moi, qui m'ont poussé quand je n'avais plus la motivation pour avancer et surtout, justement, pour m'avoir souvent fait oublier que j'avais une thèse et une tonne de travail à boucler (un peu trop parfois d'ailleurs...).

Au risque de me répéter : Un grand merci à tous !

Liste des publications

- Peypelut, M., Krause-Sakate, R., Guiraud, T., Pavan, M. A., Candresse, T., Zerbini, F. M. & Le Gall, O. (2004). Specific detection of *Lettuce mosaic virus* isolates belonging to the "Most" type. *Journal of Virological Methods* 121, 119-24.
- Revers, F., Guiraud, T., Houvenaghel, M. C., Mauduit, T., Le Gall, O. & Candresse, T. (2003). Multiple resistance phenotypes to *Lettuce mosaic virus* among Arabidopsis thaliana accessions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16, 608-16.
- Guiraud, T., Nicaise, V., Krause-Sakate, R., Redondo, E., Candresse, T., German-Retana, S., Michon, T., Revers, F., Roudet-Tavert, G., Walter, J., Pavan, M. A., Zerbini, F. M. & Le Gall, O. (2002). Host range determinants of *Lettuce mosaic virus*. *Virus Reviews* and Research 7, 29. (Revue sans comité de lecture)

Liste des communications

- <u>German-Retana, S</u>., Revers, F., Houvenaghel, M. C., Guiraud, T., Le Gall, O. & Candresse, T. (2004). Restriction of *Lettuce mosaic virus* long-distance movement in resistant lettuce and *Arabidopsis thaliana*. In *Le phloème dans tous ses états*. Poitiers, 1-2 April 2004. (Poster)
- <u>Guiraud, T</u>. (2004). Déterminisme viral chez le LMV du contournement du gène *mo1*. In 2^{ème} séminaire "Interactions Plantes-Potyvirus". Mousquety (Vaucluse), 2-4 février 2004. (Communication)
- <u>Guiraud, T.</u>, Peypelut, M., Redondo, E., Houvenaghel, M. C., Mauduit, T., Revers, F., Candresse, T. & Le Gall, O. (2003). Mapping of the viral determinants responsible for the ability of some isolates of *Lettuce mosaic virus* to infect lettuce plants with a defective eIF4E. In *AAB conference "Advances in Plant Virology"*. Montpellier, France, 29 September - 01 October 2003. (Poster)
- Revers, F., Guiraud, T., Houvenaghel, M. C., Mauduit, T., Candresse, T. & <u>Le Gall, O</u>. (2003a). Multiple resistance phenotypes to *Lettuce mosaic virus* among *Arabidopsis thaliana* accessions. In *AAB conference "Advances in Plant Virology"*. Montpellier, France, 29 September - 01 October 2003. (Communication)
- Nicaise, V., Guiraud, T., <u>German-Retana, S.</u>, Sanjuán, R., Dubrana, M. P., Mazier, M., Maisonneuve, B., Candresse, T., Caranta, C. & Le Gall, O. (2003b). The role of translation factor eIF4E in plant susceptibility to potyviruses. In *11th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions*. St-Petersburg, Russia, July 2003. (Communication)
- <u>Revers, F.</u>, Guiraud, T., Houvenaghel, M. C., Mauduit, T., Le Gall, O. & Candresse, T. (2003c). Multiple resistance phenotypes to *Lettuce mosaic virus* among *Arabidopsis* thaliana accessions. In 11th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. St-Petersburg, Russia, July 2003. (Poster)
- Nicaise, V., Guiraud, T., <u>German-Retana, S.</u>, Sanjuán, R., Dubrana, M. P., Mazier, M., Maisonneuve, B., Candresse, T., Caranta, C. & Le Gall, O. (2003a). Lettuce susceptibility to lettuce mosaic potyvirus is controlled by the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E). In *EMBO Workshop "Genomic approaches in Plant Virology"*. Keszthely, Hungary, 28-31 may 2003.
- <u>Revers, F.</u>, Guiraud, T., Houvenaghel, M. C., Mauduit, T., Le Gall, O. & Candresse, T. (2003b). Identification de déterminants viraux et de plants impliqués dans les interactions virus de la mosaïque de la laitue (LMV)/*Arabidopsis thaliana*. In 9^{èmes} rencontres de Virologie Végétale. Aussois, France, 2-6 février 2003. (Communication)
- Guiraud, T., Nicaise, V., Krause-Sakate, R., Redondo, E., Candresse, T., German-Retana, S., Michon, T., Revers, F., Roudet-Tavert, G., Walter, J., Pavan, M. A., Zerbini, F. M. & <u>Le Gall, O.</u> (2002). Host range determinants of *Lettuce mosaic virus*. In *XIII*th

Brasilian Meeting of Virology. Aguas de Lindoia, SP, Brasil, September 30 - October 3, 2002. (Communication)

- Le Gall, O., Guiraud, T., Redondo, E., Krause-Sakate, R., Walter, J., Revers, F., Houvenaghel, M. C., German-Retana, S., Zerbini, F. M. & Candresse, T. (2002). Role of the VPg in the pathogenicity of *Lettuce mosaic virus*. In *Advances in Plant Virology*. Cambridge, UK, 17-19 April 2002: Association of Applied Biologists. (Communication)
- <u>Guiraud, T</u>. (2001). Le rôle central de la protéine VPg d'un potyvirus, le LMV, dans la modulation de son pouvoir pathogène. In *1^{er} séminaire "Interactions plante-potyvirus"*. L'Isle-sur-la-Sorgue (Vaucluse), 29-30 novembre 2001. (Communication)
- <u>Revers, F</u>., Guiraud, T., Le Gall, O. & Candresse, T. (2001). Déterminisme moléculaire de la gamme d'hôtes des virus phytopathogènes : analyse du pathosystème *Arabidopsis thaliana*/virus de la mosaïque de la laitue. In 8^{èmes} Rencontres de Virologie Végétale. Aussois, France, 11-15 mars 2001. (Communication)

Abréviations

DIVERS

Amp	ampicilline
Bet	bromure d'éthidium
BSA	sérum albumine bovine
CIP	calf intestinal alkaline phosphatase
СР	protéine de capside
cv	cultivar
DMSO	diméthyl sulfoxyde
DTT	dithiothreïtol
DIECA	diéthyldithiocarbamate
EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
GUS	gène de la β-glucuronidase
HcPro	facteur assistant-protéinase (helper component)
IC	immunocapture
IgG	immunoglobuline G
IPTG	isopropyl-β-D-thiogalactoside
Kan	kanamycine
LacZ	gène de la β-galactosidase
MOPS	acide 3-(N-morpholino)propane sulfonique
MSC	multisite de clonage
NIa	protéine d'inclusion nucléaire a
NIb	protéine d'inclusion nucléaire b
NOS	terminateur de transcription du gène de la nopaline synthétase
3'NTR	région 3' non traduite
5'NTR	région 5' non traduite
ORF	open reading frame
P	protéine
PCR	polymerase chain reaction
PBS	tampon phosphate salin
PEG	polyéthylène glycol
PVP	polyvinyl pyrrolidone
RFLP	restriction fragment length polymorphism
RNase	ribonucléase
RT	transcription inverse
RTase	transcriptase inverse
SDS	dodécyl sulfate de sodium
TAE	Tris acétate EDTA
TBE	Tris borate EDTA
TE	Tris EDTA
TEG	Tris EDTA glucose
Tris	Tris(hydroxyméthyl)aminométhane
	lumière ultraviolette
VPg	protéine virale liée au génome (genome linked viral protein)
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside
70S	promoteur de transcription 35S modifié du CaMV

ACIDES NUCLEIQUES ET NUCLEOTIDES

ADN	acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
ARN	acide ribonucléique
ARNt	ARN de transfert
Α	adénosine
С	cytidine
G	guanosine
Т	thymidine
U	uridine
R	A ou G
dNTP	désoxynucléoside 5' triphosphate (dont dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
NTP	nucléoside 5' triphosphate (dont ATP, CTP, GTP, UTP)
nt	nucléotide

ACIDES AMINES

aa	acide	aminé						
Α	Ala	alanine	Ι	Iso	isoleucine	Q	Gln	glutamine
С	Cys	cystéine	K	Lys	lysine	R	Arg	arginine
D	Asp	aspartate	L	Leu	leucine	S	Ser	sérine
Ε	Glu	glutamate	Μ	Met	méthionine	Т	Thr	thréonine
G	Gly	glycine	Ν	Asn	asparagine	V	Val	valine
Η	His	histidine	Р	Pro	proline	Y	Tyr	tyrosine

UNITES

% p/v	pourcent poids par volume	Facteurs d	e multip	lication:
% v/v	pourcent volume par volume			
Α	ampère	k	kilo	(10^{3})
b	base	c	centi	(10^{-2})
°C	degré Celsius	m	milli	(10^{-3})
Ci	curie	μ	micro	(10^{-6})
сM	centimorgan	n	nano	(10^{-9})
cpm	coup par minute	р	pico	(10^{-12})
Da	dalton			
Dox	densité optique à x nm			
F	farrad			
g	gramme			
h	heure			
1	litre			
Ω	ohm			
Μ	mole par litre			
m	mètre			
min	minute			
mol	mole			
pb	paire de bases			
rpm	rotation par minute (g accélération de la p	esanteur)		
S	seconde			
t	tonne			
V	volt			

VIRUS

BaYMV	Barley yellow mosaic virus	Bymovirus
BCMV	Bean common mosaic virus	Potyvirus
BlCMV	Black eye cowpea mosaic virus	Potyvirus
BMV	Brome mosaic virus	Bromovirus
CABMV	Cowpea aphid-borne mosaic virus	Potyvirus
CaMV	Cauliflower mosaic virus	Caulimovirus
ClYVV	Clover yellow vein virus	Potyvirus
CMV	Cucumber mosaic virus	Cucumovirus
LMV	Lettuce mosaic virus	Potyvirus
MNSV	Melon necrotic spot virus	Carmovirus
PPV	Plum pox virus	Potyvirus
PSbMV	Pea seed-borne mosaic virus	Potyvirus
PVA	Potato virus A	Potyvirus
PVV	Potato virus V	Potyvirus
PVX	Potato virus X	Potexvirus
PVY	Potato virus Y	Potyvirus
RYMV	Rice yellow mottle virus	Sobemovirus
SMV	Soybean mosaic virus	Potyvirus
TBRV	Tomato black ring virus	Nepovirus
TBSV	Tomato bushy stunt virus	Tombusvirus
TEV	Tobacco etch virus	Potyvirus
TMV	Tobacco mosaic virus	Tobamovirus
ToRSV	Tomato ringspot virus	Nepovirus
TRSV	Tobacco ringspot virus	Nepovirus
TuMV	Turnip mosaic virus	Potyvirus
TVMV	Tobacco vein mottling virus	Potyvirus
WMV	Watermelon mosaic virus	Potyvirus
ZYMV	Zucchini yellow mosaic virus	Potyvirus

In	troduction	. 12
1	Généralités sur les mécanismes naturels de défense mis en place par les plantes1.1Mécanismes de défense non spécifiques.1.1.1Mécanisme de défense par l'interférence liée à ARN.1.1.2Mécanisme de défense liée au protéasome.1.2Résistances aux virus conférées par des gènes de résistance dominants.1.3Résistances aux virus conférées par des gènes récessifs.	. 14 . 14 . 14 . 16 . 17 . 20
2	 Biologie des Interactions hôte / Potyvirus. 2.1 Biologie des potyvirus. 2.2 Vue d'ensemble du cycle viral des potyvirus. 2.3 Traduction de l'ARN viral et transition vers l'étape de réplication : rôle de la VP du facteur eIF4E. 	. 22 . 23 . 24 g et . 27
3	Objectifs et contexte de la thèse. 3.1 Description du pathosystème Laitue/Virus de la mosaïque de la laitue. 3.2 Avancées récentes sur les études d'interactions hôte/virus dans le système LMV/laitue. 3.2.1 Dernières avancées sur les études de génomique fonctionnelle du LMV. 3.2.2 Identification et clonage du facteur d'initiation de la traduction, eIF4E, codé par le gène <i>mo1</i> . 3.2.3 Objectifs.	. 30 . 31 . 32 . 32 . 32 . 34 . 35
R	ésultats	. 37
1 (L	Cartographie des determinants moleculaires du virus de la mosalque de la laitue MV) responsables du contournement des gènes de résistance $mo1^1$ et $mo1^2$ chez la	
lai	 1.1 Construction des virus recombinants. 1.2 Comportement des virus recombinants sur variétés sensibles de laitue. 1.3 Comportement des virus recombinants sur variétés résistantes. 1.4 La sévérité des symptômes sur des variétés résistantes n'est pas contrôlée par la région échangée. 1.5 La région codant pour le domaine protéasique de la NIa n'est pas impliquée dans contournement de la résistance liée à Ls-eIF4E. 1.6 La VPg n'est pas le seul déterminant viral du contournement. 1.7 La région codant pour le domaine C-terminal de la CI et pour la 6K2 est impliqué dans la restauration de la compatibilité du LMV-E avec les variétés codant un des deux formes Ls-eIF4E¹ ou Ls-eIF4E². 1.8 La variété Floribibb comporte des facteurs affectant la mise en place des symptômes. 1.9 Limitations de l'utilisation de la recombinaison. 	. 38 . 38 . 40 . 42 . 43 . 43 . 43 . 44 . 43 . 44 . 45 . 46 . 46
2 L	Identification d'acides aminés impliqués dans la restauration de la compatibilité MV avec les variétés résistantes de laitue	du . 48

41 4 4		U
2.1	Approche par mutagenèse dirigée4	8

2.1.1 Désignation des acides aminés candidats dans le domaine	C-terminal de la CI.
2.1.2 Identification d'une position majeure impliquée dans le co	ntournement de
$mo1^{-}$ et $mo1^{-}$	
2.1.5 Designation des acides animes candidats dans la VPg	
2.2 Approche par inutagenese aleatorie.	J2
3 Détection spécifique d'isolats LMV appartenant au type « Most	»56
Discussion	
1. Rappel du contexte	
2. Le contournement de la résistance <i>mo1</i> par le LMV ne correspon « gène pour gène »	nd pas à un modèle 68
3. Etude de la diversité naturelle du LMV	69
4. Un modèle d'interaction entre les facteurs viraux identifiés et le	facteur eIF4E 71
5. Vers la validation du modèle d'interactions proposé	73
6. Rôle du complexe formé entre le facteur eIF4E et les facteurs vir le cycle viral	aux identifiés dans 76
7. Vers l'identification d'autres facteurs impliqués dans la compati	hilité du LMV et
les variétés de laitue résistantes	
les variétés de laitue résistantes	
les variétés de laitue résistantes	
 1 Matériel biologique	
 1 Matériels et Méthodes	81
 In the second duration duration of the second of	
 In the second duration duration duration of impliques duration duration duration of impliques duration in complete duration in	
 In the second duration duration duration is impliques duration duration duration is impliques duration in comparison duration in the second duration is in comparison duration in the second duration is in comparison duration in the second duration is in the second duration duration is in the second duration duration is in the second duration d	78 78 81 82 82 82 82 82 82 82 82 82 82 82 82 82 82 82 83 84 84 84 85 84 85 84 85 84 84 84 85 84
 Institution d'autres factors in priques dans il comparison d'autres factors in priques dans il comparison d'autres factors in priques dans il comparison de la comparis	78 78 81 82 82 82 82 82 83 83 83
 In the second duration of duration of the second of the second duration duration of the second duration o	78 78 81 82 82 82 82 82 83 83 83 83 83 83
 Intervention d'autres factors in propries dans in comparison d'autres factors in propries dans in comparison d'autres factors in propries dans in comparison de la comp	78 78 81 82 82 82 82 82 82 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83 84
1 Matériels et Méthodes 1 Matériel biologique 1.1 Les isolats de LMV utilisés 1.2 Les plantes 1.2.1 Matériel végétal 1.2.2 Inoculation mécanique du virus 1.2.3 Inoculation biolistique d'acides nucléiques 1.3 Les bactéries 1.3.1 Souches bactériennes 1.3.2 Milieux de culture 1.3.3 Transformation d'E coli par électroporation	78 78 81 82 82 82 82 82 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83 84 84
Image: Second state of the state of the property of the state of the property of the state	78 78 81 82 82 82 82 82 82 82 83 83 83 83 83 83 83 83 83 83 84 84 84 84 84
Image: Second state of the second s	78 78 81 82 82 82 82 82 82 82 82 82 82 82 82 83 83 83 83 83 83 83 83 84 84 85
Image: State of the state	78 78 81 82 82 82 82 82 82 82 82 82 83 83 83 83 83 83 83 83 84 85 86
 Intervention d'action des actions ac	78 78 81 82 82 82 82 82 82 82 82 82 82 82 83 83 83 83 83 83 83 83 84 84 85 86 86 86 86
 Matériels et Méthodes Matériels et Méthodes 1 Matériel biologique 1.1 Les isolats de LMV utilisés 1.2 Les plantes 1.2.1 Matériel végétal 1.2.2 Inoculation mécanique du virus 1.2.3 Inoculation biolistique d'acides nucléiques 1.3 Les bactéries 1.3.1 Souches bactériennes 1.3.2 Milieux de culture 1.3.3 Transformation d'E. coli par électroporation 1.4 Vecteurs de clonage 2 Techniques de manipulation des acides nucléiques 2 Précipitation des acides nucléiques 	78 78 81 82 82 82 82 82 82 83 83 83 83 83 83 83 83 83 84 84 85 86 87
1 Matériels et Méthodes 1 Matériel biologique 1.1 Les isolats de LMV utilisés 1.2 Les plantes 1.2.1 Matériel végétal 1.2.2 Inoculation mécanique du virus 1.3.1 Souches bactéries 1.3.1 Souches bactériennes 1.3.2 Milieux de culture 1.3.3 Transformation d'E. coli par électroporation 1.4 Vecteurs de clonage 2.1 Déprotéinisation des acides nucléiques 2.1 Déprotéinisation des acides nucléiques 2.1 Déprotéinisation des acides nucléiques 2.2 Précipitation des acides nucléiques 2.3 Purification d'acides nucléiques	78 78 81 82 82 82 82 82 82 82 82 82 82 82 83 83 83 83 83 83 83 83 84 84 84 84 84 84 85 86 87 87

	2.3.	2 Purification de fragments d'ADN après électrophorèse en gel d'agarose	. 87
	2.3.	3 Purification de produits obtenus par PCR	. 88
	2.4	Modifications enzymatiques	. 88
	2.4.	1 Les enzymes de restriction	. 88
	2.4.	2 L'ADN ligase du bactériophage T4	. 89
	2.4.	3 Les polymérases	. 89
	2.4.	4 Les nucléases	. 90
	2.4.	5 La phosphatase alcaline	. 90
	2.5	Séquençage enzymatique	. 90
	2.6	Séparation des acides nucléiques par électrophorèse en gel d'agarose	.91
	2.7	Techniques d'amplification de séquence par PCR	.91
	2.8	Mutagenèse dirigée par fusion-PCR	. 92
	2.9	Mutagenèse aléatoire par PCR	. 92
3	Тес	hniques d'analyse des nlantes infectées	92
J	31	Détection des protéines par ELISA	92
	3.2	Préparation des échantillons végétaux et détection par RT/PCR	.93
	3.2.	1 Immunocapture	.93
	3.2.	2 Purification des acides nucléiques totaux sur silice	.94
	3.2.	3 RT-PCR	.94
R	éféren	ces bibliographiques	. 95
A	nnexe.		106

Introduction

Au cours de leur existence, les plantes doivent faire face à de nombreux stress que ce soit les stress abiotiques, comme le stress hydrique, l'excès de sels ou la pollution, ou les stress biotiques comme les attaques des animaux ravageurs ou des agents phytopathogènes. Ces agents phytopathogènes se partagent en quatre catégories : les bactéries, les champignons, les nématodes et les virus, ces derniers nous intéressant tout particulièrement. L'ensemble de ces parasites est bien sûr à l'origine de nombreux dégâts auxquels les agriculteurs doivent faire face. Les dégâts provoqués par ces agents phytopathogènes consistent la plupart du temps en une baisse de rendement et/ou une altération de la production la rendant impropre à la vente ou la consommation. De plus, l'infection d'une plante par une de ces maladies affaiblit parfois ses défenses et augmente ainsi la possibilité de développer une autre maladie.

Autant la lutte contre certains de ces parasites peut être envisagée par le biais de traitements pesticides ou fongicides, autant il en est autrement en ce qui concerne les maladies provoquées par les virus : étant donné qu'il n'existe aucun traitement permettant de prévenir directement l'infection d'une plante par un virus ni d'en soigner les symptômes, les stratégies de lutte utilisées consistent à détecter de manière précoce les plantes infectées (et à les détruire pour éviter que la maladie ne se propage) et à choisir des variétés plus résistantes sur lesquelles les virus ne se multiplient pas ou ne provoquent pas de symptômes dommageables. Pour mettre en place ces stratégies, il importe de connaître au mieux le cycle de multiplication de ces virus et de s'intéresser plus particulièrement aux mécanismes d'interaction entre les virus et leurs hôtes que ce soit les interactions nécessaires à la propagation du virus et ainsi les inhiber au maximum ou les interactions impliquées lors des réaction de défense développées par les hôtes et les optimiser.

Dans cette optique, deux approches de recherche sont menées. La première s'attache à mieux connaître les virus en eux-mêmes : à les identifier et à les caractériser au niveau immunologique et moléculaire dans un premier temps, puis une fois leur génome connu, à étudier les fonctions des protéines virales et leurs implications dans les diverses propriétés biologiques des virus en question. La deuxième approche consiste à étudier les mécanismes de résistance en eux-mêmes, notamment par le biais de la génétique. Des gènes impliqués dans les diverses voies de défense sont ainsi identifiés puis leurs fonctions élucidées. Une combinaison de ces deux approches est indispensable pour avoir, au final, une vue d'ensemble du réseau d'interactions entre les facteurs du virus et de l'hôte mis en jeu tout au long du cycle viral et des réactions de la plante qui peuvent en découler.

Généralités sur les mécanismes naturels de défense mis en place par les plantes.

D'un côté, pour lutter efficacement contre les attaques virales sur les plantes d'intérêt économique, les acteurs de la recherche scientifique et de l'agriculture ont mis en place des mesures consistant à détecter puis détruire les plantes infectées, à pratiquer des rotations de cultures pour briser la propagation de virus phytopathogènes ayant une gamme d'hôtes réduite ou le contrôle des insectes vecteurs au moyen de produits chimiques. D'un autre côté, ceux-ci ont tôt fait de mettre à profit l'existence de plantes, d'intérêt économique ou non, montrant un développement viral limité voire une absence de symptômes face à ces virus. Et ce, en effectuant, quand c'est possible, un croisement entre la plante résistante au virus en question et la plante sensible d'intérêt suivi d'une série de croisements de manière à récupérer au final une plante aux caractères génétiques d'intérêt tout en conservant la résistance au virus. L'essor des connaissances en génétique moléculaire des virus de plantes, mais surtout des systèmes de défenses naturelles mis en place par leurs hôtes, a permis d'optimiser les stratégies de contrôle génétique des virus phytopathogènes.

1.1 Mécanismes de défense non spécifiques.

1.1.1 Mécanisme de défense par l'interférence liée à ARN.

Une autre propriété observée dans certains pathosystèmes a été étudiée et mise à profit dans la lutte contre les virus phytopathogènes : Wingard, dès 1928, a pu observer chez le tabac une « récupération » des plantes infectées par le TRSV (*Tobacco ringspot virus*), qui appartient au genre *Nepovirus*. Les symptômes provoqués par ce virus se caractérisent par les lésions nécrotiques sur les feuilles initialement infectées mais on peut observer une absence de symptômes sur les nouvelles feuilles apparues après l'infection. Ce phénomène a été observé et étudié par la suite dans d'autres pathosystèmes et notamment chez le chou-rave infecté par le CaMV (*Cauliflower mosaic virus*), un virus à ADN (Covey et al., 1997). On constate chez la plante infectée le même phénomène de récupération observé par Wingard et une analyse au niveau moléculaire montre que si l'infection se déroule normalement dans les premières feuilles infectées, la réplication virale est stoppée à cause d'une dégradation des ARN viraux

qui s'opère dans les feuilles ne développant aucun symptôme. Une étude sur Nicotiana clevelandii infectée par un autre nepovirus, le TBRV (Tomato black ring virus) a, par la suite, montré que cette dégradation était spécifique des ARN viraux et empêchait toute surinfection par un virus possédant une homologie de séquence suffisante avec le TBRV (Ratcliff et al., 1997). Depuis, ce mécanisme de défense identifié, selon les auteurs, comme de l'extinction génique post-transcriptionnelle (PTGS) ou interférence liée à l'ARN (RNAi) a été abondamment étudié ces dernières années (Baulcombe, 2004, Meister & Tuschl, 2004 pour revues). D'abord identifié chez les plantes, le PTGS a ensuite été découvert sur une grande variété d'organismes eucaryotes notamment les modèles animaux que sont Caenorhabditis elegans et Drosophila melanogaster (Kennerdell & Carthew, 1998, Plasterk, 2002). Il semble que le mécanisme de RNAi partagé par les organismes eucaryotes trouve une origine évolutive commune remontant aux eucaryotes primitifs. Dans les plantes modernes, la complexité avérée du mécanisme de RNAi se justifierait par des rôles multiples dans la défense de la plante contre les virus, la protection du génome contre les éléments transposables et la régulation de l'expression des gènes (Baulcombe, 2004, Meister & Tuschl, 2004). Il s'avère que certains virus phytopathogènes ont mis en place une contre-mesure efficace contre le PTGS en codant une protéine possédant une activité de suppression du PTGS (Moissiard & Voinnet, 2004 pour revue). Ce genre d'activité a été retrouvé à la fois chez des virus à ADN et à ARN et les protéines à l'origine de cette activité ne présentent aucune caractéristique structurelle commune. Un des modèles de la suppression du PTGS les plus étudiés est la protéine HcPro des potyvirus (Chapman et al., 2004, Dunoyer et al., 2004, Mallory et al., 2002) mais le mécanisme d'action du HcPro est encore mal connu et les données à ce sujet contradictoires. En revanche, les études sur la protéine P19 du TBSV (Tomato bushy stunt virus, Tombusvirus) montrent que ce suppresseur du PTGS interagit avec les siRNA et les miRNA, empêchant leur recrutement par le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex) possédant l'activité endoribonucléasique (Lakatos et al., 2004).

Le mécanisme de RNAi a été utilisé pour la protection des cultures sous deux de ses variantes : la prémunition ou protection croisée et la résistance par transgenèse. La prémunition consiste à protéger une plante de l'infection par une souche normale en l'inoculant préalablement par une souche faible du même virus (Goldbach et al., 2003). Dans la résistance par transgenèse, la séquence virale qui initie la réaction de RNAi est codée par un transgène, ce qui permet d'éviter les risques possibles liés à la présence d'un virus même faible (réversion vers la sévérité, attaque sur des cultures voisines, etc.). Cette approche est

utilisée de façon commerciale depuis les années 1990 comme par exemple les papayers transformés avec la CP du PRSV (*Papaya ringspot virus*, *Potyvirus*) (Gonsalves, 1998)

1.1.2 Mécanisme de défense liée au protéasome.

Des études récentes ont suggéré un rôle du protéasome, complexe protéique aux multiples activités catalytiques, dans un mécanisme encore inédit de défense contre la multiplication des virus, complémentaire du PTGS.

Le protéasome est un complexe protéique composé d'une partie centrale, l'unité 20S, conférant de multiples activités protéinasiques, secondée par deux complexes de régulation pouvant être une sous-unités 19S ou 11S (Figure 1). Le rôle majeur du protéasome est son activité protéinasique conduisant à la dégradation des protéines, lui donnant ainsi une position centrale dans nombres de processus cellulaires (Coux et al., 1996 pour revue). Outre ce rôle dans de multiples mécanismes cellulaires, il a été montré que l'activité protéolytique du protéasome pouvait jouer un rôle dans la dégradation spécifique de protéines virales via leur ubiquitinylation et ainsi conduire à inhiber la multiplication virale. Cela a été notamment démontré pour la protéine de mouvement du TMV (Tobacco mosaic virus, Tobamovirus) et pour la protéine de capside du CaMV (Cauliflower mosaic virus, Caulimovirus) (Karsies et al., 2001, Reichel & Beachy, 2000). Une étude sur le protéasome du tournesol a par ailleurs montré qu'on pouvait lui associer une activité endonucléasique ciblant spécifiquement les ARN (Ballut et al., 2003). D'un autre côté, il a été démontré que le protéasome pouvait interférer avec la traduction des ARN viraux chez le TMV (Homma et al., 1994) sans qu'il ait été montré à l'époque que l'activité endonucléasique tenait un rôle dans cette inhibition de la traduction. De par ses activités protéolytiques et endonucléasiques, le protéasome semble donc être au cœur d'un système de défense contre les virus complémentaire au mécanisme de PTGS.

D'ailleurs, comme pour le PTGS, alors que ces mécanismes de défense antivirale nouvellement identifiés ne sont pas encore clairement caractérisés, il a d'ores et déjà été démontré que les virus avaient mis en place des systèmes contrecarrant les activités du protéasome. Tout d'abord, certains virus animaux comme le *Hepatitis B virus* et le *Human immunodeficiency virus* produisent des protéines interagissant avec des sous-unités du protéasome et inhibant certaines activités protéolytiques (Apcher et al., 2003, Seeger et al., 1997, Zhang et al., 2000). Bien qu'aucun mécanisme visant les activités protéolytiques du

protéasome n'a été identifié chez les virus de plante, une étude récente a montré que le HcPro du LMV (*Lettuce mosaic virus, Potyvirus*) inhibait l'activité endonucléasique du protéasome tout en préservant, voire en stimulant légèrement, les activités protéolytiques de ce dernier (Ballut et al., submitted).

1.2 Résistances aux virus conférées par des gènes de résistance dominants.

Pour se protéger spécifiquement contre les pathogènes, les plantes ont développé un système de défense active basé sur la reconnaissance des micro-organismes phytopathogènes et notamment des virus qui nous intéressent. Le mécanisme le mieux connu à ce jour est la réaction dite hypersensible (HR) qui résulte en une mort cellulaire programmée des cellules environnant le point d'infection par l'organisme pathogène et qui consiste du point de vue macroscopique en une lésion nécrotique locale. Cette réaction permet de circonscrire l'infection localement et d'empêcher (sinon de limiter) la propagation du parasite au reste de la plante.

Cette réaction n'est possible que s'il y a une reconnaissance spécifique du pathogène par la plante, plus précisément entre une protéine produite par le pathogène (le gène d'avirulence) et une protéine produite par la plante exprimée à partir d'un gène dominant (gène R).

L'interaction, directe ou non, entre ces deux protéines entraîne l'activation d'une cascade de réactions entraînant la production de signaux, comme la modification des flux de calcium ou la génération d'ions superoxyde ou d'oxyde nitrique, conduisant à des réponses de types nécrotiques comme les lésions nécrotiques locales (Durner et al., 1998, Hammond-Kosack & Jones, 1996). Cette réaction de type HR a pu être observée contre une large gamme d'organismes phytopathogènes que ce soient des nématodes (Lagudah et al., 1997, Milligan et al., 1998), des bactéries (Pedley & Martin, 2003, Tai et al., 1999), des champignons (Ellis et al., 1997, Jia et al., 2000), des virus (Brommonschenkel et al., 2000) mais aussi certains insectes (Rossi et al., 1998). De nombreuses études ont été menées pour parvenir à l'identification, au clonage et au séquençage des gènes R intervenant à l'encontre de l'ensemble de ces différents pathogènes (voir Belkhadir et al., 2004 pour revue). Malgré la grande diversité des pathogènes visés par ce système de défense, les gènes R présentent une relativement faible variabilité. La classe de gènes R la plus communément retrouvée est celle dite NBS-LRR comprenant un site de fixation aux nucléotides (<u>Nucleotide Binding S</u>ite) et un

motif riche en leucine (Leucine-Rich Repeat) (Figure 2). Tous les gènes R impliqués dans la résistance aux virus font partie de cette classe. Les motifs de type LRR sont connus, chez d'autres protéines, pour leur capacité d'interaction avec d'autres protéines (Kajava & Kobe, 2002). Le motif NBS suggère une interaction du produit du gène R avec de l'ATP ou du GTP et un rôle dans l'activation de la cascade de réactions conduisant à la réponse nécrotique. Cette large classe de gènes R de type NBS-LRR peut être divisée selon la nature du domaine N-terminal. En effet, on peut retrouver des gènes R portant un motif TIR (Drosophila Toll/Human Interleukin-1 Receptor), un motif LZ (Leucine Zipper) ou encore un motif CC (coiled-coil). Ces domaines seraient impliqués dans l'interaction avec les partenaires de l'hôte en aval de l'étape de reconnaissance des facteurs d'avirulence et dans la modulation de l'activation qui s'ensuit.

Ces gènes R ont des spectres d'action plus ou moins larges. Certains ne permettent la reconnaissance que d'un pathotype voire d'un isolat spécifique d'un virus donné, d'autres confèrent une résistance à des virus de plusieurs espèces d'un genre donné. Par exemple, le gène Pot-2 chez Lycopersicon hirsutum ne confère une résistance que vis-à-vis de l'isolat PVY-LYE90 (PVY pour Potato virus Y) (Légnani et al., 1995) alors que le gène Rysto est efficace à la fois contre les espèces PVY, PVA (Potato virus A), PVV (Potato virus V) et TEV (Tobacco etch virus) appartenant au genre Potyvirus (Hamalainen et al., 1997, Hinrichs et al., 1997). Dans le cas de résistances multiples, des études montrent qu'un seul gène dominant peut en être à l'origine mais il peut s'avérer aussi que plusieurs gènes R de spectres d'action différents puissent être étroitement liés génétiquement et être localisés dans la même région génomique, formant ainsi un cluster. Cela a été démontré notamment chez le haricot où les gènes I, Bcm, Cam, Hsw, et Smv conférant une résistance au BCMV (Bean common mosaic virus), au BICMV (Black eye cowpea mosaic virus), au CABMV (Cowpea aphid-borne mosaic virus), au WMV (Watermelon mosaic virus) et au SMV (Soybean mosaic virus) respectivement (Fischer & Kyle, 1994, Kyle & Provvidenti, 1993). Fait intéressant, il a été montré que le gène Sw-5 identifié chez Lycopersicon peruvianum qui confère une résistance à un grand nombre d'espèces et d'isolats du genre Tospovirus reste fonctionnel quand il est transféré dans une autre plante hôte des tospovirus notamment Nicotiana tabacum (Spassova et al., 2001).

Cette dernière information laisse penser que les différentes espèces de plantes partagent les mêmes voies de transduction impliquées dans le mécanisme de résistance de type HR et que seules les présences d'un gène de résistance R et du facteur d'avirulence et l'interaction spécifique entre ces deux partenaires conditionnent la mise en place de la réaction HR. Mais

la résistance au champignon *Magnaporthe grisea* chez le riz est le seul cas démontrant que l'interaction directe entre le gène d'avirulence, *AVR-Pita*, et le gène de résistance à LRR, *Pi-ta* permet la mise en place de la résistance (Jia et al., 2000). En effet, ce genre d'interaction a été recherché dans de multiples systèmes biologiques sans avoir été démontré. Des études récentes menées chez *Arabidopsis thaliana* sur deux gènes de résistance de type NBS-LRR, *RPM1* et *RSP2*, ont permis d'envisager un nouveau modèle de mécanisme concernant la mise en place de ce type de résistance, l'hypothèse dite « de garde » émise pour la première fois en 2001 (Dangl & Jones, 2001, Marathe & Dinesh-Kumar, 2003).

Les produits des gènes de résistance R n'interagiraient pas directement avec le facteur d'avirulence pour provoquer la réaction de défense mais ils « contrôleraient », interagiraient avec des protéines de l'hôte, différentes des protéines NBS-LRR, dont l'activité serait modifiée en fonction de la présence ou de l'absence des facteurs d'avirulence. Si l'activité de cette protéine intermédiaire est modifiée ou inhibée, la réaction hypersensible se met en place. L'absence de facteur d'avirulence ou son incompatibilité avec la protéine intermédiaire n'entraîne pas l'activation de la résistance (**Figure 3**).

Chez A. thaliana, les facteurs d'avirulence, AvrB et AvrRpm1, produits par Pseudomonas syringae, interagissent avec la protéine RIN4, facteur inhibant les mécanismes de défense de l'hôte mises en place de façon basale, et entraînent sa phosphorylation ce qui augmenterait son activité. La protéine RPM1, de type NBS-LRR, est stabilisée, indirectement ou non, par RIN4 et, selon le niveau de phosphorylation de RIN4, activerait une cascade spécifique de réactions de défense (Mackey et al., 2002). Toujours dans le même système biologique, le facteur d'avirulence AvrRpt2 entraînerait la dégradation de la protéine RIN4 et la protéine RPS2, de type NBS-LRR, détecterait l'absence de RIN4 et enclencherait une autre cascade de signaux spécifique menant à la réaction de défense (Axtell & Staskawicz, 2003, Mackey et al., 2002). A ce jour, cette « hypothèse de garde » n'a pu être illustrée que dans le pathosystème P. syringae/A. thaliana. Cependant, d'après les bases de données d'EST (Expressed Sequence Tags), il existe des protéines homologues à RIN4 chez le soja, la tomate et la pomme de terre. De même, des réponses hypersensibles provoquées par les facteurs d'avirulence AvrB et AvrRpt2 ont pu être mises en évidence chez le soja et le tabac (Ashfield et al., 1995, Peart et al., 2002). Tout ceci laisse penser que le mécanisme centré autour de la protéine RIN4, ou du moins qu'un mécanisme fonctionnant selon le même concept, pourrait se retrouver dans d'autres pathosystèmes faisant intervenir les résistances dominantes et résultant en une réaction HR.

Il existe d'autres types de résistances conférées par des gènes de résistance dominants. Ces résistances entraînant des réponses non nécrotiques face aux phytopathogènes, les mécanismes sous-jacents ne sont probablement pas les mêmes que ceux impliqués lors de la résistance de type HR. Là où les gènes R induisent un mécanisme de défense que l'on pourrait qualifier « d'actif », dans le sens où la présence du pathogène (production de facteur d'avirulence) induit un ensemble de réactions si le contexte est favorable (expression d'un gène R adéquat), ces autres gènes de résistance dominants agiraient de manière « passive » : exprimés dans la plante hôte saine à un même niveau que dans la plante infectée, le produit de ces gènes inhiberait la multiplication du virus ou sa propagation au reste de la plante. Ce mode d'action peut être illustré notamment par les gènes de résistance dominants RTM-1 et RTM-2 identifiés chez Arabidopsis thaliana et qui confèrent une résistance au TEV, en empêchant sa propagation au niveau du reste de la plante (Chisholm et al., 2000, Whitham et al., 2000). Une analyse fonctionnelle de ces deux gènes révèle qu'ils codent respectivement pour une protéine comportant un motif de type « jacaline » et une protéine présentant des homologies avec les protéines de choc thermique, ces deux protéines étant exprimées au niveau du phloème, plus particulièrement au niveau des tubes criblés (Chisholm et al., 2001). Ces protéines feraient partie d'un complexe structurel du phloème impliqué dans le transport des protéines dont la conformation empêcherait le TEV de transiter via le phloème dans le reste de la plante. Une hypothèse alternative serait que le complexe auquel appartiennent les protéines RTM-1 et RTM-2 participerait au transport vers le reste de la plante d'un signal de défense dirigé spécifiquement contre le TEV.

1.3 Résistances aux virus conférées par des gènes récessifs.

Toutes les résistances ne sont pas associées à des gènes uniques dominants. Une classe très importante est également constituée des résistances à déterminisme récessif. Selon certains auteurs, ces résistances représentent 20 à 40 %, voire plus de 60 % selon les sources, des gènes de résistance identifiés chez les plantes cultivées (Diaz-Pendon et al., 2004, Provvidenti & Hampton, 1992). Deux hypothèses (émises par Fraser, 1992) sont communément admises en ce qui concerne le mécanisme de défense lié à ces gènes : soit la forme dominante codée par ces derniers est un facteur de l'hôte indispensable à la multiplication virale, soit l'allèle dominant code pour un régulateur négatif de la résistance. L'étude de ces gènes de résistance récessifs est doublement intéressante, d'une part parce qu'il s'avère que les résistances de ce

type semblent plus durables que les résistances conférées par les gènes dominants (Fraser, 1992, Lecoq et al., 2004) et d'autre part, parce qu'identifier et caractériser ces gènes récessifs permet de mieux comprendre les étapes du cycle viral dans lesquelles ces facteurs de l'hôte sont impliqués. Les données ainsi recueillies pour une espèce virale pouvant être éventuellement transposées sur d'autres espèces au fonctionnement présumé similaire.

Les résistances conférées par des gènes de résistance récessifs semblent principalement se diriger contre les virus plutôt qu'envers d'autres agents phytopathogènes (voir Diaz-Pendon et al., 2004 pour revue). Malgré cela, ce type de résistance a été globalement moins étudié que les résistances conférées par les gènes dominants. L'ensemble des données concernant les virus tend à confirmer la première hypothèse sur le mécanisme de ce type de résistance, les allèles dominants étant des facteurs intervenant dans le cycle viral et indispensables à la multiplication du virus dans la plante alors que la seconde hypothèse n'a pu être illustrée que dans le cas de résistances à des champignons, l'oïdium *Erysiphe graminis*, chez l'orge, conférée par une mutation, récessive, du gène *Mlo* (Buschges et al., 1997) et *Erysiphe cichoracearum*, chez *A. thaliana*, par une mutation du gène *edr1* (Frye & Innes, 1998).

Les produits codés par les gènes récessifs de résistance aux virus peuvent potentiellement intervenir dans chacune des étapes du cycle viral mais dans la réalité la grande majorité empêche la multiplication virale au niveau cellulaire et à ce jour seule une résistance récessive semble agir au niveau du mouvement de cellule à cellule (Nicolas et al., 1997). D'après les données actuelles, alors que de nombreux gènes récessifs impliqués dans les résistances naturelles aux virus ont été identifiés et positionnés sur une carte génétique, peu d'entre eux ont été clonés et séquencés (Diaz-Pendon et al., 2004). La majorité des gènes récessifs identifiés concernent d'ailleurs les potyvirus, probablement parce que ce genre est le plus représenté chez les virus phytopathogènes. Ainsi, le clonage des gènes de résistance au LMV mol^1 et mol^2 chez la laitue, du locus de résistance pvr2 au PVY chez le poivron et du gène sbm1 de résistance au PSbMV (Pea seed-borne mosaic virus) chez le pois a permis d'identifier dans ces trois cas le gène eIF4E codant pour un facteur d'initiation de la traduction des ARN messagers (Gao et al., 2004, Nicaise et al., 2003a, Ruffel et al., 2002). Des résultats similaires ont été obtenus sur d'autres genres viraux lors d'études très récentes avec le clonage de nsv, le gène de résistance au MNSV (Melon necrotic spot virus, *Carmovirus*) (Orjeda et al., 2004), le clonage positionnel des mutants *cum1* et *cum2*, conférant la résistance au CMV (Cucumber mosaic virus, Cucumovirus), codant pour les facteurs de traduction eIF4E et eIF4G (Yoshii et al., 2004) et l'identification d'un gène de résistance au RYMV (Rice yellow mottle virus, Sobemovirus) codant lui aussi pour eIF4G (Albar et al., 2003, Boisnard et al., 2004). Une des hypothèses admises aujourd'hui est que ces facteurs de l'hôte participeraient à la traduction des ARN viraux et les formes codées par les allèles récessives de ces gènes ne pourraient pas être recrutées par les ARN viraux. Une autre hypothèse alternative, se basant sur l'observation des phénotypes de résistance limitant le mouvement de cellule à cellule (Nicolas et al., 1997) et sur la capacité de eIF4G à se fixer aux microtubules (Bokros et al., 1995), a été émise (Gao et al., 2004, Lellis et al., 2002) : les facteurs eIF4G et eIF4E participeraient au mouvement de protéines virales à travers la cellule vers le noyau, *via* les voies de trafic nucléo-cytoplasmiques, dans le but de réguler l'expression de certains gènes de l'hôte, ou encore à la translocation de la particule virale dans une cellule voisine à travers le plasmodesme. Dans ce dernier cas, les facteurs d'initiation de la traduction « embarqués » vers la cellule voisine participeraient à la traduction de la première polyprotéine virale et initiant ainsi un nouveau cycle viral.

2 Biologie des Interactions hôte / Potyvirus.

А ce jour. l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/index.htm), a répertorié 17 familles de virus et viroïdes phytopathogènes réparties elles-mêmes en 81 genres (van Regenmortel et al., 2000). Parmi ceux-ci, un genre en particulier, le genre Potyvirus (du nom de son membre-type, Potato virus Y ou PVY), compte le plus grand nombre d'espèces (139 espèces reconnues à ce jour). Bien que ces virus aient chacun une gamme d'hôtes relativement restreinte et se limitent pour la plupart à seulement quelques espèces de plantes, les potyvirus sont responsables de pertes agricoles importantes dans le monde entier. De plus, lorsqu'un potyvirus s'avère être peu virulent, il sensibilise souvent les plantes à une surinfection par d'autres agents phytopathogènes ou est capable, en synergie avec d'autres virus, de provoquer des symptômes plus importants (Shukla et al., 1994). Ce phénomène de synergie est dû à l'effet inhibiteur de RNAi exercé par la protéine HcPro (Anandalakshmi et al., 1998, Shi et al., 1997). L'importance économique des potyvirus par rapport aux autres genres de virus phytopathogènes en a fait un sujet de recherche de choix pour mener à une meilleure compréhension des interactions entre un virus et ses hôtes et, à terme, une optimisation de la lutte contre ces pathogènes.

Introduction

2.1 Biologie des potyvirus.

Les potyvirus sont caractérisés par des particules non enveloppées, flexueuses à symétrie hélicoïdale longues de 680 à 900 nm et larges de 11 à 15 nm (Figure 4). Elles sont composées d'environ 2000 copies d'une seule protéine de capside (CP) qui protègent l'ARN viral simple brin polyadénylé en 3' (Hari et al., 1979) et lié en 5' de façon covalente à une protéine virale, la VPg (viral protein genome-linked) (Hari, 1981). Le génome viral de 10 kb environ possède un seul cadre ouvert de lecture qui code pour une polyprotéine de 340 à 370 kDa, qui est ensuite maturée de manière co- ou post-traductionnelle en produits intermédiaires de clivage ou directement en produits finis par des protéinases virales. L'organisation génomique des potyvirus est représentée sur la **Figure 5**. Une autre des caractéristiques communes des virus appartenant au genre *Potyvirus* est la présence d'inclusions cytoplasmiques en roues à aube ou 'pinwheels' (Edwardson, 1974) dans le cytoplasme des cellules végétales infectées. Ces corps d'inclusion typiques sont constitués à partir d'une protéine virale, nommée CI (Cylindrical Inclusion). Outre ce critère phénotypique de l'infection, les potyvirus partagent un mode de transmission par pucerons selon un mode non persistant. De plus, certaines espèces de potyvirus ont la capacité d'être transmis par la graine. Les premiers séquençages d'espèces potyvirales, comme par exemple pour le TVMV (Domier et al., 1986), et la comparaison de leur séquences avec celles d'autres groupes viraux mieux connus infectant les plantes ou les animaux ont permis de proposer des fonctions aux divers produits de la traduction des ARN potyviraux (Lain et al., 1989). Plus tard, l'obtention des premiers clones infectieux complets et l'application d'approches de génétique inverse (mutagenèse, construction de virus chimériques), mais aussi l'utilisation de clones infectieux « marqués » (via l'insertion entre deux séquences de sites de clivage d'un gène rapporteur codant par exemple pour la ßglucuronidase (Dolja et al., 1992) ou la GFP, Green Fluorescent Protein (German-Retana et al., 2000)) ont permis de vérifier in vivo les fonctions supposées de ces protéines virales. Depuis ces premières avancées, nombres de données sur la fonction des protéines des potyvirus ont été accumulées (Riechmann et al., 1992, Urcuqui-Inchima et al., 2001 pour revues). Tout en gardant à l'esprit que, du fait du faible nombre de gènes viraux, ces protéines sont dotées chacune de multiples fonctions, il apparaît que les protéines codées de la portion N-terminale de la polyprotéine participent à des mécanismes de mouvement alors que les protéines de la portion C-terminale ont plutôt un rôle dans la réplication. Un aperçu des propriétés biologiques et biochimiques de l'ensemble de ces protéines est compilé dans la Figure 6 sachant que toutes les protéines virales ont un rôle plus ou moins direct dans l'amplification du génome du virus et qu'il a été démontré que toutes avaient la capacité d'interagir avec l'ARN, mises à part les protéines P3, 6K1 et 6K2.

L'ensemble des données recueillies lors de l'étude des fonctions des protéines virales, des bases moléculaires du pouvoir pathogène des virus ainsi que celles concernant la caractérisation des mécanismes de défense développés par les plantes ont permis de lever le voile sur de multiples étapes du cycle des potyvirus qui nous intéressent ici. Ces données, outre leur intérêt intrinsèque concernant la connaissance de la biologie des potyvirus, peuvent parfois être transposées à d'autres virus à ARN en partant sur l'hypothèse que ces virus partagent des modes de fonctionnement communs. Inversement, selon la même logique, certains aspects peu ou pas étudiés du cycle des potyvirus peuvent être spéculés sur la base des informations recueillies sur d'autres espèces virales présentant une biologie similaire. La synthèse qui suit est centrée essentiellement sur les avancées concernant l'identification des facteurs d'hôtes des potyvirus et la signification de leurs interactions avec les facteurs viraux au cours du cycle viral, plus particulièrement de la phase de traduction qui est à ce jour la mieux étudiée chez les potyvirus. Je conseille aux lecteurs s'intéressant à une étude détaillée des propriétés biochimiques et biologiques des protéines des potyvirus de se référer aux revues publiées par Urcuqui-Inchima en 2001 et par Riechmann en 1992 (Riechmann et al., 1992, Urcuqui-Inchima et al., 2001). De même, la revue de Revers publiée en 1999 constitue une source abondante de données sur la biologie des potyvirus et de leur cycle viral tout en étant plutôt orientée sur le rôle qu'y tiennent les protéines virales (Revers et al., 1999).

2.2 Vue d'ensemble du cycle viral des potyvirus.

Le cycle d'un potyvirus consiste d'abord en l'infection d'une cellule végétale par une ou plusieurs particules virales. Très peu de données ont été obtenues à ce sujet chez les potyvirus. Le seul modèle d'étude concernant l'entrée dans la cellule et le désassemblage de l'architecture capsidique d'un virus filamenteux est le TMV (Shaw, 1999).

La prochaine étape dans le cycle de multiplication est la traduction de l'ARN en une polyprotéine qui sera elle-même clivée en cis- tout d'abord puis en trans- par des protéases virales (**Figure 7**). Les informations sur les potyvirus concernant cette étape de traduction sont nombreuses et ont été obtenues notamment grâce aux récentes avancées sur

l'identification des gènes de résistance récessifs et aux études d'interaction entre facteurs d'avirulence et facteurs de l'hôte. Une brève synthèse concernant la traduction des potyvirus est présentée dans le paragraphe 2.3.

Le cycle viral est ensuite marqué par la constitution d'un complexe de réplication et la mise en place d'une stratégie d'amplification du génome viral via la synthèse de brins d'ARN à polarité négative dans un premier temps puis de brins d'ARN à polarité positive. Les données concernant la réplication chez les potyvirus ne sont pas nombreuses et les hypothèses sur cette étape se basent surtout sur les similitudes de structures génomiques et de stratégies de fonctionnement entre les potyvirus et des virus beaucoup mieux étudiés comme les virus de la famille des Picornaviridae, voire d'autres virus à ARN. Les données concernant la réplication de ces derniers est extrêmement abondante et parfois contradictoire (Agol et al., 1999, Andino et al., 1999 pour revue sur les picornavirus, Ahlquist et al., 2003, Noueiry & Ahlquist, 2003 pour revue sur le BMV). Les seules données existantes sur le mécanisme de réplication des potyvirus sont l'identification des protéines appartenant au complexe de réplication. Chez les potyvirus, les dix protéines codées par le génome viral semblent indispensables à l'amplification du génome et sept ont la capacité de se lier à l'ARN (Urcuqui-Inchima et al., 2001) mais parmi celles-ci la NIb, la NIa, la CI et la 6K2 semblent avoir un rôle prépondérant dans la réplication de part leurs fonctions principales présumées : la NIb possède une activité enzymatique ARN polymérase ARN-dépendante (Hong & Hunt, 1996), la protéine 6K2 participerait à l'ancrage du complexe réplicatif dans la membrane du réticulum (Schaad et al., 1997a), la protéine NIa interagit avec la proteine NIb pour potentialiser l'amplification génomique (Fellers et al., 1998) et il a été démontré que la protéine CI avait une activité hélicasique en son domaine N-terminal (Lain et al., 1990), cette hélicase participerait à la réplication en déroulant les structures d'ARN double brin constituant la forme intermédiaire de réplication.

Les nouvelles particules virales transitent ensuite de cellule à cellule *via* les plasmodesmes, organelles de communication dite symplasmique entre les cellules végétales, jusqu'aux tissus conducteurs du phloème. Pour cette étape également, peu d'informations sont disponibles concernant les potyvirus. Les analyses de séquences des génomes potyviraux n'ont pas permis de trouver d'homologie avec des protéines de mouvement connues chez d'autres espèces virales comme la protéine 25K du PVX ou la protéine 30K du TMV (Atabekov & Taliansky, 1990 pour revue). Des approches de génétique fonctionnelle montrent cependant que la CP, la

CI et la VPg sont potentiellement impliqués dans la translocation de la particule virale de cellule à cellule. Des approches par microscopie électronique ou par micro- injection montrent toutefois que la CP et la CI sont associées au plasmodesme (Roberts et al., 1998, Rodriguez-Cerezo et al., 1997) et que la CP et le HcPro entraînent une augmentation de la taille limite d'exclusion du plasmodesme (Rojas et al., 1997). Malgré ces données, le rôle de la CI dans la translocation de la particule virale à travers le plasmodesme doit encore être démontré.

Le mouvement de cellule à cellule est suivi du mouvement à longue distance. Cette étape consiste au passage de la particule virale des cellules du parenchyme périvasculaire vers le parenchyme du phloème et les cellules compagnes pour gagner les tubes criblés et être véhiculée vers le reste de la plante (Carrington et al., 1996 pour revue). Au vu de la complexité de ces processus, peu d'éléments viennent donner une indication sur les mécanismes sous-jacents. Une fois encore, des approches de génétique fonctionnelle des potyvirus mais aussi l'utilisation de virus marqués par des gènes rapporteurs, indiquent que la CP, la VPg et le HcPro avaient un rôle dans le mouvement à longue distance.

L'infection systémique de la plante mène chez la plupart des potyvirus à l'expression de symptômes. On suppose que le déterminisme moléculaire peut en être très varié que ce soit dû à la mise en place de réactions de défense par la plante ou à une modification de la physiologie de la plante *via* une régulation active de l'expression des gènes de l'hôte par le virus à son propre compte. L'apparition des symptômes peut aussi être provoquée par le bouleversement du schéma biochimique et développemental de la plante dû à une interférence des mécanismes de régulation endogène provoquée par la simple présence du virus. Cependant, l'ampleur de ces bouleversements rend difficile l'étude des mécanismes des mécanismes de la symptomatologie. Malgré cela plusieurs déterminants moléculaires viraux ont pu être identifiés (Revers et al., 1999). Une hypothèse séduisante impliquant la fonction suppressive de la RNAi a été émise : il a été démontré chez A. thaliana que le suppresseur de RNAi du TuMV, le précurseur de maturation P1-HcPro, interférait avec la RNAi régulant l'expression de certains gènes endogènes via des micro-ARN (miRNA). Dans ce cas là, il s'agissait d'ARNm impliqués dans le développement d'A. thaliana dont le clivage est nécessaire à un moment donné du développement. L'infection par le TuMV, donc la présence du suppresseur de RNAi, interfère avec la régulation du développement (Kasschau et al., 2003). Cette hypothèse pourrait être extrapolée, les potyvirus interférant avec la régulation d'autres gènes que ceux impliqués dans le développement, déréglant ainsi l'équilibre de la physiologie de la plante et provoquant l'apparition de symptômes.

La dernière étape du cycle viral concerne la transmission des potyvirus à d'autres plantes saines. Les deux voies de transmission des potyvirus sont la transmission par pucerons et pour certains d'entre eux la transmission par la graine. Concernant la transmission par pucerons, les deux seules protéines virales impliquées semblent être la CP et HcPro. Une étude montre l'interaction entre la CP et HcPro du TVMV au niveau de motifs conservés indispensables à la transmission par pucerons (Blanc et al., 1997). L'hypothèse communément admise est que HcPro jouerait le rôle de pont entre la CP et le stylet du puceron, en recouvrant la particule virale. Les études sur la transmission par la graine ont été essentiellement menées sur le PSbMV et montrent que cette transmission nécessite l'infection des tissus embryonnaires (Wang & Maule, 1992) avant que le suspenseur ne disparaisse lors des premiers stades du développement embryonnaire (Wang & Maule, 1994). Il n'est donc pas surprenant de constater que les déterminants viraux de la transmission par la graine, HcPro et la CP, soient des protéines impliquées dans le mouvement des potyvirus (Johansen et al., 1996).

2.3 Traduction de l'ARN viral et transition vers l'étape de réplication : rôle de la VPg et du facteur elF4E.

Cette étape de traduction est primordiale et c'est la première étape du cycle viral à l'intérieur d'une cellule, dans le sens où les virus à ARN à polarité positive ne sont pas connus pour encapsider des protéines comme la réplicase qui permettrait d'initier l'amplification du génome dès l'entrée dans la cellule. L'ARN des potyvirus se différencie des ARN messagers cellulaires par l'absence en 5' de la coiffe nécessaire à ces derniers pour recruter les facteurs d'initiation de la traduction et le ribosome. Chez les potyvirus, cette coiffe est remplacée par une protéine virale liée de manière covalente à l'extrémité 5', la VPg.

Dans le paragraphe 1.3., nous avons vu qu'une majorité des résistances aux virus et notamment aux potyvirus étaient contrôlées par des gènes récessifs et que ceux qui ont été identifiés et clonés codaient pour un facteur d'initiation de la traduction eIF4E ou eIF4G. Des approches de génétique inverse ont été menées dans de nombreux modèles plante/potyvirus pour identifier les facteurs viraux qui conditionnaient le contournement de ce type de

résistance par certaines souches. Etant donné que les facteurs de l'hôte codés par les allèles récessifs de ces gènes de résistance sont potentiellement impliqués dans le cycle des potyvirus, ces approches de génétique inverse permettraient d'identifier les protéines virales qui interagissent directement avec ces facteurs nécessaires à l'accomplissement du cycle viral, en l'occurrence lors de l'initiation de la traduction de l'ARN viral.

A ce jour, sur huit gènes de résistance étudiés, il a été montré dans sept d'entre eux que la VPg était le facteur de contournement (ou la région codant pour la P3 et la 6K1 pour un seul d'entre eux, le modèle *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV)/*sbm2* chez le pois (Johansen et al., 2001)) : cela a été démontré une nouvelle fois dans le cas du PSbMV où un petit nombre de changements d'acides aminés dans la VPg permettent de contourner la résistance conférée par le gène *sbm-1* chez le pois (Keller et al., 1998), du *Tobacco vein mottling virus* (TVMV) et le gène *va* du tabac (Nicolas et al., 1997), du *Clover yellow vein virus* (ClYVV) chez le haricot (Sato et al., 2003), du TEV chez le tabac (Schaad et al., 1996) et du PVY et le gène *pot-1* chez la tomate et le gène *pvr2* chez le poivron (Moury et al., 2004). Dans un genre voisin, le genre *Bymovirus*, c'est également le cas du *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV) pour le gène *rym4* du riz (Kuhne et al., 2003).

D'un autre côté, le criblage d'une banque d'ADNc d'*A. thaliana* contre la VPg du TuMV a permis de montrer que cette protéine virale interagissait avec le facteur d'initiation de la traduction eIF(iso)4E (Wittmann et al., 1997b). Une interaction similaire a pu être identifiée entre la VPg du TEV avec le facteur eIF4E de la Tomate et du Tabac (Schaad et al., 2000). Il a été démontré que l'interaction entre la VPg avec le facteur eIF(iso)4E ou le facteur eIF4E était nécessaire à l'infectiosité du TuMV et permettait l'augmentation de la multiplication du TEV respectivement (Leonard et al., 2000, Schaad et al., 2000). Il a été aussi montré, chez *A. thaliana*, que des mutations altérant le facteur eIF(iso)4E provoquent une insensibilité au TuMV, au TEV et au LMV (Duprat et al., 2002, Lellis et al., 2002). Enfin, *pvr2*, le gène récessif de résistance au PVY et au TEV chez le poivron, a été identifié comme étant le gène *eIF4E* (Ruffel et al., 2002).

Dans la cellule végétale, le facteur d'initiation de la traduction eIF4E a la capacité d'interagir avec la coiffe des ARN messagers et participe au sein du complexe eIF4F au recrutement d'autres facteurs de traduction dont la petite sous-unité ribosomale et à la circularisation de l'ARNm permettant ainsi l'initiation de la traduction (Gallie, 2002 pour revue). Dans une cellule infectée par un potyvirus, la VPg de l'ARN viral jouerait le rôle de coiffe et interagirait avec le facteur eIF4E pour initier la traduction de l'ARN viral (**Figure 8**).

Chez d'autres virus possédant également une VPg, notamment les picornaviridae, il s'avère que la région 5' non traduite forme une structure secondaire, un site interne d'entrée du ribosome ou IRES (Internal Ribosome Entry Site) permettant une initiation de la traduction indépendante de la coiffe (Kolupaeva et al., 1996). Chez les potyvirus, ce type de structure IRES a été retrouvé et étudié chez le TEV, permettant la traduction d'ARN viraux sous la dépendance du facteur d'initiation de la traduction eIF4G (Gallie, 2001) mais cela reste à ce jour le seul exemple mentionnant une activité de traduction indépendante de la coiffe chez les potyvirus.

Bien qu'en ce qui concerne les potyvirus, aucun élément nous permette de trancher parmi ces deux hypothèses, une étude menée sur un virus animal, le *Norwalk virus* (NV, *Calicivirus*), montre que la VPg interagit avec la sous-unité eIF3D du facteur d'initiation de la traduction eIF3 et que cette interaction inhibe la traduction dépendante des structures IRES (Daughenbaugh et al., 2003). On pourrait imaginer en transposant cette information chez les potyvirus que les deux modes d'initiation de la traduction sont envisageables dans la cellule infectée et que la traduction dépendante de la coiffe, et donc de l'interaction VPg-eIF4E, est prépondérante par rapport à l'initiation de la traduction *via* une éventuelle structure IRES. On peut noter l'existence d'une troisième voie d'initiation de la traduction chez le PPV (*Plum pox virus*) où un mécanisme de « leaky scanning » peut se mettre en place, sachant que ce mécanisme est tributaire de la présence d'un codon AUG en amont du codon d'initiation (Simon-Buela et al., 1997).

Des facteurs de l'hôte nécessaires au cycle viral ont pu être identifiés dans d'autres systèmes biologiques, notamment chez des mutants de *Saccharomyces cerevisiae* entraînant une incapacité du BMV (*Brome mosaic virus*, *Bromovirus*) à s'y multiplier. Cette approche a donc permis d'identifier, entre autres, deux facteurs impliqués dans la traduction ou la régulation de la traduction : le facteur DED1, une hélicase à ARN impliquée dans l'initiation de la traduction des ARNm de la levure (Noueiry et al., 2000) et le facteur LSM1, appartenant à un complexe de dé-adénylation des ARNm dont le rôle dans la levure est d'en faciliter le renouvellement, en régulant ainsi la traduction (Diez et al., 2000). Dans le cas du BMV, ce facteur LSM1 interagirait avec des éléments de la portion 5' des ARN viraux pour participer à la transition entre la traduction et la réplication virale. Il est intéressant de constater qu'un facteur similaire, Hfq, intervient dans l'initiation de la synthèse du brin négatif chez le bactériophage Q β (Sledjeski et al., 2001).

Dans le même ordre d'idée, chez le BMV et le TMV, une interaction entre les réplicases de ces virus et une sous-unité du facteur d'initiation de la traduction eIF3 a pu être recensée (Osman & Buck, 2003, Quadt et al., 1993). Le facteur eIF3 interagissant, dans le cadre de la traduction, avec les ARNt et la sous-unité 40S du ribosome, ce facteur interagirait avec les structures secondaires tige-boucle, similaire aux ARNt, présentes dans les structures de la portion 5' des ARN viraux du BMV et du TMV, jouant ainsi un rôle régulateur dans la transition traduction-réplication (Ahlquist et al., 2003).

Chez les potyvirus, une étude a montré une interaction entre la réplicase NIb du ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*) et la PABP (poly(A) binding protein) du concombre (Wang et al., 2000). Cette protéine se lie à la queue poly(A) retrouvée en 3' des ARNm et de l'ARN viral des potyvirus et participe, *via* une interaction avec le facteur eIF4G, à la circularisation de l'ARN (Gallie, 2002). Récemment, il a été démontré que les précurseurs VPg-NIaPro et 6K2-VPg-NIaPro du TuMV interagissaient non seulement avec eIF4E de *Brassica perviridis* mais aussi avec la PABP (Leonard et al., 2004). Sans fournir d'indication supplémentaire quant aux significations biologiques de ces interactions, ces données suggèrent que chez les potyvirus, comme chez les autres virus à ARN positif, les étapes de traduction et de réplication sont étroitement liées et que la transition entre les deux est facilitée par les interactions entre ces protéines virales multifonctionnelles, les protéines de l'hôte impliquées dans l'initiation de la traduction et la stabilité des ARNm et l'ARN viral.

L'ensemble de ces données laisse penser que l'étape d'initiation de la traduction durant laquelle la VPg et le facteur eIF4E interagissent est centrale dans le cycle viral et qu'une modification de ces interactions est plus susceptible de conditionner l'accomplissement du cycle qu'une modification intervenue à un autre niveau. L'initiation de la traduction de l'ARN viral est à ce jour l'étape la plus précoce du cycle où une interaction entre une protéine virale et une protéine de l'hôte a été mise en évidence. On peut donc imaginer que cette interaction est l'étape la plus limitante concernant la mise en place de l'infection par le potyvirus. Ceci peut expliquer que les études s'intéressant aux gènes de résistance récessifs et aux propriétés de contournement de ces gènes n'ont pu démontrer que l'implication de protéines potentiellement impliquées dans l'étape de traduction virale.

3 Objectifs et contexte de la thèse.

Mon travail de thèse s'est focalisé sur un pathosystème particulièrement étudié au laboratoire, ce système faisant intervenir le LMV (*Lettuce mosaic virus*) et la laitue, son hôte privilégié. L'objectif étant d'étudier les mécanismes d'interactions entre les potyvirus et leurs hôtes, le travail a consisté à étudier et identifier les facteurs du LMV mis en jeu dans la capacité de certains isolats à se multiplier sur des variétés de laitue exprimant une des deux formes d'eIF4E, codées par les allèles récessifs du gène *mo1*, incompatibles avec la multiplication d'isolats communs du LMV.

3.1 Description du pathosystème Laitue/Virus de la mosaïque de la laitue.

La laitue cultivée appartient à la famille des *Asteraceae*, sous-famille *Cichoreae*, genre *Lactuca*, espèce *sativa*. C'est un légume très consommé dans le monde et sa production mondiale atteint 20,8 millions de tonnes en 2003 (données FAOSTAT), dont 3,0 millions dans l'Union Européenne à 15. La France est le troisième producteur de laitue en Europe après l'Espagne et l'Italie avec une production atteignant 426000 tonnes de laitues (FAO, 2003 ; voir http://www.fao.org). L'essentiel des cultures de laitue provient de la Provence (Hutin, 1995), l'Aquitaine étant la troisième région de production en France.

Il existe une vingtaine de virus infectant les cultures de laitue (Blancard et al., 2003), parmi ceux-ci, le potyvirus LMV est le plus dévastateur et peut occasionner la perte totale des récoltes de printemps en plein champ (Dinant & Lot, 1992, Le Gall, 2003). Il a été décrit pour la première fois en Floride par Jagger en 1921. Les symptômes observés dépendant de l'isolat de LMV, du génotype de l'hôte et des conditions environnementales, ils peuvent être modérés (présence d'une mosaïque) ou sévères (présence de nécroses voire mort de la plante). Le LMV possède une gamme d'hôte assez étendue car il est capable d'envahir 121 hôtes différents appartenant à 16 familles et à 60 genres différents (Horvath, 1980). Parmi ces espèces, le LMV infecte d'autres plantes cultivées comme le pois, l'épinard, la chicorée, le carthame et le pois chiche ainsi que de nombreuses plantes sauvages qui peuvent constituer un réservoir naturel (Dinant & Lot, 1992, Horvath, 1980). Comme la plupart des potyvirus, le LMV est transmis par pucerons (Dickson & Laird, 1959, Kennedy et al., 1962) et certains isolats sont aussi transmis par la graine (Broadbent et al., 1951). La lutte contre le LMV implique donc l'emploi de graines certifiées saines et des techniques de détection du LMV par PCR commencent à être développées (Peypelut et al., 2004). Cette stratégie est complémentaire de

l'emploi de gènes de résistance qui est la composante essentielle de la lutte contre le LMV, les gènes les plus utilisés étant les gènes récessifs de résistance au LMV mol^1 et mol^2 .

Plus de 200 isolats du LMV ont pu être dénombrés dans le monde et une étude de leur diversité génétique, basée sur la séquence codant la jonction entre la NIb et la CP du LMV, a permis de proposer la structure phylogénétique présentée dans la **Figure 9**. Parmi ces isolats, on peut distinguer deux branches phylogénétiques particulières : les isolats de type « Commun » et les isolats de type « Most » (mo-breaking, seed transmitted). Les isolats communs constituaient la majorité des isolats retrouvés dans les champs de laitue et partagent la capacité à se transmettre par la graine sans toutefois pouvoir contourner les résistances contrôlées par $mo1^1$ et $mo1^2$. Les isolats Most sont apparus quant à eux durant ces dernières années et possèdent, comme leur nom l'indique, la capacité de contourner les résistances $mo1^1$ et $mo1^2$ tout en conservant la capacité à se transmettre par la graine (Krause-Sakate et al., 2002). Autant les isolats communs peuvent être contrôlés par l'utilisation en champ de laitues résistantes, autant ces variétés ne sont d'aucun secours vis-à-vis des isolats Most. Le seul moyen de lutte contre des isolats de ce type est de les détecter suffisamment tôt, dans les graines de laitue notamment, afin d'en limiter la propagation.

3.2 Avancées récentes sur les études d'interactions hôte/virus dans le système LMV/laitue.

3.2.1 Dernières avancées sur les études de génomique fonctionnelle du LMV.

Ces dernières années, la première approche menée dans ces études d'interaction LMV/laitue a été de développer des outils de génomique fonctionnelle pour identifier les déterminants génétiques du LMV impliqués dans ses différentes propriétés biologiques. Tout d'abord, ces études ont été rendues possibles par le séquençage et la caractérisation de plusieurs isolats du LMV dont le LMV-0 (isolat de type commun), le LMV-E et le LMV-AF199 (isolat de type Most) (Krause-Sakate et al., 2002, Revers et al., 1997a, Revers et al., 1997b). L'intérêt de ces isolats se portant dans leurs propriétés biologiques très différentes, recensées dans le **Tableau 1**. LMV-0 induit des symptômes légers tels que des mosaïques et éclaircissement des nervures sur cultivar sensible, LMV-E et LMV-AF199 provoquent des symptômes sévères tels qu'une mosaïque déformante, un fort rabougrissement de la plante infectée ainsi que des nécroses en

ce qui concerne LMV-E. Sur des variétés résistantes mol^1 ou mol^2 , LMV-E et LMV-AF199 sont capables de se multiplier et de développer des symptômes systémiques sévères, les symptômes provoqués par LMV-AF199 étant plus précoces et plus sévères que ceux provoqués par LMV-E. Outre cette précocité, une des caractéristiques du LMV-AF199 par rapport au LMV-E est de provoquer une nécrose systémique sur la variété brésilienne Ithaca (Krause-Sakate et al., sous presse), l'autre étant la capacité du LMV-AF199 à être transmis par la graine. L'inoculation de LMV-0 sur des variétés portant un de ces deux gènes, mol^1 ou mol^2 , n'entraîne jamais l'apparition de symptômes même si la multiplication de cet isolat sur ces variétés est quelque fois détectée.

La construction de clones complets infectieux du LMV-0 et du LMV-E (Redondo et al., 2001, Revers et al., 1997a, Revers et al., 1997b) a permis de mettre en place une stratégie de génétique inverse pour identifier les protéines virales impliquées dans les différentes propriétés biologiques des isolats LMV-0, LMV-E et LMV-AF199.

Les premiers éléments d'informations ont été obtenus en construisant une série de clones recombinants entre le LMV-0 et le LMV-E (Redondo et al., 2001). Les déterminants viraux conditionnant la sévérité des symptômes du LMV-E sur variétés sensibles et la capacité de cet isolat à se multiplier sur les variétés portant la résistance conférée par les allèles mol^1 ou mol^2 ont pu être ainsi être cartographiés dans des portions relativement larges du génome du LMV. Il s'est donc avéré que la partie N-terminale du HcPro était responsable de la sévérité des symptômes du LMV-E sur la variété Trocadéro. En revanche, la cartographie des déterminants responsables du contournement de la résistance mol n'a pu impliquer qu'une portion génomique du LMV codant pour une portion C-terminale de la CI, la 6K2, la VPg et une portion N-terminale du domaine protéinasique de la NIa (Redondo et al., 2001).

Par la suite, la construction de clones recombinants du LMV-E échangeant des portions génomique de l'isolat LMV-AF199 a permis d'identifier les protéines du LMV-AF199 responsables de la nécrose systémique sur la variété de laitue brésilienne Ithaca ou de la rapidité d'expression des symptômes sur une variété portant le gène de résistance *mo1*². (Krause-Sakate et al., submitted). Le premier travail de cartographie a permis d'identifier deux portions génomiques, une zone codant pour une portion N-terminale de la région pour la protéine P1 et une zone codant pour une petite portion C-terminale de la CI. L'analyse des séquences du LMV-E et du LMV-AF199 dans ces régions a démontré, qu'il n'y avait aucune différence au niveau protéique mais que le déterminisme de ces symptômes particuliers se retrouvait seulement au niveau de l'ARN viral (Krause-Sakate et al., 2002, Krause-Sakate et

al., submitted). La cartographie des déterminants viraux de la rapidité d'apparition des symptômes du LMV-AF199 a montré que la zone codant pour la P1 et le domaine N-terminal du HcPro était partiellement impliquée. Le rôle de ces protéines dans la suppression du PTGS a été démontré en inoculant ces clones recombinants entre le LMV-E et le LMV-AF199 sur des plants de *N. benthamiana* portant le transgène de la *GFP* (Green Fluorescent Protein) et dont l'expression a été préalablement éteinte par le biais de l'agroinfiltration d'une construction exprimant la GFP (Krause-Sakate, 2001).

3.2.2 Identification et clonage du facteur d'initiation de la traduction, eIF4E, codé par le gène *mo1*.

La deuxième approche menée dans l'étude des interactions LMV/laitue a été de s'intéresser aux mécanismes de défense développés par la laitue contre le LMV et notamment le gène de résistance récessif *mo1* et ce, en se basant sur l'hypothèse qu'un gène de résistance récessif code pour un facteur dont la forme dominante est nécessaire au cycle viral d'un virus. Les études menées dans de nombreux autres systèmes biologiques plante/Potyvirus ont montré que les gènes récessifs de résistance aux potyvirus codaient pour un facteur d'initiation de la traduction que ce soit une isoforme d'eIF4E ou eIF4G et que la VPg était le facteur viral impliqué dans le contournement de gènes de résistance récessifs (Paragraphe 2.3.). Or, les étapes préliminaires de cartographie du facteur viral du contournement de la résistance *mo1* par l'isolat LMV-E pointent sur une région comprenant la séquence codant pour la VPg.

L'ensemble de ces éléments nous a conduit, au laboratoire, à penser que le gène *mo1* codait pour eIF4E ou son isoforme eIF(iso)4E. Les ADNc de ces deux facteurs ont donc été clonés et séquencés sur un ensemble de variétés sensibles et résistantes de laitue. Ces séquençages ont montré un polymorphisme des séquences protéiques des eIF4E clonés corrélant avec le phénotype de résistance des variétés à partir desquels les ADNc ont été isolés, l'allèle *mo1*¹ et *mo1*² codant respectivement pour les formes Ls-eIF4E¹ et Ls-eIF4E², Ls-eIF4E⁰ étant la forme d'eIF4E codée par l'allèle de *mo1* portée par les variétés de laitue sensibles au LMV. A l'opposé, aucune variation de séquence n'a pu être observé en ce qui concerne les ADNc de l'isoforme eIF(iso)4E (Nicaise et al., 2003a).

Des expériences de complémentation fonctionnelle sont venues confirmer cette hypothèse : l'expression transitoire de Ls-eIF4E⁰, la forme codée par l'allèle de sensibilité de *mo1*, restaure l'accumulation en systémie d'un clone LMV marqué par la GFP sur une variété de génotype mol^2 (Nicaise et al., 2003b). De plus, un clone LMV recombinant exprimant LseIF4E⁰ se multiplie et produit des symptômes sur des variétés résistantes mol^1 et mol^2 contrairement à des clones LMV exprimant Ls-eIF4E¹ ou Ls-eIF(iso)4E, le facteur eIF(iso)4E de laitue ne présentant d'ailleurs aucun polymorphisme de séquence suivant s'il est codé par une variété de laitue sensible ou résistante. Les différences de séquences entre les deux allèles récessifs *Ls-eIF4E¹* et *Ls-eIF4E²* par rapport à l'allèle de sensibilité *Ls-eIF4E⁰* se traduisent sur la protéine Ls-eIF4E¹, par le remplacement des acides aminés 108 à 110 par une histidine et par la substitution d'une alanine 186 en une sérine. La protéine Ls-eIF4E² diffère par une substitution de l'alanine 70 par une proline. Ces trois différences se positionnant, selon une analyse prédictive de la structure tridimensionnelle de l'eIF4E, à proximité de la poche d'interaction entre eIF4E et la coiffe des ARNm cellulaires (**Figure 10**).

3.2.3 Objectifs.

Cette thèse s'inscrit dans le cadre de l'étude des interactions entre les potyvirus et leur plante hôte, en utilisant le pathosystème LMV/laitue comme modèle d'étude. Pour mieux comprendre le rôle du facteur eIF4E dans le cycle viral du LMV, il est nécessaire de se recentrer à nouveau sur l'étude des facteurs viraux mis en jeu. Les dernières approches de cartographie des facteurs d'avirulence de la résistance *mo1* tendent à montrer que la VPg est potentiellement impliquée, rejoignant a priori les autres modèles d'étude où l'interaction entre la VPg et l'eIF4E conditionne la pathogénicité des potyvirus, mais ceci doit être confirmé.

C'est dans ce but que j'ai poursuivi ces travaux de génétique inverse déjà entamés au laboratoire et que j'ai tenté d'affiner au maximum la cartographie des facteurs viraux conditionnant la capacité des certains isolats du LMV à se multiplier sur des variétés de laitue exprimant une forme non-permissive d'eIF4E.

Tout d'abord, j'ai utilisé les outils de génétique inverse à ma disposition que sont les clones infectieux du LMV-0 et du LMV-E pour échanger des portions génomiques plus restreintes que la zone précédemment cartographiée. Le comportement des clones recombinants résultants a été étudié sur un ensemble de variétés de laitue exprimant chacune une forme différente d'eIF4E dans le but d'identifier la ou les régions du génome viral dans lesquelles des mutations permettaient au virus d'infecter des plantes porteuses d'allèles mutants de eIF4E.

Ensuite, la stratégie consistant à construire des virus chimériques montrant ses limites tant pour ce qui est de la construction des chimères que pour l'interprétation des résultats, j'ai tenté une approche par mutagenèse dirigée sur le clone infectieux du LMV-0 pour tenter de restaurer ainsi la compatibilité entre le LMV-0 et les formes incompatible d'eIF4E et ainsi identifier les acides aminés impliqués dans le contournement de la résistance.

Enfin, les résultats conduisant à l'identification de ces acides aminés ont été exploités pour mettre en œuvre un test de détection spécifique des isolats de type Most, utilisable en détection de routine.
Résultats

1 Cartographie des déterminants moléculaires du virus de la mosaïque de la laitue (LMV) responsables du contournement des gènes de résistance *mo1*¹ et *mo1*² chez la laitue.

L'objectif de ce travail consiste à poursuivre les travaux, déjà initiés au laboratoire, de cartographie des déterminants viraux de la pathogénicité du LMV (Redondo et al., 2001). Cette étape de cartographie par une approche de génétique inverse permettra d'identifier les facteurs viraux du LMV impliqués dans le contournement de la résistance récessive conférée chez la laitue par le gène *mol* et donc intervenant potentiellement dans le même processus du cycle viral que eIF4E.

L'approche par génétique inverse est possible grâce à l'obtention, au laboratoire, de clones infectieux de deux isolats du LMV aux propriétés biologiques différentes vis-à-vis de la résistance conférée par le gène *mo1*. D'une part, l'isolat LMV-0, isolat de référence ayant la capacité de se transmettre par la graine mais étant incapable de se multiplier et/ou d'induire des symptômes sur les variétés de laitue portant les allèles de résistance $mo1^1$ ou $mo1^2$. D'autre part, le LMV-E, incapable de se transmettre par la graine mais provoquant des symptômes prononcés sur variétés sensibles comme sur variétés résistantes (Revers et al., 1997b). Cette approche est d'autant plus intéressante que les séquences protéiques de ces deux isolats sont homologues à 97% (Revers et al., 1997b), cet aspect rendant plus facile l'identification des acides aminés à l'origine des différences entre les propriétés biologiques du LMV-E.

Ces clones infectieux consistent en un ADNc, préparé à partir de LMV-0 ou LMV-E, et placé dans un vecteur plasmidique entre un promoteur constitutif eucaryote fort (promoteur 35S du CaMV dont la séquence « enhancer » a été dupliquée) et un terminateur de transcription, permettant ainsi l'expression de cet ADNc viral dans le contexte de la plante (Redondo et al., 2001, Yang et al., 1998) (**Figure 30, Matériels et Méthodes, pour le vecteur d'expression pBS70T**). Sous cette forme, le génome du LMV peut être manipulé et en l'occurrence, des clones recombinants échangeant diverses parties du génome du LMV-0 et du LMV-E ou portant des certaines mutations ont pu être construits.

1.1 Construction des virus recombinants.

Les travaux préliminaires à cette thèse ont permis par cette méthode de localiser les déterminants du contournement dans la partie du génome codant pour le domaine C-terminal de la protéine CI, la protéine 6K2, la protéine VPg et le domaine N-terminal de la protéase NIa-Pro (Redondo et al., 2001) (**Figure 11**). L'affinement de la cartographie a consisté dans un premier temps à échanger des portions génomiques plus réduites à l'intérieur de cet intervalle.

Etant donné que ces différentes portions génomiques échangées sont bordées par des sites de restriction non uniques, que ce soit dans les pLMV-0 ou pLMV-E d'origine (**Figure 12 A**), il a fallu opérer en plusieurs étapes pour chacun des clones recombinants obtenus (**Figures 13 et 14**).

Le principe consiste d'abord à sous-cloner une portion du pLMV d'origine contenant à la fois la portion génomique à échanger, les sites de restriction d'échange présents en un seul exemplaire et des sites de restriction uniques dans la séquence du pLMV situés de part et d'autre de la portion génomique d'intérêt. L'échange est ensuite réalisé dans le sous-clone entre les génomes du LMV-0 et du LMV-E grâce aux enzymes de restriction bordant la région d'intérêt. Enfin, la région recombinante est excisée du sous-clone et échangée avec la région correspondante du pLMV grâce aux sites de restriction uniques situés de part et d'autre de la région recombinante.

Les portions génomiques échangées, les sites de restriction et les vecteurs de sous-clonage utilisés ainsi que le nombre d'étapes intermédiaires diffèrent selon les clones recombinants souhaités. L'ensemble de ces données est compilé dans le **Tableau 2** destiné aux lecteurs s'intéressant aux détails des stratégies appliquées pour la construction des virus recombinants.

Au final, 4 clones recombinants ont été obtenus (Figure 20 A) :

- LMV-0xbaflE, dérivé du LMV-0, comprenant la portion génomique codant pour la région C-terminale de la CI, la 6K2 et la VPg du LMV-E.
- LMV-0staflE, dérivé du LMV-0, comprenant la séquence codant pour la VPg du LMV-E.
- LMV-Estafl0, dérivé du LMV-E et clone recombinant réciproque du LMV-0staflE, comprenant la séquence codante de la VPg du LMV-0.

• LMV-0xbastyE, dérivé du LMV-0, comprenant la séquence codant pour la région Cterminale de la CI et pour la 6K2.

1.2 Comportement des virus recombinants sur variétés sensibles de laitue.

Avant d'étudier le comportement de ces virus sur des variétés résistantes de laitue, ces clones sont inoculés par biolistique sur des jeunes plants de laitue de la variété Trocadéro (variété ne portant aucun gène de résistance connu). Cette étape préalable a pour but de vérifier si les modifications apportées n'induisent pas de changement dans les propriétés biologiques de ces virus sur plantes sensibles voire une perte d'infectivité.

Tous les clones recombinants se sont montrés infectieux sur Trocadéro (Figure 15, Tableau 3) :

Le clone LMV-Estafl0 (**Figure 15 F**) semble se comporter comme son isolat « parental », le LMV-E (**Figure 15 B**), et exprimer des symptômes de même type avec un éclaircissement précoce des nervures, une mosaïque déformante puis l'apparition tardive de nécroses. Ces symptômes diffèrent notablement de ceux causés par LMV-0 et par les autres recombinants qui en dérivent. Ils sont probablement liés à la présence de la protéine HcPro du LMV-E (Redondo et al., 2001).

A l'inverse, les clones issus du LMV-0 (LMV-0xbaflE (Figure 15 D), LMV-0staflE (Figure 15 E) et LMV-0xbastyE (Figure 15 G)) montrent des symptômes, plus légers que ceux du LMV-E, comparables à ceux du LMV-0 (éclaircissement des nervures suivi d'une mosaïque atténuée (Figure 15 A)). Ce type de symptômes est caractéristique de virus porteurs d'un HcPro de type LMV-0 (Redondo et al., 2001). Cependant le clone LMV-0staflE semble montrer des symptômes un peu atypiques dans le sens où l'éclaircissement des nervures disparaît quelques jours après son apparition, une mosaïque réapparaissant par la suite dans les feuilles plus jeunes. Cette mosaïque est d'ailleurs moins homogène et circonscrite sur les bords des feuilles et à proximité de certaines nervures sans pour autant gagner l'ensemble du limbe foliaire comme c'est la cas pour le LMV-0.

Cette étape d'inoculation par biolistique est indispensable pour obtenir des inoculums homogènes nécessaires pour procéder à une inoculation mécanique par la suite. En effet, la méthode d'inoculation par biolistique n'est pas efficace à 100%, et ne permet pas d'obtenir des résultats fiables après inoculation directe des variétés résistantes. On pourrait craindre que le fait d'inoculer ces constructions sur des variétés sensibles avant d'étudier leur comportement sur des variétés résistantes induise l'apparition de mutations secondaires qui pourraient biaiser l'interprétation des propriétés biologiques des virus recombinants. Pour pallier à cette éventualité, nous vérifions systématiquement la descendance de chaque construction obtenue après leur inoculation sur la variété Trocadéro. Une RT-PCR ciblant les régions génomiques échangées est réalisée, après une extraction des ARN totaux des feuilles distales du foyer primaire d'infection, quelques jours après l'apparition des symptômes. Les produits de ces RT-PCR sont ensuite séquencés pour vérifier l'absence de mutations apparues dans la descendance de l'inoculum primaire cloné. Pour chacun des clones recombinants testés, aucune mutation (silencieuse ou non) n'a été observée. Cette méthode permettrait uniquement de déceler l'apparition de mutations majoritaires, c'est-à-dire de mutations apparues suffisamment tôt dans l'infection de la variété Trocadéro pour apparaître dans la plupart des particules virales prélevées pour ce test. Un moyen de déceler les éventuelles mutations tardives aurait été de cloner le produit de ces RT-PCR dans un vecteur plasmidique et de séquencer un échantillon représentatif pour chaque construction étudiée. De plus, le fait de séquencer seulement au niveau des régions génomiques échangées ne nous permet pas de mettre en évidence d'éventuelles mutations secondaires compensatoires qui auraient pu avoir lieu dans d'autres régions du génome du LMV. Pour cela, il aurait fallu amplifier, cloner et séquencer intégralement l'ensemble du génome de chaque construction testée mais ceci représente une charge de travail irréalisable en termes de coût et de temps. Par ailleurs, le bien-fondé de la recherche de telles mutations est questionnable en lui-même dans la mesure où l'expérience montre que, durant des années de maintien sur variété sensible, les isolats parentaux LMV-0 et LMV-E ont conservé leurs propriétés. Durant la suite des expérimentations, nous tenons compte de l'éventuelle apparition de mutations secondaires tardives mais nous considèrerons qu'elles auront peu d'impact (puisque minoritaires et indétectables) sur les propriétés biologiques des virus recombinants étudiés.

1.3 Comportement des virus recombinants sur variétés résistantes.

Etant donné que les clones recombinants obtenus précédemment sont infectieux et présentent des symptômes systémiques sur la variété sensible Trocadéro, ces constructions sont inoculées mécaniquement sur des jeunes plants de la variété Salinas 88 (portant l'allèle $mo1^2$ qui code pour la forme défective Ls-eIF4E², variété quasi-isogénique de la variété sensible Salinas), Mantilia et Floribibb (portant l'allèle $mo1^1$ qui code pour la forme défective Ls-eIF4E¹) ainsi que sur la variété sensible Salinas (**Figures 16, 17, 18 et 19**).

Certains virus recombinants présentent des délais d'apparition de symptômes (**Tableau 3**) ou une intensité moindre (voire une absence de symptôme) par rapport à d'autres virus recombinants ou aux virus « parentaux ». Sur la variété Mantilia, les symptômes provoqués par les différentes constructions apparaissent en systémie une à deux semaines après ceux provoqués par le LMV-E. Sur la variété Floribibb, soit les symptômes n'apparaissent pas, soit ils présentent un retard d'une semaine selon les virus testés. Enfin sur la variété Salinas 88, les virus provoquant des symptômes présentent un délai variable n'excédant pas cinq jours. Il parait important de comparer ces données avec le degré d'accumulation de ces virus dans les diverses variétés étudiées. Cette information nous permettra de déterminer si les modifications apportées provoquent une altération des symptômes liée à une altération de la multiplication ou si seule l'expression des symptômes est touchée.

Le niveau d'accumulation des constructions recombinantes sur les variétés résistantes Mantilia, Floribibb et Salinas 88 (ainsi que sur la variété sensible Salinas) a été estimé par ELISA 30 jours après inoculation à l'aide d'un anticorps polyclonal dirigé contre la capside du LMV-0 (**Figure 20 B**). Cet anticorps reconnaît aussi la capside du LMV-E mais est moins sensible dans ce cas de figure du fait de la distance génétique entre les deux isolats. Les niveaux d'accumulation du LMV-E et du recombinant LMV-Estafl0, qui possèdent la CP de LMV-E, sont donc sous-estimés par rapport à leur niveau d'accumulation réel et ne peuvent pas être directement comparés aux données d'accumulation des virus codant pour la protéine de capside du LMV-0.

L'ensemble de ces niveaux d'accumulation a été évalué lors de deux séries d'inoculations indépendantes par souci de reproductibilité. Cependant de manière à ce que les informations à en tirer soient plus lisibles, seuls les résultats de la première expérience ont été compilés dans la **Figure 20 B**. Les mesures sur la deuxième série d'inoculations ont globalement révélé un comportement semblable de la part des clones LMV testés, mise à part une moins bonne

accumulation de l'ensemble des clones sur les variétés résistantes corrélée elle-même avec des symptômes moins marqués que lors de l'ensemble des expériences précédentes. Nous mettons cela sur le compte de conditions générales différentes (ensoleillement, température) qui n'auraient pas favorisé la multiplication des virus, les deux expériences ayant été réalisées à plusieurs mois d'intervalle et notre serre ne nous permettant pas d'être isolés totalement des influences du climat extérieur.

1.4 La sévérité des symptômes sur des variétés résistantes n'est pas contrôlée par la région échangée.

Les symptômes du LMV-0xbaflE apparaissent sensiblement en retard par rapport à ceux provoqués par le LMV-E : une semaine sur Mantilia, 5 jours sur Salinas 88 (**Tableau 3**) et sont beaucoup plus faibles sur Trocadéro (**Figures 9 B et D**) et Mantilia (**Figure 17 B et C**). Cela est sûrement dû au fait qu'un déterminant de la sévérité des symptômes du LMV sur laitue, HcPro, est codé par une autre région génomique que celle échangée chez le LMV-0xbaflE (Redondo et al., 2001). Les clones LMV codant pour le HcPro du LMV-0 provoqueraient donc des symptômes plus faibles que ceux codant pour le HcPro du LMV-E. Ces symptômes étant plus faibles, la présence de ces clones LMV serait détecté plus tardivement que si le suivi de la présence du LMV l'avait été par un test basé sur la multiplication du virus plutôt que sur un critère visuel comme la symptomatologie.

1.5 La région codant pour le domaine protéasique de la NIa n'est pas impliquée dans le contournement de la résistance liée à LseIF4E.

Les données d'accumulation montrent que le clone recombinant LMV-0xbaflE s'accumule aussi bien sur les variétés résistantes mol^1 (Mantilia et Floribibb) et mol^2 (Salinas 88) que sur la variété sensible Salinas (pistes 9, 10, 11 et 12 de la **Figure 20 B**, un test de Student montre qu'il n'y a pas de différences significatives entre les niveaux d'accumulation sur Mantilia, Floribibb et Salinas 88 avec celui mesuré sur Salinas, p>0,05) bien qu'aucun symptôme significatif n'ait été détecté sur Floribibb (**Tableau 3, Figure 18 C**). Quand on compare la séquence nucléique du LMV-0 et celle du LMV-E dans la zone cartographiée lors des travaux précédents (entre la position 5855 et la position 7207), on dénombre 14 différences menant à des différences en acides aminés, dont 13 sont localisées dans le fragment échangé dans la construction LMV-0xbaflE (7 dans le fragment *Xba*I-*Sty*I et 6 dans le fragment *Sty*I-*Afl*II). De plus, le fait que LMV-0xbaflE, qui code pour une protéine NIa-Pro sans aucune différence d'acides aminés avec celle de LMV-0, s'accumule sur les variétés résistantes $mo1^1$ (Mantilia et Floribibb) et $mo1^2$ (Salinas 88) et que, jusqu'alors, aucune donnée bibliographique ne démontre le rôle de la NIa-Pro dans un contournement de résistance récessive, suggère que la portion codant pour la partie N-terminale de la protéase de la protéine NIa n'est effectivement pas impliquée. La construction de recombinants échangeant uniquement cette partie du génome du LMV ou de mutants sur la position présentant une différence entre le LMV-E et le LMV-0 permettrait de confirmer cette hypothèse.

1.6 La VPg n'est pas le seul déterminant viral du contournement.

Dans de nombreux pathosystèmes étudiés impliquant un membre de la famille des *Potyviridae* d'une part et un gène de résistance récessif d'autre part, la VPg se trouve être le facteur viral responsable du contournement de ces résistances.

Le comportement du recombinant LMV-0xbaflE, dans lequel la région du génome échangée contient surtout celle codant pour la VPg, laisse présager que le système LMV/Laitue ne diffère pas des autres systèmes. Toutefois, quand on échange une région plus restreinte comprenant seulement la VPg comme chez les chimères LMV-0staflE et LMV-Estafl0, on constate que la situation n'est pas aussi tranchée. Le virus recombinant LMV-0staflE induit bien sûr des symptômes sur les variétés sensibles testées (Trocadéro et Salinas, **Figures 15 E et 16 D**) mais aussi sur la variété porteuse de mol^1 Mantilia (**Figure 17 D**) où on observe des symptômes modérés en systémie (mosaïque atténuée). Comme pour le recombinant LMV-0xbaflE, on peut noter que malgré l'absence de symptômes sur Floribibb (**Figure 18 D**), le virus LMV-0staflE parvient tout de même à s'y multiplier (**Figure 20 B, piste 15**).

Cette donnée montre que la VPg est impliquée dans la capacité du LMV-E à contourner la résistance conférée par le gène mol^1 mais la légère atténuation des symptômes provoqués sur Mantilia par rapport au LMV-0xbaflE (comparer **Figures 17 C et D**) et son plus faible degré d'accumulation sur la variété Floribibb (à peu près deux fois moins importante, **Figure 20 B**, **pistes 11 et 15**) suggère que la VPg n'est pas la seule protéine impliquée et qu'un autre facteur viral est impliqué dans cet aspect des propriétés biologiques du LMV-E.

Cette hypothèse se confirme quand on constate que le LMV-0staflE n'induit aucun symptôme sur Salinas 88 (mol^2) (Figure 19 D) et qu'on ne le détecte pas sur les plants de Salinas 88

inoculés avec ce virus (**Figure 20 B, piste 16**). La VPg n'est donc pas le facteur viral permettant au LMV-E de se multiplier sur les variétés codant la forme Ls-eIF4E².

1.7 La région codant pour le domaine C-terminal de la CI et pour la 6K2 est impliquée dans la restauration de la compatibilité du LMV-E avec les variétés codant un des deux formes Ls-elF4E¹ ou Ls-elF4E².

Les comportements du clone recombinant réciproque, LMV-Estaflo, et du clone LMV-OxbastyE donnent une indication sur la localisation du déterminant du contournement de la résistance conférée par mol^2 . En effet, LMV-Estafl0 s'accumule et provoque des symptômes légèrement plus forts que ceux provoqués par les autres virus recombinants que ce soit sur les variétés sensibles où on observe une mosaïque presque aussi marquée que celle provoquée par le LMV-E (Figures 15 F, 16 E et Figure 20 B, piste 21), sur les variétés résistantes mol¹ (Figures 17 E, 18 E et Figure 20 B, pistes 22 et 23) ou sur la variété résistante mol^2 (Figures 19 E et Figure 20 B, piste 24). Une seconde expérience de dosage du LMV a montré que le niveau globalement plus élevé de LMV-Estafl0 par rapport au LMV-E observé dans la Figure 20 B n'était pas reproductible et atteignait plutôt des niveaux d'accumulation comparables à celui-ci. La VPg n'est donc pas un déterminant absolument nécessaire au contournement de la résistance conférée par mol^1 puisque le LMV-Estafl0 se développe sur Mantilia et Floribibb. Un autre déterminant se trouve donc soit dans la région codant pour le domaine C-terminal de la CI et pour la 6K2, soit dans la région codant pour le domaine Nterminal de la NIa-Pro. Toutefois, les propriétés biologiques du clone LMV-0xbaflE nous ont montré que NIa-Pro n'était pas impliquée. LMV-0xbastyE provoque des symptômes proches de ceux de LMV-0xbaflE sur la variété Mantilia (mol^{1}) , et y est détecté en même temps (Tableau 3 et comparer Figures 17 C et F), mais aussi sur la variété Salinas 88 (mol²) (Figure 19 F). L'analyse de l'accumulation de ce virus montre un niveau comparable à celui du LMV-0xbaflE sur Mantilia et sur Salinas 88 (comparer les pistes 7 et 11 Figure 20 B et les pistes 8 et 12 Figures 20 B). Un test de Student effectué pour chacune de ces comparaisons montre que ces niveaux d'accumulation ne sont pas très significativement différents entre eux : dans les deux cas 0,05>p>0,01. De plus, les symptômes du LMV-OxbastyE et du LMV-EstaflO sur Salinas 88 apparaissent respectivement plus rapidement que ceux provoqués par le LMV-0xbaflE et le LMV-E (Tableau 3). Ceci montre non seulement que la région codant pour le domaine C-terminal de la CI et la 6K2 contient l'autre déterminant du contournement de la résistance *mo1* mais cela laisse aussi présager que la VPg du LMV-E dans le contexte du LMV-0 jouerait en la défaveur de la multiplication de ces virus sur la variété Salinas 88 exprimant la forme Ls-eIF4E².

1.8 La variété Floribibb comporte des facteurs affectant la mise en place des symptômes.

Quand on compare le comportement des virus recombinants LMV-0xbaflE, LMV-0staflE et LMV-0xbastyE sur les variétés Mantilia et Floribibb, on constate une différence au niveau des symptômes et de l'accumulation de ces virus. Alors que ces trois constructions sont capables de produire des symptômes en systémie sur Mantilia (**Figure 17 C, D et F**), aucun de ceux-ci n'est capable d'en produire sur la variété Floribibb (**Figure 18 C, D et F**). De même, les virus LMV-0xbaflE et LMV-0staflE s'accumulent moins bien sur Floribibb (**Figure 20 B**, comparer les **pistes 10 et 11** ainsi que les **pistes 14 et 15**; un test de Student montre que les valeurs d'accumulation pour ces deux virus sur Mantilia et Floribibb sont très significativement différentes, p>0,01). Ce différentiel d'accumulation du LMV entre la variété Mantilia et Floribibb a été retrouvé lors de répétitions indépendantes de l'expérience.

Ceci montre que la variété Floribibb possède probablement un ou plusieurs facteurs modulant la résistance récessive mol^{1} . La présence de tels facteurs dans la variété Floribibb inhiberait la multiplication ou du moins l'accumulation en systémie du LMV de telle manière que les symptômes ne peuvent se mettre en place pour les virus concernés. On peut imaginer que ces facteurs interviennent dans le cycle du LMV à l'instar du facteur de traduction eIF4E mais que les formes présentes dans la variété Floribibb ne sont pas suffisamment différentes de celles de la variété Mantilia pour entraîner une incompatibilité totale entre les LMV recombinants et Floribibb. Une approche de génétique classique faisant intervenir un croisement entre la variété Floribibb et une variété mol^{1} comme Mantilia permettrait d'identifier ces facteurs.

1.9 Limitations de l'utilisation de la recombinaison.

Durant cette étape de cartographie, la stratégie consistant à échanger des portions génomiques de plus en plus réduites entre les isolats LMV-E et LMV-0 a semblé montrer ses limites. D'une part, parce que les échanges sont de plus en plus difficiles à réaliser au fur et à mesure

que les fragments à échanger sont de plus en plus petits (ils contiennent donc de moins en moins de sites de restriction utilisables) et d'autre part, parce que certains échanges réalisés semblent engendrer des effets imprévisibles et sans aucune relation avec le phénomène étudié. C'est le cas, par exemple, du clone recombinant échangeant la région codant pour la VPg, LMV-0staflE qui, même s'il est infectieux et se multiplie sur les variétés mol^1 , provoque des symptômes atypiques sur Trocadéro, plus atténués que le LMV-0 dont il dérive. Il semble donc que la présence de la VPg du LMV-E dans un contexte « LMV-0 » affecte le pouvoir pathogène du virus recombinant, ce qui peut interférer avec les observations faites. De la même façon, le fait que le virus recombinant LMV-0staflE ne s'accumule pas du tout sur Salinas 88 pourrait avoir été dû à une incompatibilité liée à l'insertion de la VPg du LMV-E plutôt qu'à l'absence de déterminants impliqués dans le contournement. Il semble que la recombinaison effectuée dans ce virus affecte plusieurs fonctions de la VPg et ne facilite pas l'interprétation des modifications des propriétés biologiques observées. Une explication serait que l'échange de fragments génomiques entre le LMV-E et le LMV-0 modifie la structure de l'ARN viral en créant ou affectant une structure secondaire d'ARN double brin. Cette structure dont l'existence reste à démontrer serait la cible du mécanisme endogène d'extinction génique et du complexe RISC. Dans le modèle TuMV/Arabidopsis thaliana, il a été montré que la présence d'un potyvirus pouvait interférer avec le mécanisme d'extinction génique endogène et pouvait être à l'origine de bouleversements du développement et donc de symptômes (Kasschau et al., 2003). On peut imaginer que, dans le modèle LMV/Laitue également, ce type d'interférence puisse avoir un impact sur les symptômes observés. Dans ce cas, une modification de cette structure secondaire entraînerait une modification de cette interférence et donc une modification de la symptomatologie.

Un moyen de contourner ce problème inhérent à l'approche de génétique inverse par recombinaison est d'opérer des modifications plus fines sur les clones d'ADNc, notamment par le biais de la mutagenèse dirigée.

2 Identification d'acides aminés impliqués dans la restauration de la compatibilité du LMV avec les variétés résistantes de laitue.

2.1 Approche par mutagenèse dirigée.

Dans l'étape précédente, nous avons démontré que la capacité du LMV-E à se multiplier et émettre des symptômes sur les variétés de laitue exprimant des formes défectueuses d'eIF4E était imputée à deux régions du LMV : celle codant la VPg vis-à-vis de la forme Ls-eIF4E¹ et celle codant le domaine C-terminal de la CI et/ou la 6K2 vis-à-vis des formes Ls-eIF4E¹ et Ls-eIF4E². L'objectif de ces travaux de cartographie génétique étant de pouvoir identifier les acides aminés impliqués dans cet aspect et la stratégie qui consiste à construire des virus recombinants ne permettant plus d'échanger des régions plus réduites, la stratégie la plus adaptée semble consister à cibler des acides aminés potentiellement impliqués dans le contournement et de les substituer par mutagenèse dirigée.

2.1.1 Désignation des acides aminés candidats dans le domaine Cterminal de la CI.

Un déterminant moléculaire conditionnant le contournement des résistances mol^1 et mol^2 a pu être positionné sur le génome du LMV dans une région encadrée par les sites de restriction XbaI (position 5855) et StyI (6163). Quand on compare les séquences protéiques du LMV-0 et du LMV-E dans cet intervalle, on dénombre 7 différences : 3 dans la région codant le domaine C-terminal de la CI et 4 dans celle de la 6K2 (**Figure 21**). Bien que substituer chacune de ces positions soit envisageable, il parait plus judicieux de trouver des éléments pouvant nous permettre de sélectionner la ou les positions les plus susceptibles d'être impliquées, afin de hiérarchiser les opérations à mener.

Le pathosystème LMV/Laitue est riche d'une centaine d'isolats du LMV aux propriétés biologiques diverses, notamment vis-à-vis des résistances contrôlées par eIF4E qui nous intéressent (**Figure 22**). En plus de LMV-0 et LMV-E, nous avons sélectionné parmi ceux-ci 10 isolats du LMV répartis dans les différentes branches de l'arbre phylogénétique et se comportant différemment vis-à-vis des résistances $mo1^1$ et $mo1^2$: 4 isolats contournant $mo1^1$

et mol^2 (LMV-Cl2, LMV-AF199, LMV-13 et LMV-Tn4), 3 isolats capables de contourner seulement la résistance mol^1 (LMV-1, LMV-9 et LMV-Cordoue) et 3 isolats incapables de contourner mol^1 ni mol^2 (LMV-AF198, LMV-Dg et LMV-A435). La séquence de la portion génomique codant pour le domaine C-terminal de la CI et la 6K2 a été obtenue pour chacun de ces isolats (**Figure 21**).

L'alignement des séquences protéiques entre elles et avec celles de LMV-0 et LMV-E semble indiquer 2 positions dans la CI où des substitutions entre les isolats pourraient expliquer les différences de propriétés biologiques, les positions 1927 et 1946. Les 5 autres différences entre LMV-0 et LMV-E semblent a priori ne pas être corrélées avec le contournement des résistances $mo1^1$ et/ou $mo1^2$. Tous les isolats incapables de contourner ont une alanine à la position 1927 alors que 4 des 5 isolats contournant $mo1^1$ et $mo1^2$ ont une valine (ainsi qu'1 des 3 isolats ne contournant que $mo1^1$) et le LMV-E une thréonine. A la position 1946, la sérine des isolats non-contournants est substituée soit par une thréonine (LMV-E et LMV-Cordoue), soit par une isoleucine (LMV-Cl2, LMV-AF199 et LMV-Tn4).

Deux mutants du LMV-0 ont été construits en se basant sur ces indications de séquence : le mutant LMV-0-A1927V, où l'alanine 1927 est mutée en valine, et le mutant LMV-0-S1946T, où la sérine 1946 est mutée en thréonine. Même si les acides aminés substitués ont des propriétés physico-chimiques peu différentes, nous émettons comme hypothèse que ces différences même légères, qui sont partagées avec les isolats capables de contourner $mo1^1$ et $mo1^2$, pourraient engendrer des modifications suffisantes de l'encombrement stérique pour altérer les interactions entre les différents facteurs de l'hôte et du LMV impliqués dans la résistance mo1 et pour induire donc un contournement par ces mutants des résistances $mo1^1$ et $mo1^2$.

2.1.2 Identification d'une position majeure impliquée dans le contournement de *mo1*¹ et *mo1*²

Les mutants LMV-0-A1927V et LMV-0-S1946T ont été obtenus et sont inoculés sur la variété sensible Trocadéro comme pour les virus recombinants discutés ci-dessus. Les deux mutants sont infectieux et provoquent des symptômes identiques à ceux provoqués par le LMV-0 (**Figure 15 H et I**). Après avoir vérifié la descendance des mutants par RT-PCR, les plants de Trocadéro infectés peuvent donc servir pour inoculer mécaniquement les variétés

Salinas, Mantilia, Floribibb et Salinas 88. Le suivi des symptômes provoqués par ces mutants est effectué (**Tableau 3, Figures 16, 17, 18 et 19**) et au bout de 30 jours, la descendance vérifiée une nouvelle fois, le niveau d'accumulation en systémie de ces mutants est estimé par ELISA (**Figure 23**).

Le mutant LMV-0-A1927V provoque des symptômes comparables à ceux provoqués par le LMV-0 sur les variétés sensibles Salinas et Trocadéro (**Figures 15 H et 16 G**) mais n'en induit aucun sur les variétés résistantes testées (**Figures 17 G, 18 G et 19 G**). Le fait que l'on ne détecte pas le mutant par ELISA (**Figure 23 pistes 6, 7 et 8**) montre qu'il n'y a pas de tolérance de ces variétés vis-à-vis du mutant et qu'il est bien incapable de se mouvoir en systémie sur les plantes exprimant les formes défectueuses Ls-eIF4E¹ et Ls-eIF4E². La substitution d'une alanine en valine à cette position n'est donc pas suffisante pour entraîner une modification du pouvoir pathogène du LMV-0 contrairement à ce que l'alignement de séquences des isolats contournants aurait pu laisser croire. Pour vérifier si l'acide aminé 1927 est tout de même impliqué dans la capacité d'un isolat à se multiplier malgré un eIF4E défectueux (du moins pour le LMV-E si les autres isolats contournants s'avéraient utiliser une autre stratégie), il serait intéressant de substituer l'alanine 1927 du LMV-0 en une thréonine.

Le mutant LMV-0-S1946T montre un comportement différent : contrairement au LMV-0 dont il dérive, il exprime des symptômes sur les variétés Mantilia et Salinas 88 (mais pas sur la variété Floribibb). Sur Mantilia (*mo1*¹), les symptômes, détectés plus tardivement que pour le LMV-0xbastyE, sont très faibles et instables dans la mesure où ils ne sont pas toujours visibles, sur la même plante, durant la période d'observation (**Tableau 3, 17 H**). Ce mutant s'accumule dans des proportions trois fois moins importantes que pour les virus recombinants LMV-0xbaflE et LMV-0xbastyE sur cette même variété (**Figure 23, piste 10, à comparer avec la Figure 20 B, pistes 6 et 10**).

Sur Salinas 88 ($mo1^2$), le mutant LMV-0-S1946T provoque une mosaïque systémique (**Figure 19 H**) et s'accumule à un niveau comparable à celui du LMV-0xbaflE et LMV-0xbastyE (**Comparer Figure 23, piste 12, et Figure 20 B, pistes 8 et 12**). La substitution de la sérine en une thréonine en position 1946 confère donc au LMV-0 la capacité de contourner la résistance conférée par la forme Ls-eIF4E² et partiellement la résistance conférée par la forme Ls-eIF4E¹. Nous avons identifié un déterminant moléculaire majeur impliqué dans l'incompatibilité conférée par le Ls-eIF4E². Pour confirmer cette hypothèse et surtout vérifier

que c'est la seule position et la seule différence entre LMV-0 et LMV-E qui contrôle le pouvoir pathogène du LMV-E sur Salinas 88, il conviendrait de construire le mutant réciproque, le LMV-E avec la substitution de la thréonine 1946 en une sérine. Pour que l'hypothèse se confirme, il faudrait que ce mutant soit incapable de se multiplier sur Salinas 88. Dans le cas contraire, cela signifierait que la substitution sur la position 1946 n'est pas le seul déterminant, il faudrait alors construire d'autres mutants ponctuels du LMV-0 à chacune des 6 autres positions où l'on observe une différence entre LMV-0 et LMV-E (y compris une substitution de l'alanine 1927 en une thréonine puisque l'incapacité du LMV-0-A1927V à se multiplier en présence de Ls-eIF4E¹ ou de Ls-eIF4E² ne démontre en rien que cette position n'est pas impliquée chez le LMV-E).

En ce qui concerne le facteur Ls-eIF4E¹, la situation semble plus complexe puisque même si la position 1946 semble impliquée, la mutation S1946T ne confère pas au LMV-0 le pouvoir pathogène du LMV-0xbastyE. Il y a donc au moins une autre position impliquée dans la portion génomique échangée dans le LMV-0xbastyE. Pour la mettre en évidence, il faudrait construire d'autres mutants à au moins une des 6 autres positions où il y a une différence entre le LMV-E et le LMV-0. Au vu de l'alignement des séquences protéiques, il n'y a pas de substitution particulièrement spécifique aux isolats contournant $mo1^1$ même si, dans la 6K2, la double substitution de l'alanine 2017 et de la valine 2018, en respectivement une valine et une isoleucine, est partagée par deux des trois isolats ne contournant que la résistance $mo1^1$ en plus du LMV-E. Une double substitution étant plus à même de modifier les propriétés physico-chimiques du domaine protéique concerné, il serait préférable d'effectuer une ou deux mutations à cet endroit en premier lieu.

2.1.3 Désignation des acides aminés candidats dans la VPg.

Un autre déterminant conditionnant la compatibilité du LMV avec les variétés résistantes de laitue a été précédemment identifié au niveau de la région codant pour la VPg. L'analyse de l'alignement des séquences protéiques du LMV-0 et du LMV-E dans cette région montre qu'il y a seulement 6 différences en acides aminés. Nous avons procédé de la même manière pour sélectionner des positions dans la VPg susceptibles d'être impliquées dans le contournement de la résistance conférée par la forme Ls-eIF4E¹ (puisque les travaux de cartographie ont montré que la VPg n'était pas impliquée vis-à-vis de la résistance conférée par la forme Ls-

eIF4E²). La séquence nucléotidique codant pour la VPg a été obtenue pour 10 isolats du LMV : 3 isolats ne contournant aucune résistance *mo1*, les isolats LMV-0, LMV-AF198 et LMV-Dg, 2 isolats ne contournant que la résistance *mo1*, les isolats LMV-1 et LMV-9 et 5 isolats du LMV contournant les deux types de résistances, les isolats LMV-E, LMV-AF199, LMV-Tn4, LMV-Cl2 et LMV-13. L'alignement des séquences protéiques de ces isolats est représenté de manière simplifiée dans la **Figure 24**. Dans cette figure, on ne visualise les séquences des divers isolats qu'au niveau des 6 différences entre le LMV-E et le LMV-0 mais l'ensemble de l'alignement est disponible dans l'**Annexe I**.

Comme pour l'alignement des séquences protéiques de la région CI-6K2, on ne retrouve pas de corrélation parfaite entre les différences d'acides aminés et la capacité à contourner la résistance mol. Cependant, certaines substitutions semblent partiellement corréler soit avec la capacité à contourner seulement mol^1 (positions 2091 et 2111) soit avec la capacité à contourner les deux types de résistances (positions 2079, 2121 et 2169). Afin de restreindre le nombre de positions candidates et donc de mutants à construire, nous nous sommes basés sur les autres modèles plantes/potyvirus : en effet il a été montré dans les pathosystèmes PSbMV/Pois (Borgstrom & Johansen, 2001), TVMV/Tabac (Nicolas et al., 1997), PVA/Nicandra physaloides (Rajamaki & Valkonen, 1999) et TEV/Tabac (Schaad et al., 1997b) que les acides aminés impliqués dans le contournement des résistances contrôlées par un gène de résistance récessif chez ces plantes étaient localisés dans la partie centrale de la VPg de ces potyvirus. En prenant pour hypothèse que le modèle LMV/Laitue ne diffère pas de ces modèles, nous avons sélectionné deux positions dans la zone centrale de la VPg, les positions 2111 et 2121 et nous avons construits deux mutants du LMV-0 : le mutant LMV-0-S2111T où la sérine positionnée en 2111 est mutée en thréonine, telle qu'on la retrouve dans les isolats LMV-1, LMV-9 et LMV-E, et le mutant LMV-0-S2121G où la sérine positionnée en 2121 est mutée en glycine.

A l'heure actuelle, ces mutants ont été construits mais leur infectivité et leurs propriétés biologiques n'ont pas encore été testées.

2.2 Approche par mutagenèse aléatoire.

La diversité naturelle des isolats du LMV a permis la mise en place de la stratégie de génétique inverse que ce soit par la construction de clones recombinants entre LMV-0 et LMV-E ou de mutants par mutagenèse dirigée. Cependant elle ne permet pas de mettre en

évidence toutes les positions du LMV véritablement impliquées dans la restauration de la compatibilité entre le LMV et les variétés de laitues exprimant un eIF4E non permissif. De manière à identifier d'autres positions potentiellement impliquées, nous avons entamé une nouvelle approche conduisant à générer une diversité artificielle par mutagenèse aléatoire.

La stratégie de mutagenèse aléatoire exploite le manque de fidélité de la Taq ADN polymérase utilisée en PCR classique. En présence de cations Mn²⁺, l'enzyme génère alors un plus grand nombre d'erreurs au cours de la réaction de PCR (Fromant et al., 1995, Lin-Goerke et al., 1997). Le produit ainsi obtenu constitue une banque de fragments mutants que l'on introduit dans un clone infectieux du LMV, produisant ainsi une banque de clones infectieux du LMV, mutants dans la région concernée par l'étape de PCR (**Figure 25**).

Nous envisageons d'appliquer cette stratégie d'une part, au niveau de la portion du génome codant pour le domaine C-terminal de la CI et la 6K2 et d'autre part pour la région centrale de la VPg et ce dans le contexte du LMV-0. Nos efforts se sont tout d'abord concentrés sur la VPg pour laquelle nous n'avons pas identifié d'acide aminé impliqué dans la compatibilité du LMV avec les variétés *mo1*¹, à la différence de la région CI-6K2. De nombreuses données sur d'autres potyvirus laissent penser que pour la VPg, les déterminants recherchés sont susceptibles de se trouver dans sa région centrale (Borgstrom & Johansen, 2001, Nicolas et al., 1997, Rajamaki & Valkonen, 1999, Schaad et al., 1997b).

Pour chacune de ces expériences indépendantes, un criblage sera effectué de manière à retrouver les mutants présentant un gain de pathogénicité, que ce soit une augmentation de l'accumulation du LMV ou l'apparition de symptômes selon la variété résistante testée. Des mélanges de mutants du LMV-0 ainsi générés seront inoculés par la méthode de biolistique directement sur la variété résistante Mantilia où la multiplication du LMV est plus explicite que sur Floribibb. Les propriétés biologiques de ces mélanges de mutants seront ensuite évaluées. Les mutants infectant les plantes présentant des symptômes ou une accumulation accrue (selon la portion du génome mutée) seront ensuite séquencés et analysés individuellement.

Ce criblage fonctionnel constitue le point fort de cette stratégie, la corrélation entre une mutation et un gain d'infectivité pouvant être facilement faite contrairement à la sélection de mutants présentant une perte d'infectivité. Le point faible de cette méthode est le nombre relativement restreint de mutants pouvant être criblés de cette manière. En effet, même si le nombre maximum de mutants pouvant être testés dans un seul mélange doit, à ce jour, encore être déterminé, il apparaît clairement que toutes les combinaisons d'acides aminés ne seront

pas testées pour toutes les positions des zones visées par la mutagenèse (367 pb (123 a.a.) pour la portion codant pour le domaine CI-6K2 d'intérêt et 385 pb (129 a.a.) pour la portion codant pour la zone centrale de la VPg).

Pour faciliter le clonage de la banque de fragments PCR mutants dans un clone complet, nous avons élaboré une stratégie du mutagenèse par PCR-Fusion (Figure 31) sur le LMV-0 consistant à la fois à y insérer de nouveaux sites de restriction uniques facilitant le clonage des produits de PCR (sans modifier la séquence en acides aminés), à déléter une partie de la région visée et à y introduire un site de restriction unique dans le LMV. Ces deux dernières modifications permettent ainsi de faciliter le criblage de clones mutants selon un critère de taille de fragment de restriction et/ou en détruisant après l'étape de ligation (site de « digestion-suicide ») les clones délétés qui se seraient religués (Figure 26). A ce jour, nous avons pu construire deux clones délétés, un au niveau de la zone centrale de la VPg et un autre au niveau de la 6K2 (Figure 27).

Actuellement, la mutagenèse aléatoire au niveau de la zone centrale de la VPg et le clonage d'une banque de mutants LMV-0 d'un millier d'individus a été effectué. Le taux de mutagenèse, après séquençage d'une dizaine de fragments de 385 pb obtenus après la PCR mutagène, présente une moyenne de 2,6 mutations non-synonymes par fragment alors que le taux de mutation minimum espéré était de 1 mutation non-synonyme par fragment. Ce taux de mutation nous permet de cibler plus de positions pour un plus petit nombre de mutants à cribler au risque d'entraîner plus de mutations délétères pour le LMV ou plus de réversions d'une mutation intéressante.

Avant de cribler l'ensemble de la banque de mutants LMV-0 ainsi obtenue, il reste à valider la méthode de criblage. A ce jour nous n'avons pas pu déterminer le nombre maximum de mutants inoculables en un seul mélange par la méthode de biolistique, sachant que cette méthode est peu reproductible quand la concentration de l'inoculum est faible. Une solution pour se passer de cette méthode d'inoculation relativement coûteuse et si peu fiable dans des conditions limites serait d'inoculer les mutants par agroinfection. Cette technique d'inoculation consiste à cloner une cassette d'expression de l'ADNc du LMV (comprenant donc un promoteur et un terminateur fonctionnant dans la cellule végétale) dans un vecteur binaire d'*Agrobacterium tumefaciens* qui, une fois infiltrée dans les tissus végétaux,

entraînera l'expression ectopique de l'ARN viral puis de la polyprotéine virale d'une manière plus efficace.

3 Détection spécifique d'isolats LMV appartenant au type « Most »

Certains isolats ayant la capacité d'être transmis par la graine, la lutte contre le LMV, outre l'utilisation de variétés de laitue résistantes, passe par la commercialisation de graines de laitue certifiées saines et la destruction des lots contaminés (Tomlinson, 1962).

Les allèles récessifs du gène *mo1* permettent non seulement de résister à la plupart des isolats viraux mais aussi de limiter la transmission par la graine puisque les isolats transmissibles se multipliant sur les variétés $mo1^1$ ou $mo1^2$ ne peuvent pas atteindre les tissus embryonnaires et se transmettre de cette manière (Dinant & Lot, 1992, Pink et al., 1992).

Cependant ces dernières années, de nouveaux isolats LMV ont émergé avec la capacité non seulement de se multiplier sur les variétés de laitue exprimant Ls-eIF4E¹ ou Ls-eIF4E² mais pouvant aussi être transmis par la graine (Dinant & Lot, 1992, Krause-Sakate et al., 2002, Revers et al., 1997a), ce sont les isolats de type « Most » (mo-breaking, seed transmitted) dont LMV-AF199 est le type. Outre leur capacité à se multiplier sur les variétés *mo1*¹ et *mo1*² et à se transmettre par la graine, ces isolats provoquent parfois des symptômes sévères, le LMV-AF199 peut par exemple provoquer une nécrose systémique sur la variété brésilienne Ithaca (Krause-Sakate et al., in press). Récemment, une étude a montré l'existence d'un recombinant naturel entre un LMV de type Most et un LMV commun (Krause-Sakate et al., 2004). L'émergence au niveau mondial du LMV-Most pourrait donc entraîner des dommage économiques directement mais aussi via l'apparition d'isolats recombinants aux propriétés biologiques et épidémiologiques nouvelles et potentiellement dommageables. Tout ceci souligne l'importance du contrôle du LMV-Most par de mesures prophylactiques strictes.

Nous avons exploité les différences de séquence nucléotidique d'un ensemble d'isolats viraux aux propriétés biologiques différentes pour mettre en place un protocole de détection spécifique par RT-PCR des isolats de type « Most ». Dans l'article présenté ci-après (Peypelut et al., 2004), nous présentons trois protocoles de détection spécifiques du LMV-Most que nous avons mis en place.

La première stratégie à été conçue en se basant sur la variabilité du LMV au niveau de la portion génomique codant pour la jonction entre la NIb (réplicase) et la CP (protéine de la capside). Il consiste à une amplification par RT-PCR au moyen d'amorces « universelles »

reconnaissant la grande majorité des isolats du LMV (mis à part les branches « Yar » et « Gr » provenant respectivement du Yémen et de Grèce). Les produits de cette RT-PCR issus des isolats du LMV de type Most (277 pb) présentent un site de restriction EcoRI spécifique et une digestion des fragments RT-PCR par cette enzyme donne donc deux fragments de 194 et 83 pb dans le cas d'une plante infectée par le LMV-Most et un fragment de 277 pb dans les autres cas.

Cette stratégie présente deux inconvénients : le premier est qu'elle ne permet de détecter spécifiquement le LMV-Most dans un mélange de LMV-Most/LMV-0 que si ce ratio est de 1 pour 10. L'autre inconvénient est la nécessité d'effectuer deux étapes, une RT-PCR et une digestion enzymatique, qui rendent difficile la mise en routine de ce test.

La deuxième stratégie exploite la diversité du LMV au niveau de la région codant pour la partie centrale de la protéine P1. Un couple d'amorces spécifiques du LMV-Most ciblant cette région a été dessiné. En principe, seules les RT-PCR effectuées en présence d'isolats de type Most permettent l'amplification d'un fragment de 481 pb mais ce test de détection permet de détecter d'autres isolats comme le LMV-Tn2 qui n'ont pas les propriétés biologiques du LMV-Most. Grâce à ce test de détection, il a pu être mis en évidence que l'isolat émergent LMV-Tn2 est en fait un produit naturel de recombinaison entre un isolat de type commun et un isolat de type Most (Krause-Sakate et al., 2004). Le point de recombinaison se situerait dans la région codant pour la moitié N-terminale de la P3. La séquence en amont du point de recombinaison correspond à une séquence de type Most ce qui explique que cet isolat puisse être détecté par ce test de détection spécifique du LMV-Most. A l'opposé la séquence située en aval de la région codant pour la P3 est de type commun ce qui explique les propriétés biologiques de cet isolat qui est incapable de contourner les résistances de type mol. Cette stratégie a été abandonnée pour éviter de détecter de tels virus mais surtout d'éventuels recombinants inverses possédant la capacité de contourner la résistance mol mais ne pouvant être détectés par une RT-PCR ciblant la région codant pour la P1.

Mon travail a consisté à utiliser les données de cartographie obtenues précédemment pour mettre en place une troisième stratégie et cibler les isolats de type Most en fonction de leurs propriétés biologiques, en l'occurrence leur capacité à contourner les deux types de résistance *mo1*. Grâce aux approches de génétique inverse par recombinaison et par mutagenèse dirigée, nous avons montré que les déterminants du contournement de la résistance *mo1* se situaient dans la région codant pour l'extrémité C-terminale de la CI, la 6K2 et la VPg. Nous avons

donc dessiné un couple d'amorces spécifiques des isolats de type Most dans cette région. Nous nous sommes basés notamment sur les différences de séquences conduisant respectivement à la substitution de la sérine 1946 en une isoleucine et à la substitution de l'asparagine 2140 en une sérine chez la plupart des isolats de type Most.

Ce test de détection a pour avantage de pouvoir détecter du LMV-Most dans un mélange LMV-Most/LMV-0 dans une proportion de 1 pour 1000 ce qui est 100 fois plus efficace que le test de détection spécifique basé sur la séquence de la jonction NIb/CP. En revanche, cette RT-PCR détecte d'autres isolats qui ne font pas partie du type Most (comme le LMV-E) mais qui partagent certaines propriétés biologiques comme la capacité à contourner la résistance *mo1*. Contrairement au test de détection basé sur la séquence de la P1, le fait de détecter ce genre de faux positifs n'est pas gênant et peut être éventuellement contourné en effectuant une amplification à partir de graines. Ceci permettrait de ne détecter que les isolats du LMV ayant à la fois la capacité de contourner la résistance *mo1* et de se transmettre par la graine ce qui n'est pas le cas des isolats comme le LMV-E détectables par ce test.

Discussion

Discussion

1. Rappel du contexte

Les plantes se protègent des parasites obligatoires que sont les virus phytopathogènes en développant une grande variété de mécanismes de défense que ce soit des défenses tributaires des barrières naturelles de la plante et de la cellule végétale ou des mécanismes de « sauvegarde ». Ces derniers veillent continuellement à l'intégrité du fonctionnement de la cellule végétale en reconnaissant les bouleversements dus à l'intrusion de ces pathogènes dans la plante et en déclenchant consécutivement une série de contre-mesures permettant de limiter la multiplication et la propagation de ces virus dans le reste de la plante. Certaines plantes présentent des mécanismes de défense que l'on pourrait qualifier de passifs dans le sens où les virus ne peuvent se servir de certains facteurs cellulaires, mutés chez ces plantes, nécessaires à la mise en place de leur cycle de multiplication. Ces facteurs impropres à la multiplication virale sont communément désignés comme des facteurs d'incompatibilité.

Les attaques virales visant les plantes d'intérêt économique constituent une préoccupation majeure de la part des acteurs de la recherche agronomique. Pour limiter au mieux l'impact des dégâts provoqués par les virus phytopathogènes, les chercheurs se sont attelés à mieux connaître les mécanismes naturels de défense, conduisant ainsi à leur optimisation par le biais de stratégies de sélection génétique adaptées ou l'utilisation d'approches biotechnologiques visant à adapter des mécanismes de défense efficaces sur certaines espèces végétales qui en sont dépourvues ou tout simplement pour en augmenter l'efficacité. Un moyen d'approfondir la connaissance de ces mécanismes naturels de défense passe par l'étude du cycle de multiplication de ces virus et l'identification de mécanismes centraux dont l'inactivation pourrait à terme conduire à la production d'espèces végétales sur lesquelles l'infection virale n'aurait que peu ou pas d'impact. De par leurs mécanismes de fonctionnement, les systèmes de résistance dits actifs que sont les résistances liées à l'extinction génique cytoplasmique (PTGS) ou aux activités catalytiques du protéasome ou encore les résistances conférées par les gènes R ne constituent pas une source adaptée d'informations quant au cycle de multiplication des virus contre lesquels ils se mettent en place. A l'inverse, l'étude des systèmes de défense dits passifs, c'est à dire des mécanismes viraux affectés par ce manque de compatibilité, mis en jeu notamment lors de phénotypes de résistance conférés par des gènes récessifs, et l'étude des moyens que les virus mettent en œuvre pour la restaurer, sont plus à même de fournir des indications intéressantes sur les processus qui constituent le cycle viral.

Discussion

Les recherches menant à la caractérisation de ces mécanismes d'incompatibilité ont pu être mises en œuvre par diverses approches expérimentales s'intéressant soit aux facteurs viraux ou plus particulièrement aux facteurs impliqués dans les stratégies virales conduisant à la restauration de la compatibilité, soit aux facteurs de l'hôte impliqués dans l'incompatibilité notamment par le biais du clonage de gènes de résistance récessifs ou dont la mutation entraîne une perte de sensibilité au virus. Les virus appartenant au genre Potyvirus constituent un des modèles d'étude les plus utilisés. En effet, l'importance économique des dégâts qu'ils provoquent a stimulé la recherche en sélection variétale qui a pu mettre ainsi en évidence l'existence d'un grand nombre de phénotypes de résistance contrôlées par des gènes récessifs (Diaz-Pendon et al., 2004). De manière concomitante, l'utilisation en champ de ces ressources génétiques a révélé l'émergence d'isolats potyviraux pouvant se multiplier sur ces variétés résistantes malgré la présence de facteurs incompatibles à l'origine. Des analyses génétiques comparant des isolats viraux se multipliant sur ces plantes résistantes et des isolats ne le pouvant pas ont été rendues possibles grâce au séquençage et à l'obtention de clones d'ADNc infectieux de nombreux potyvirus. Dans de nombreux systèmes biologiques plante/potyvirus, ces analyses ont montré que le facteur viral conditionnant la restauration de la compatibilité entre les plantes résistantes et les isolats s'y multipliant était la protéine VPg (Keller et al., 1998, Nicolas et al., 1997, Sato et al., 2003, Schaad et al., 1996). Ces résultats ont suggéré que la VPg des potyvirus était impliquée dans un mécanisme clé du cycle viral souvent mis en défaut lors des résistances contrôlées par des gènes récessifs ou, en supposant que ces gènes récessifs soient impliqués dans des mécanismes différents dans le cycle viral, que la VPg y tenait une position centrale. Partant de ce postulat, la protéine VPg a été utilisée dans le système de double hybride dans la levure pour cribler l'ensemble des facteurs codés par la cellule végétale et identifier des interacteurs potentiels. Cette approche menée pour le TEV et le TuMV a permis de montrer une interaction de la VPg avec deux protéines cellulaires, respectivement les facteurs d'initiation de la traduction eIF4E et son isoforme eIF(iso)4E, interaction qui s'avère indispensable pour l'infectivité du TuMV sur B. perviridis (Leonard et al., 2000, Schaad et al., 2000, Wittmann et al., 1997a). Indépendamment, la caractérisation de mutants d'A. thaliana présentant un phénotype de perte de sensibilité aux potyvirus a montré que le facteur eIF(iso)4E était affecté (Duprat et al., 2002, Lellis et al., 2002).

Sur la base de ces informations, une approche par gène candidat a été utilisée pour identifier les gènes de résistance impliqués dans plusieurs autres systèmes biologiques plante/potyvirus. Ainsi, dans les pathosystèmes PVY/poivron et PSbMV/pois, la corrélation entre les différences de séquences du facteur eIF4E issus d'un ensemble de variétés résistantes ou sensibles et la présence ou non, chez ces mêmes variétés, d'un allèle récessif de résistance des gènes *pvr2* et *sbm1*, respectivement, a permis de suggérer que, dans ces pathosystèmes, eIF4E était bien le produit codé par ces gènes de résistance. Des analyses par complémentation fonctionnelle ont permis de confirmer ces hypothèses (Gao et al., 2004, Ruffel et al., 2002).

Dans le modèle biologique LMV/Laitue, la même approche par gène candidat a montré que le facteur eIF4E (Ls-eIF4E chez la laitue) était lui aussi le produit du gène *mo1* dont les allèles récessifs *mo1*¹ et *mo1*², codant donc pour les formes Ls-eIF4E¹ et Ls-eIF4E², confèrent à l'état homozygote une absence de sensibilité (et donc pour l'agronome une résistance) au LMV (Nicaise et al., 2003a). Une première approche de génétique inverse avait permis de montrer qu'une portion centrale du LMV, comprenant notamment la région codant pour la VPg, portait les déterminants du contournement de la résistance *mo1* (Redondo et al., 2001). Ce premier élément suggérait qu'à l'instar d'autres potyvirus, le LMV pourrait contourner l'incompatibilité conférée par des formes défectives d'eIF4E par le biais de la VPg.

Partant de ces éléments, l'objectif du travail présenté était de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse en identifiant véritablement le facteur du LMV impliqué dans les relations de compatibilité contrôlés, chez la laitue, par le facteur eIF4E.

2. Le contournement de la résistance *mo1* par le LMV ne correspond pas à un modèle « gène pour gène ».

Les premiers travaux de génétique inverse consistant à affiner la cartographie initiée auparavant permettent de montrer que la protéine VPg joue effectivement un rôle dans la restauration de la compatibilité entre le LMV et la laitue. Plus précisément, la VPg du LMV-E, isolat se développant sur les variétés mol^1 et mol^2 , permet aux virus recombinants la codant de s'accumuler sur des variétés de laitue exprimant la forme Ls-eIF4E¹. Cependant, l'analyse du comportement des LMV chimériques possédant une portion génomique codant pour un domaine de la CI et la 6K2 a montré que cette région était elle aussi impliquée dans la compatibilité du LMV sur les variétés codant pour les formes non-permissives d'eIF4E : d'une part, ces analyses montrent que la VPg du LMV-E est insuffisante pour restaurer une pleine compatibilité entre le LMV et la variété mol^2 et d'autre part, la région codant pour le domaine C-terminal de la CI et pour la 6K2 suffit à elle seule à conférer la capacité à se multiplier sur des variétés exprimant la forme Ls-eIF4E¹ et est absolument nécessaire pour qu'il se multiplie sur des variétés exprimant la forme Ls-eIF4E². Ces résultats compliquent donc notre hypothèse de travail de départ et suggèrent une complexité jusqu'alors inédite dans les modèles impliquant les potyvirus. En effet, tous les travaux sur le contournement des gènes récessifs de résistance aux potyvirus montrent qu'une seule protéine virale est en jeu, la VPg dans la grande majorité des cas et la région codant pour la P3 et la 6K1 dans un seul cas (Voir paragraphe 2.3. de l'Introduction). Dans le modèle LMV/Laitue, nous montrons par ces approches de génétique inverse que deux régions du génome du LMV (et donc potentiellement au moins deux protéines virales) sont suffisantes indépendamment l'une de l'autre pour restaurer la compatibilité entre le LMV et les variétés de laitue codant pour les formes résistantes de *Ls-eIF4E*.

3. Etude de la diversité naturelle du LMV.

Partant de ces résultats, nous avons cherché à déterminer quel facteur, de la CI ou de la 6K2, conditionnait la capacité d'isolats du LMV à se multiplier sur des variétés mol^1 ou mol^2 et d'identifier les acides aminés codés par la région CI-6K2 et la VPg qui sont impliqués dans cet aspect. Dans ce but, dans un premier temps nous nous sommes basés sur les différences de séquences dans les régions génomiques concernées d'un ensemble d'isolats du LMV aux propriétés variées vis-à-vis de la résistance conférée par les différents allèles du gène mol. L'analyse de la diversité du LMV dans ces régions révèle que nous pouvons corréler ce qu'on peut considérer comme trois pathotypes différents vis-à-vis de mol avec trois différents types de séquences (**Figure 28**) :

Le premier pathotype englobe les isolats du LMV qui n'ont pas la capacité de contourner la résistance *mo1* qu'elle soit conférée par l'allèle *mo1*¹ ou *mo1*². Les isolats appartenant à ce pathotype ne présentent pas de différence de séquence significative, les différences observées ne semblent pas corrélées avec l'incapacité de contourner la résistance *mo1*.

Le deuxième pathotype englobe les isolats du LMV qui peuvent uniquement contourner la résistance associée à l'allèle mol^1 . Quand on s'intéresse à leurs séquences, on constate un plus grand nombre de différences par rapport à la séquence des isolats non contournants. Ces différences semblent principalement localisées dans la région codant pour la VPg même si un isolat présente une différence potentiellement impliquée dans le contournement de mol^1 au

niveau de la séquence de la 6K2 (la position 2018). Nous pouvons noter que nous avons obtenu de manière expérimentale un virus recombinant dont la séquence est de même type, le LMV-0staflE, qui code pour la VPg du LMV-E ; ce virus chimérique appartient également à ce pathotype, ce qui renforce notre observation. Nos données de séquences nous permettent de proposer plusieurs positions dans la VPg qui seraient impliquées dans la compatibilité du LMV avec les variétés mol^1 notamment les positions 2111 et 2121. Une approche par mutagenèse dirigée dont les premières étapes ont déjà été effectuées (mutagenèse du LMV-0 sur ces positions) nous permettrait de vérifier l'implication de ces positions.

Le dernier pathotype englobe les isolats qui ont la capacité de contourner la résistance conférée par les deux allèles mol^1 et mol^2 . Quand on analyse leurs séquences, on constate que les différences avec le premier pathotype sont réparties dans les région codant pour le domaine C-terminal de la CI, la VPg et dans une moindre mesure, la 6K2. Le comportement d'un des virus recombinants construits, le LMV-0xbastyE, montre que la capacité de contourner les deux types de résistances est plutôt corrélée avec des différences de séquences au niveau de la région codant pour l'extrémité de la CI et la 6K2. Néanmoins, nous ne retrouvons pas d'isolats naturels possédant de différences au niveau de cette région sont toujours accompagnées de différences au niveau de la région codant pour les apparaissent au niveau de la région CI-6K2, des mutations compensatoires apparaissent rapidement dans la VPg. Il est également possible que de tels isolats naturels possédant une VPg de type « non-contournant » existent mais qu'ils n'aient pas encore été trouvés ou identifiés.

Sur la base de ces données, nous avons cherché à déterminer quelles positions de la région CI-6K2 étaient impliquées dans le contournement de la résistance *mo1*. Deux positions dans la CI semblent plus particulièrement corrélées avec les propriétés de ces isolats : les positions 1927 et 1946. Nous avons donc construit deux mutants du LMV-0 sur ces deux positions et un seul d'entre eux, le mutant LMV-0-S1946T, a permis de retrouver partiellement les propriétés des isolats appartenant au troisième pathotype et celles du virus recombinant LMV-0xbastyE. En effet, ce mutant se multiplie en systémie sur la variété *mo1*² testée de la même manière que le LMV-E et le LMV-0xbastyE mais se multiplie de beaucoup plus faible sur une des variétés *mo1*¹. Ceci montre que la capacité du LMV de contourner la résistance *mo1*¹ ne peut imputée à une seule mutation. Nous savions déjà que des mutations dans la VPg pouvaient conférer cette capacité mais le comportement de ce mutant montre que d'autres positions dans la région CI-6K2 sont aussi impliquées. Malgré la redondance d'une mutation en position 1927 chez les isolats contournants, étant donné que le mutant LMV-0-A1927V ne peut pas contourner la résistance *mo1*, nous pensons qu'une autre position de la région CI-6K2 est impliquée. Ce pourrait être la position 2018 que l'on retrouve chez un isolat contournant seulement la résistance *mo1*¹.

4. Un modèle d'interaction entre les facteurs viraux identifiés et le facteur elF4E.

L'ensemble des éléments obtenus lors de la cartographie des déterminants du contournement de la résistance associée à *mo1* et de l'étude de la diversité naturelle du LMV combinés avec les données sur Ls-eIF4E nous ont permis de mettre en scène les facteurs viraux identifiés et les différentes formes de Ls-eIF4E dans un modèle simplifié expliquant les relations de compatibilité entre le LMV et la laitue (**Figure 29**).

Ce modèle confronte les trois formes d'eIF4E codées par les différentes variétés de laitue qui interagissent avec les différentes formes des trois déterminants viraux potentiels identifiés précédemment : la VPg impliquée dans la compatibilité avec Ls-eIF4E¹, l'acide aminé en position 1946 du domaine C-terminal de la CI impliqué dans la compatibilité avec Ls-eIF4E¹ et Ls-eIF4E² et l'autre déterminant potentiel positionné dans la région codant pour le domaine C-terminal de la CI et pour la 6K2, ce dernier étant plus spécialement impliqué dans la compatibilité avec Ls-eIF4E¹. Dans ce modèle, chacun de ces déterminants viraux peut être sous deux formes, selon qu'ils sont codés par la séquence génomique du LMV-0 ou du LMV-E. Le cas le plus simple est le contexte d'une variété codant pour Ls- $eIF4E^0$: ce facteur peut interagir avec toutes les formes de chaque déterminant viral et permet la multiplication d'un LMV quelle que soit la combinaison de formes de déterminants codées par celui-ci. Dans le contexte Ls-eIF4E¹, seules les formes de déterminants viraux codées à partir d'une séquence du LMV-E sont capables d'interagir avec le facteur Ls-eIF4E¹. Dans notre modèle, il suffit qu'un seul déterminant viral soit compatible avec Ls-eIF4E pour que la multiplication du LMV soit possible bien que l'implication de l'acide aminé 1946 dans la compatibilité avec Ls-eIF4E¹ soit mineure. Ceci permettrait d'expliquer la capacité à se multiplier sur les variétés *mol*¹ des LMV ne comportant que la VPg ou la région CI-6K2 du LMV-E ou même seulement une thréonine en position 1946. Dans le contexte Ls-eIF4E², parmi les déterminants viraux identifiés, seule la présence de cette thréonine permet d'interagir avec ce facteur. Une incertitude reste en ce qui concerne la VPg du LMV-E qui pourrait inhiber les interactions du complexe CI-6K2 avec Ls-eIF4E² puisque l'influence négative de la présence de la VPg du LMV-E dans les clones l'exprimant n'a pas été confirmée.

Ce modèle soulève quelques questions et entraîne quelques hypothèses qui demandent à être validées.

La première question soulevée concerne l'identification précise des deux autres facteurs viraux. L'approche par mutagenèse dirigée n'a été exploitée que pour vérifier le rôle de deux positions candidates dans le domaine C-terminal de la CI et a permis de n'en valider qu'une seule, la position 1946. Cette approche sous-exploitée jusqu'alors devrait être à nouveau mise en oeuvre pour identifier les acides aminés de la VPg d'une part et ceux du domaine C-terminal de la CI et la 6K2 d'autre part qui sont impliqués dans la compatibilité avec Ls-eIF4E¹. Une autre approche envisagée et déjà initiée lors de ces travaux est de ne pas se limiter à la variabilité naturelle du LMV pour trouver ces informations mais d'opérer par une stratégie de mutagenèse aléatoire. Cela consiste à provoquer des mutations aléatoires sur une région amplifiée par PCR en optimisant l'infidélité de la Taq ADN polymérase grâce à la présence d'ions manganèse (Fromant et al., 1995, Lin-Goerke et al., 1997) et à inoculer en masse les mutants de cette banque ainsi générée sur une variété résistante moI^1 ou moI^2 et sélectionner les mutants du LMV présentant un gain d'infectivité. Nous avons d'ores et déjà engagé cette approche dans le cadre de cette thèse, et obtenu une banque de clones complets mutants dans le domaine central de la VPg.

On peut aussi s'interroger sur les stratégies utilisées par d'autres isolats du LMV pour contourner $mo1^1$ et/ou $mo1^2$. L'alignement des séquences correspondant, pour ces isolats, à la région codant pour le domaine C-terminal de la CI et pour la 6K2 semble indiquer que certains isolats du LMV partagent des similitudes avec le LMV-E et donc potentiellement les mêmes déterminants, notamment sur la position 1946 où la plupart des isolats apparentés au type Most possèdent une isoleucine à la place de la sérine présente chez le LMV-0. Bien qu'une thréonine soit présente en cette position chez le LMV-E, on peut supposer que la substitution d'une alanine en isoleucine en position 1946 puisse restaurer à son tour la compatibilité du LMV vis-à-vis du facteur Ls-eIF4E². Cette hypothèse est cependant mise en échec notamment par la séquence de l'isolat LMV-13 contournant $mo1^1$ et $mo1^2$ mais qui ne présente, dans cette région, que deux substitutions : Ala-1927-Val et Val-2018-Ile. La mutation Ala-1927-Val n'étant pas suffisante pour restaurer la compatibilité avec Ls-eIF4E¹
ni avec Ls-eIF4E². Chez le LMV-13, la capacité à se multiplier sur une variété $mo1^2$ serait conférée par un autre acide aminé que celui positionné en 1946, soit par un unique acide aminé qui aurait donc une forte implication, soit une combinaison d'acides aminés « collaborant » entre eux et n'ayant chacun d'eux qu'une implication minime comme c'est le cas de la position 1946 vis-à-vis de la compatibilité avec Ls-eIF4E¹. Quoiqu'il en soit, bien que cette utilisation de la richesse du pathosystème du LMV ait permis l'identification précise d'un déterminant majeur de la restauration de la compatibilité du LMV-E avec Ls-eIF4E², cet exemple du LMV-13 montre les « dangers » toujours présents qu'il y aurait à transposer les résultats de génétique inverse concernant un isolat à d'autres isolats de propriétés biologiques similaires. Plusieurs « solutions » existent peut-être au sein de l'espèce LMV pour répondre à une même problématique, le contournement de *mo1*.

Sur tous les isolats naturels du LMV connus, outre ceux qui ne contournent aucun allèle de *mol*, on ne connaît que des isolats capables de contourner seulement mol^1 et des isolats contournant à la fois mol^1 et mol^2 , et aucun ne contournant seulement mol^2 . Le modèle proposé peut expliquer cette observation en transposant aux autres isolats du LMV contournant mol^1 et mol^2 le fait que, pour le LMV-E, le seul facteur de compatibilité avec Ls-eIF4E² identifié, l'acide aminé 1946, est aussi impliqué dans la compatibilité avec LseIF4E¹. Ainsi, tout en se gardant d'affirmer que l'acide aminé 1946 est aussi impliqué chez ces autres isolats, cela signifierait que, quel qu'il puisse être, le déterminant leur conférant la capacité de se multiplier sur mol^2 leur donnerait automatiquement la capacité de se multiplier aussi sur mol^1 . Cela pourrait être dû à la combinaison de deux exigences. Tout d'abord, cela nécessiterait la proximité, au niveau de la structure tridimensionnelle de Ls-eIF4E, du site de mutation conduisant à la forme Ls-eIF4 E^2 et du site de celle conduisant à la forme Ls-eIF4 E^1 . Ce qui semble effectivement le cas entre la mutation A70P du Ls-eIF4E² et la mutation QGA108∆H du Ls-eIFE4¹ (Nicaise et al., 2003b). Cela nécessiterait ensuite une conservation, parmi tous les isolats contournant mol^2 , de la conformation du déterminant interagissant avec Ls-eIF4E², positionnant ainsi ce déterminant toujours en vis-à-vis du site de mutation conduisant à la forme Ls-eIF4E¹. Cette conformation leur permettrait d'interagir au niveau des deux sites et de contourner à la fois mol^1 et mol^2 .

5. Vers la validation du modèle d'interactions proposé.

Un des principaux postulats de ce modèle est que la compatibilité entre les formes de LseIF4E et les facteurs viraux identifiés se traduit par une interaction physique. Inversement à cette hypothèse, l'incompatibilité entre les formes résistantes de Ls-eIF4E et les facteurs viraux du LMV-0 aurait pu s'expliquer par une interaction conduisant à la séquestration des facteurs viraux, les rendant ainsi inaptes à jouer leur rôle dans le cycle du LMV. Ceci correspondrait plutôt au mécanisme d'un gène de résistance dominant comme les gènes RTM1 et RTM2 (Chisholm et al., 2001). Pour confirmer ou infirmer notre modèle, il convient désormais de mettre en œuvre la caractérisation biochimique des interactions entre les formes de Ls-eIF4E et les différentes formes des facteurs viraux impliqués. La première étape serait de démontrer les interactions entre la VPg, la CI et éventuellement la 6K2. En effet, notre modèle ne fonctionne que si les trois déterminants viraux identifiés collaborent et « complémentent » le défaut d'interaction d'un des facteurs par la restauration de l'interaction d'un autre facteur avec le Ls-eIF4E. Cette « complémentation » ne peut se faire que s'il y a un lien physique entre ces protéines virales. Or nous savons que des produits de clivage partiel de la polyprotéine du LMV peuvent avoir une durée de vie suffisamment importante pour être détectée notamment des précurseurs de ces trois protéines (Leonard et al., 2004, Merits et al., 2002). La deuxième étape de cette caractérisation consiste en la mise en évidence d'une interaction entre le Ls-eIF4E et la VPg d'une part et la CI d'autre part, notamment via son domaine C-terminal. En ce qui concerne l'interaction entre le facteur eIF4E et la VPg, nous savons que des interactions eIF(iso)4E/VPg et eIF4E/VPg ont déjà été démontrées dans les pathosystèmes TuMV/A. thaliana et TEV/N. tabacum (Leonard et al., 2000, Leonard et al., 2004, Schaad et al., 2000, Wittmann et al., 1997a). Un étude récente sur un népovirus, le ToRSV (Tomato ringspot virus), a aussi montré une interaction entre le précurseur VPg-NIaPro du ToRSV et le facteur eIF(iso)4E bien que le déterminant de l'interaction soit dans ce cas là positionné dans le domaine protéasique (Leonard et al., 2002). Des interactions du même type ont été révélées chez des virus infectant les animaux : ainsi la protéine liée au génome du IBDV (Infectious bursal disease virus, Birnaviridae), un virus à ARN double brin, interagit avec le facteur d'initiation de la traduction eIF4AII (Tacken et al., 2004) et la VPg du Norwalk virus (Calicivirus) interagit avec le facteur eIF3 (Daughenbaugh et al., 2003). Tous ces éléments semblent indiquer que l'interaction entre la VPg et le complexe d'initiation de la traduction est une caractéristique commune des virus dont le génome est lié à une VPg. Au sein de notre équipe de recherche, de premiers éléments viennent confirmer cette hypothèse avec la mise en évidence par ELISA et par la fluorométrie, une technique permettant de mesurer une interaction entre la VPg du LMV et le Ls-eIF4E, d'une part, et le HcPro du LMV, d'autre part (Roudet-Tavert, soumis) ; Michon, soumis). Aucune publication n'a pu démontrer à ce jour une interaction entre la CI d'un potyvirus et un facteur impliqué dans le complexe d'initiation de la traduction mais, toujours au sein de notre équipe, des expériences réalisées au vu des résultats de cette thèse ont récemment permis de révéler des interactions faibles entre la CI du LMV et le Ls-eIF4E dans le système de double hybride dans la levure (Walter, communication personnelle). Pour promouvoir notre modèle d'interaction et en étayer les hypothèses sous-jacentes, la caractérisation biochimique des interactions entre le Ls-eIF4E et les facteurs du LMV identifiés doit aller au-delà de la simple mise en évidence d'interactions entre ces facteurs. Elle doit permettre de montrer un différentiel qualitatif ou quantitatif du niveau d'interactions en fonction de la confrontation des différentes formes de Ls-eIF4E avec les différentes formes de VPg et CI, codées par le LMV-0 ou le LMV-E. Les expériences d'expression ectopique par agroinfiltration de Ls $eIF4E^2$ ou de Ls- $eIF4E^1$ dans une variété mol^2 , puisqu'elles permettent de restaurer l'accumulation du LMV-0 en systémie, suggèrent un différentiel d'interaction avec la VPg pour les différentes formes de Ls-eIF4E et notamment une affinité plus faible en ce qui concerne les formes Ls-eIF4E1 et Ls-eIF4E2. Une plus grande concentration de ces Ls-eIF4E contrebalancerait leur faible affinité avec les facteurs viraux et le LMV pourrait tant bien que mal poursuivre son cycle.

On pourrait penser que l'expression des symptômes du LMV sur les plantes résistantes mol^1 et mol^2 est dépendante de la forme de Ls-eIF4E exprimée, de l'efficacité de ces interactions et qu'ils reflèteraient le niveau d'accumulation du virus. Cela ne peut être vrai pour toutes les variétés puisque sur Floribibb, la restauration des interactions entre Ls-eIF4E¹ et la CI, la 6K2 et la VPg confère au virus la capacité de se multiplier mais pas d'émettre des symptômes observables comme pour le LMV-E. Cet élément combiné au fait que dans l'ensemble, le LMV s'accumule moins sur Floribibb que sur Mantilia indique qu'en plus de la résistance conférée par l'allèle *Ls-eIF4E¹*, Floribibb possède d'autres facteurs qui affectent quantitativement la multiplication du LMV. A ce stade des recherches sur le modèle LMV/Laitue, nous ne pouvons pas savoir quel est l'incidence exacte de la forme de Ls-eIF4E exprimée sur la mise en place d'une tolérance ou d'une résistance et il se peut que le fond génétique des différentes variétés soit prépondérant sur le phénotype de résistance de ces variétés. ne Il faudrait effectuer des croisements entre une variété tolérante et une variété résistante exprimant toutes les deux la même forme de Ls-eIF4E (comme les variétés *mol*¹

gènes impliqués et de vérifier leur caractère dominant ou récessif. A terme ce type d'approche nous permettrait de cartographier et de cloner ces gènes.

En parallèle, on pourrait d'ores et déjà essayer d'identifier le facteur du LMV-E qui permet de se multiplier et d'exprimer des symptômes sur Floribibb en effectuant une série de clones doublement recombinants. Ces clones comporterait la région du LMV-E codant pour la CI, la 6K2 et la VPg et échangeraient d'autres parties du génome de manière à pouvoir cartographier ces autres déterminants viraux.

6. Rôle du complexe formé entre le facteur elF4E et les facteurs viraux identifiés dans le cycle viral.

Le rôle dans le cycle viral de ces interactions entre le facteur eIF4E, la région CI-6K2 et la VPg est encore à déterminer. Plusieurs hypothèses peuvent tout de même être avancées. La première est un rôle dans la traduction de l'ARN viral notamment parce que eIF4E est un des facteurs clés de l'initiation de la traduction (Gallie, 2002). La VPg jouerait le rôle de la coiffe des ARNm et participerait au recrutement d'eIF4E par l'ARN viral, première étape pour le recrutement des autres facteurs nécessaires à la traduction. Dans ce contexte, la CI qui possède une activité hélicase (Lain et al., 1990), un domaine de fixation à l'ARN (Fernandez et al., 1995) et un domaine ATPase (Lain et al., 1991) pourrait jouer un rôle dans la traduction de l'ARN viral. Le site d'interaction supposée entre la CI et eIF4E est dans la partie C-terminale qui ne possède aucune de ces activités enzymatique : on peut donc supposer que ce domaine a un rôle structurel dans le complexe formé et que les domaines catalytiques sont positionnés vis-à-vis de l'ARN viral.

Cependant plusieurs données vont à l'encontre de cette hypothèse. Tout d'abord, l'existence chez le TEV d'une initiation de la traduction indépendante de la coiffe (Gallie, 2001). Ce mécanisme dépendant du facteur de traduction eIF4G utilise une structure secondaire de la région 5' non traduite de l'ARN viral, un IRES (Internal Ribosome Entry Site) qui permet le recrutement du ribosome pour initier la traduction. Ensuite, les études d'interaction entre la VPg du TuMV et le facteur eIF(iso)4E *d'A. thaliana* ont démontré que le site d'interaction était différent du site d'interaction avec la coiffe et qu'il y avait une inhibition non compétitive entre la VPg et un analogue de la coiffe (Leonard et al., 2000). Chez la laitue, une étude prédictive de la structure tridimensionnelle d'eIF4E a montré que les mutations conférant la résistance au LMV étaient situées non pas sur le site de fixation avec la coiffe des

ARNm mais dans des structures adjacentes dont la modification de la conformation n'entraînerait pas de modification de la poche d'interaction avec la coiffe (Nicaise et al., 2003a). Ceci semble aussi être le cas pour le gène *pvr2* du poivron où les mutations entraîneraient les mêmes modifications structurales que pour Ls-eIF4E (Ruffel et al., 2002). Ces éléments combinés indiqueraient que l'interaction de la VPg des potyvirus avec eIF4E ne serait pas clairement reliée à un rôle de séquestration d'eIF4E de la part de la VPg ou du moins que la VPg de ces potyvirus peut interagir et séquestrer le facteur eIF4E sans pour autant empêcher le facteur eIF4E d'interagir avec la coiffe des ARNm.

Un autre rôle possible de ces interactions serait dans le cadre de la réplication du LMV : la CI, la 6K2 et la VPg sont toutes les trois des protéines virales impliquées dans la réplication. La protéine CI de par ses diverses fonctions notamment son activité hélicase, permettrait de dérouler les structures secondaires d'ARN double brin apparaissant lors de la réplication. La protéine transmembranaire 6K2 jouerait un rôle dans la localisation du complexe de réplication dans les membranes du réticulum endoplasmique, là où se déroule la réplication des potyvirus (Restrepo-Hartwig & Carrington, 1992, Restrepo-Hartwig & Carrington, 1994, Schaad et al., 1997a). La protéine VPg, liée de manière covalente à l'ARN viral, selon un modèle exposé par Merits en 1998 et selon les données sur la réplication des picornavirus, pourrait interagir dans cette position avec d'autres composants nécessaires à la réplication comme la réplicase et participer notamment à l'amorçage nécessaire à la synthèse des brins négatifs et positifs (Agol et al., 1999, Andino et al., 1999, Merits et al., 1998).

L'étude récente sur l'interaction entre la VPg du TuMV d'une part, et eIF4E et la PABP d'*A. thaliana* d'autre part, montre que ces interactions ont lieu dans la fraction membranaire correspondant au réticulum endoplasmique et que la VPg interagit avec ces facteurs cellulaires sous la forme de deux précurseurs, VPg-NIaPro mais aussi 6K2-VPg-NIaPro. Ceci va partiellement dans le sens de notre modèle qui nécessite une interaction physique entre CI-6K2 et VPg. L'interaction de ce complexe VPg-eIF4E avec la PABP entraîne une circularisation de l'ARN qui est nécessaire à la traduction (Gallie, 2002) et les études chez les picornavirus montrent qu'une circularisation de l'ARN viral est nécessaire à leur réplication (Herold & Andino, 2001, Thornton et al., 1981). On peut poser comme hypothèse que dans notre modèle, les interactions entre Ls-eIF4E, CI-6K2 et VPg participent à la circularisation de l'ARN viral pour permettre à la fois la traduction du génome viral et sa réplication. Dans ce contexte, eIF4E n'aurait pas un rôle direct dans la réplication précoce de l'ARN viral et sa réplication.

Ces interactions peuvent potentiellement être impliquées dans deux autres aspects du cycle viral. Le facteur eIF4E est connu pour être aussi localisé dans le noyau où il pourrait jouer un rôle dans la traduction nucléaire ou dans l'exportation des ARNm vers le cytoplasme (Strudwick & Borden, 2002). La VPg et son précurseur NIa sont connues pour s'accumuler dans le noyau (Hajimorad et al., 1996). On pourrait formuler comme hypothèse que ce complexe de protéines CI-(6K2)-VPg-eIF4E est importé dans le noyau, soit pour y jouer un rôle dans la traduction nucléaire, soit dans la régulation de gènes cellulaires au profit de la multiplication virale (soit l'inhibition de gènes de défense, soit la stimulation de gènes nécessaires à la multiplication). Cependant cette hypothèse est contredite par le fait qu'à ce jour ni l'ARN viral, ni la CI, ni la 6K2 des potyvirus n'aient été détectées dans le noyau de cellules infectées. Une dernière hypothèse énoncée pour la première fois en 2002 (Lellis et al., 2002) et qui ressurgit avec le clonage chez le pois du gène *sbm1* de résistance au PSbMV (Gao et al., 2004), est que le facteur eIF4E participe au mouvement du virus de cellule à cellule. On pense actuellement que l'infection virale se propage de cellule à cellule sous forme de particules qui ne contiennent comme protéines que la VPg et la CP. De plus la CI semble impliquée dans la translocation à travers le plasmodesme puisqu'elle a été détectée chez divers potyvirus à proximité de ces organes de communication intercellulaire (voir Revers et al., 1999 pour revue). Enfin des études ont montré que le facteur eIF(iso)4E pouvait interagir avec les microtubules formant le cytosquelette, microtubules impliquées dans le trafic des protéines à travers la cellule et le plasmodesme (Bokros et al., 1995). Bien que le rôle de la 6K2 (potentiellement impliquée dans les interactions avec Ls-eIF4E) reste indéterminé, tous ces éléments laissent penser que les interactions entre Ls-eIF4E et les facteurs viraux CI-6K2 et VPg peuvent avoir un rôle dans le mouvement de cellule à cellule du LMV.

7. Vers l'identification d'autres facteurs impliqués dans la compatibilité du LMV et les variétés de laitue résistantes.

Après avoir validé notre modèle d'interaction entre Ls-eIF4E, CI-6K2 et VPg, un des moyens pour étayer les hypothèses précédentes serait d'identifier les autres facteurs viraux et cellulaires impliqués dans cette interaction. Ces informations pourront venir d'autres études de génétique inverse menées dans d'autres pathosystèmes faisant intervenir d'autres potyvirus ou des espèces virales proches qui permettront éventuellement d'identifier d'autres facteurs viraux impliqués dans la restauration de la compatibilité entre ces virus et des gènes de résistances. C'est déjà le cas par exemple chez le pois où les gènes viraux de la P3 et de la 6K1 permettent de contourner la résistance récessive *sbm2* (Johansen et al., 2001), ou encore pour le système plus éloigné Melon/MNSV (*Melon necrotic spot virus, Carmovirus*) dont le déterminant viral correspondant au domaine C-terminal de la CP et à la région 3' non codante permet de restaurer la résistance conférée par le gène récessif *nsv* récemment identifié comme étant le gène eIF4E (Diaz et al., 2004, Orjeda et al., 2004).

La caractérisation de la plupart des gènes de résistance récessifs connus sera aussi une source intéressante d'indications. Le clonage de gènes de résistance au RYMV (*Sobemovirus*) et au CMV (*Cucumovirus*) a d'ailleurs récemment permis d'identifier le gène eIF4G comme source de résistance récessive potentielle (Albar et al., 2003, Boisnard et al., 2004, Yoshii et al., 2004). Mais la source la plus importante d'informations à ce sujet semble être l'identification de facteurs cellulaires et viraux par le biais d'études d'interactions physiques. Le criblage de banques d'ADNc de plantes par la technique du double hybride dans la levure a permis d'identifier eIF4E et eIF(iso)4E comme étant les interacteurs de la VPg chez les potyvirus. Cette technique ne permet de mettre en évidence que les interactions les plus fortes et les interactions faisant intervenir deux protéines ou domaines protéiques. C'est peut être pour cela que les interactions entre la VPg ou la CI du LMV avec Ls-eIF4E n'ont pu être facilement démontrées.

De nos jours, il existe d'autres techniques d'investigation qui permettent de purifier et d'isoler des complexes protéiques formés à partir d'interactions faibles, notamment la technique dite du TAP-tag (Rohila et al., 2004). Cette technique, dont la mise au point est en route au sein de notre équipe, consiste à exprimer une protéine fusionnée à deux ligands très spécifiques dans une cellule (infectée ou non), de faire une double purification par chromatographie des complexes formés avec la protéine *in planta* et d'identifier chaque protéine de ce complexe par micro-séquençage ou par analyse au spectromètre de masse. Cette technique puissante mais délicate a déjà permis par exemple d'identifier, chez la levure, les différents interacteurs d'un complexe cycline-CDK (cyclin-dependant kinase) impliqué dans le cycle cellulaire (Honey et al., 2001).

A terme, la combinaison de toutes ces approches, que ce soient la génétique fonctionnelle des potyvirus, les approches permettant la caractérisation des facteurs de l'hôte (génétique classique, approche par gènes candidats, mutagenèse) ou les études de recherche extensive d'interacteurs avec les facteurs connus, permettra d'obtenir une plus grande connaissance du cycle viral et de la topographie complexe des interactions entre les facteurs viraux et

cellulaires impliqués. On peut prédire que les mécanismes les plus centraux seront aussi les plus rapidement élucidés. Ces informations pourront guider la recherche plus appliquée et faciliter les stratégies déjà utilisées comme la sélection variétale assistée par marqueurs moléculaires ou encore permettre d'optimiser les mesures prophylactiques.

Matériels et Méthodes

1 Matériel biologique

1.1 Les isolats de LMV utilisés

Plusieurs isolats de *Lettuce mosaic virus* (LMV) différant par leur origine géographique et leurs caractéristiques biologiques, ont été utilisés lors de ce travail (**Tableau 4**). Les isolats LMV-0, LMV-E, LMV-1, LMV-9 et LMV-13 ont été fournis par H. Lot (Station de Pathologie Végétale, INRA, Montfavet). L'isolat LMV-Dg, isolé sur la composée ornementale *Osteospermum*, a été fourni par T. Wetzel (Revers et al., 1997a) et les isolats LMV-AF198, LMV-AF199 ont été isolés sur laitue au Brésil par M. A. Pavan Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Brésil'; (Krause-Sakate et al., 2001). L'isolat A435 a été fourni par J. Thomas (Australie). Les isolats suivants ont été collectés par les chercheurs du laboratoire : Tn2, Tn4 en Tunisie en 1999 sur laitue, Cl2 sur laitue au Chili et Cordoue sur laitue en Espagne.

1.2 Les plantes

1.2.1 Matériel végétal

Toutes les plantes utilisées lors de ce travail ont été cultivées en serre à une température d'environ 25 °C et avec 16 heures d'éclairement par jour.

Tous les isolats de LMV ont d'abord été multipliés sur le cultivar de laitue Trocadéro (aucun gène de résistance connu). Les souches LMV-0 et LMV-E, ainsi que les virus recombinants ou mutants construits à partir de ces deux souches, ont été inoculés par la suite à d'autres cultivars de salade tels que Mantilia et Floribibb (portant le gène de résistance mol^{1}), Salinas 88 (portant le gène de résistance mol^{2}) ou Salinas (cultivar quasi-isogénique de Salinas 88 ne portant aucun gène de résistance connu).

1.2.2 Inoculation mécanique du virus

L'inoculum est obtenu par broyage de feuilles infectées dans un mortier en présence de Na_2HPO_4 25 mM, DIECA 2 % (p/v 1/3) additionné de Carborundum (400 mg/g de feuille). Les feuilles des jeunes plants sont alors frottées avec l'inoculum et aussitôt rincées avec de l'eau. Le matériel infecté, récolté 12 à 30 jours après inoculation, peut être conservé pendant plusieurs mois à 4 °C après lyophilisation ou utilisé frais.

1.2.3 Inoculation biolistique d'acides nucléiques

Le protocole de préparation du matériel à bombarder a été fourni par Bio-Rad. Aux 5 mg de billes d'or d'un micromètre de diamètre sont ajoutés 100 μ l de spermidine (0.05 M) et après avoir mélangé pendant 30 secondes au vortex, le plasmide est ajouté à raison de 100 ng par cartouche en présence de 100 μ l de CaCl₂ 1 M. Dix minutes à température ambiante sont nécessaires à la précipitation de l'ADN sur les billes d'or. Le mélange est ensuite lavé trois fois dans 1 ml d'éthanol absolu puis repris dans 600 μ l de PVP/éthanol 0.05 mg/ml. Il est alors placé dans un tube en plastique (Bio-Rad) et séché sous un flux d'azote. L'inoculation biolistique est réalisée avec le pistolet à particules Bio-Rad "Helios Gene Gun", à une pression d'hélium de 180 psi.

1.3 Les bactéries

1.3.1 Souches bactériennes

La bactérie Gram (-) *Escherichia coli* a été utilisée comme organisme de clonage lors de ce travail. Les souches employées, XL1-blue (Stratagene) et Top10F' (Invitrogen), présentent les génotypes et caractéristiques suivants :

<u>XL1-blue:</u> F' ::Tn10proA $^+B^+lacI^{Q}\Delta(lacZ)M15/recA1$ endA1 gyrA96 (Nal^r)thi hsdR17 ($r_k r_k^+$) supE44relA1 lac.

Cette souche porte une délétion dans la partie α du gène codant pour la β -galactosidase, permettant l' α -complémentation avec les plasmides de type pUC. Ces plasmides contiennent

en effet le domaine codant pour la partie α de la β -galactosidase dans lequel est situé le multisite de clonage (MSC). L'insertion d'un ADN au niveau de ce MCS entraîne l'inactivation de ce peptide. Ainsi en présence d'un substrat chromogène de la β -galactosidase, le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-Gal), les colonies bactériennes apparaissent bleues si leur β -galactosidase est active et blanches si cette enzyme n'est pas fonctionnelle. Ce système de sélection blanc/bleu permet une identification visuelle des bactéries contenant un plasmide recombinant.

<u>Top10F'</u>: F' (lacI^q Tet^r), mcrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), Φ 80lacZdM15, Δ lacX74, deoR, recA1, araD139, Δ (ara-leu)7697, galU, galK, rpsL, endA1, nupG. Cette souche est utilisée pour les clonages avec le plasmide pZeroTM-2 et permet aussi

Les bactéries, recombinantes ou non, sont conservées à -70 °C après ajout de 15 % p/v de glycérol dans une culture à saturation.

1.3.2 Milieux de culture

Les bactéries *E. coli* sont cultivées à 37 °C sur un milieu complet LB (milieu de Luria-Bertani, BRL) liquide sous agitation, ou solide (addition de 1.5 % d'agar bactériologique, BRL). Un litre de ce milieu contient 10 g de bacto-tryptone, 5 g d'extrait de levure, 10 g de chlorure de sodium. Après autoclavage à 120 °C pendant 20 minutes, le milieu est supplémenté en ampicilline (50 μ g/ml) ou kanamycine (50 μ g/ml) selon le gène de résistance porté par le plasmide à sélectionner. Pour sélectionner les bactéries hébergeant un plasmide pZeroTM-2 le milieu solide doit également contenir 1 mM d'IPTG comme inducteur du promoteur lac.

1.3.3 Transformation d'E. coli par électroporation

l'utilisation de l'α-complémentation avec les plasmides adéquats.

La transformation est réalisée selon la méthode d'électroporation (Dower et al., 1988, Neumann et al., 1982) qui consiste à introduire des macromolécules dans des cellules compétentes en créant des pores membranaires transitoires à l'aide d'un champ électrique. Les bactéries compétentes sont obtenues par lavages successifs de cellules en fin de phase exponentielle de croissance (DO₅₅₀=0.6) dans du glycérol 10 % froid et stérile (Zabarovsky & Winberg, 1990). Elles sont utilisées à une concentration de 5.10^5 cellules/ml. Un champ électrique de 1800V/cm est appliqué durant 9 millisecondes (résistance 200 Ω , capacité de 25 μ F) à l'aide d'un électroporateur Gene Pulser[®]II (Bio-Rad). Après une incubation de 1 h à 37 °C dans du milieu SOC (bacto-tryptone 2 % p/v, extrait de levure 0.5 % p/v, NaCl 10 mM, KCl 2.5mM, MgSO₄ 10 mM, MgCl₂ 10 mM, glucose 20 mM), les bactéries sont étalées sur du LB solide contenant l'antibiotique de sélection. Les boîtes sont incubées une nuit à 37 °C.

1.4 Vecteurs de clonage

Les vecteurs de clonages ont principalement été utilisés en tant que vecteurs intermédiaires, pour le clonage de séquences ADNc du LMV (**Figure 30**).

Le plasmide pBS+ (Bluescribe M13+, Stratagene), utilisé principalement en tant que vecteur intermédiaire, pour le clonage de séquences ADNc du LMV (Revers et al., 1997b), dérive du plasmide pUC19(Yanisch-Perron et al., 1985). Il possède entre autres, de son parent pUC, le système de sélection blanc/bleu des plasmides recombinants par α -complémentation et le gène de la β -lactamase conférant la résistance à l'ampicilline. Le multisite de clonage est flanqué des promoteurs des ARN polymérases des bactériophages T3 et T7, permettant la transcription *in vitro* de chacun des brins des fragments d'ADN clonés.

Le plasmide pBGS-SK+ construit par C. Robaglia (INRA, Versailles), a aussi été utilisé pour le clonage de séquences partielles de LMV. Il s'agit du vecteur pBGS18 (Spratt et al., 1986) dont le multisite de clonage a été remplacé par celui du plasmide pBluescript KS +/- (Stratagene). Il possède le gène de résistance à la kanamycine et la partie α du gène de la β -galactosidase permettant l' α -complémentation.

Le plasmide pJKKmf(-), dérivé du vecteur pGEM3Zf(-) (Kirschman & Cramer, 1988) a été utilisé comme vecteur intermédiaire pour le clonage des virus recombinants entre LMV-0 et LMV-E. Il possède un multisite de clonage dérivé du vecteur pUC-19 (Vieira & Messing, 1987), flanqué des promoteurs de transcription T7 et SP6. Il porte également le gène de résistance à la kanamycine et la partie α du gène de la β -galactosidase.

Le plasmide pZeroTM-2 est inclus dans le kit de clonage Zero backgroundTM/Kan cloning (Invitrogen). Il a été utilisé pour le clonage de fragments d'ADN obtenus par PCR dans la souche d'*E. coli*, TOP10F'. Il contient le gène de résistance à la kanamycine et le gène ccdB, létal pour *E. coli*, fusionné avec la partie C-terminale du gène $LacZ\alpha$. L'expression de ce gène sous contrôle du promoteur lac est induite par l'IPTG et entraîne la mort des bactéries. Le multisite de clonage étant situé dans le gène $LacZ\alpha$, la présence d'un insert ne permet plus l'expression du gène ccdB. Ce système sélectionne donc en présence de kanamycine et d'IPTG uniquement les bactéries contenant un plasmide recombinant.

Le plasmide pGEM[®]-T Easy (Promega) a été utilisé pour le clonage de produits de PCR issus d'une amplification par la Taq ADN polymérase ou la DyNAzymeTMEXT DNA Polymérase (Finnzymes). Ce plasmide permet le clonage de fragments portant une adénine 3' sortante à leurs extrémités. Il possède le gène de résistance à l'ampicilline et la partie α du gène de la β -galactosidase permettant la sélection blanc/bleu des plasmides recombinants.

Le plasmide pBS70T, construit au laboratoire par O. Le Gall et T. Candresse, a été utilisé pour l'obtention du clone complet de LMV-0. Il possède le gène résistance à l'ampicilline, le promoteur 35S du CaMV dont les séquences « enhancer » ont été dupliquées, nommé P70S, et le terminateur du gène de la nopaline synthétase d'Agrobacterium, NOS. Le multisite de clonage, identique à la portion *Eco*RI-*Pst*I de la cassette de clonage de pBS+, est situé entre P70S et NOS.

2 Techniques de manipulation des acides nucléiques

Au cours de ce travail, la plupart des techniques classiques de biologie moléculaire ont été utilisées suivant les protocoles décrits (Sambrook et al., 1989) et par les fiches techniques des fournisseurs des réactifs employés.

2.1 Déprotéinisation des acides nucléiques

Les solutions d'acides nucléiques sont traitées par un volume égal d'un mélange de phénol saturé en Tris-HCl 50 mM pH 8, chloroforme et alcool isoamylique (25/24/1, v/v/v). Après homogénéisation et centrifugation (18000g pendant 5 min à 4 °C), la phase aqueuse est traitée par un mélange de chloroforme et d'alcool isoamylique (24/1, v/v). Après une nouvelle homogénéisation et centrifugation, la phase aqueuse obtenue est dépourvue de protéines.

2.2 Précipitation des acides nucléiques

Les acides nucléiques en solution sont précipités par addition de 1/10^{ème} de volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 et de 2,5 volumes d'éthanol à 95 % ou 0,6 volumes d'isopropanol. Le mélange est centrifugé durant 15 min à 18000 g et à 4 °C. Le culot d'acides nucléiques est rincé par de l'éthanol à 70 % et séché.

Lorsque les acides nucléiques sont en faible quantité (moins de 1 μ g), des ARNt (10 μ g) peuvent être ajoutés comme entraîneurs de précipitation. Il faut toutefois réserver ce procédé à la précipitation d'acides nucléiques qui ne sont pas destinés à subir des modifications enzymatiques par des enzymes qui ont aussi comme substrat les ARNt.

2.3 Purification d'acides nucléiques

2.3.1 Purification d'ADN plasmidique d'E. coli

Les plasmides sont extraits par la méthode de la lyse alcaline (Sambrook et al., 1989) à partir d'une culture bactérienne en phase stationnaire. En routine, le plasmide ainsi purifié est analysé par électrophorèse, après digestion par des enzymes de restriction.

Pour le séquençage ou la transcription *in vitro*, les plasmides sont extraits grâce à l'utilisation du kit WIZARD[®] Plus SV DNA Purification System (Promega). Cette méthode, plus rapide, est basée sur la chromatographie sur colonnes de silice et permet un meilleur rendement.

2.3.2 Purification de fragments d'ADN après électrophorèse en gel d'agarose

Si l'on désire récupérer les bandes d'ADN sur un gel après migration, on utilise des gels d'agarose 1 % (p/v) à bas point de fusion dans le tampon TAE (40 mM Tris, 40 mM acétate, 1 mM EDTA). La purification s'effectue à l'aide du kit GENECLEAN[®] Turbo (Q-BIOgene) : Après électrophorèse, la bande désirée est découpée et placée à 50 °C dans une solution saline (GENECLEAN® Turbo Salt Solution) qui entraîne la dissolution de l'agarose et favorise l'adsorption de l'ADN sur la silice contenue dans les colonnes de purification fournies dans le kit. L'ADN fixé sur la silice des colonnes est ensuite brièvement lavé avec la solution de lavage du kit (GENECLEAN® Turbo Wash Concentrate) et élué avec un faible volume d'eau (10 à 30µl selon l'intensité de la bande).

2.3.3 Purification de produits obtenus par PCR

Afin de faciliter le clonage des produits obtenus par PCR, les dimères d'amorces et les fragments contaminants de moins de 300pb ont été éliminés grâce à l'utilisation du GENECLEAN[®] Turbo (Q-BIOgene). Le procédé utilisé est le même que celui pour purifier l'ADN sur gel d'agarose, les petits fragments d'ADN de moins de 300pb étant élués lors de la phase de lavage. Les produits de PCR de taille inférieure à 300pb mais supérieure à 100pb sont purifiés en utilisant une solution de lavage plus diluée (selon les indications du kit).

2.4 Modifications enzymatiques

Les acides nucléiques sont substrats de nombreuses réactions enzymatiques permettant leur manipulation *in vitro*. En règle générale, les enzymes sont éliminées après leur action par déprotéinisation (paragraphe 2.1.) et les acides nucléiques sont précipités par l'éthanol (paragraphe 2.2.).

2.4.1 Les enzymes de restriction

Les enzymes de restriction reconnaissent spécifiquement une courte séquence d'ADN bicaténaire (le plus souvent un palindrome de 4 ou 6 nucléotides) et coupent la molécule à ce niveau. Elles sont utilisées pour caractériser une molécule d'ADN et lors des clonages pour préparer le plasmide et le fragment d'ADN à insérer. Le temps d'incubation et la quantité

d'enzyme à utiliser dépendent de la quantité d'ADN à digérer. En général, 1 μ g d'ADN plasmidique est coupé par 5 unités d'enzyme après 1 heure d'incubation à la température préconisée.

2.4.2 L'ADN ligase du bactériophage T4

Cette enzyme catalyse la liaison covalente entre deux molécules d'ADN. Elle est capable de lier entre elles des extrémités franches ou cohésives. Elle utilise l'ATP comme cofacteur. La réaction est réalisée dans un volume de 20 μ l en une nuit à 14 °C en présence d'une unité d'enzyme pour 50 à 200 ng de vecteur dans le tampon recommandé par le fournisseur (BRL), qui contient de l'ATP et du PEG.

Pour les clonages dans le vecteur pZero-TM2, la ligation est réalisée dans un volume de 10 μ l après incubation 30 min à 16 °C en présence de 2 unités d'enzyme, suivant les recommandations du fournisseur (Invitrogen). Dans le vecteur pGEM®-T Easy, la ligation s'opère à température ambiante pendant une heure en présence de 3 unités de l'enzyme fournie dans le kit.

2.4.3 Les polymérases

Les ADN polymérases ADN dépendantes

Les ADN polymérases ADN dépendantes synthétisent des molécules d'ADN à partir de matrices d'ADN.

Pour l'amplification d'acides nucléiques par PCR, trois polymérases thermostables ont été utilisées. La *Taq* ADN polymérase (Q-BIOgene) isolée de *Thermus aquaticus* a servi à l'amplification de l'ADNc issu de la reverse transcription lors des réactions de RT-PCR (paragraphe 3.2). La *Pfu* ADN polymérase (Stratagene) isolée de *Pyrococcus furiosus* possède une activité exonucléasique correctrice $3' \rightarrow 5'$ qui rend la polymérisation plus fiable. La DyNAzymeTMEXT DNA Polymérase (Finnzymes) est un mélange de DyNazyme II isolée et purifiée à partir d'une souche *E. coli* qui contient un plasmide avec le gène de la DyNAzyme DNA polymérase de *Thermus brockianus* auquel a été rajoutée une séquence codant pour un peptide possédant une activité exonucléasique 5' \rightarrow 3' et d'une enzyme portant une activité de relecture 3' \rightarrow 5' ce qui permet le clonage direct dans pGEM®-T Easy. Ces deux dernières

polymérases très fiables ont été utilisées pour amplifier des séquences destinées à être clonées puis séquencées.

Les reverse transcriptases

Un mélange de reverse transcriptases a été utilisé préalablement aux réactions de PCR sur des extraits de plantes infectées, le mélange Reverse-iT[™] de ABgene. Il s'agit d'un mélange de reverse transcriptases extraites du virus de la myéloblastose aviaire et du virus leucémique murin de Moloney combinant les propriétés de chacune de ces enzymes et optimisé en terme de sensibilité et de stabilité.

2.4.4 Les nucléases

La RNase A (Sigma) est une ribonucléase isolée de pancréas bovin et a été utilisé pour dégrader les ARN d'origine bactérienne présents dans les préparations d'ADN plasmidique (paragraphe 2.3.1.)

2.4.5 La phosphatase alcaline

La phosphatase alcaline extraite de l'intestin de veau (BRL) catalyse l'hydrolyse des groupements phosphate situés à l'extrémité 5' d'acides nucléiques. Elle est essentiellement utilisée pour la préparation de vecteurs de clonage, où la déphosphorylation empêche la recircularisation du vecteur sur lui-même lors de l'étape de ligation.

La déphosphorylation est réalisée à la suite de la linéarisation du vecteur (l'enzyme ayant été préalablement inactivée par chauffage à 70 °C pendant 10 min) par ajout dans le milieu réactionnel de Tris-HCl 50 mM, EDTA 0.1 mM (pH 8.5) et de 1 unité de phosphatase. Après incubation (10 min à 37 °C pour des extrémités cohésives ; 1 h à 37 °C pour des extrémités franches) l'enzyme et une étape de déprotéinisation, l'ADN est précipité par l'éthanol.

2.5 Séquençage enzymatique

Les séquençages de plasmide ont surtout été réalisés par Genome Express (Meylan) à l'aide d'un séquenceur automatique 377 AB/100.

2.6 Séparation des acides nucléiques par électrophorèse en gel d'agarose

Les acides nucléiques sont des polyanions. Dans un champ électrique, ils migrent donc vers l'anode. Ils peuvent être séparés selon leur taille grâce à une migration dans une structure réticulée telle que des gels d'agarose préparés dans un tampon conducteur. Les ADN non marqués sont visualisés par une coloration par le bromure d'éthidium (BEt ; 0.5 μ g/ml), molécule qui s'intercale dans les acides nucléiques et émet une lumière visible quand il est exposé à des rayons UV (254 nm).

Les gels d'agarose utilisés sont horizontaux et leur concentration est généralement comprise entre 0.7 et 2 % (p/v). L'électrophorèse a lieu sous une tension de 50 à 120 V. Les gels d'ADN dans le tampon TBE (Tris 89 mM, borate 89 mM, EDTA 2 mM) permettent d'analyser la taille des acides nucléiques. Si l'on désire purifier les acides nucléiques, on utilise des gels d'agarose dans le tampon TAE (Tris 40 mM, acétate 40 mM, EDTA 1 mM). Avant la charge, les échantillons sont dans tous les cas additionnés de 1/5 de leur volume de tampon de charge 6x (EDTA 60 mM, SDS 0.6 % p/v, glycérol 30 % p/v, bleu de bromophénol 0.1 % p/v, xylène cyanol 0.1 % p/v).

2.7 Techniques d'amplification de séquence par PCR

Pour la réalisation de certains clonages, l'ADN d'intérêt a été amplifié par PCR (Saiki et al., 1988), notamment pour introduire des sites de restriction (via les amorces) permettant la ligation de l'insert dans le vecteur choisi.

Les séquences sont amplifiées avec la *Pfu* ADN polymérase, à partir d'ADN plasmidique linéarisé (paragraphes 2.2. et 2.4.1.). Les réactions d'amplification sont réalisées dans un volume réactionnel de 100 μ l contenant : Tris-HCl pH 8.8 20 mM, KCl 10 mM, (NH₄)₂SO₄ 10 mM, MgSO₄ 2 mM, 1 % de triton X-100, 100 μ g/ml de BSA, 250 μ M de chaque nucléotide, 0.5 μ M de chaque amorce, 4 unités de *Pfu* ADN polymérase et de quelques nanogrammes d'ADN plasmidique linéarisé.

Les techniques d'amplification destinées à détecter et caractériser un virus dans une plante infectée sont décrites au paragraphe 3.2.

2.8 Mutagenèse dirigée par fusion-PCR

Cette technique a été utilisée afin d'obtenir des mutants ponctuels dans la CI. Une première PCR avec des oligonucléotides portant la mutation à introduire permet d'obtenir les deux fragments à fusionner qui ont une région terminale commune de 20 nucléotides centrées autour de la mutation à introduire (**Figure 31**). La seconde PCR est réalisée en présence des deux fragments obtenus précédemment à une concentration assez élevée (au moins 10 ng/ μ l) et des deux amorces externes. La fusion-PCR se fait dans le mélange réactionnel d'une PCR normale mais il est parfois nécessaire de réaliser 10 cycles avec une température d'hybridation basse (40 °C) avant de poursuivre avec 30 cycles avec une température d'hybridation classique (55 °C) afin de favoriser l'appariement des deux fragments.

2.9 Mutagenèse aléatoire par PCR

La stratégie de mutagénèse aléatoire exploite le manque de fidélité de la Taq ADN polymérase utilisée en PCR classique. En présence de cations Mn2+, l'enzyme génère alors un plus grand nombre d'erreurs au cours de la réaction de PCR (Fromant et al., 1995, Lin-Goerke et al., 1997).

Les réactions de polymérisation se font dans un tampon réactionnel contenant 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl2, 10 mM de Tris-HCl pH 9, 0,1 mM de MnCl2, 0,2 mM de dNTP, 1 μ M de chaque amorce, 0,1 unité par μ l de milieu réactionnel de Taq DNA polymérase et de 1 ng/ μ l de milieu réactionnel de matrice ADN.

3 Techniques d'analyse des plantes infectées

3.1 Détection des protéines par ELISA

La méthode d'Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (Clark & Adams, 1977) a surtout été utilisée pour révéler la présence de LMV dans les feuilles de plantes infectées par les constructions de LMV recombinants et quantifier l'accumulation de particules virales dans les variétés résistantes.

Les anticorps utilisés ont été préparés et purifiés au laboratoire de Pathologie Végétale de Montfavet par Hervé Lot et Sylvie Souche (INRA, France). Il s'agit d'anticorps polyclonaux dirigés contre le LMV-0. La composition des tampons utilisés lors d'un test ELISA est donnée dans le **Tableau 5**.

Les plaques de microtitration sont sensibilisées par incubation pendant 3 heures à 37 °C, les puits contenant 200 μ l de tampon de coating dans lequel les anticorps ont été dilués à une concentration de 0.5 μ g/ml. La plaque est ensuite lavée trois fois avec une solution de PBS-Tween puis 200 μ l de chaque échantillon sont déposés dans les puits et incubés une nuit à 4 °C. Les échantillons sont constitués de jus de feuilles de plantes saines ou infectées broyées dans trois fois leur volume de PBS-Tween-PVP (PVP_{25K} (21 % p/v)).

Après trois lavages au PBS-Tween, 200 μ l de conjugué anticorps/phosphatase alcaline dilué au 1/2000^{ème} dans du PBS-Tween supplémenté en ovalbumine (0.2 % p/v) sont déposés dans chaque puits. La plaque est à nouveau incubée pendant 3 heures à 37 °C. Enfin, après trois nouveaux lavages au PBS-Tween, le substrat de révélation (paranitrophénylphosphate, Sigma) est dilué dans le tampon substrat à une concentration de 1 mg/ml et déposé dans les puits. En présence de phosphatase alcaline, ce substrat donne un produit coloré jaune (paranitrophénol) dont l'apparition est mesurée à une longueur d'onde de 405 nm à l'aide d'un lecteur automatique (modèle PR 2100, Sanofi Diagnostics Pasteur).

3.2 Préparation des échantillons végétaux et détection par RT/PCR

3.2.1 Immunocapture

L'immunocapture permet de piéger directement à l'aide d'anticorps spécifiques le virus présent dans une plante infectée avant d'amplifier des segments de son génome par RT-PCR (Wetzel et al., 1992). L'immunocapture est réalisée de la façon suivante :

- adsorption des IgG anti-virus (100 μ l d'IgG à 2 μ g/ml dans un tampon NaHCO₃ 2,93 g/l, Na₂CO₃ 1,59 g/l, pH 9,6) dans des microtubes pendant 3 heures à 37 °C suivi d'un lavage dans du tampon PBS-Tween (NaCl 8 g/l, KH₂PO₄ 0,2 g/l, Na₂HPO₄,12 H₂0 2,9 g/l, KCl 0,2 g/l, Tween 20 0,5 g/l). Les tubes ainsi préparés peuvent être stockés plusieurs mois à -20 °C ou utilisés immédiatement.

- addition de 100 μ l d'extrait de plante infectée obtenu par broyage de feuilles infectées (p/v = 1/5) dans un tampon PBS-Tween additionné de PVP K25 2 % p/v, DIECA 20 mM, MgCl₂ 0,1 % suivi d'une centrifugation (10 min à 12000g). Les tubes sont incubés 3 heures à 37 °C ou toute la nuit à 4 °C puis lavés une fois avec du tampon PBS-Tween.

Les tubes peuvent être stockés des mois à -80 °C ou utilisés immédiatement pour une RT/PCR.

3.2.2 Purification des acides nucléiques totaux sur silice

Le génome du LMV étant constitué d'une molécule d'ARN, une étape de transcription inverse est nécessaire avant toute amplification et est réalisée sur un extrait d'ARN de plantes infectées obtenu selon la méthode suivante : les feuilles de plantes infectées sont broyées dans un mortier en présence de 5 volumes de PBS-Tween (**Tableau 5**), PVP K25 2 % p/v, DIECA 20 mM et 200 μ l de ce broyat clarifié est additionné de 20 μ l de SDS 10 % puis incubé pendant 15 min à 55 °C. Après avoir laissé le mélange pendant 5 min dans la glace en présence de 100 μ l de KO/CH₃COOH 3 M/5 M (acétate de potassium 3M / acide acétique 5 M), il est centrifugé 5 min à 13000 rpm. Le surnageant est supplémenté de 700 μ l de NaI 6 M et de 5 μ l de silice (Sigma) et laissé 10 min à température ambiante. Le culot de silice est alors lavé deux fois par 500 μ l de solution de lavage (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, éthanol 50 %) puis séché. Il est ensuite remis en suspension dans 400 μ l d'eau et incubé pendant 5 min à 55 °C. La transcription inverse est réalisée sur une fraction aliquote (5 – 10 μ l) du surnageant récupéré après centrifugation du précédent mélange.

3.2.3 RT-PCR

Pour des amplifications courtes (moins de 1.5 kb), un protocole simplifié a été développé permettant de réaliser dans un seul tube, la transcription inverse et la PCR, avec un seul milieu réactionnel contenant le mélange de reverse transcriptases Reverse-iTTM (ABgene) et la Taq ADN polymérase de Q-BIOgene (**Tableau 6**). Dans le cas où le fragment amplifié est destiné à être cloné ou séquencé, la DyNAzymeTMEXT DNA Polymérase (Finnzymes) est utilisée.

Références bibliographiques

Cette liste contient 172 références bibliographiques.

- Agol, V. I., Paul, A. V. & Wimmer, E. (1999). Paradoxes of the replication of picornaviral genomes. *Virus Res* 62, 129-47.
- Ahlquist, P., Noueiry, A. O., Lee, W. M., Kushner, D. B. & Dye, B. T. (2003). Host factors in positive-strand RNA virus genome replication. *J Virol* 77, 8181-8186.
- Albar, L., Ndjiondjop, M. N., Esshak, Z., Berger, A., Pinel, A., Jones, M., Fargette, D. & Ghesquiere, A. (2003). Fine genetic mapping of a gene required for Rice yellow mottle virus cell-to-cell movement. *Theor Appl Genet* 107, 371-8.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G. J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A. C., Smith, T. H. & Vance, V. B. (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 13079-13084.
- Andino, R., Boddeker, N., Silvera, D. & Gamarnik, A. V. (1999). Intracellular determinants of picornavirus replication. *Trends Microbiol* **7**, 76-82.
- Apcher, G. S., Heink, S., Zantopf, D., Kloetzel, P. M., Schmid, H. P., Mayer, R. J. & Kruger, E. (2003). Human immunodeficiency virus-1 Tat protein interacts with distinct proteasomal alpha and beta subunits. *FEBS Lett* 553, 200-4.
- Ashfield, T., Keen, N. T., Buzzell, R. I. & Innes, R. W. (1995). Soybean Resistance Genes Specific for Different Pseudomonas-Syringae Avirulence Genes Are Allelic, or Closely Linked, at the Rpg1 Locus. *Genetics* 141, 1597-1604.
- Atabekov, J. G. & Taliansky, M. E. (1990). Expression of a plant virus-coded transport function by different viral genomes. *Adv Virus Res* **38**, 201-48.
- Axtell, M. J. & Staskawicz, B. J. (2003). Initiation of RPS2-specified disease resistance in Arabidopsis is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* 112, 369-377.
- Ballut, L., Drucker, M., Pugnière, M., Cambon, F., Blanc, S., Roquet, F., Candresse, T., Schmid, H. P., Nicolas, P., Le Gall, O. & Badaoui, S. (submitted). HcPro, a multifunctional protein encoded by a plant RNA virus, targets the 20S proteasome and affects its enzymatic activities. *J Virol*.
- Ballut, L., Petit, F., Mouzeyar, S., Le Gall, O., Candresse, T., Schmid, P., Nicolas, P. & Badaoui, S. (2003). Biochemical identification of proteasome-associated endonuclease activity in sunflower. *Biochim Biophys Acta* 1645, 30-9.
- Baulcombe, D. (2004). RNA silencing in plants. Nature 431, 356-63.
- Belkhadir, Y., Subramaniam, R. & Dangl, J. L. (2004). Plant disease resistance protein signaling: NBS-LRR proteins and their partners. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 391-9.
- Blanc, S., Lopez-Moya, J. J., Wang, R., Garcia-Lampasona, S., Thornbury, D. W. & Pirone, T. P. (1997). A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology* 231, 141-7.
- Blancard, D., Lot, H. & Maisonneuve, B. (2003). Diseases of lettuces: identification, detection and control. In *Maladies des salades: identifier, connaitre et maitriser*, pp. 375. Paris: INRA Editions.
- Boisnard, A., Albar, L. & Ghesquiere, G. (2004). Eucaryotic translation initiation factors as candidate genes for RYMV resistance in rice. In *Plant GEMS*. Lyon.
- Bokros, C. L., Hugdahl, J. D., Kim, H. H., Hanesworth, V. R., van Heerden, A., Browning, K. S. & Morejohn, L. C. (1995). Function of the p86 subunit of eukaryotic initiation factor (iso)4F as a microtubule-associated protein in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 7120-4.

- Borgstrom, B. & Johansen, I. E. (2001). Mutations in pea seedborne mosaic virus genomelinked protein VPg after pathotype-specific virulence in Pisum sativum. *Mol Plant Microbe Interact* 14, 707-14.
- Broadbent, L., Tinsley, T. W., Buddin, W. & Roberts, E. T. (1951). The spread of lettuce mosaic in the field. *Annals of Applied Biology* **38**, 689-706.
- Brommonschenkel, S. H., Frary, A. & Tanksley, S. D. (2000). The broad-spectrum tospovirus resistance gene Sw-5 of tomato is a homolog of the root-knot nematode resistance gene Mi. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 1130-8.
- Buschges, R., Hollricher, K., Panstruga, R., Simons, G., Wolter, M., Frijters, A., van Daelen, R., van der Lee, T., Diergaarde, P., Groenendijk, J., Topsch, S., Vos, P., Salamini, F. & Schulze-Lefert, P. (1997). The barley *Mlo* gene: a novel control element of plant pathogen resistance. *Cell* 88, 695-705.
- Carrington, J. C., Kasschau, K. D., Mahajan, S. K. & Schaad, M. C. (1996). Cell-to-Cell and Long-Distance Transport of Viruses in Plants. *Plant Cell* **8**, 1669-1681.
- Chapman, E. J., Prokhnevsky, A. I., Gopinath, K., Dolja, V. V. & Carrington, J. C. (2004). Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev* **18**, 1179-86.
- Chisholm, S. T., Mahajan, S. K., Whitham, S. A., Yamamoto, M. L. & Carrington, J. C. (2000). Cloning of the Arabidopsis RTM1 gene, which controls restriction of longdistance movement of tobacco etch virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 489-494.
- Chisholm, S. T., Parra, M. A., Anderberg, R. J. & Carrington, J. C. (2001). Arabidopsis RTM1 and RTM2 genes function in phloem to restrict long-distance movement of tobacco etch virus. *Plant Physiol* **127**, 1667-75.
- Clark, M. F. & Adams, A. N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzymelinked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol* **34**, 475-83.
- Coux, O., Tanaka, K. & Goldberg, A. L. (1996). Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem* **65**, 801-47.
- Covey, S. N., AlKaff, N. S., Langara, A. & Turner, D. S. (1997). Plants combat infection by gene silencing. *Nature* **385**, 781-782.
- Dangl, J. L. & Jones, J. D. G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* **411**, 826-833.
- Daughenbaugh, K. F., Fraser, C. S., Hershey, J. W. & Hardy, M. E. (2003). The genomelinked protein VPg of the Norwalk virus binds eIF3, suggesting its role in translation initiation complex recruitment. *Embo J* 22, 2852-9.
- Diaz, J. A., Nieto, C., Moriones, E., Truniger, V. & Aranda, M. A. (2004). Molecular characterization of a Melon necrotic spot virus strain that overcomes the resistance in melon and nonhost plants. *Mol Plant Microbe Interact* 17, 668-75.
- Diaz-Pendon, J. A., Truniger, V., Nieto, C., Garcia-Mas, J., Bendahmane, A. & Aranda, M. A. (2004). Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Mol Plant Path* 5.
- Dickson, R. C. & Laird, E. F. (1959). California desert and costal populations of flying aphids and the spread of lettuce mosaic virus. *J Econ Entomol* **52**, 440-443.
- Diez, J., Ishikawa, M., Kaido, M. & Ahlquist, P. (2000). Identification and characterization of a host protein required for efficient template selection in viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 3913-8.
- Dinant, S. & Lot, H. (1992). Lettuce mosaic virus. Plant Path 41, 528-542.
- Dolja, V. V., McBride, H. J. & Carrington, J. C. (1992). Tagging of plant potyvirus replication and movement by insertion of beta-glucuronidase into the viral polyprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 10208-12.

- Domier, L. L., Franklin, K. M., Shahabuddin, M., Hellmann, G. M., Overmeyer, J. H., Hiremath, S. T., Siaw, M. F., Lomonossoff, G. P., Shaw, J. G. & Rhoads, R. E. (1986). The nucleotide sequence of tobacco vein mottling virus RNA. *Nucleic Acids Res* 14, 5417-30.
- Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of E. coli by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* **16**, 6127-45.
- Dunoyer, P., Lecellier, C. H., Parizotto, E. A., Himber, C. & Voinnet, O. (2004). Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* 16, 1235-50.
- Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K. S. & Robaglia, C. (2002). The Arabidopsis eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant J* **32**, 927-34.
- Durner, J., Wendehenne, D. & Klessig, D. F. (1998). Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 10328-10333.
- Edwardson, J. R. (1974). Some properties of the potato virus Y group. *Florida Agricultural Experimental Station Monograph* **Series 4**, 398.
- Ellis, J., Lawrence, G., Ayliffe, M., Anderson, P., Collins, N., Finnegan, J., Frost, D., Luck, J. & Pryor, T. (1997). Advances in the molecular genetic analysis of the flax-flax rust interaction. *Annu Rev Phytopathol* 35, 271-91.
- Fellers, J., Wan, J., Hong, Y., Collins, G. B. & Hunt, A. G. (1998). In vitro interactions between a potyvirus-encoded, genome-linked protein and RNA-dependent RNA polymerase. J Gen Virol 79 (Pt 8), 2043-9.
- Fernandez, A., Lain, S. & Garcia, J. A. (1995). RNA helicase activity of the plum pox potyvirus CI protein expressed in Escherichia coli. Mapping of an RNA binding domain. *Nucleic Acids Res* 23, 1327-32.
- Fischer, M. L. & Kyle, M. M. (1994). Inheritance of resistance to potyviruses in Phaseolus vulgaris L. III. Cosegragation of phenotypically similar dominant responses to nine potyviruses. *Theor Appl Genet* 89, 818-823.
- Fraser, R. S. S. (1992). The genetics of plant-virus interactions: implications for plant breeding. *Euphytica* 63, 175-185.
- Fromant, M., Blanquet, S. & Plateau, P. (1995). Direct random mutagenesis of gene-sized DNA fragments using polymerase chain reaction. *Anal Biochem* **224**, 347-53.
- Frye, C. A. & Innes, R. W. (1998). An Arabidopsis mutant with enhanced resistance to powdery mildew. *Plant Cell* **10**, 947-56.
- Gallie, D. R. (2001). Cap-independent translation conferred by the 5' leader of tobacco etch virus is eukaryotic initiation factor 4G dependent. *J Virol* **75**, 12141-52.
- Gallie, D. R. (2002). Protein-protein interactions required during translation. *Plant Mol Biol* **50**, 949-70.
- Gao, Z., Johansen, E., Eyers, S., Thomas, C. L., Noel Ellis, T. H. & Maule, A. J. (2004). The potyvirus recessive resistance gene, sbm1, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. *Plant J* **40**, 376-85.
- German-Retana, S., Candresse, T., Alias, E., Delbos, R. P. & Le Gall, O. (2000). Effects of green fluorescent protein or beta-glucuronidase tagging on the accumulation and pathogenicity of a resistance-breaking Lettuce mosaic virus isolate in susceptible and resistant lettuce cultivars. *Mol Plant Microbe Interact* **13**, 316-24.
- Goldbach, R., Bucher, E. & Prins, M. (2003). Resistance mechanisms to plant viruses: an overview. *Virus Res* **92**, 207-212.
- Gonsalves, D. (1998). Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. Annu Rev Phytopathol 36, 415-37.

- Hajimorad, M. R., Ding, X. S., Flasinski, S., Mahajan, S., Graff, E., HaldemanCahill, R., Carrington, J. C. & Cassidy, B. G. (1996). Nla and Nlb of peanut stripe potyvirus are present in the nucleus of infected cells, but do not form inclusions. *Virology* 224, 368-379.
- Hamalainen, J. H., Watanabe, K. N., Valkonen, J. P. T., Arihara, A., Plaisted, R. L., Pehu, E., Miller, L. & Slack, S. A. (1997). Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to potato virus Y. *Theor Appl Genet* 94, 192-197.
- Hammond-Kosack, K. E. & Jones, J. D. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* **8**, 1773-91.
- Hari, V. (1981). The RNA of tobacco etch virus : further characterization and detection of protein linked to RNA. *Virology* **112**, 391-399.
- Hari, V., Siegel, A., Rozek, C. & Timberlake, W. E. (1979). The RNA of tobacco etch virus contains poly(A). *Virology* **92**, 568-71.
- Herold, J. & Andino, R. (2001). Poliovirus RNA replication requires genome circularization through a protein-protein bridge. *Mol Cell* **7**, 581-91.
- Hinrichs, J., Berger, S. & Buchenauer, H. (1997). Susceptibility of potato cultivars to the N and O strain of potato virus Y (PVY) and other potyviruses. Zeitschrift Fur Pflanzenkrankheiten Und Pflanzenschutz-Journal of Plant Diseases and Protection 104, 193-199.
- Homma, S., Horsch, A., Pouch, M. N., Petit, F., Briand, Y. & Schmid, H. P. (1994). Proteasomes (prosomes) inhibit the translation of tobacco mosaic virus RNA by preventing the formation of initiation complexes. *Mol Biol Rep* **20**, 57-61.
- Honey, S., Schneider, B. L., Schieltz, D. M., Yates, J. R. & Futcher, B. (2001). A novel multiple affinity purification tag and its use in identification of proteins associated with a cyclin-CDK complex. *Nucleic Acids Res* **29**, E24.
- Hong, Y. L. & Hunt, A. G. (1996). RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirusencoded RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* **226**, 146-151.
- Horvath, J. (1980). Viruses of lettuce II. Host ranges of lettuce mosaic virus and cucumber mosaic virus. *Acta Agronomica Academiae Scientiarum Hungaricae* **29**, 333-352.
- Hutin, C. (1995). Le marché français des laitues. CTIFL Infos. 115, 16-21.
- Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P. & Valent, B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *Embo J* 19, 4004-14.
- Johansen, I. E., Dougherty, W. G., Keller, K. E., Wang, D. & Hampton, R. O. (1996). Multiple viral determinants affect seed transmission of pea seedborne mosaic virus in Pisum sativum. J Gen Virol 77 (Pt 12), 3149-54.
- Johansen, I. E., Lund, O. S., Hjulsager, C. K. & Laursen, J. (2001). Recessive resistance in Pisum sativum and potyvirus pathotype resolved in a gene-for-cistron correspondence between host and virus. J Virol 75, 6609-14.
- Joisson, C., Dubs, M. C., Briand, J. P. & Van Regenmortel, M. H. (1992). Detection of potyviruses with antisera to synthetic peptides. *Res Virol* 143, 167-78.
- Kajava, A. V. & Kobe, B. (2002). Assessment of the ability to model proteins with leucinerich repeats in light of the latest structural information. *Protein Sci* **11**, 1082-90.
- Karsies, A., Hohn, T. & Leclerc, D. (2001). Degradation signals within both terminal domains of the cauliflower mosaic virus capsid protein precursor. *Plant J* **27**, 335-43.
- Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E. J., Krizan, K. A. & Carrington, J. C. (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA unction. *Dev Cell* 4, 205-17.

- Keller, K. E., Johansen, I. E., Martin, R. R. & Hampton, R. O. (1998). Potyvirus genomelinked protein (VPg) determines pea seed-borne mosaic virus pathotype-specific virulence in Pisum sativum. *Mol Plant Microbe Interact* 11, 124-30.
- Kennedy, J. S., Day, M. F. & Eastop, V. F. (1962). A conspectus of Aphids as Vectors of Plant Viruses. *Commonwealth Institute of Entomology*, 26-27.
- Kennerdell, J. R. & Carthew, R. W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* **95**, 1017-26.
- Kirschman, J. A. & Cramer, J. H. (1988). Two new tools: multi-purpose cloning vectors that carry kanamycin or spectinomycin/streptomycin resistance markers. *Gene* **68**, 163-5.
- Kolupaeva, V. G., Hellen, C. U. T. & Shatsky, I. N. (1996). Structural analysis of the interaction of the pyrimidine tract-binding protein with the internal ribosomal entry site of encephalomyocarditis virus and foot-and-mouth disease virus RNAs. *Rna-a Publication of the Rna Society* 2, 1199-1212.
- Krause-Sakate, R. (2001). Análise molecular da interação *Lettuce mosaic virus* (LMV)-alface, utilizando como modelo o isolado LMV-AF199. In *Fitopatologia*, pp. 165. Viçosa, MG, Brasil: Universidade Federal de Viçosa.
- Krause-Sakate, R., Fakhfakh, H., Peypelut, M., Pavan, M. A., Zerbini, F. M., Marrakchi, M., Candresse, T. & Le Gall, O. (2004). A naturally occurring recombinant isolate of Lettuce mosaic virus. Arch Virol 149, 191-7.
- Krause-Sakate, R., Le Gall, O., Fakhfakh, H., Peypelut, M., Marrakchi, M., Varveri, C., Pavan, M. A., Souche, S., Lot, H., Zerbini, F. M. & Candresse, T. (2002). Molecular and biological characterization of Lettuce mosaic virus (LMV) isolates reveals a distinct and widespread type of resistance-breaking isolate: LMV-Most. *Phytopathology* **92**, 563-572.
- Krause-Sakate, R., Redondo, E., Forget-Richard, F., Peypelut, M., Candresse, T., Lot, H., Zerbini, F. M. & Le Gall, O. (2001). Caractérisation moléculaire d'une souche brésilienne de type Most du virus de la mosaïque de la laitue. In 8^{èmes} Rencontres de Virologie Végétale. Aussois, France, 11-15 mars 2001.
- Krause-Sakate, R., Redondo, E., Richard-Forget, F., Jadão, A. S., Houvenaghel, M. C., German-Retana, S., Pavan, M. A., Candresse, T., Zerbini, F. M. & Le Gall, O. (in press). Molecular mapping of the viral determinants of systemic wilting induced by a *Lettuce mosaic virus* (LMV) isolate in some lettuce cultivars. *Virus Res*.
- Krause-Sakate, R., Redondo, E., Richard-Forget, F., Jadão, A. S., Houvenaghel, M. C., German-Retana, S., Pavan, M. A., Candresse, T., Zerbini, F. M. & Le Gall, O. (submitted). Molecular mapping of the viral determinants of systemic wilting induced by a *Lettuce mosaic virus* (LMV) isolate in some lettuce cultivars. *Virus Research*.
- Kuhne, T., Shi, N., Proeseler, G., Adams, M. J. & Kanyuka, K. (2003). The ability of a bymovirus to overcome the rym4-mediated resistance in barley correlates with a codon change in the VPg coding region on RNA1. *J Gen Virol* **84**, 2853-9.
- Kyle, M. M. & Provvidenti, R. (1993). Inheritance of resistance to potyviruses in Phaseolus vulgaris L. II. Linkage relations and utility of a dominant gene for lethal systemic necrosis to soybean mosaic virus. *Theor Appl Genet* 86, 189-196.
- Lagudah, E. S., Moullet, O. & Appels, R. (1997). Map-based cloning of a gene sequence encoding a nucleotide-binding domain and a leucine-rich region at the Cre3 nematode resistance locus of wheat. *Genome* **40**, 659-65.
- Lain, S., Martin, M. T., Riechmann, J. L. & Garcia, J. A. (1991). Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection: nucleic acid-stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicaselike protein. *J Virol* **65**, 1-6.
- Lain, S., Riechmann, J. L. & Garcia, J. A. (1990). RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic Acids Res* 18, 7003-6.

- Lain, S., Riechmann, J. L., Martin, M. T. & Garcia, J. A. (1989). Homologous potyvirus and flavivirus proteins belonging to a superfamily of helicase-like proteins. *Gene* 82, 357-62.
- Lakatos, L., Szittya, G., Silhavy, D. & Burgyan, J. (2004). Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *Embo J* 23, 876-84.
- Le Gall, O. (2003). *Lettuce mosaic virus*. In *CMI/AAB Description of Plant Viruses*, pp. n°399. Edited by A. T. Jones, D. J. Robinson, N. Boonham & R. Mumford. Wellesbourne, UK: Association of Applied Biologists.
- Lecoq, H., Moury, B., Desbiez, C., Palloix, A. & Pitrat, M. (2004). Durable virus resistance in plants through conventional approaches: a challenge. *Virus Res* **100**, 31-39.
- Légnani, R., Gébré Sélassié, K., Nono Wondim, R., Gognalons, P., Moretti, A., Laterot, H. & Marchoux, G. (1995). Evaluation and inheritance of the Lycopersicon hirsutum resistance against potato virus Y. *Euphytica* **86**, 219-226.
- Lellis, A. D., Kasschau, K. D., Whitham, S. A. & Carrington, J. C. (2002). Loss-ofsusceptibility mutants of Arabidopsis thaliana reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Curr Biol* **12**, 1046-51.
- Leonard, S., Chisholm, J., Laliberte, J. F. & Sanfacon, H. (2002). Interaction in vitro between the proteinase of Tomato ringspot virus (genus Nepovirus) and the eukaryotic translation initiation factor iso4E from Arabidopsis thaliana. *J Gen Virol* **83**, 2085-9.
- Leonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M. G. & Laliberte, J. F. (2000). Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *J Virol* **74**, 7730-7.
- Leonard, S., Viel, C., Beauchemin, C., Daigneault, N., Fortin, M. G. & Laliberte, J.-F. (2004). Interaction of VPg-Pro of Turnip mosaic virus with the translation initiation factor 4E and the poly(A)-binding protein in planta. *J Gen Virol* **85**, 1055-1063.
- Lin-Goerke, J. L., Robbins, D. J. & Burczak, J. D. (1997). PCR-based random mutagenesis using manganese and reduced dNTP concentration. *Biotechniques* 23, 409-12.
- Mackey, D., Holt, B. F., Wiig, A. & Dangl, J. L. (2002). RIN4 interacts with Pseudomonas syringae type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in Arabidopsis. *Cell* **108**, 743-54.
- 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 USA* **99**, 15228-33.
- Marathe, R. & Dinesh-Kumar, S. P. (2003). Plant defense: One post, multiple guards?! *Molecular Cell* **11**, 284-286.
- Meister, G. & Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* **431**, 343-9.
- Merits, A., Guo, D. & Saarma, M. (1998). VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato A potyvirus bind RNA in a sequence-unspecific manner. *J Gen Virol* **79** (**Pt 12**), 3123-7.
- Merits, A., Rajamaki, M. L., Lindholm, P., Runeberg-Roos, P., Kekarainen, T., Puustinen, P., Makelainen, K., Valkonen, J. P. & Saarma, M. (2002). Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells. J Gen Virol 83, 1211-21.
- Milligan, S. B., Bodeau, J., Yaghoobi, J., Kaloshian, I., Zabel, P. & Williamson, V. M. (1998). The root knot nematode resistance gene Mi from tomato is a member of the leucine zipper, nucleotide binding, leucine-rich repeat family of plant genes. *Plant Cell* 10, 1307-19.
- Moissiard, G. & Voinnet, O. (2004). Viral suppression of RNA silencing in plants. *Mol Plant Path* **5**, 71-82.

- 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. *Mol Plant Microbe Interact* 17, 322-9.
- Neumann, E., Schaefer-Ridder, M., Wang, Y. & Hofschneider, P. H. (1982). Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields. *Embo J* **1**, 841-5.
- Nicaise, V., German-Retana, S., Sanjuán, R., Candresse, T., Caranta, C. & Le Gall, O. (2003a). Role of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E in lettuce susceptibility to LMV. In 11th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. St-Petersburg, Russia, July 2003.
- Nicaise, V., German-Retana, S., Sanjuan, R., Dubrana, M. P., Mazier, M., Maisonneuve, B., Candresse, T., Caranta, C. & LeGall, O. (2003b). The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the Potyvirus Lettuce mosaic virus. *Plant Physiol* 132, 1272-82.
- Nicolas, O., Dunnington, S. W., Gotow, L. F., Pirone, T. P. & Hellmann, G. M. (1997). Variations in the VPg protein allow a potyvirus to overcome va gene resistance in tobacco. *Virology* 237, 452-459.
- Noueiry, A. O. & Ahlquist, P. (2003). Brome mosaic virus RNA replication: Revealing the role of the host in RNA virus replication. *Annual Review of Phytopathology* **41**, 77-98.
- Noueiry, A. O., Chen, J. B. & Ahlquist, P. (2000). A mutant allele of essential, general translation initiation factor DED1 selectively inhibits translation of a viral mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 12985-12990.
- Orjeda, G., Dogimont, C., Nieto, C., Morales, M., Garcia, J., Aranda, M. & Bendahmane, A. (2004). Positional cloning of a recessive resistance gene to the Melon necrotic spot carmovirus and plant-virus interactions implicated in the resistance. In *3rd Plant Genomic European Meeting*, pp. 253. Lyon.
- Osman, T. A. & Buck, K. W. (2003). Identification of a region of the tobacco mosaic virus 126- and 183-kilodalton replication proteins which binds specifically to the viral 3'-terminal tRNA-like structure. *J Virol* **77**, 8669-75.
- Peart, J. R., Lu, R., Sadanandom, A., Malcuit, I., Moffett, P., Brice, D. C., Schauser, L., Jaggard, D. A., Xiao, S., Coleman, M. J., Dow, M., Jones, J. D., Shirasu, K. & Baulcombe, D. C. (2002). Ubiquitin ligase-associated protein SGT1 is required for host and nonhost disease resistance in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 10865-9.
- Pedley, K. F. & Martin, G. B. (2003). Molecular basis of Pto-mediated resistance to bacterial speck disease in tomato. *Annu Rev Phytopathol* **41**, 215-43.
- Peypelut, M., Krause-Sakate, R., Guiraud, T., Pavan, M. A., Candresse, T., Zerbini, F. M. & Le Gall, O. (2004). Specific detection of lettuce mosaic virus isolates belonging to the "Most" type. J Virol Methods 121, 119-24.
- Pink, D. A. C., Lot, H. & Johnson, R. (1992). Novel pathotypes of lettuce mosaic virus breakdown of a durable resistance? *Euphytica* **63**, 169-174.
- Plasterk, R. H. (2002). RNA silencing: the genome's immune system. Science 296, 1263-5.
- Provvidenti, R. & Hampton, R. O. (1992). Sources of resistance to viruses in the *Potyviridae*. *Archives of Virology* [Suppl. 5], 189-211.
- Quadt, R., Kao, C. C., Browning, K. S., Hershberger, R. P. & Ahlquist, P. (1993). Characterization of a host protein associated with brome mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 1498-1502.
- Rajamaki, M. L. & Valkonen, J. P. (1999). The 6K2 protein and the VPg of potato virus A are determinants of systemic infection in Nicandra physaloides. *Mol Plant Microbe Interact* 12, 1074-81.

- Ratcliff, F., Harrison, B. D. & Baulcombe, D. C. (1997). A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* **276**, 1558-1560.
- Redondo, E., Krause-Sakate, R., Yang, S. J., Lot, H., Le Gall, O. & Candresse, T. (2001). Lettuce mosaic virus pathogenicity determinants in susceptible and tolerant lettuce cultivars map to different regions of the viral genome. *Mol Plant Microbe Interact* 14, 804-10.
- Reichel, C. & Beachy, R. N. (2000). Degradation of tobacco mosaic virus movement protein by the 26S proteasome. *J Virol* **74**, 3330-7.
- Restrepo-Hartwig, M. A. & Carrington, J. C. (1992). Regulation of nuclear transport of a plant potyvirus protein by autoproteolysis. *J Virol* **66**, 5662-6.
- Restrepo-Hartwig, M. A. & Carrington, J. C. (1994). The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. *J Virol* **68**, 2388-97.
- Revers, F., Le Gall, O., Candresse, T. & Maule, A. J. (1999). New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. *Mol Plant Microbe Interact* 12, 367-376.
- Revers, F., Lot, H., Souche, S., Le Gall, O., Candresse, T. & Dunez, J. (1997a). Biological and molecular variability of lettuce mosaic virus isolates. *Phytopathology* **87**, 397-403.
- Revers, F., Yang, S. J., Walter, J., Souche, S., Lot, H., Le Gall, O., Candresse, T. & Dunez, J. (1997b). Comparison of the complete nucleotide sequences of two isolates of lettuce mosaic virus differing in their biological properties. *Virus Res* 47, 167-77.
- Riechmann, J. L., Lain, S. & Garcia, J. A. (1992). Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J Gen Virol* **73** (**Pt 1**), 1-16.
- Roberts, I. M., Wang, D., Findlay, K. & Maule, A. J. (1998). Ultrastructural and temporal observations of the potyvirus cylindrical inclusions (Cls) show that the Cl protein acts transiently in aiding virus movement. *Virology* **245**, 173-81.
- Rodriguez-Cerezo, E., Findlay, K., Shaw, J. G., Lomonossoff, G. P., Qiu, S. G., Linstead, P., Shanks, M. & Risco, C. (1997). The coat and cylindrical inclusion proteins of a potyvirus are associated with connections between plant cells. *Virology* 236, 296-306.
- Rohila, J. S., Chen, M., Cerny, R. & Fromm, M. E. (2004). Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants. *Plant J* 38, 172-81.
- Rojas, M. R., Zerbini, F. M., Allison, R. F., Gilbertson, R. L. & Lucas, W. J. (1997). Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* 237, 283-95.
- Rossi, M., Goggin, F. L., Milligan, S. B., Kaloshian, I., Ullman, D. E. & Williamson, V. M. (1998). The nematode resistance gene Mi of tomato confers resistance against the potato aphid. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 9750-4.
- Roudet-Tavert, G., Michon, T., Walter, J., Dulucq, M. J., Delaunay, T., Redondo, E. & Le Gall, O. (soumis). The central domain of a potyvirus VPg is involved in the interaction with the host translation initiation factor eIF4E and the viral protein HcPro. *J Virol*.
- Ruffel, S., Dussault, M. H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C. & Caranta, C. (2002). A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J* 32, 1067-75.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-91.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning, a laboratory manual, Second Edition. Cold Spring Harbor, NY: CSH Laboratory Press.

- Sato, M., Masuta, C. & Uyeda, I. (2003). Natural resistance to Clover yellow vein virus in beans controlled by a single recessive locus. *Mol Plant Microbe Interact* **16**, 994-1002.
- Schaad, M. C., Anderberg, R. J. & Carrington, J. C. (2000). Strain-specific interaction of the tobacco etch virus NIa protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. *Virology* 273, 300-6.
- Schaad, M. C., HaldemanCahill, R., Cronin, S. & Carrington, J. C. (1996). Analysis of the VPg-proteinase (NIa) encoded by tobacco etch potyvirus: Effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. J Virol 70, 7039-7048.
- Schaad, M. C., Jensen, P. E. & Carrington, J. C. (1997a). Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *Embo J* 16, 4049-59.
- Schaad, M. C., Lellis, A. D. & Carrington, J. C. (1997b). VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *J Virol* **71**, 8624-31.
- Seeger, M., Ferrell, K., Frank, R. & Dubiel, W. (1997). HIV-1 tat inhibits the 20 S proteasome and its 11 S regulator-mediated activation. *J Biol Chem* **272**, 8145-8.
- Shaw, J. G. (1999). Tobacco mosaic virus and the study of early events in virus infections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **354**, 603-11.
- Shi, X. M., Miller, H., Verchot, J., Carrington, J. C. & Vance, V. B. (1997). Mutations in the region encoding the central domain of helper component-proteinase (HC-Pro) eliminate potato virus X/potyviral synergism. *Virology* 231, 35-42.
- Shukla, D. D., Ward, C. W. & Brunt, A. A. (1994). The *Potyviridae*, pp. 516. Wallingford, UK: CAB International.
- Simon-Buela, L., Guo, H. S. & Garcia, J. A. (1997). Cap-independent leaky scanning as the mechanism of translation initiation of a plant viral genomic RNA. J Gen Virol 78 (Pt 10), 2691-9.
- Sledjeski, D. D., Whitman, C. & Zhang, A. X. (2001). Hfq is necessary for regulation by the untranslated RNA DsrA. *Journal of Bacteriology* **183**, 1997-2005.
- Spassova, M. I., Prins, T. W., Folkertsma, R. T., Klein-Lankhorst, R. M., Hille, J., Goldbach, R. W. & Prins, M. (2001). The tomato gene Sw5 is a member of the coiled coil, nucleotide binding, leucine-rich repeat class of plant resistance genes and confers resistance to TSWV in tobacco. *Molecular Breeding* 7, 151-161.
- Spratt, B. G., Hedge, P. J., te Heesen, S., Edelman, A. & Broome-Smith, J. K. (1986). Kanamycin-resistant vectors that are analogues of plasmids pUC8, pUC9, pEMBL8 and pEMBL9. *Gene* **41**, 337-42.
- Strudwick, S. & Borden, K. L. (2002). The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus. *Differentiation* **70**, 10-22.
- Tacken, M. G., Thomas, A. A., Peeters, B. P., Rottier, P. J. & Boot, H. J. (2004). VP1, the RNA-dependent RNA polymerase and genome-linked protein of infectious bursal disease virus, interacts with the carboxy-terminal domain of translational eukaryotic initiation factor 4AII. *Arch Virol*.
- Tai, T. H., Dahlbeck, D., Clark, E. T., Gajiwala, P., Pasion, R., Whalen, M. C., Stall, R. E. & Staskawicz, B. J. (1999). Expression of the Bs2 pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 14153-8.
- Thornton, G. B., Robberson, D. L. & Arlinghaus, R. B. (1981). Attachment of avidin-coupled spheres to linear and circular forms of mengovirus double-stranded RNA. *J Virol* **39**, 229-37.
- Tomlinson, J. A. (1962). Control of lettuce mosaic by the use of healthy seed. *Plant Path* **11**, 61-64.

- Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A. L. & Bernardi, F. (2001). Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res* 74, 157-75.
- van Regenmortel, M. H. V., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Carstents, E. B., Estes, M. K., Lemon, S. M., Maniloff, J., Mayo, M. A., McGeoch, D. J., Pringle, C. R. & Wickner, R. B. (2000). Virus taxonomy. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, pp. 1162. San Diego: Academic Press.
- Vieira, J. & Messing, J. (1987). Production of single-stranded plasmid DNA. *Methods Enzymol* **153**, 3-11.
- Wang, D. & Maule, A. J. (1992). Early embryo invasion as a determinant in pea of the seed transmission of pea seed-borne mosaic virus. *J Gen Virol* **73** (**Pt 7**), 1615-20.
- Wang, D. & Maule, A. J. (1994). A Model for Seed Transmission of a Plant Virus: Genetic and Structural Analyses of Pea Embryo Invasion by Pea Seed-Borne Mosaic Virus. *Plant Cell* 6, 777-787.
- Wang, X., Ullah, Z. & Grumet, R. (2000). Interaction between zucchini yellow mosaic potyvirus RNA-dependent RNA polymerase and host poly-(A) binding protein. *Virology* 275, 433-43.
- Wetzel, T., Candresse, T., Macquaire, G., Ravelonandro, M. & Dunez, J. (1992). A highly sensitive immunocapture polymerase chain reaction method for plum pox potyvirus detection. *J Virol Methods* **39**, 27-37.
- Whitham, S. A., Anderberg, R. J., Chisholm, S. T. & Carrington, J. C. (2000). Arabidopsis RTM2 gene is necessary for specific restriction of tobacco etch virus and encodes an unusual small heat shock-like protein. *Plant Cell* 12, 569-82.
- Wittmann, S., Chatel, H., Fortin, M. G. & Laliberte, J. F. (1997a). Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of Arabidopsis thaliana using the yeast two-hybrid system. *Virology* 234, 84-92.
- Wittmann, S., Chatel, H., Fortin, M. G. & Laliberté, J. F. (1997b). Interaction of the viral protein genome linked of *Turnip mosaic potyvirus* with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* 234, 84-92.
- Yang, S. J., Revers, F., Souche, S., Lot, H., Le Gall, O., Candresse, T. & Dunez, J. (1998). Construction of full-length cDNA clones of lettuce mosaic virus (LMV) and the effects of intron-insertion on their viability in Escherichia coli and on their infectivity to plants. *Arch Virol* 143, 2443-51.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J. & Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-19.
- Yoshii, M., Nishikiori, M., Tomita, K., Yoshioka, N., Kozuka, R., Naito, S. & Ishikawa, M. (2004). The Arabidopsis Cucumovirus Multiplication 1 and 2 Loci Encode Translation Initiation Factors 4E and 4G. J Virol 78, 6102-6111.
- Zabarovsky, E. R. & Winberg, G. (1990). High efficiency electroporation of ligated DNA into bacteria. *Nucleic Acids Res* **18**, 5912.
- Zhang, Z., Torii, N., Furusaka, A., Malayaman, N., Hu, Z. & Liang, T. J. (2000). Structural and functional characterization of interaction between hepatitis B virus X protein and the proteasome complex. *J Biol Chem* **275**, 15157-65.

Annexe

T.MV.= 0						57	90	атст	58	00 actru		5810	CTAC	582 תפידים	20 2070 - 20	5 CATC	830	2070	584	0 TAC1		5850	ссал	Xb	aI	CAC	220	587		5880 ACTACA		
LMV-0							T	T	S I	N F	ci cci	T 9	9 110 S S	т т	GD	M	T	2 3	R	v	د n در ا	T N	Н	S	R	E	N	т.	0	ĸ	T. 0	
AF198							-	-	0		0	÷. '		-						÷.				A	1	÷.	1	÷.	ž	÷.	- ×	
Da																			1.1				1.1	÷.								
2435																												1.1				
T.MV-9												1.1				1.1			1.1	1.1			1.1	1.1	1.1		1.1	1.1				
IMV = 9 T $MV = 1$																																
Cordoue												1.1		1.1		1.1			1.1	1.1	1.1				1.1		1.1	1.1				
T MV-F														т																		
LMV-E														ь																		
2012												1		1		1	1	· ·	1	1	1	· ·	1	÷.	1	1	1	1	÷.			
AF199																																
LMV-13												1	· · ·			1		· · ·	1	1		· · ·	1	1	1	1	1	1	÷	÷		
Tn4										1 0 0 0			· ·	1			101	· ·	1		1	· ·	1	1	1.0			1	÷			
CI										1900							191	J							19	20						
		5890		5900		59	10		59	20		5930		594	40	5	950		596	0		5970		5	980			599	0		6000	
IMV-0 AG	CAG	TCAGAG	ACAC	AATCA	TCAAC	TTC	GAG!	TGCC	AGG	CTGG	AACT	GTG	ACGG	GGGT	- ° FCCTT	CGAC	ATGG	AGAC	AGCA	CAG	AAAT	TGGC	AGAG	GAG	TAT	GGG	TGC	ATC	GATO	TCA	TTTA	
LMV-0		VR	יד ת	т	TN	F	E	C	0	A G	т	GI		G	S F	ח	M	с т	Δ	0	к	т. А	E	E	v	G	- C C	т	Л	v	ту	
AF198			7, 7			- T.	-		÷.			s			1 î.			11		×.			-	-	Ξ.			Ξ.	-	1	7.7	
Da						1.1					1.1	S				1.1			1.1	1.1	1.1				1.1	1.1	1.1	1.1				
A435							1.1					s							1.1				1.1	1.1		1.1		1.1	1.	1.1		
T.MV-9						1.1	1.1	1.1	1.0		1.1	s				1.1			Ŧ	1.1	1.1		1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1		
LMV-1							1.1				1.1	g				1.1			÷.	1.1			1.1	1.1	1.1		1.1	1.1				
Cordoue	v						1.1	1.1			1.1	g			. .	1.1			1.1	1.1			1.1	1.1	1.1		1.1	1.1				
LMV-F	m.						1.1	1.1			1.1	g			. .	1.1				1.1			1.1	1.1			1.1	1.1				
C12	v						1.1	1.1			1.1	g			÷ .	1.1				1.1			1.1	1.1			1.1	1.1				
75100	v											0			÷ .																	
TMU 12	v											5			÷																	
TWA-12	v											0			- .																	
CT	v	103	20							1 9 1 0		5			<u>+</u>		105	h							10	60						
01		100								1) 1 0							1))	0							τJ	00						
						<u> </u>	20		<u> </u>	10				60	<u> </u>	6	070		608	0		c 0 0 0		C	100			611	0		6120	
		6010		6020		60.	30		60	40	(5050		600	50	0	070			•		0090		ю	100			OTT	<u> </u>		0 0	
LMV-0 TC	CACCA	6010 AATCGA	AAGA	6020 AGCTC	TCAG	00 60.	CGA	CTCG	GTC	TCAA	AGGC	050 AGAT(GGAA	600 TCAG	agcct	GATA	TGCA	AAGA	TTTA	TTG	GTTT	TCTG	CGGC	o GTA	GCC	ATT	GGC	GGC	ACAI	rgga	TGAT	
LMV-0 TC	CACCI H (6010 AATCGA Q//S	AAGA K E	6020 AGCTC A	TCAGI L S	60. [AAA (K	CGA	CTCG L	GTC	40 TCAA L K	AGGC2 G	AGATO R I	GGAA W N	600 TCAG	AGCCT	GATA	TGCA	AAGA:	TTTA L	TTGO	STTT V	TCTG FC	CGGC G	° GTA V	GCC	ATT I	GGC G	GGC	ACA1	rgga W	ATGAT M M	
LMV-0 TC LMV-0 AF198	CACCI H (6010 AATCGA Q//S ·//·	K E	6020 AGCTC A	TCAGI L S	60 [AAA K	CGA R	CTCG L	GTC	TCAA L K	AGGC2 G	AGAT(R I	GGAA W N	CAG2	AGCCT SL	GATA I L	C 1	AAGA! KD	ITTA L	TTGO	STTT V	TCTG FC	CGGC G	GTA V	GCC:	ATT I	GGC G	GGC	ACAT T	rgga W	M M	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg	H (6010 AATCGA Q//S ·//·	K E	6020 AGCTC A	TCAGI L S	60. [AAA(K	CGA R	CTCG L	GTC	TCAA L K	AGGC2 G	AGATO R I	GGAA WN	600 TCAG2 Q	AGCCT SL	GATA I L	C 1	AAGA! KD	FTTA L	TTGO	STTT V	TCTG F C	CGGC G	GTA V	.GCC.	ATT I	GGC G	GGC	ACA1 T	rgga W	M M	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435	H (6010 AATCGA 2//S ·//· ·//·	K E	6020 AGCTC A	TCAGI	60. [AAA) K	CGA(R	CTCG L	GTC	40 TCAA L K	AGGC2 G	5050 AGAT(R 1	GGAA WN	600 TCAG2 Q	AGCCT	GATA I L	C 1	AAGA! KD	TTTA L	TTGC L	STTT V · I	FCTG	CGGC G	GTA V	GCC:	ATT I ·	GGC G	GGC	ACA1 T	rgga W	M M	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9	H (6010 AATCGA Q//S ·//· ·//· ·//·	KE	6020 AGCTC A		60. K	20 CGA0 R	CTCG L	GTC	40 TCAA L K	AGGC2 G ·	•050 AGAT(R 1	GGAA WN	600 TCAG2 Q	AGCCT	GATA I L	C 1	AAGA! KD	FTTA L	TTGC L	STTT V · I I	F C	CGGC G · ·	GTA V	.GCC:	ATT(I	GGC G	GGC	ACA1 T	N W	M M	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1	H (6010 AATCGA 2//S ·//· ·//· ·//·	AAGA K E	6020 AGCTC A		60. FAAA (CGA(R	CTCG L · ·	G	40 TCAA L K	AGGC2 G · ·	•050 AGAT(R 1	GGAA WN	600 TCAG2 Q	AGCCT	GATA I L	C 1	AAGA! K D 		TTGC L	STTT V I I	F C	CGGC G · · ·	0 GTA V	GCC:	ATT(I	GGC G	GGC	ACA1 T	IGGA W	M M	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue	H (6010 AATCGA 2//S ·//· ·//· ·//· ·//·	K E	6020 AGCTC A		60. FAAA	CGA(R	CTCG L	GTC	40 TCAA L K	AGGC2 G · ·	AGAT(R 1	GGAA W N 	600 TCAG2 2	AGCCT	GATA I		AAGA! K D 	L	TTGC L	STTT V I I	F C	CGGC G · ·	6 GTA V	GCC.	ATT(I	GGC G · ·	GGC	ACA1 T	IGGA W	M M	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E	EACCI H (6010 AATCGA Q//S ·//· ·//· ·//· ·//·	K E 	6020 AGCTC A		60. FAAA (CGA(R	CTCG L	GTC	40 TCAA L K	AGGCI G	AGAT(R 1	GGAA W N 	600 TCAGJ Q	AGCCT	GATA I	C 1	AAGA! K D 	L	TTGC L	STTT V I I I	TCTG F C	CGGC G	6 GTA V	GCC:	ATT(I	GGC G · · ·	GGC		IGGA W	M M	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E C12	H (6010 AATCGA Q//S ·//· ·//· ·//· ·//·	K E	6020 AGCTC A	TCAG7 L S 	60. [AAA(CGA(R	L · ·	GTC	40 TCAA L K	AGGCI G	AGAT(R 1	GGAA W N 	600 TCAG2	AGCCT S L 	GATA I L	TGCAI	AAGA!			STTT V I I	TCTG F C	CGGC G · · · ·	6 GTA	GCC:	ATT(I	GGC G · · · ·	GGC		IGGA W	M M M	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E C12 AF199	H (6010 AATCGP Q//S ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//·	AAGA K E · · · · · · · · · · · · · · ·	6020 AGCTC A		60. [AAA(CGA0 R	CTCG L	GTC	40 TCAA L K	AGGCI G · · ·	AGAT(R 1	GGAA W N 	600 TCAG2	AGCCT S L 			AAGA!			STTT V I I I	TCTG F C	CGGC G · · · · · · · · · · · · · · · · ·	*GTA V		ATT(I	GGC G · · · · · · · · · · · · · · · · ·	GGGC		IGGA W	M M	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E C12 AF199 LMV-13	H (6010 AATCGP Q//S ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//·	AAGA K E ·	6020 AGCTC A	TCAGI L S	60. [AAA (CGA(R	CTCG L	G	40 TCAA L K 	AGGCI	AGAT(R 1	GGAA W N 	600 TCAG2	AGCCT S L · · ·			AAGA! X D 		TTG(L	STTT V I I	TCTG F C	CGGC G · · · · · · · · · · · · · · · · ·	*GTA V	A GCC:	ATT(I	GGC	GGGC		IGGA 	ATGAT M M 	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E C12 AF199 LMV-13 Tn4	EACCI	6010 AATCGP Q//S ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//·	LAAGA K E · · · · G · · · G · · · G · · · ·	6020 AGCTC A		60. [AAA(CGA(R	CTCG L	G	40 TCAA L K	AGGC2 G · · · ·	AGAT(R 1	GGAA W N 	600 TCAGJ Q	AGCCT S L · · ·		TGCAI C 1	AAGA! K D 		TTG(L	3TTT V	TCTG F C	CGGGC G	°GTA V · · · ·	GCC:	ATT(I	GGC	G		IGGA W	ATGAT M M 	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2	CI	6010 AATCGF Q//S ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//·	XAAGA K E · · · · · · · · · · · · · · ·	6020 AGCTC	TCAGI L S 	60. FAAA (CGA(R		GTC	40 TCAA L K · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	AGGCI	3050 AGAT(R 1	GGAA W N 	600 TCAG2 Q	AGCCT S L · · ·		TGCA C 1	AAGA!		TTG(L	STTT V	TCTG F C	CGGC G · · · · · · · · · · · · · · · · ·	*GTA V	GCC: A	ATT(I	GGC G	G		rgg#	M M 	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2	CI,	6010 AATCGF Q//S ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//·	K E · · · · · · · · · · · · · · ·	6020 AGCTC A	TCAGI L S 	60. FAAA	CGA(R		600 GTC G	40 TCAA L K 	AGGCI	AGAT(R 1	GGAA W N 	600 TCAGJ	AGCCT S L · · · · · ·		TGCA C 1	AAGA!		TTG(STTT V	TCTG F C	CGGC G · · · · · · · · · · · · · · · · ·		GCC .	I	GGC G	GGC:		rgg#	M M 	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2	CI,	6010 AATCGF Q//S ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//·	XAAGA K C C C C C C C C	6020 AGCTC A		60. FAAA	CGA(R		60 GCC G	40 TCAA L K 	AGGCI G	5050 AGAT(R 1 - - - - - - - - - - - - -	GGAA W N 	600 TCAGJ 2	AGCCT S L 		TGCA C 1		620	TTGC L	STTT V I I I ·	6210	CGGC G	6 GTA V	GCC. A	ATT (GGC G	6223	ACA1 T · · ·	FGGA W	6240	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-1 Crdoue LMV-2 C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2	CI,	6010 AATCGP 2//S ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//·	K E 	6020 AGCTC A		60. K	CGA(R		60. G :	40 TCAA L K 	AGGCI G · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		AAGG	600 TCAGJ	AGCCT S L · · · · · · · · ·		TGCA C 1		6200 CCGT	0 TTGC I	STTT V · · · · · ·	6210 AAGC	CGGC G · · · · · · · · · · · · · · · · ·	°GTA V	GCC. A	ATT(GGC G · · · · ·	6233 GGCC	ACA1 T	FGGA W	6240 67TTTA	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2 LMV-0 GT LMV-0 GT	CI,	6010 AATCGA 2//S ·//· ···· ·//· ···· ·/·· ···· ·/·· ···· ···· ···· ····· ····· ····· ······	XAAGA K E 	6020 AGCTC A	GGATC	61 61 63 61	CGA(R	CTCG L · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	61 8 7 61 8 7 7 7	40 TCAA L K · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	AGGCI G · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	AGAT(R T	CGAA W N · · · · · · · · · · · · · · · · ·	600 TCAGJ - - - - - - - - - - - - - - - - - - -	AGCCT SL	GATA I L · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	TGCA C	AGCT(X L	6200 CCGT R	0 I - - - - - - - - - - - - -	STTT V · · · · · · · · · · · · · · ·	6210 AAGC Q A	CGGC G · · · · · · · · · · · · · · · · ·	6 GTA V	GCC. A	ATT (I	GGC G · · · · · · · · · · · · · · · · ·	623 GGC:	ACAT T	FGGA W	6240 TTTTA V Y	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2 LMV-0 GT LMV-0 AF198	CACCI H (CI, CI,	6010 AATCGP 2//S ·//····/····//····//····//····//····//····	K E 	6020 AGCTC A	TCAGI L S 	60. RAAA K	CGA(R · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	CTCG L	61 STTC V	40 TCAA L K 	AGGCI G · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	AGAT(R T	GGAA W N ·	600 TCAGJ 2	AGCCT SL	6 GATA I L	TGCAI C 1	AAGA* D	6200 CCGT R	O L · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	STTT V I I I I S CGAC	6210 AAGC Q A	CGGC G · · · · · · · · · · · · · · · · ·	6 GTA V	GCC. A	ATT (GGC G · · · · · · · · · · · · · · · · ·	6233 GGC.	ACAT T	FGGA W · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	6240 TTTTA V Y	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-0 C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2 LMV-0 GT LMV-0 GT LMV-0 GT LMV-0 GT	CACCI H (CI, CI,	6010 AATCGP 2//S ·//· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ···· ·/··· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ····· ····· ····· ····· ····· ····· ····· ······	K E G G G G G G G C C C C C C C C C C C C C	6020 AGCTC A	TCAGT L S 	60. RAAA K	CGA(R · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	GCAG	610 G	400 TCAA L K 	Sty: CCCAAC CCCAAC CCCAAC	50500 AGAT (R 1	GGAA W N 	600 TCAGJ Q	AGCCT SL 	6 GATA I L	TGCA C 1	AAGA**********************************	6200 CCGT R	0 ITGC	STTT V I I I S CGAC CGAC	62100 AAGCC Q A	CGGC G · · · · · · · · · · · · · · · · ·	©GTA V	GCC: A	ATT I	GGC G · · · · · · · · · · · · · · · · ·	6233 GGC.	O ACAT T · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	FGGA W · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	6240 GTTTA V Y	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-1 Cordoue LMV-2 C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2 LMV-0 GT LMV-0 GT LMV-0 GT LMV-0 GT LMV-0 GT	CI,	6010 AATCGP 2//S ·//· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/··· ·/··· ·/··· ·/··· ···· ···· ···· ···· ····· ····· ····· ······	XAAGA K E 	6020 AGCTC A	TCAGI L S 	61. 61. 61. 61.	50 CGA (R	GCAG	60. G	400 TCAA L K 	Sty: CCAA(2, 	50500 AGAT(R 1	GGAA W N 	600 TCAGJ Q	AGCCT S L 	GATA I L · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	C 1	AAGA*	6200 CCGTT R	0 ITGC	GTTT V I I I S CGAC R · ·	62100 AAAGCC 2 A	CGGGC G · · · · · · · · · · · · · · · ·	©GTA V	GCC: A	ATT I · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	GGC G · · · · · · · · · · · · · · · · ·	6233 GGC.	O ACAT T · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	FGG2 W	6240 STTTA V Y 	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-1 Crdoue LMV-2 LMV-1 STn4 6K2 LMV-0 GT LMV-0 AF198 Dg Tn2 A435	CI,	6010 AATCGP 2//S ·//· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/··· ·/··· ·/··· ·/··· ···· ···· ····· ····· ····· ····· ····· ······	AAAGA K E · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	60200 AGCTC A	TCAGT L S 	60. R	50 50 50 50 50 50 50 50 50 50	CTCG L	600 GCTC G 1 1 61 STTC V 1	40 TCAA L K · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	Sty 	50500 AGAT(GGAA N N - - - - - - - - - - - - -	600 TCAGJ Q	AGCCT S L 	GATA I	C 1 C 1 1990 1990 CAGAA Q 1	AAGAX X D 	6200 CCCGT R	0 TTGCO L · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	GTTT V I I I CGAC R · ·	62100 ΑΑGC 2 Δ Δ Δ Δ Δ Δ Δ Δ Δ Δ Δ Δ Δ	CGGC G · · · · · · · · · · · · · · · · ·	6 GTA V 	GCC: A	ATT(I	GTA GTA V	6233 GGC: G G G G G G G	O ACAT T · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	GAAGE	6240 6240 5TTTA V Y 	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 COrdoue LMV-E C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2 LMV-0 GT LMV-0 AF198 Dg Tn2 A435 LMV-9	CACCJ H (6010 AATCGP 2//S ·//· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ··· ·/·· ··· ·/··· ·/··· ·/··· ·/··· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ····· ····· ····· ····· ····· ····· ······	AAAGA K E · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	60200 AGCTC A	TCAGT L S 	60. FAAA	50 CGA (R	GCAG	600 GG :	40 TCAA L K · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	Sty: Sty: CCAAM 0// //, //, //, //, //,	50500 AGAT(GGAA N N - - - - - - - - - - - - -	6002 Q	AGCCT AGCCT S C C C C C C C C C C C C C	GATA I L · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	C 1	AAGA:	6200 CCCGT R	0 TTGC L · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	STTT V I I I S CCGACC R S S S S S S S S S S S S S S S S S S	62100 AAGC Q A	CGGC G · · · · · · · · · · · · · · · · ·	6 GTA V 	GCC: A	ATT(I	GTA GTA V	6233 GGC: G G G G G G G G C.	O ACAT T · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	TGG27 W · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	6240 67177 6240 67177 V Y 	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-0 C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2 LMV-0 GT LMV-0 GT LMV-0 AF198 Dg Tn2 A435 LMV-9 LMV-9 LMV-1	CI,	6010 AATCGF 2//S ///· ///· ///· ///· ///· ///· ///· ///· ///· ///· ///· ///· ///· ///· ///· ///· ///· / //·	AAGAA K E · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	60200 AGCTC A	TCAGT L S 	60. RAAA	50 CGA (R	CTCG L	60. GCTC: GC:	40 TCAA L K 	Sty: CCAAC Sty: 	50500 R 1 - - - - - - - - - - - - -	GGAA W N ·	600 TCA2 Q	AGCCT S L 	GATA I L · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	C 1	AAGAT	6200 CCGT R	0 TTGC	GTTT V I I I CGAC R · ·	62100 AAGCC Q A	CGGC G · · · · · · · · · · · · · · · · ·	°GTA V · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	GCC. A	ATT I	GGCC G	6233 GGC:	O ACAT T · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	rgga w · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	6240 57777 6240 577777 577777 577777 577777 577777 577777 577777 577777 577777 5777777 577777777	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-1 Crdoue LMV-13 Tn4 6K2 LMV-0 GT LMV-0 GT LMV-0 AF198 Dg Tn2 A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue	CACCJ H (6010 AATCGP 2//S ·//· ···· ·/·· ···· ·/·· ···· ·/·· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ····· ····· ····· ····· ····· ····· ····· ····· ····· ······	AAGA K E · · · · G · · · · · · · · · · · · · · ·	60200 AGCTC A	TCAG7 I S 	611 611 611 612 613	50 CGA (R	CTCG L · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	60. GCC: GC: 1 61 STTC: V 1	40 TCAA L K · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	Sty: CCAAC CCAAC CCAAC C/ ·// ·// ·//	50500 R T	GGAA W N 	600 TCAQ Q	AGCCT S L 	6 GATA I I ·	C 11	AAGAT 0 	6200 CCGT R	0 TTTGC	STTT V I I S S S S S S S S S S S S S S S S S	62100 AAGCC Q A 	CGGC G · · · · · · · · · · · · · · · · ·	© GTA V 	GCC. A	ATT I	GGC G G	6233 GGC.	O O O A A T C C C C C C C C C C C C C C C C C	rgga W · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	6240 6240 TTTTA V Y 	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-1 CT2 LMV-0 GT LMV-0 GT LMV-0 GT LMV-0 GT Tn2 A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-1	CACCJ H (6010 AATCGP 2//S ·//· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ··· ·/·· ··· ··· ··· ··· ··· ··· ··· ··· ··· ··· ··· ··· ··· ··· ··· ··· ···· ··· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ····· ····· ····· ······	AAGA K E ·	60200 AGCTC A	TCAGT L S 	61 61 61 61 61 61 61 61 61 61 61 61 61 6	50 GGAT D	CTCG L · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	600: GG :	400 TCAA L K 	Sty: CCAA(- - - - - - - - - - - - -	50500 R 1	GGAA W N 	6010 CAG2 Q	AGCCT S L 	6 AAAGA R	C 1	AGGATU 	6200 CCGT R	0 TTGC	STTT V I I I S CGACC R S S S S S S S S S S S S S S S S S S	62100 AAGCC 2 A 6210 AAGCC 2 A 6210 A 6210 A 6210 AAGCC 2 A 6 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7	CGGC G · · · · · · · · · · · · · · · · ·	6 GTA	GCC. A 2000 2200 N	ATT I	GGC G G	6233 GGC.	O ACAT I	FGG# W	6240 5777777777777777777777777777777777777	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2 LMV-0 GT LMV-0 AF198 Dg Tn2 A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-2 LMV-2 C12	CACCJ H (CI, CI,	6010 AATCGP 2//S ·//· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ··· ·/·· ··· ·/·· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ····· ····· ····· ····· ······	AAGA K E · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	60200 AGCTC A	TCAG7 L S 	61 61 61 3GCT(A	50 50 60 60 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7	CTCG L	600: GG :	400 TCAAL 1 K 	Sty: Sty: CCAAC Sty: 	SUSOU AGATCI R 1	GGAA W N 	6010 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	AGCCT AGCCT 	6 AAAGA R	C 11	AGGCT(6200 CCGT R	0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	STTT V I I I · · · · · · · · · · · · · · · ·	6210 AAGC Q A 	CGGCC G · · · · · · · · · · · · · · · ·	6 GTA • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	GCC. A 2000 2200 AAC.	ATT I	GGC G G	6233 GGC.	0 T T · · · · · · · · · · · · · · · · ·	FGG# W · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	6240 6240 777777777777777777777777777777777777	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-0 C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2 LMV-0 GT LMV-0 GT LMV-0 AF198 Dg Tn2 A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-9 LMV-	CI,	6010 AATCGF 2//S ///· ///· ///· ///· ///· ///· ///· ///· ///· ///· ///· ///· ///· ///· ///· ///· ///· // //	AAGA K E ·	60200 AGCTC A	TCAG7 I S 	61. 61. 61. 61. 61. 61. 61. 61.	50 GAT (D	CTCG L	600: GG :	40 TCAA L K 	Sty: 	AGATC R 1	GGAA W N 	6010 611 TAAA(611 TAAA(K	AGCCT AGCCT 	6 AAAGA R	C 11	AGG2T 	6200 CCGT R	0 TATCC 0 TATCC Y	STTT V I I I · · · · · · · · · · · · · · · ·	62100 AAGC Q A	CGGCC G · · · · · · · · · · · · · · · ·	6 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	GCC. A 2000 2200 AACC.	ΑΤΤ΄ Ι · · · · · · · · · · · · ·	GGC G G	6233 GGCC.	O ATTCO ATTCO I	FGGA W	6240 6240 GTTTA V Y 	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-1 COrdoue LMV-13 Tn4 6K2 LMV-0 GT LMV-0 GT LMV-0 AF198 Dg Tn2 A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-1 Cordoue LMV-1 Cordoue LMV-1 LMV-1 Cordoue LMV-1 LMV-1	CACCJ - - - - - - - - - - - - -	6010 AATCGP 2//S ·//· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ····· ····· ····· ······	AAAGA K E C G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	60200 AGCTC A	TCAG1 I S 	61. 61. 61. 61. 61. 61. 61. 61.	CGA(R · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	CTCG L · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	600: GG :	40 TCAA L K 	Sty: Sty: CCAAA CCCAAA CCCCAAA CCCCAAA CCCCAAA CCCCAAA CCCCAAA CCCCAAA CCCCAAA CCCCAAA CCCCAAA CCCCAAA CCCCAAA CCCCAAA CCCCAAA CCCCAAAA CCCCAAA CCCCAAA CCCCAAA CCCCAAA CCCCAAA CCCCAAA CCCCAAA CCCCAAA CCCCAAA CCCCAAA CCCCCAAA CCCCAAA CCCCCAAA CCCCCAAA CCCCCAAA CCCCCAAA CCCCCAAA CCCCCCCC	SUSO () AGATO	GGAA W N 	6010 	AGCCT AGCCT 	GATA I L	C 11	AGGCT 	6200 CCCGT R	0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	STTT V I I I SCGAC R · · · ·	6210 AAGC Q A 	CGGGC G - - - - - - - - - - - - - - - -	°GTA 2GTA 	GCC. A 2000 2200 AACC.	ATT I	GGC G G	6233 GGC.	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	FGG2 W · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	6240 6240 STTTA V V	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-1 COrdoue LMV-13 Tn4 6K2 LMV-0 GT LMV-0 GT LMV-0 GT n2 A435 LMV-9 LMV-1 GOrdoue LMV-1 Cordoue LMV-1 Zn2 AF199 LMV-1 LMV-1 Tn2 AF199 LMV-1 Cordoue LMV-1 Tn2 AF199 LMV-1 Cordoue LMV-1 COrdoue LMV-1 COrdoue LMV-1 COrdoue LMV-1 COrdoue LMV-1 COrdoue LMV-1 COrdoue LMV-1 COrdoue LMV-1 COrdoue LMV-1 CORDOUE LMV-1 CORDOUE C	CI,	6010 AATCGP 2//S ·//· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ····· ····· ····· ····· ······	AAGA K E · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	60200 AGCTC A	TCAGT I S 	61. 61. 63GCT A	50 CGA (R	CTCG L · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	600: GG :	11 CAA 1 K K K K K K K K K K K K K K K K K K	Sty: CC2AAA CC2AA CC2AA CC2AAA CC2AA CC2AA CC2AA CC2AAAA CC2AAAA CC2AAAA CC2AAAA CC2AAAAA CC2AAAAA CC2AAAAA CC2AAAAA CC2AAAAAA CC2AAAAAAA CC2AAAAAA CC2AAAAAAAAAA	AGATC	GGAA W N 	6010 	AGCCT S L 	арана (1997) арана (1997) а	C 11	AAGA: X D 	6200 6200 CCGT R	0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	STTT V I I S GGAC R	62100 AAGCC 2 A 	CGGC G - - - - - - - - - - - - - - - - -	°GTA 2GTA 	GCC. A	ATT I	GGC G G	6233 GGC.	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	FGG2 W · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	6240 6240 TTTTA V Y 	

			6250			6260)		627	70		62	80		62	90		63	00		63	10		63	20		63	30		63	340		(6350)		6360
LMV-0	TGG	TGA	CGAT	GCG	ACG.	ATG	GAA(CACI	CAT1	rtt(GGAC	GCTG	CGT	ATAC	GGA	GAAA	AGGG.	AAG	AAA	rcco	GAA	AAA	CGAA	AGG.	AATG	GGA	ACG.	AAA	AAT	CGA	AGA	TTT	GTA	AATA	M	ATG	GATA
LMV-U	G	D .	D	A	T	м	E	H	Y .	E.	G	A	A 1	ст.	E	K	G	ĸ	ĸ	S	G	ĸ	T P	(G	М	G	т	ĸ	N	R	R	E.	V	N	М	Y	G Y
Da Da								1			1	1	1				1			1	1	1	1				1							1			
Tn2	1.1		1.1	1.1	1.1			1.1		1.1		1.1	1.00			1.1	1.1	1.1	1.1			1.1	1.00				1.1	1.1	1.1			1.1		1.1			
LMV-9	1.1	÷.,	1.1	1.	1.1	1.1	1.1	1.1		1.1		1.0	1.00			1.1	1.1	1.1		1.1	1.1	1.1	1.00		1.	1.1		1.	1.1	1.1		1.1	1.	1.1		1.1	1.11
LMV-1			1.1	1.		1						1.0	÷			1.1	1.1	1.1	1	1.0		1.0	÷			1.1			1.	1		1.1		1.0		1.0	
Cordou	e ·	1	1.1	1	1																																
LMV-E			1.1	1	1		1	÷.,		1		÷	1	• •	1	1	1	1	1	1	÷	1	•	• •		1		1	1		1			1		1	· · ·
C12	1	1		1	1	1	1	1	1	1		1	÷		1	1	1	1	1	1	1	1	•	· ·		1	1	1	1	1	Κ	1		1		1	1.1
AF199	1		1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	· · ·		1	1	1	1	1	1	1	1	•	1	1		1	1	1	K	1	1	1	1	1	1.1
TDA	1		1	1	1		1	÷.	÷.	1	1	1	1		1		1		1	1	1	1	1			1	÷.	1	1		ĸ	1	1	1	1	1	11
VPg			205	0								2	060								2	2070								4	208	0					
			6370			638()		639	90		64	00		64	10		64:	20		64	30		64	40		64	50		64	460		(6470)		6480
LMV-0	CAA	CCC.	AGAA	GAT'	TTC	TCA:	TTC2	ATCO	GAI	rtt(CTG	GACC	CGCI	CAC2	AGG	GAAA	ACA	ATG	GAC	GAAC	AAG	TAT	TTTC	TGA	CATA	AGT	CTC	GTC	CAA	GAT	GCC	TTT.	AGT <i>i</i>	AAGO	GAAA	GAC	TCAA
LMV-0	Ν	Ρ	Ε	D	F	S	F	I	R	F	L	D	ΡI	Т	G	K	Т	М	D	Е	Q	V	F <mark>S</mark>	D	I	s	L	V	Q	D	А	F	s	K	Е	R	L K
AF198		1	1.1		1	1	1	1	1	1	1		1	• •	1		1		1	1	1		1		1		1	1	1	1	1	1			1	1	
Dg	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			1	1	1	1	1	1	1	· .		1		1	1	1	1	1	1		1	1	1	1.1
Tn2			1			1	1	1	1	1	1	1	1				1		1	1	1		÷		1		1	1	1	1	1	1			1	1	
LMV-9					I V		1			1			1		1					1		1					1				1						1.1
LMV-E					Y		÷.	÷.		÷.			1		1		1			1	2	1					1	1			1	1	G		÷.		
C12				1.1	1	1.1				Y						1.		1.1		1.1		1.1						1.1	1.1	1.1			G		1.1	1.1	
AF199				1.1		1.				÷.						1.1		1.1								G		1.	1.1	1.			G				
LMV-13												+	÷								÷	+	÷ .			G					+		G				
Tn4				1	1	1	1		+	1		÷	÷	· ·		1.1		1			\mathbf{r}_{i}	÷	÷			G	1	1	1.1	1	÷.,		G	÷	÷	÷	÷
VPg			20	90									2100)								211	0								21	20					
			6490			6500	C		651	10		65	20		65	30		65	40		65	50		65	60		65	70		6	580		(6590)		6600
LMV-0	ACTO	CCT.	ATCC	GAA	GGA	GAA	ATCO	GAAT	rcgo	GAG	CACA	ATGC	GAAA	ACGGI	AAT!	FAGA	AGCT	TAT	CTTO	GTCA	AGA	ATC	TTAC	CAC.	AGCA	AGCA	CTC	GAG	ATA	GAC!	ATG.	ACC	CCTO	CACF	ACI	CTT	GCCA
LMV-U	ц	ц -		E .	G	E .	1	Е	S .	E .	н	M	R I	V G	1	R	A	ĭ.	ь	· ·	к	N .	ь и	ст 	A	A	ь	E .	1		M	T	Р	н	IN	S .	C Q
Da	1.1		1.1	1.1	1.1			1.1		1.1		1.1	1.00			1.1	1.1	1.1	1.1		1.1	1.1	1.1					1.1	1.1					1.1			
Tn2										1.1		1.				1.1		1.1		1.1							1.	1.			1	1.1					
LMV-9			1.1	1.		1		÷.,				1.0	÷			1.1	1.1	1.1	1.	1.0		1.1				1.1			1.	1			1.	1.1		1.0	
LMV-1			1.1	1	1	1	1	1		1	÷	÷	÷		1	1.1	1.1	1		1	$\epsilon_{\rm e}$	\mathbf{r}_{i}	÷	· ·		1.1	1	1	1	1	\mathbf{r}	1		1	÷	\mathbf{r}_{i}	$\gamma = \mathbf{L}$
LMV-E	1	1	1.1	1	1	1	1	1	÷	1	÷	1	÷		1	1.1	1	1	1	1	1	1	÷	• •		1.1	1	1	1	1	1	1	1	1	÷	1	1.1
C12	1	1	1.1	1	1	1	1	1		1	1	1	• 5	s .		1	1	1	1	1	1	1	1	• •	1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	1.1
AF199	1	1	1.1	G	1	1	1	1	1	1	1	1	·	<u> </u>		1	1	1	1	1	1	1	1			1	1	1	1	1	1			1		1	1.1
LMV-13	1			1	1	1	÷.,	1		÷.,		1		· ·		1	1	1		1	1	1	1	• •			1	1	1	1	1	1		1		1	· · ·
VPg			21	30									214()								215	0								21	60					
			6610			6620	C		667	3.0		66	40		66'	50		66	60		66	570		66	80		66	90		6'	700		,	6710)		6720
LMV-0	GCT	CGG.	AGCC.	AAG	ACA.	AAC	AAC	ATA	GCAC	GGA'	TAT	GTCG	ACAC	GAGA	ATA	IGAA	ATTG	CGT	CAG	ACTO	GAG	GAAG	CTAC	GGT	TGTI	GCT	CCA	GCA	CTG	ATC	CCA.	AAG	GAC	AATC	CAA	ATTA	CGGA
LMV-0	L	G	A	K	т	Ν	Ν	I	А	G	Y	V	D F	RΕ	Y	Е	L	R	Q	т	G	Е	A F	r v	V	A	Ρ	А	L	I	Ρ	Κ	D	Ν	Ρ	I	T D
AF198	1		1.1	1	1	1	1	1		1	F	1	1			1.1	1	1	1	1	1	1	÷	· · ·		1	1	1	1	1	1	1		1	1	1	· · ·
Dg		1	т		1	1	1	1	1	1	F	1	1		1		1		1		1	1	1				1	1	1	1	1		1	1	1	1	
Th2				÷	1	1	1	1	1	1	-	1	1			1	1	1	1	1	1	1	1				1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
ыму = 9 т.му_1		1						1	1		r F	1	1				1		1	1	1	1	1		1		1		1		1	1	т. F	1	1	1	11
LMV-E			Ť								F					1.						1.1															
C12	1.1	÷.,	ī		1.1		1.1			1.1	Ĩ	1.1				1.1		1.		1.	1	1.1					1.	1.						1.1			
AF199			I	1.							F		÷			1.1		1.			÷ .	÷									÷.						
LMV-13			I				+			+	F	+	÷								+	÷	÷												÷	+	· ·
Tn4	1		I	1	. •		÷.,	÷.,		÷.,	F	÷	÷	• •		1.1	1	1	1	÷	÷.,	(\mathbf{r}_{i})	•	· I		1			1		÷.,			1	÷	÷	· ·
VPg			21	70									2180)								219	0								22	00					
			6730			6740	C		675	50		67	60	1	Afl	II		67	80		67	90		68	00		68	10		68	820		(6830)		6840
LMV-0	CGA	AGA	CATC	CCT	GTA.	AAG	CAC	GAAA	AGCI	AAA	ACAC	CTGT	TCAC	GGGG	CTT	AAGA	GAT	TAC	AAC	CCTF	TAG	GCAG	CAG	CAAT	ATGC	CTTG	CTT.	ACC	AAC	GAA	ГСG	GAT	GGA	ATGA	AAG	GAGA	CAAT
LMV-0	Е	D	I	Ρ	V	K	Η	E//	/S	K	т	L	F F	R G	L	R	D	Y	Ν	Ρ	Ι	A	A A	A I	С	L	L	т	Ν	Е	S	D	G	Μ	K	Е	т м
AF198								- /,																													
Dg mp2																																					
T.MV-9																																					
$L_{MV} = 9$								1																													
LMV-E								. / ,	1.							1.							s														
C12								1															1														
AF199				(\cdot, \cdot)	+	+	+	.//	/ •	+	÷.,	÷	÷	· ·						÷.,	•	÷	•		-		+			+	+		+	÷.,	÷.,	÷	÷
LMV-13								1																													
Tn4				1.0				_/	-													0.0.5	~														
			22	τU			VI	2g//	Pro	C			222(J								223	υ								22	40					


Figure 1 : Représentation de la structure du protéasome 26S.

Le protéasome est composé d'une partie centrale de 20S et d'une unité régulatrice de 19S ou 11S (en bleu).

La partie centrale est formée de 4 anneaux : 2 anneaux centraux composés de 7 sous-unités B (en rouge) et 2 anneaux externes composés de 7 sous-unités A (en orange).



Figure 2 : Structure des protéines de type NBS-LRR (d'après Belkhadir et al., 2004). Cette représentation schématique montre les fonctions allouées aux différents domaines des protéines NBS-LRR.

En jaune est représenté le domaine N-terminal qui peut être de type CC (<u>C</u>oiled-coi<u>l</u>) ou de type TIR (Drosophila <u>T</u>oll/Human Interleukin-1 <u>r</u>eceptor). Les formes en jaune représentent les interacteurs cellulaires impliqués en aval de la cascade de signaux provoquée par l'activation de la protéine NBS-LRR.

En bleu est représenté le domaine NBS (<u>N</u>ucleotide <u>B</u>inding <u>S</u>ite) qui hydrolyse l'ATP (ou le GTP) lors de l'activation de la protéine NBS-LRR. L'ATP est représenté par un carré bleu.

En rouge est représenté le domaine LRR (<u>L</u>eucine-<u>R</u>ich <u>R</u>epeat) qui peut être subdivisé en deux parties, N-terminale et C-terminale. La partie N-terminale du domaine LRR peut interagir avec des facteurs qui stimulent l'activation de la protéine NBS-LRR (ces facteurs sont représentés par les formes grises). La partie C-terminale du domaine LRR interagirait avec les facteurs modifiés par la présence du pathogène et du facteur d'avirulence.



Figure 3 : L'hypothèse dite "de garde" (Dangl & Jones, 2001).

a, Un complexe protéique (bleu) qui inclut la protéine « gardée » (rouge) et la protéine NBS-LRR (grise) est la cible d'une protéine codée par un pathogène (orange). **b**, L'interaction de la protéine pathogène et le complexe protéine cellulaire provoque la dissociation, l'activation de la protéine NBS-LRR et la mise en place de la résistance. **c**, Hypothèse alternative : la protéine NBS-LRR sous sa forme inactivée ne fait pas partie du complexe cellulaire et la présence et la fixation de la protéine pathogène permet à la protéine NBS-LRR d'interagir avec le complexe. **d**, La fixation de la protéine NBS-LRR avec le complexe protéine lié à la protéine pathogène entraîne son activation et le déclenchement de la résistance.



Figure 4 : Prise de vue par microscopie électronique.

A. Potato virus Y (PVY). La barre représente 100 nm.

B. Infection de *Nicotiana clevelandii* par le *Turnip mosaic virus* (TuMV) provoquant dans le cytoplasme des structures en roue à aube, en feuillets et en agrégats stratifiés.

B.

A.



Figure 5 : Organisation génomique des potyvirus.

La polyprotéine est représentée par un rectangle, les régions non codantes par des traits, la VPg par le rond noir.

Protéines	Propriétés biologiques et biochimiques						
	Protéase à sérine de type trypsine						
P1 (32 à 64 kDa)	Auto-clivage en C-terminal						
	Symptomatologie						
	Transmission par pucerons						
	Interagit avec lui-même						
	Mouvement systémique						
HcPro (56 à 58 kDa)	Suppression de la RNAi						
	Synergisme et symptomatologie						
	Protéase à cystéine de type papaïne						
	Auto-clivage en C-terminal						
P3 (37 kDa)	Pathogénicité						
6K1	?						
$CL(70 hD_{0})$	ATPase, Hélicase						
CI(70 kDa)	Mouvement de cellule à cellule						
6K2	Ancrage du complexe de réplication dans la membrane						
	Localisation nucléaire						
NI_{0} (40 $I_{2}D_{0}$)	VPg impliquée dans la réplication						
Nia (49 KDa)	Protéase à cystéine de type trypsine (cis- et trans-)						
	Interaction avec facteurs de traduction						
NIb (58 kDa)	ARN polymérase dépendante de l'ARN (réplicase)						
	Transmission par pucerons						
$CD(29 \ge 40 l_{2}D_{2})$	Mouvement de cellule à cellule						
CF (20 a 40 KDa)	Mouvement systémique						
	Encapsidation						

Figure 6 : **Propriétés biologiques et biochimiques des protéines des potyvirus.**



Figure 7 : Représentation schématique du génome et de la maturation de la polyprotéine des potyvirus. D'après (Riechmann et al., 1992).

Ce schéma représente une chronologie probable de cette maturation même si aucune donnée *in vivo* ne vient préciser l'ordre exact de ces évènements. Les premières réactions protéolytiques sont autocatalytiques et ont probablement lieu de manière co-traductionnelle. Ces premières étapes produisent à la fois des précurseurs et des produits matures comme la NIa (ces produits matures sont reconnaissables sur le schéma grâce à leur nom indiqués en dessous). Ces étapes précoces de la maturation sont suivies par d'autres clivages en *-trans* et en *-cis*. Au cours de cette maturation, de nombreuses formes de précurseurs, comme le précurseur NIa-NIb, peuvent coexister avec des protéines sous leur forme mature. Abréviations : Hel, hélicase, Pro, protéase.





Figure 8 : Rôle de la VPg dans l'initiation de la traduction de l'ARN viral.

A. Dans la cellule végétale, l'ARNm dispose d'une coiffe en 5' qui participe au recrutement des facteurs d'initiation de la traduction en interagissant avec le facteur eIF4E (rouge). Le facteur eIF4E fait partie d'un complexe protéique qui entraîne la circularisation de l'ARNm puis le recrutement du ribosome.

B. Dans la cellule infectée, l'ARN viral dispose d'une VPg à la place de la coiffe. La VPg pourrait jouer le même rôle que la coiffe et participer au recrutement d'eIF4E puis des autres facteurs de traduction pour initier la traduction de l'ARN viral.



Figure 9 : Dendrogramme montrant les distances génétiques entre les isolats LMV connus.

Ce dendrogramme est basé sur le séquençage de la jonction entre la séquence codante de la NIb et de la CP. La barre représente une distance de 0,025 substitution par site. La branche phylogénétique colorée en rouge correspond au groupe LMV-Most et la branche colorée en bleu correspond au groupe LMV commun.

	Symptômes sur variétés sensibles	Contournement de mol ¹	Contournement de <i>mo1</i> ²	Transmission par la graine
Variétés utilisées	Trocadéro	Floribibb	Salinas 88	87-20M
	Salinas	Mantilia	Vanguard 75	Trocadéro
LMV-0	mosaïque	R/T	R/T	2-9 %
LMV-E	mosaïque déformante, nécroses	S	S	0%
LMV-AF199	mosaïque sévère	S	S	5-10%

Tableau 1 : Caractéristiques biologiques des isolats LMV-0, LMV-E et LMV-AF199.

R : Résistance : le virus ne se multiplie pas

T : Tolérance : le virus se multiplie mais aucun symptôme n'apparaît

S : Sensibilité : le virus se multiplie et des symptômes apparaissent.



Figure 10 : Vue de la structure tridimensionnelle prédite de LselF4E (d'après Nicaise et al., 2003).

La prédiction est basée sur l'homologie du Ls-eIF4E⁰ avec le Mm-eIF4E (souris).

L'analogue de la coiffe et un peptide dérivé d'eIF4G (représentés en jaune) sont positionnés en fonction des données de leur co-cristallisation avec le Mm-eIF4E. La structure du Ls-eIF4E⁰ est colorée en vert alors que les mutations conduisant aux Ls-eIF4E¹ et Ls-eIF4E² (nommées respectivement $X^{1}Y$ et $X^{2}Y$) sont colorées en rouge.

Annexe



Figure 11 : Représentation schématique des résultats obtenus lors de l'analyse des déterminants de la pathogénicité du LMV par la construction de virus recombinants (Redondo et al., 2001).

Les sites de restriction et leur site de coupure qui délimitent les régions impliquées dans la sévérité des symptômes et dans le contournement de la résistance *mo1* sont placés au dessus de la séquence du LMV.



	Xbal	AfIII	Styl	Spel	Pstl	Sacl	Tth111I	Eco47III	Xhol	Ndel	Xmnl
LMV-0	112, 5855	812, 4571, 6766	704, 2362, 3033, 4777, 6163 , 8129, 9058	7207	1067, <i>4650</i> , pBS70T ^{aval}	8175, pBS70T ^{aval}	6033	5494	5496, 6566	2677, 4579, 5113, 8774, 8863	185, 2657, 5417, 7299, 8384, 9133
LMV-E	112, 5855	812, 2983, 4571, 6766	704, 2362, 2836, 2860, 4663, 4777, 4783, 6163 , 7409, 8129, 9058	5924, 7207	1067, 4650, 5871, pBS70T ^{aval}	6019, 9092	6033	691, 5494	5496	2677, 5113, 8774, 8863	5604, 6936, 7299, 8384, 9133

sés pour la construction des différents clones recombinants du LMV.

A. Représentation schématique du génome du LMV-0 et du LMV-E et emplacement des sites de restriction utilisés pour les étapes de sous-clonage et de recombinaison.

B. Liste exhaustive des enzymes de restrictions utilisées et de leurs positions sur le génome du LMV-0 et du LMV-E. En gras, positions des sites de recombinaison. En italique, positions des sites de sous-clonage. pBS70T^{aval}, sites de restriction positionnés dans le multi-site de clonage du pBS70T, directement en aval de l'ADNc du LMV.



Figure 13 : Principes de la stratégie de construction en 3 étapes de clonage utilisée pour l'obtention du pLMV-0xbafIE, du pLMV-0xbastyE et du pLMV-EstafI0.

Le schéma présenté ici illustre précisément la stratégie de construction du pLMV-0xbaflE. Pour le pLMV-0xbastyE et le pLMV-Estafl0, les étapes de clonage restent les mêmes mais les sites de restrictions diffèrent. (Kan^R, Amp^R, vecteurs de clonage portant un gène de résistance à la kanamycine ou à l'ampicilline respectivement).



Figure 14 : Principes de la stratégie de construction en 4 étapes de clonage du pLMV-0stafIE.

(Kan^R, Amp^R, vecteurs de clonage portant un gène de résistance à la kanamycine ou à l'ampicilline respectivement).

	0xbaflE	0xbastyE	0staflE	Estafl0
zone codante	CI (C-ter), 6K2, VPg	CI (C-ter), 6K2	VPg	VPg
échangée	(5855 - 6766)	(5855 - 6163)	(6163 - 6766)	(6163 - 6766)
pLMV d'origine	pLMV-0	pLMV-0	pLMV-0	pLMV-E
Sites de sous- clonage utilisés	Pstl (4650) - Sacl (8175)	Pstl (4650) - Sacl (8175)	Ndel (5113) - Xmnl (7299)	Spel (5924) - Spel (7207)
Vecteur de sous- clonage utilisé	pBGS-SK+ (Kan ^R)	pBGS-SK+ (Kan ^R)	pBS+ (Amp ^R)	pBGS-SK+ (Kan ^R)
Site(s) d'insertion dans le vecteur de sous-clonage	Pstl - Sacl	Pstl - Sacl	Smal	Spel
Origine de la région recombinante	pLMV-E	pLMV-Estafl0	pLMV-E	pLMV-0
Sites d'échange utilisés	Xbal - AfIII	Xbal - AfIII	Styl -AfIII	Styl -AflII
Sites de sous- clonage n°2	-	-	EcoRI (pBS+) - Spel	-
Vecteur de sous- clonage n°2	-	-	pBGS-SK+ (Kan ^R)	-
Sites d'excision	Xhol (5496) - Spel ^{part.} (7207)	Xhol (5496) - Xhol (6566)	Eco47III (5494) - Spel (7207)	Spel (5924) - Spel (7207)
pLMV "receveur"	pLMV-0	pLMV-0	pLMV-0	pLMV-E

Tableau 2 : Tableau compilant les détails des plasmides et des sites de restriction utilisés lors de la construction des virus recombinants entre LMV-0 et LMV-E.

(Kan^R, Amp^R, vecteurs de clonage portant un gène de résistance à la kanamycine ou à l'ampicilline respectivement).



Figure 15 : Symptômes des clones recombinants et mutants du LMV sur la variété sensible Trocadéro.

Symptômes observés en systémie à 15 jpi sur plants de Trocadéro infectés par le LMV-0 (A) ou le LMV-E (B) et par les différents virus recombinants : LMV-0xbaflE (D), LMV-0staflE (E), LMV-Estafl0 (F), LMV-0xbastyE (G). Et par les mutants LMV-0-A1927V (H) et LMV-S1946T (I). Témoin non infecté (C). Les (+) ou les (-) représentent respectivement la présence ou l'absence de symptômes provoqués par ces virus.

Annexe

	Trocadéro	Salinas	Mantilia	Floribibb	Salinas88
LMV-0	<7	<7	-	-	-
LMV-E	<7	<7	7	9	15
LMV-0staflE	<7	<7	12-14	-	-
LMV-0xbaflE	<7	<7	12-14	-	20
LMV-0xbastyE	<7	<7	12-14	-	14-15
LMV-Estafl0	<7	<7	12	15	12-14
LMV-0-A1927V	<7	<7	-	-	-
LMV-0-S1946T	<7	<7	18-19	-	14-15

Tableau 3 : Délai d'apparition des premiers symptômes du LMV-0, du LMV-E, des constructions recombinantes et mutantes sur différentes variétés de laitue.

Trocadéro et Salinas (sensibles), Mantilia et Floribibb (mol^1) , Salinas 88 (mol^2) . Les délais sont exprimés en jours après inoculation (jpi). (-) : pas de symptôme détectable à 30 jpi.



Figure 16 : Symptômes des clones recombinants et mutants du LMV sur la variété sensible Salinas.

Symptômes observés en systémie à 20 jpi sur plants de Salinas (variété exprimant Ls-eIF4E⁰) infectés par le LMV-0 (A) ou le LMV-E (B), par les différents virus recombinants : LMV-0xbaflE (C), LMV-0staflE (D), LMV-Estafl0 (E), LMV-0xbastyE (F) et par les mutants LMV-0-A1927V (G) et LMV-0-S1946T (H). Les (+) ou les (-) représentent respectivement la présence ou l'absence de symptômes provoqués par ces virus.



Figure 17 : Symptômes des clones recombinants et mutants du LMV sur la variété résistante Mantilia.

Symptômes observés en systémie à 20 jpi sur plants de Mantilia (variété exprimant Ls-eIF4E¹) infectés par le LMV-0 (A) ou le LMV-E (B), par les différents virus recombinants : LMV-0xbaflE (C), LMV-0staflE (D), LMV-Estafl0 (E), LMV-0xbastyE (F) et par les mutants LMV-0-A1927V (G) et LMV-0-S1946T (H). Les flèches blanches montrent les symptômes du LMV quand ils ne sont pas évidents sur la photographie. Les (+) ou les (-) représentent respectivement la présence ou l'absence de symptômes provoqués par ces virus.



Figure 18 : Symptômes des clones recombinants et mutants du LMV sur la variété résistante Floribibb.

Symptômes observés en systémie à 20 jpi sur plants de Floribibb (variété exprimant Ls-eIF4E¹) infectés par le LMV-0 (A) ou le LMV-E (B), par les différents virus recombinants : LMV-0xbaflE (C), LMV-0staflE (D), LMV-Estafl0 (E), LMV-0xbastyE (F) et par les mutants LMV-0-A1927V (G) et LMV-0-S1946T (H). Les flèches blanches montrent les symptômes du LMV quand ils ne sont pas évidents sur la photographie. Les (+) ou les (-) représentent respectivement la présence ou l'absence de symptômes provoqués par ces virus.



Figure 19 : Symptômes des clones recombinants et mutants du LMV sur la variété résistante Salinas 88.

Symptômes observés en systémie à 20 jpi sur plants de Salinas 88 (variété exprimant Ls-eIF4E²) infectés par le LMV-0 (A) ou le LMV-E (B), par les différents virus recombinants : LMV-0xbaflE (C), LMV-0staflE (D), LMV-Estafl0 (E), LMV-0xbastyE (F) et par les mutants LMV-0-A1927V (G) et LMV-0-S1946T (H). Les flèches blanches montrent les symptômes du LMV quand ils ne sont pas évidents sur la photographie. Les (+) ou les (-) représentent respectivement la présence ou l'absence de symptômes provoqués par ces virus.



Figure 20 : Représentation schématique du génome et dosage de l'accumulation en systémie des clones recombinants.

A. Représentation schématique du génome des virus recombinants construits à partir du LMV-0 et du LMV-E pour déterminer la région qui confère au LMV-E sa capacité à contourner la résistance conférée par mol. Les sites de restriction utilisés ainsi que leur position sur le génome sont indiqués en dessous. La présence ou l'absence de symptômes en systémie sur les variétés Mantilia, Floribibb (mo11) et Salinas 88 (mo12) est symbolisée respectivement par un (+) ou un (-).

B. Accumulation virale à 30 jpi, des virus parentaux LMV-0 et LMV-E et des virus recombinants LMV-OxbastyE, LMV-OxbaflE, LMV-OstaflE et LMV-EstaflO sur les variétés Salinas (Ls-eIF4E⁰), Mantilia et Floribibb (Ls-eIF4E¹) et Salinas 88 (Ls-eIF4E²). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur moyenne mesurée pour LMV-0 sur Salinas. Chaque valeur représente la moyenne obtenue pour 2 mesures par plante et 3 plantes par construction soit 6 mesures au total.

T MSZ O								579	90		5	800	mon	5	810)	C T A	5820		~ n m	583	0		58	40	2007	58	50	<u>с л п</u> и	Xb	aI	~~~	220	587	0		588	;0 77
									CA	ATC	rCA.	AACI	FTCI	CCA	TTA	GTF	GTA	TTGC	-TGA	CAT	GAI	CAG	9. T.C	GAG.	ATA	JTCF	MCA	AAC	CAT	TCT.	AGA	GAG	AAC	CTG				A.
LMV-0									Ţ	Ŧ	5	IN	Ľ	5	±	5	5		э D	141	. 1	. <u>r</u>		R	T		1	IN	п.	2	ĸ	-	IN	-	2	<u>к</u>	-	2
AF190															1	1	1																					
D9 2425																																						
A435																																						
LMV-9																																						
LMV-1 Cordono																																						1
LMUE																		- -																				-
C12																																						
75100																																						
IMV-13																	1.1								1		1.1			1.1		1.1	1.1		1.1			1
Tm/																	1.1								1		1.			1.1		1.1	1.1		1.1			
СТ												1 9 (0								1	910)								1 9	20						
01												1) (-		, 								10.	20						
		5890)		5900)		591	LO		5	920		5	930)		5940)		595	0		59	60		59	70		5	980			599	0		600	0
LMV-0 AG	CAG	TCAGA	GAC	ACA	ATC	ATCI	AAC!	TTCO	SAG	TGC	CAG	GCT	GGAA	CTG	GTG	ACG	GGG	GTTC	CTT	CGA	CAT	GGA	GAC	AGC	ACAG	GAAA	TTG	GCA	GAG	GAG	TAT	GGG	TGC	ATC	GAT	GTC.	ATTI	.'A
LMV-0	<mark>A</mark> '	V R	D	т	I	I	N	F	Е	С	Q	A	G	т	G	D	G	G <mark>S</mark>	F	D	M	I E	т	A	Q	K	L	A	Е	Е	Y	G	С	I	D	v	I	Y
AF198	1	1.11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	S	1	1	·	· ·	1				1	1	1	11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Dg	1	1.11	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	S	1	1	·	· ·	1				1	1	1	1		1	1	1	1		1	1	1	1	1
A435	1	1.11	1	1.1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	S	1	1	·	· ·					1	1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
LMV-9	1	1.11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	S	1	1	·	· ·	1				Т	1	1	11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
LMV-1	1	1.11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	S	1	1	·	· ·	1				1	1	1	11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Cordoue	V	1.11	1	1.1	1	1	1	1.1	1	1	1	1	1	1	S	1	1.1	· 1		1	1			1.1	1	1	11	1	11	1	1	1	1	11	1	1	1.1	1
LMV-E	Т	1.1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	S	1	1	•		1				1	1	1	11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
C12	V	1.11		1.1			1	1	1	1	1	1	1	1	S	1	1	· -		1				1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1.1	1
AF199	V	1.1		1	1		1	1	1	1		1	1	1	S	1	1	· -	•	1				1	1		1	1	1	1	1	1	1	1		1	1	1
LMV-13	V	1.1		1	1		1	1	1	1		1	1	1	S	1	1	· [1				1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
I'n4	V			1			1	1	÷.,	1				÷	S	1	1	· .	- 1			0.5.0					1	1	1	1	1.0.	· ·	1	1	1		1	1
CI		19	50									194	ŧU								T	950)								191	00						
								c 0 7	0		G	040		G	050)		6060)		607	0		60	80		60	90		6	100			611	0		613	20
		6010)		6020)	_	603	50		0	040		0	0.50	, 		0000													± 0 0		_				012	_
LMV-0 TC	ACC	6010 AATCG) SAAA	GAA	6020 GCT0) CTCI	AGT		GA	CTC	GGT	CTC	AAAG	GCA	GAT	GGA	ATC	AGAG	CCT	GAT	ATG	CAA	AGA	TTT	ATTO	GGTI	TTC	TGC	GGC	GTA	GCC	ATT	GGC	GGC	ACA	TGG	ATGZ	١T
LMV-0 TC	ACC.	6010 AATCG Q//S) SAAA K	GAA E	6020 GCT0 A) CTCI L	AGTI S	AAAC K	CGA R	CTC	GGT	CTC2	AAAG K	GCA G	GAT R	GGA W	ATC N	AGAC	CCT L	GAT I	ATG	CAA		TTT	ATT(L	GTI V	TTC F	TGC C	GGC(G	GTA	GCC2 A	ATT I	GGC G	GGC	ACA T	TGG. W	ATGZ M	M
LMV-0 TC LMV- 0 AF198	H	6010 AATCG Q//S	K K	GAA E	6020 GCT0 A) CTCI L	AGT2 S	AAAC K	CGA R	CTC L	GGT(G	CTC2	K	GCA G	GAT R	'GGA W	ATC N		CCT L	GAT I L	ATG	CAA		TTT	ATT(L	GGTI V	TTC F	TGC	GGC(G	GTA V	GCC2	ATT I	GGC G	GGC	ACA T	TGG. W	M	M N
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg	H	6010 AATCG Q//S ·//·	BAAA K	GAA E	6020 GCT0 A) CTCI L	AGT2 S	AAAC K	CGA R	CTC L	G		AAAG K	GCA G	GAT R	GGA W	N	AGA0 2 5	GCCT(GAT I L	ATG	CAA		TTT	ATTO	GGTI V	F	TGC C	GGC(G	GTA V		ATT I	GGC G	GGC	ACA T	TGG. W	ATGZ M	M
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435	H	6010 AATCG Q//S ·//· ·//·	K K	IGAA E	6020 GCTC A	CTC2	AGT:	603 AAAAC K	CGA	CTCO L	G G		K K	GCA	GAT R	W W	N	AGA0		GAT I L	ATG	CAA		TTT	ATTO	GGTI V I	F	TGC C	GGC G	GTA V		ATT I	GGC G	GGC	ACA T	TGG: W	ATGZ M	АТ М
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9	H	6010 AATCG Q//S ·//· ·//· ·//·	5 AAA K	IGAA E	6020 GCT0 A) CTC2 L	AGTI S	603 AAAC K	CGA(R	CTCC L	G	CTC2	K	GCA	GAT R	W W	N			GAT I	'ATG C	CAA		TTT	ATT(L	GGTI V I I	F	TGC C	GGC	GTA	GCCI A	ATT I	GGC G	GGC	ACA T	TGG. W	ATGZ M	Т М
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1	H	6010 AATCG Q//S ·//· ·//· ·//·	5 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3 3	GAA E G	6020 GCT(A) CTC2 L	AGT	603 AAAC K	CGA(R	CTCO L	G		K	GCA	GAT	N W	N			GAT I	'ATG	CAA F		TTT	ATTO	GGTI V I I	F	TGC	GGC	GTA	GCCI A	ATT I	GGC	GGC	ACA T	TGG. W	ATGZ M	М М
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue	H	6010 AATCG Q//S ·//· ·//· ·//· ·//·) K	GAA E G	6020 GCT0 A) CTC2 L	AGTI S	603 AAAAC	CGA(R		G	CTC2	K	GCA	GAT	GGA W	N	AGA0		GAT I	ATG	CAA		TTT	ATTO	U V I I V	F	TGC C	GGC		GCC2	ATT I	GGC	GGC	ACA T	TGG. W	ATG2	АТ М
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E	H	6010 AATCG Q//S ·//· ·//· ·//· ·//·) SAAA	GAA E · · · G G	6020 GCT0) CTC2	AGT	603 AAAAC	CGA(R		G	CTC2	K	GCA	GAT R	'GG2' W	N			GAT I	ATG	CAP				SGTI V	TTTC F	TGC	GGC			ATT I	GGC	GGC	ACA' T	TGG. W	ATG2 M	M M
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E C12 AF199	H	6010 AATCG Q//S ·//· ·//· ·//· ·//· ·//·) K · · · ·	GAA G G G	6020 GCT0 A) CTC2 - - - - - - - - - - - - -	AGT	603 AAAAC K	CGA(R		G G		K	GCA	GAT R	'GG2' W	N N	AGA0		GAT I	ATG	CAP				GGTI V	F	TGC	GGC			ATT I	GGC G	GGC		TGG. W	ATG2 M	M M · · ·
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E C12 AF199 UMV-13	H	6010 AATCG Q//S ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//·	5 AAA K · · ·	GAA G G · ·	6020 GCTC) CTC2 - - - - - - - - - - - - - - - - - - -	AGT	603 AAAO K	CGA(R		G G G	CTC2	K	GCA	GAT R	"GG2" W	N N	AGA0		GAT I	ATG	CAA			ATT(GGTI V · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	TTC F	TGC C	GGC			ATT I	GGC G · · · · ·	GGC		TGG. W	ATG2 M	M
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E C12 AF199 LMV-13 Tp4	H	6010 AATCG Q//S ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//·	5 AAA K · · · ·	GAA E · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	6020 GCTC A · · · ·) CTC2 - - - - - - - - - - - - - - - - - - -	AGTI S · · ·	603 AAAC K	CGA(R		GGT(G	CTC2	×AAC	GCA	GAT R · ·		N N	AGA0 2 5		GAT I	ATG	CAA			ATT(GGTI V · · · · · · · · · · · · · ·	TTC F	TGC C	GGC		GCC2 A · ·	ATT I	GGC	GGCi		TGG. W	ATG2 M	M
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2	CI	6010 AATCG Q//S ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//·	BAAA K	GAA	6020 GCT0 A · · · · · · · ·) CTC2 I · · ·	AGTI S	603 AAAC K	CGA(R		GGT	CTC2 L	×AAG K · · · · · · · ·	GCA	GAT R	*GGA W · ·	N · ·			GAT I	'ATG	CAA : F				SGTI V I I	"TTC F	TGC	GGC		GCC2 A · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	ATT I · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	GGC	GGCi		TGG: W	ATG2 M	M · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2	CI	6010 AATCG Q//S ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//·	50000000000000000000000000000000000000	GAA - - - - - - - - - - - - - - - - - -	6020 GCT0 • • • • • • • • • • • • • • • • • • •		AGTI	603 AAAC K	CGA(R		GGT	L	• • • • • • • • • • • • • • • • • • •	GCA	GAT R.	W	ATC			GAT I	'ATG C	CAA B			ATT(L	GGTI V I I	TTC	TGC	GGC	CTA V	GCC1 A · · · · · · · ·	ATT I · · · · ·	GGC G	GGCi	ACA T	TGG. W	ATG2 M	M
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2	CI	6010 AATCG Q//S ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//·		GAA E	602(GCTC A · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		AGT	6115 6115	CGA(R		G G	CTC2 L	• • • • • • • • • • • • • • • • • • •	GCA G	GAT R ·	WGGA		618(GAT I L	ATG	290 20		62	200 200	GGTI V · · · · · ·	62	TGC C · · ·	GGCU	STA (GCC A		GGC G · · ·	6233	ACA T · · · · · ·	TGG.	624 624	M
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2 LMV-0 GT	CI	6010 AATCO Q//S ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//·		GAA E	602(GCTC A · · · · · · · · · · · · · · · · · ·		AGT	615 GCTC	CGA(R · ·			CTC2 L		GCA G	GCA GAT GCA GCA		ATC N	6180		GAT I	2 ATG CC	290 00 00		62 CCCG	ATT(L · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	GGTI V · · · · · · · · ·	622 622	TGC C	GGCU G	CTA V · · · · ·	GCC1 A · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	ATT I	GGC G · · · · · · · · · · · · · · · · ·	GGCi G G G G G G G G G G G G G G G G G G		TGG. W	6224 6224 GTTT	M · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2 LMV-0 GT LMV-0 GT LMV-0 GT	CI	6010 AATCG Q//S ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//·) 3AAA K	GAA E	6020 GGCTC A · · · · · · · · · · · · ·		AGTJ S · · · · · · · ·	615 615 615 615	CGA(R		6 G · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	CTC2 L	XAAG K · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	GCA G G S S S S S S S S S S S S S S S S S	GAT R · · · · · ·	VGGA W	GGTAA G	6180 6180 6180 6480 6480	GGCCT(GCCT(GCCT(L	GAT I L	2ATG	290 00 00 00		62 CCCG R	DOO TTAY Y	GGTI V · · · · · · · · · · · · · ·	62 CAA Q	TGC C · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	GGCU G	GTAI V · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	GCC1 A · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	ATT I	GGC G	GGC: G 6230 GGC: G	ACA T · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	TGG. W	624 624 GTT1 V	м
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 COrdoue LMV-E C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2 LMV-0 GT LMV-0 GT LMV-0 AF198 Dg	CI	6010 AATCG Q//S ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//·) 3AAA K	GAA E	6020 GGCTC A · · · · · · · · · · · · ·) CTC2 L · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	AGTI S · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	615 GCTC A	CGA(R		6 G · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	CTC2 L · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	AAAG K · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	GCA G :	GGCA GGCA GGCA GG	CGCA W · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	GGTA G	6180 6180 6180	GGCCT(GCCT(GCCT(L	GAT I L	ATG	290 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 0		62 CCCG R	D00 TTA: Y	GGTI V · · · · · · · · · · · · ·	TTC F	TGC C · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	GGC G	GTAI V · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	GCC1 A	ATT I	GGC G - - - - - - - - - - - - -	GGC1 G 6230 GGC2 G G G G G	ACA T	TGG. W	624 624 GTT1 V	Т. М.
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2 LMV-0 GT LMV-0 AF198 Dg Tn2	CI TTTC.	6010 AATCO Q//S ·//·) GAAA K · · · · · · · · · · · · · ·	GAA G G 197 CAAG K	6020 GCTC A · · · · · · · · · · · · · · · · · ·) CTC2 L · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	AGTI S · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	615 615 615 615	CGA(R		6 G · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	CTC2 L · · · · · · · · · · · · ·	AAAG K · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	GCA G · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	GCA GCA GCA GCA	GGA W · · · · · ·	GGTA G	6180 6180 6180 6180	GGCA: GGCA: GGCA: C 0 GGCA: C 0 C 0 C 0 C 0 C 0 C 0 C 0 C 0	GAT I L	ATG	290 00 00 00		62 CCCG	DOO TTAC Y	GGTT V I I I I I I CGZ R R · ·	622 622 622	TGC C	GGC(G	6. GGTAI	GCC1 A	ATT I	GGC G - - - - - - - - - - - - -	6233 GGC: 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6 6	ACA T · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	TGG. W	624 M 624 GTT1 V	M
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2 LMV-0 GT LMV-0 GT LMV-0 AF198 Dg Tn2 A435	CI TTTC.	6010 AATCO Q//S ·//· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/·· ·/··· ·/··· ·/··· ·/··· ·/··· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ···· ····· ···· ···· ····· ····· ······) SAAA K · · · · · · · · · · · · · · ·	GAA G G 197 CAAG K	6020 GCTC A · · · · · · · · · · · · · · · · · ·) CTC2 L · · · · · · · · · · · · · · · · ·	AGT/ S · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	615 615 615 615 615	CGA(R		6 G · · · · · · · ·	CTC2 L	AAAG K	GCA G · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	GAT R · · · · · · · · · ·		GGTA	6180 AGAG 2 \$ 	GGCA: GGCA: GGCA: C C C C C C C C C C C C C	GAT I L	ATG	290 00 00 00 00 00		62 CCCG ^R	000 1774 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	GGTT V I I I I I CGZZ R C S C S C S C S C S C S C S S C S	62 CAA CAA	TGC C	GGCC G · · · · · · · · · · · · · · · · ·	6. GAC.	GCC1 A 22000 2200 N	ATT I · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	GGCC G	6231 G G G G G G G G G G G G G G G G G G G	ACA T	TGG. W	624 M 624 GTT1 V	M
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2 LMV-0 GT LMV-0 GT LMV-0 GT LMV-0 GT LMV-0 GT LMV-0 LMV-0 LMV-0	CI	6010 AATCC Q//S ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//·	50000 K	GAA E G G G 197 K	6020 GCTC A · · · · · · · · · · · · · · · · · ·) CTC2 L · · · · · · · · · · · · · · · · ·	AGTI S · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	615 GCTC A	CGA(R · · · ·		6 G G · · · · · · ·	CTC2 L	222200 22220 22220 22200 2200 22000 2000 2000 2000 2000 2000 2000 2000 2000 200	GCA G :	GAT R · · · · · · · · · · · · · · · ·	GGA W	GGTA G	6180 AGACO 6180 AACCO K F	GGCCT(5 L 	GAT I L · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	ATG	290 00 00 00 00		62 CCCG R	000 1774 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1	SGTT V · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	622 CAAA Q	TGC C	GGCC G · · · · · · · · · · · · · · · · ·	GTAI V	GCC1 A 22000 2200 N	ATT I · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	GGC G G	623) GGC	ACA T · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	TGG. W	624 GTT1 V	M
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-1 C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2 LMV-0 GT LMV-0 GT LMV-0 AF198 Dg Tn2 A435 LMV-9	CI	6010 AATCC Q//S ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//·	50000000000000000000000000000000000000	GAAA E	6020 GCTC A · · · · · · · · · · · · · · · · · ·) CTC2 L · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	AGTI S · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	615 615 615 615	CGA(R · · · · · ·	CTC(L		CTC2 L	Example 2 and 2 an	GCA G :	Gat R	, GG2 W	GGTA GGTA	6180 AGAG	GGCCT(5 L 	GAT I L · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	ATG	290 00 00 00 00		622 CCCG R	000 TTA: Y	GGTT V · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	622 CAAA Q	TGC C	AGG(6. GAC:	GCC/ A 22000 2220 N	ATT I	GGC G G	623) GGC, GGC, GGC,	ACA T · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	TGG. W	624 624 GTT1 V	ТМ · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-2 C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2 LMV-0 GT LMV-0 AF198 Dg Tn2 A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue CORDOUE C	CI TTTC.	6010 AATCC Q//S ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//·) SAAA K · · · · · · · · · · · · · ·	GAAA E	6020 GCTC A · · · · · · · · · · · · · · · · · ·) CTC2 L · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	AGTI S · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	615 GCTC A	50 CGA(R	CTC(L		CTC2 L	**************************************	GGA G :	Gat R	MAAC K	GGTA G G G	6180 AGAG	GGCCT(3 L 	GAT I L · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	619 2ACA	2990 300 300 300 300 300 300 300 300 300		62 CCCG R	200 200 7777 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2	GGTT V · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	62 62 62	TGC C	AGG R	6 6 6 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	GCC1 A 22000 2200 N	ATT I	GGC G G	623) GGC	ACA T	GAA	624 GTT1 V	ти м
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2 LMV-0 GT LMV-0 AF198 Dg Tn2 A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue	CI	6010 AATCC Q//S ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//·) SAAA K · · · · · · · · · · · · · · ·	GAA G G 197 CAAG K	6020 GCTC - - - - - - - - - - - - - - - - - -) TC2 L · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	AGTI S · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	6115 GGTTG	50 CGA(R	CTC(L		CTC2 L	×AAG K · · · · · · · · · · · · ·	GGCA G :	GCAT R	MAAC K	ATC	6180 AGACO 6180 AACCO K F	GGCCA GGCA GGCA GGCA GGCA GGCA GGCA GGCA GGCA GGCA GGCA GGCA GGCA	GAT I L	619 2ACA	290 300 300 300 300 300 300 300 300 300 3		62 CCCG R		GGTT V · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	62 CCAA	TGC C	GGC(G	6 GGAC.	GCC1 A 22000 2200 N	ATT I	GGC G G	623) GGC2 GGC2 GGC2 GGC2 GGC2	ACA T	GAA 6 6 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7 7	624 624 GTT1 V	ТМ · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-2 C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2 LMV-0 GT LMV-0 GT Dg Tn2 A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-0 C12	CI	6010 AATCC Q//S ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//·) 5000000	(GAA) E	6020 GCTC A · · · · · · · · · · · · · · · · · ·) CTC2 L · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	AGTI S · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	615 GCTC	50 CGA(R · · · ·	CTC(L	GIGT(G · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	CTC2 L	E CACCO C C CACO C C CACO C C C C C C C C C C C C C C C C C C C	GGA G .	GCAT R	AAAG K	ATC	6180 AGACO 6180 AACCO K F	GGCCT 3 L 	GAAT I I I I I I I I I I I I I I I I I I	619 2ACA	290 00 00 00		62 CCGG R	D00 TTA:	SGTT V · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	62 CAAA Q	TGC C	GGC(G	6. GTA4	GCC1 A	ATT I	GGCC G · · · · · · · · · · · · · · · · ·	6233 GGCC GGCC GGCC GGCC	ACA T	TGG. W	624 624 GTT1 V	10 /A Y · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2 LMV-0 GT LMV-0 GT LMV-0 GT Dg Tn2 A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-2 Cordoue LMV-1 Cordoue	CI	6010 AATCC Q//S ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//·) 3AAA K	CGAA E G G G C C C C C C C C C C C C C C C C	6020 GCTC) TC2 L	AGTI S · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	615 GCTC A	50 CGA(R · · · ·	CTC(L · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	6 GTT(G · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	CTC2 L	E CACCO CACO CACO CACO CACO CACCO CACCO CACCO CACCO CACO CACO CACCO CA	GGA G .	GCA GGCA GGCA GGCA GGCA S	AAAG K	ATC N G G G	6180 6180	GGCCT GGCA GGCA C C C C C C C C C C C C C	GAAT I I I I I I I I I I I I I I I I I I	619 ACA	290 00 00 00 00		62 CCG R		36711 V	622 CAAA	TGC C · · · · · · · · · · · · ·	AGGC	GTA4 V	GCC1 A	ATT I	GGC G G G GTA V C M M M	623) GGC: GGC: GGC: GGC: GGC: GGC: GGC: GGC	ACA T	TGG. W	624 GTT1 V	™ · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-E C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2 LMV-0 GT LMV-0 GT LMV-0 GT LMV-0 GT LMV-1 Cordoue LMV-1 Cordoue LMV-1 Cordoue LMV-1 Cordoue LMV-1 LM	CI	6010 AATCC Q//S ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//·) SAAA K	CGAA E G G G	6020 GCTC - - - - - - - - - - - - - - - - - -) TC2 L	AGTI S · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	615 GCTC A	50 CGA(R	CTC(L	6 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00	CTC2 L	Example 2 and 2 an	GGCA G .	GCA GGCA GGCA GGCA GG	GGA W AAAG K	GGTA G	6180 6180	GGCCT GGCCT GGCCA GGC	GAT I L	ATG C 19 619 ACA	2990 00 00 00 00 00 00		62 CCCG R		GGTT V · · · · · · · · · · · · ·	62 62 62 62 62 62 62 62 62 62	TGC C · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	AGGG	6. GAAC 0	CCCi CCCi A	ATT I	GGC G G G GTA V C M M C M	623) GGC: GGC: GGC: GGC: GGC: GGC: GGC: GGC		TGG. W	624 GTT1 V	
LMV-0 TC LMV-0 AF198 Dg A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-2 C12 AF199 LMV-13 Tn4 6K2 LMV-0 GT LMV-0 AF198 Dg Tn2 A435 LMV-9 LMV-1 Cordoue LMV-2 LMV-1 Tn2 Cordoue LMV-1 Tn2 A435 LMV-9 LMV-1 Tn2 A435 LMV-1 TN2 LMV-1 TN2 LMV-1 TN2 LMV-1 TN2 LMV-1 TN2 LMV-1 TN2 LMV-1 TN2 LMV-1 TN2 LMV-1 TN2 LMV-1 TN2 LMV-1 TN2 LMV-1 TN2 LMV-1 TN2 LMV-1 TN2 LMV-1 TN2 LMV-1 TN2 LMV-1 TN2 LMV-1	CI TTTC.	6010 AATCC Q//S ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//· ·//·) 3AAA K	CGAA E G G C 1977 CAAGG K	6020 GGCTC A · · · · · · · · · · · · · · · · · ·) TC2 I	AGTI S · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	615 GCTQ A	50 CGA(R	CTC(L · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	600 GGT 6	CTC2 L	E CACCO CACCO CACCO H · · ·	GCA G G C C C C C C C C C C C C C C C C	GGAT R.	IGGA W	GGTA G	6180 6180 AACC K F	GGCCAI GGCAI C 2 GGCAI C 2 C 2 C 2 C 2 C 2 C 2 C 2 C 2	GAT I L	ATG C 19 619 ACA	2990 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00 00		62 CCGG R		36711 V	62 CCAA Q	TGC C · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	AGGG	6 GAAC.	GCC1 A	ATT I	GGC G - - - - - - - - - - - - -	6233 GGC		TGG. W	624 624 6717 7	1 M · · · · · · · · · · · · · · · · · ·

Figure 21 : Alignement des séquences protéiques de divers isolats LMV correspondant à la région CI-6K2.

La première ligne est la séquence nucléotidique du LMV-0, les autres lignes sont les séquences protéiques prédites correspondantes, seul les acides aminés qui diffèrent avec la séquence du LMV-0 sont indiqués.

Les isolats écrits en vert ne se multiplient pas sur les variétés mol^1 ou mol^2 , les isolats en bleu ne se multiplient que sur les variétés mol^1 , les isolats en rouge se multiplient à la fois sur les variétés mol^1 et mol^2 .

La ligne du haut indique la position des nucléotides sur le génome du LMV alors que la ligne du bas celle des acides aminés sur la polyprotéine du LMV ainsi que la protéine à laquelle ces acides aminés appartiennent.

Les deux positions candidates pour la mutagénèse dirigée sont surlignées en jaune.



Figure 22 : Dendrogramme montrant les distances génétiques entre les isolats LMV connus.

Ce dendrogramme est basé sur le séquençage de la jonction entre la séquence codante de la NIb et de la CP. La barre représente une distance de 0,1 substitution par site. Les flèches noires pointent sur les isolats utilisés. La branche phylogénétique colorée en rouge correspond au groupe LMV-Most.



Figure 23 : Dosage de l'accumulation de la capside des mutants en systémie.

Accumulation virale à 30 jpi, du virus LMV-0 et des mutants LMV-0-A1927V et LMV-0-S1946T sur les variétés Salinas (*Ls-eIF4E0*), Mantilia et Floribibb (*Ls-eIF4E1*) et Salinas 88 (*Ls-eIF4E2*). Les résultats sont exprimés en pourcentage de la valeur moyenne mesurée pour LMV-0 sur Salinas.



Figure 24 : Représentation simplifiée de l'alignement des séquences protéiques de divers isolats LMV correspondant à la région VPg.

Seul les séquences de 4 portions de la VPg (hachurées sur le génome du LMV) sont représentées ici. Le détail de cet alignement est disponible dans l'Annexe I.

La première ligne est la séquence nucléotidique du LMV-0, les autres lignes sont les séquences protéiques prédites correspondantes, seul les acides aminés qui diffèrent avec la séquence du LMV-0 sont indiqués.

Les isolats écrits en noir ne se multiplient pas sur les variétés mol^1 ou mol^2 , les isolats en rouge ne se multiplient que sur les variétés mol^1 , les isolats en bleu se multiplient à la fois sur les variétés mol^1 et mol^2 .

Les rectangles gris positionnent les 6 différences en acides aminés entre le LMV-0 et le LMV-E. Les deux positions candidates pour la mutagenèse dirigée, les positions 2111 et 2121, sont encadrées en rouge.

Annexe



Séquençage et analyse des mutants présentant un gain d'infectivité

Figure 25 : Stratégie de mutagénèse aléatoire par PCR chez le LMV.

Les deux flèches noires horizontales représentent les amorces utilisées pour la PCR mutagène. Les pointillés rouges représentent les sites de mutation générés par l'infidélité de la Taq DNA polymérase.

Annexe



Figure 26 : Stratégie de construction par PCR-Fusion d'un clone délété au niveau de la VPg.

Les flèches noires représentent les amorces utilisées pour les trois étapes de la PCR-Fusion. La portion quadrillée représente une séquence non virale contenant le site de « digestion-suicide ».



Figure 27 : Représentation schématique d'une partie des deux clones délétés obtenus.

Les délétions conduisant au LMV-0 Δ VPg et au LMV-0 Δ 6K2 font ~400 pb toutes les deux. NotI et ApaI sont respectivement les sites de digestion-suicide utilisables pour le LMV-0 Δ VPg et le LMV-0 Δ 6K2.



Figure 28 : Diversité naturelle du LMV et contournement de la résistance mol.

terminal de la CI.

Cette figure représente les séquences de la région codant pour le domaine C-terminal de la CI, la 6K2 et la VPg des divers isolats du LMV et ce en fonction de leur capacité à contourner les résistances conférées par les allèles mol^1 et mol^2 . Les zones grises représentent les séquences du LMV qui ne sont pas significativement différentes de celles des isolats incapables de contourner la résistance mol. Les étoiles représentent les différences de séquence avec celles des isolats non-contournants les plus significatives. Les carrés colorés correspondent à la portion de séquence du LMV-E dans le virus recombinant LMV-0staflE (bleu) et dans le virus LMV-0xbastyE (rouge). Les isolats naturels du LMV contournant seulement la résistance mol^1 portent des mutations plutôt positionnées dans la VPg ce qui correspond à ce qui a été obtenu expérimentalement avec le virus LMV-0staflE qui ne contourne lui aussi que la résistance mol^1 . Les isolats naturels du LMV contournant les deux types de résistance mol portent des mutations réparties dans la CI, la 6K2 et la

VPg alors que le virus recombinant ayant les mêmes propriétés n'en portent que dans le domaine C-



Figure 29 : Proposition de modèle d'interaction entre les 3 formes de Ls-elF4E et les déterminants viraux identifiés.

Ls-eIF4 E^0 , Ls-eIF4 E^1 et Ls-eIF4 E^2 sont respectivement représentés par les rectangles vert clair, jaunes et roses.

La nature des acides aminés 70, 108-110 et 186 est indiquée en bas de chaque rectangle.

Les facteurs viraux identifiés correspondant au domaine CI-6K2 et la VPg sont représentés par des rectangles de même nom. Leur couleur verte ou bleu foncé qu'ils sont codés respectivement par le LMV-0 ou le LMV-E.

La nature des acides aminés viraux impliqués est indiquée en haut de chaque rectangle ou par un point d'interrogation quand elle n'est pas connue.

Les pointillés noirs entre le domaine CI-6K2 et la VPg symbolisent l'interaction physique nécessaire entre ces facteurs.

Les pointillés bleu foncé symbolisent l'interaction entre l'acide aminé 1946 et Ls-eIF4E².

La compatibilité entre deux facteurs est interprétée dans ce modèle par un gain d'interaction et signalée par le symbole « OK ». Le gain (ou la perte) de taille d'un facteur représente respectivement l'augmentation (ou la diminution) de sa capacité à interagir avec l'autre facteur correspondant. Dans ce modèle une seule interaction (symbole « OK ») entre Ls-eIF4E et le complexe viral suffit pour restaurer la compatibilité entre le LMV et la laitue.

Nom	Drevenence	Compo	rtement	Transmissibilité	Turne	Course	A i		
NOM	Provenance	mo1 ¹	mo1²	par la graine	туре	Source	ACC6221011		
0	France	-	-	+	Commun	Revers et al., 1997	X97704		
1	France	+	-	-	?	Revers et al., 1997	Z78225		
13	France	+	+	+	MOST	Revers et al., 1997	Z78223		
9	France	+	-	-	?	Revers et al., 1997	Z78226		
A435	Australie	-	-	-	?	Krause-Sakate et al., 2002	AF368954		
AF198	Brésil	-	-	+	Commun	Krause-Sakate et al., 2002	AJ278855		
AF199	Brésil	+	+	+	MOST	Krause-Sakate et al., 2002	AJ278854		
Dg	Danemark	-	-	3	Commun	Krause-Sakate et al., 2002	AF368956		
E	Espagne	+	+	-	?	Revers et al., 1997	X97705		
Tn2	Tunisie	-	-	?	Recombinant MOST/Commun	Krause-Sakate et al., 2002, 2004	AF368963		
Tn4	Tunisie	+	+	?	MOST	Krause-Sakate et al., 2002	AF368965		
Cl2	Chili	+	+	?	Pré-MOST	IPV, non publié	-		
Cordoue	Espagne	+	-	?	?	IPV, non publié	-		
TnHam1	Tunisie	+	+	?	?	IPV, non publié	-		

Tableau 4 : Propriétés biologiques et provenance des isolats de LMV utilisés. Comportement sur laitues.

Capable de contourner le gène de résistance ("+"), incapable de contourner ("-"). Transmissibilité par la graine : non transmissible ("-"), transmissible ("+"), faiblement transmissible (" ϵ ").


Figure 30 : Représentation schématique des plasmides pBS+, pBGS-SK+, pJKKmf(-), pZero™-2, pGEM-T Easy et du pBS70T.

Gènes de résistance aux antibiotiques : Amp^{R} : ampicilline, Kan^{R} : kanamycine f1 ori : origine de réplication du bactériophage f1 ColE1 : origine de réplication ColE1 $lacZ\alpha$: région codant pour le fragment α de la β -galactosidase. Promoteurs de transcription des RNA polymérases : T3 : du bactériophage T3 T7 : du bactériophage T7, SP6 : du bactériophage SP6 **Plac :** promoteur inductible permettant l'expression de la fusion lacZa-ccdB *ccdB* : gène létal *ccdB*

70S : promoteur de transcription 35S du CaMV dont la partie enhancer a été dupliquée.

NOS : terminateur de la transcription de la nopaline synthase.



Figure 31 : Représentation schématique du principe de la PCR-Fusion.

Les rectangles gris représentent la séquence à muter et les rectangles quadrillés les séquences extravirales introduites après la première PCR.

Les amorces sont représentées par des flèches noires dont les extrémités hachurées signalent une séquence extra-virale portant des sites de restriction qui permettent de faciliter le clonage. Le losange schématise la mutation introduite.

Tampon de coating

Na ₂ CO ₃	15 mM
NaHCO ₃	30 mM

Tampon PBS-Tween

NaCl	136.9 mM
KH ₂ PO ₄	1.47 mM
KCl	2.68 mM
Na ₂ HPO ₄	8.1 mM
Tween 20	0.05 % v/v

Tampon substrat (pH 9.8)

Diéthanolamine PH ajusté avec HCl 9.7~%~v/v

Tableau 5 : Composition des tampons utilisés pour la réalisation d'un test ELISA.

RT-PCR

(à partir d'ARN viral ou de virus piégé par immunocapture)

Triton X-100	0.3 %
Tris-HCl pH8.8	10 mM
KCl	50 mM
$MgCl_2$	1.5 mM
Chaque dNTP	250 μM
Chaque amorce	$1 \mu M$
RTase Reverse-iT TM	0.5 unité
Taq Q-BIOgen	1 unité
Volume total	50 µl

Transcription inverse

-15 min à 42 °C puis 2 min à 95 °C

Amplification

-dénaturation de l'ADN à 92-95 °C -hybridation des amorces sur leur séquence cible -élongation à 72 °C

Les trois étapes sont répétées 35 à 40 fois

Tableau 6 : Milieu réactionnel des RT/PCR réalisées avec Taq ADN polymérase de Q-BlOgene ou la DyNAzymeTMEXT DNA Polymérase (Finnzymes) à partir d'ARN ou de virus piégé par immunocapture.