

**Recherche d'interactions entre la capsidite du Raspberry
Bushy Dwarf Virus (RBDV) et les protéines eIF4G
d'Arabidopsis**
Aramata Marena

► **To cite this version:**

Aramata Marena. Recherche d'interactions entre la capsidite du Raspberry Bushy Dwarf Virus (RBDV) et les protéines eIF4G d'Arabidopsis. Faculté des Sciences de Luminy. Université de la Méditerranée (Aix Marseille 2), Marseille, FRA. 2011, 25 p. hal-02805234

HAL Id: hal-02805234

<https://hal.inrae.fr/hal-02805234>

Submitted on 6 Jun 2020

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

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

Université de la Méditerranée
Aix-Marseille II
Faculté des Sciences de Luminy



Master 1
Mention Microbiologie, Biologie Végétale et Biotechnologies
Année universitaire 2010-2011

**Recherche d'interactions entre
la capsid du Raspberry Bushy Dwarf Virus (RBDV)
et les protéines eIF4G d'*Arabidopsis***

Aramata Maréna

INRA, Centre de Recherches d'Avignon
Unité de Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes,
Domaine St Maurice
Responsable de stage : **Jean-Luc Gallois**
Stage du 24 janvier au 8 Mars 2011



Remerciements

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mon maître de stage Jean-Luc Gallois, grâce à qui j'ai pu réaliser ce travail et sur un sujet de recherche passionnant. Je te remercie aussi pour ta grande disponibilité, surtout pour ton accueil rassurant au sein de l'équipe et pour tout ce que j'ai appris tout au long de ces 6 semaines.

Ses connaissances, ses perpétuels encouragements et sa confiance m'ont été d'une grande aide et c'était un grand plaisir de travailler avec lui.

Mes sincères remerciements s'adressent également à Carole Caranta.

.

Je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance à André, pour l'expérience enrichissante et pleine qu'il m'a fourni, sans oublier Charlotte de l'unité Pathologie pour sa disponibilité.

Enfin, je remercie l'ensemble de l'équipe 'résistance aux virus' avec qui j'ai été amenée à travailler, pour avoir fait preuve de disponibilité et d'attention à mon égard tout au long de mon stage.

Je remercie aussi mon père, tonton Léon et sa famille pour le soutien moral.

SOMMAIRE

1-Introduction

1-1 recherche d'interactions entre la capsid du RBDV et les protéines eIF4G	1
1-2 le système ubiquitin/proteasome et la résistance aux potyvirus	1
1-3 Objectif du stage	2

2- Matériel et méthodes

2-1 Plasmides utilisés pour le double hybride	3
2-1-1 Purification et digestion des plasmides recombinants	3
2-1-2 Polymerase Chain Reaction (PCR)	3
2-2 Double Hybride dans la levure	3
2-2-1 Transformation de plasmides dans des levures compétentes	3
2-2-2 Conjugaison de levures et étude d'interactions	4
2-2-3 Western Blot	4
2-3 Etude de la résistance d'Arabidopsis thaliana aux Potyvirus	4
2-3-1 Matériel viral et protocole d'inoculation	4
2-3-2 Détection des particules virales dans les plantes par DAS-ELISA	5

3-Résultats et Discussions

3-1-Test d'interaction entre la capsid du RBDV et les protéines eIF4G	6
3-1-1- Amplification et Vérification des plasmides	6
3-1-1-1Vérification des plasmides par digestion	6
3-1-1-2Vérification de plasmides par PCR	6
3-1-2- Test d'interaction entre la capsid et les protéines eIF4G	7
3-1-2-1 Résultats des tests d'interaction	7
3-1-3- Vérification des levures	8
3-3-1 Par Western blot	8
3-3-2 Par Polymerase Chain Reaction (PCR)	8
3-2- Rôle du système ubiquitin/proteasome (UPS) dans la résistance aux virus	9

4-Conclusion et perspectives

5- Références bibliographiques

6-Annexe

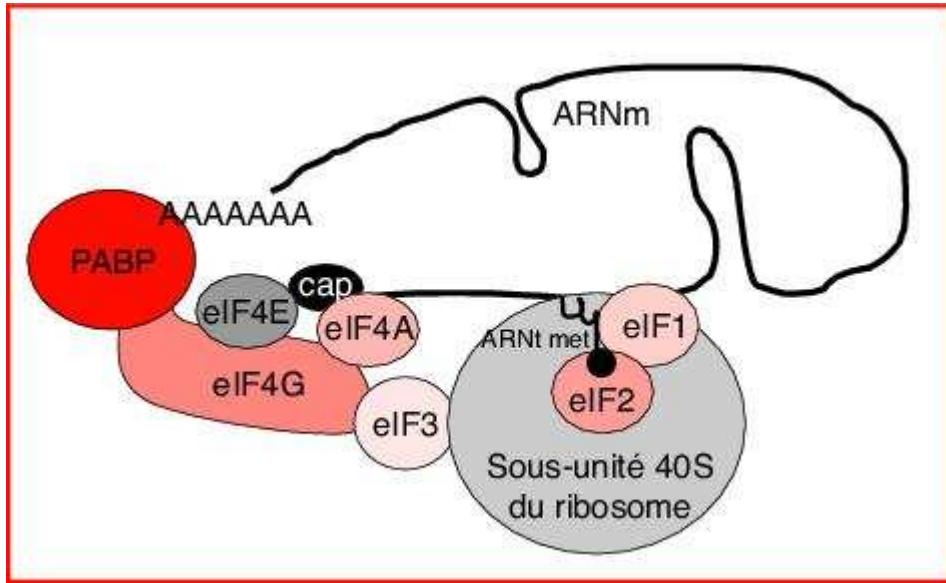
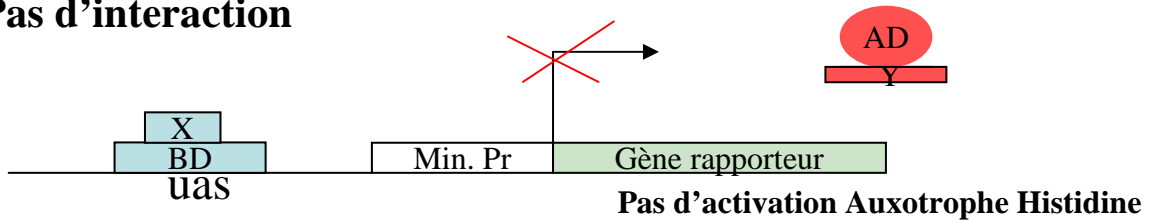


Figure1: les facteurs d'initiation à la traduction: Les ARNs sont recrutés par le complexe eIF4F: on en distingue deux types chez les végétaux: eIF4F, composé de eIF4E (eIF4E1, eIF4E2 ou, eIF4E3) qui lie la coiffe des ARNm, et eIF4G qui joue le rôle de protéine d'échafaudage pour les autres composants du complexe d'initiation de la traduction. Le deuxième complexe est eIFiso4F composé d'eIFiso4E (capable de lier la coiffe des ARNm) et eIFiso4G (eIFiso4G1 ou eIFiso4G2).

• **Pas d'interaction**



• **Interaction**

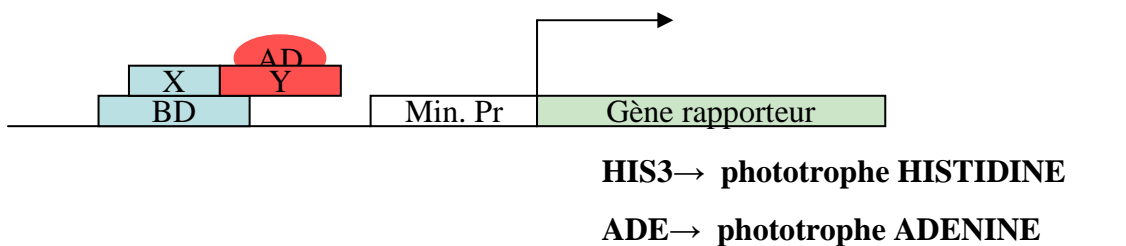


Figure 2 le système double hybride dans la levure: La protéine d'intérêt X est fusionnée au domaine de liaison (BD) du facteur transcription GAL4 qui se fixe à une séquence promotrice (UAS), tandis que la protéine Y est liée à la région d'activation (AD) de ce même activateur. Dans une levure, si les protéines X et Y n'interagissent pas, l'activateur sera inactif et l'ARNm des gènes rapporteur ne seront pas transcrit. A l'inverse si les protéines interagissent, l'activateur sera reconstitué et l'ARNm du gène rapporteur sera transcrit. Dans ce cas, les gènes apportent à la levure la phototrophie à l'histidine et l'adénine

1-Introduction

Les recherches de l'équipe "résistance aux virus" visent à comprendre le fonctionnement des gènes de résistance des plantes et les interactions entre les plantes et leurs bioagresseurs. Ces connaissances sont indispensables pour élaborer de nouvelles stratégies de lutte contre les bioagresseurs. L'utilisation de gènes de résistance identifiés dans la diversité naturelle des plantes est une des meilleures solutions de contrôler des virus des plantes dans l'environnement. Dans ce cadre, mon stage est subdivisé en deux parties :

1-1 recherche d'interactions entre la capsid du RBDV et les protéines eIF4G

L'équipe a été contactée par Stuart MacFarlane, enseignant-chercheur au SCRI (Scottish Crop Research Institute). Il travaille sur un virus qui affecte la framboise, une culture importante en termes d'économie et de santé nutritionnelle. Le virus RBDV (Raspberry Bushy Dwarf Virus) est un virus qui cause des dégâts importants aux cultures de la framboise. Une fois établie dans la culture, la propagation du virus entre les plantes est très rapide et peut menacer toute la plantation entière. Le RBDV est transmis dans les cultures par infection des grains de pollen et le processus est accéléré par des vecteurs pollinisateurs (MacFarlane et McGaven, 2009). Les virus à ARN ont des stratégies sophistiquées qui leur permettent de contourner les mécanismes de l'hôte à leur profit pour la traduction de l'ARNm (Robaglia et Caranta, 2006).

Le RBDV est un virus du genre *Idaeivirus*, mais n'a pas été attribué à une famille, même s'il a quelques similitudes avec *ilarvirus* de la famille *Bromoviridae* (MacFarlane et McGaven, 2009). Son génome viral est constitué d'ARNs simple brin positif, l'ARN1 d'environ 5,4 kb code pour une polymérase et l'ARN2 d'environ 2,2 kb code pour une protéine de mouvement (MP) et la protéine d'enveloppe (CP). Les particules virales contiennent deux ARN génomique ainsi qu'un troisième ARN sous-génomique (ARN3) de 946 nt qui n'est pas répliqué, mais permet l'expression de la CP. Le virus, pour se répliquer et se propager dans la plante, a besoin de la protéine de capsid. Chez un Bromovirus, l'Alfalfa Mosaic Virus, il a été montré que la CP stimule l'efficacité traductionnel et interagit avec eIF4F (Krab et al, 2005) qui est un complexe intervenant lors de l'initiation de la traduction. Ce complexe eIF4F est composé d'eIF4E, qui se lie à la coiffe de l'ARNm, eIF4G et d'eIF4A, qui est une hélicase (Figure 1).

D'où notre intérêt d'étudier les relations entre la protéine de capsid et les autres facteurs d'initiation de la traduction notamment eIF4G et ces isoformes eIF(iso)4G1 et eIF(iso)4G2.

1-2 le système ubiquitin/proteasome et la résistance aux potyvirus

En parallèle, je me suis intéressée à un autre thème au cours de mon stage. Les Potyvirus constituent un des plus grands groupes de virus phytopathogènes causant des pertes

agronomiques les plus importantes. L'analyse génétique des résistances à ces virus chez des plantes (cultivées ou modèles) a permis de mettre en évidence le rôle central des composants du complexe d'initiation de la traduction eucaryote et en particulier de la protéine eIF4E (eukaryotic Initiation Factor 4E, protéine liant la coiffe des ARNm) dans la résistance aux Potyvirus (Robaglia et Caranta, 2006).

Chez les plantes, le système ubiquitin/26S proteasome joue un rôle central dans la dégradation des protéines et est impliqué dans de nombreuses étapes des mécanismes de défenses, quel que soit le type de pathogènes ciblés. Au cours des dernières années, l'importance de cette voie dans les interactions plante-pathogène a été de plus en plus mise en évidence (Dielen et al, 2010). Il a été montré que le mutant *eif(iso)4E* est résistant au TuMV (Turnip Mosaic Virus) (Duprat et al, 2002) et que la protéine eIFiso4E est régulée par le proteasome (Castello et al, 2010). La protéine RPT5 est une ATPase et un sous unité du proteasome, qui est nécessaire à la dégradation ciblée des protéines. Elle est codée par deux gènes : *RPT5a* et *RPT5b*. Nous supposons que si ces événements de dégradation sont des étapes obligatoires dans le cycle viral pour assurer la propagation du virus, la mutation d'un de ces facteurs pourrait jouer un rôle sur la résistance / sensibilité aux potyvirus (la combinaison des deux est létale) (Gallois et al, 2009).

1-3 Objectif du stage

Plusieurs approches génétiques ont confirmé l'importance des gènes du complexe d'initiation de la traduction dans le cycle infectieux viral et dans la résistance aux virus à ARN.

Notre objectif est de voir s'il y a des interactions entre la protéine de capsid RBDV et eIF4G. Si c'est le cas, eIF4G pourrait être utilisé comme source de résistance aux virus. La méconnaissance du génome de la framboise nous amène à utiliser les gènes eIF4G d'*Arabidopsis thaliana* qui a déjà son génome séquencé. L'approche consiste à identifier des protéines de l'hôte capable d'interagir avec la protéine de capsid grâce à des systèmes d'interaction protéine-protéine en utilisant le système double hybride qui est une technique de biologie moléculaire permettant de détecter une interaction physique entre deux protéines (Figure 2).

L'objectif du deuxième axe de recherche est d'étudier les mutants simples (*rpt5a-4* ou *rpt5b-2*). Pour ce faire les plantes Columbia (sauvage) et les plantes *rpt5a-4* ou *rpt5b-2* sont inoculés avec les virus TuMV et WMV (Watermelon Mosaic Virus) et vérifier leurs comportements (résistance/sensibilités) face à ces virus.

Les deux parties de cette étude étant indépendantes, les discussions seront traitées séparément.

Tableau 1: liste des vecteurs utilisés dans cette étude

	AD	Bact/levure/tag		BD	bact/levure/tag
P1012	pACT2/WT RBDV CP	Ampi, Leu, HA	P1022	pGBT9/Arabidopsis eiFiso4G1	Ampi, TRP, -
P1013	pACT2/RBDV N-deletion-CP	Ampi, Leu, HA	p1024	pGBT9/Arabidopsis eiFiso4G2	Ampi, TRP, -
P1023	pGAD424/Arabidopsis eiFiso4G1	Ampi, Leu, -	p1121	pGBKT7/WT RBDV CP	Kana/ TRP/ cmcy
P1025	pGAD424/Arabidopsis eiFiso4G2	Ampi, Leu, -	p1122	pGBKT7/RBDV N-deletion-CP	Kana/ TRP/ cmcy
SI28	pGADT7:Arabidopsis eIF4G cDNA	Ampi, Leu, HA	SL33	pGBKT7:Arabidopsis eIF4G cDNA	Kana/ TRP/ cmcy
SL36	pGADT7:Arabidopsis eiFiso4G1 cDNA colony 5	Ampi, Leu, HA	SL34	pGBKT7:Arabidopsis eiFiso4G1 cDNA	Kana/ TRP/ cmcy
SL29	pGADT7:Arabidopsis eiFiso4G2 cDNA	Ampi, Leu, HA	SL35	pGBKT7:Arabidopsis eiFiso4G2 cDNA	Kana/ TRP/ cmcy
SL37	pGADT7: domaine MIF4G de At eIF4G colony 1	Ampi, Leu, HA			
SL30	pGADT7: domaine MIF4G de At eiFiso4G1 colony 7	Ampi, Leu, HA			
SL31	pGADT7: domaine MIF4G de At eiFiso4G2 colony 12	Ampi, Leu, HA			
SL12	pGADT7: domaine MA3 de At eIF4G colony 24	Ampi, Leu, HA			
SL16	pGADT7: domaine MA3 de At eiFiso4G1 colony 51	Ampi, Leu, HA			
SL32	pGADT7: domaine MA3 de At eiFiso4G2 colony 21	Ampi, Leu, HA			

Tableau 2 : caractéristiques des amorces utilisées pour la PCR dans cette étude

domaines	Nom de l'amorce	Séquence 5'	3'	fonction
MIF4G Eif4G	Z2219F	ACCCCGGGTCCGCACACTCCTATGCAAG		PCR
	Z2220R	TGGGATCCTTAATTCGCTTGAGTTTGCGC		
MA3 eIF4G	Z2221F	ACCCCGGGAGCTACAGTAAACAGTCCTCG		PCR
	Z2222R	TGGGATCCTTAAACATCGCCGCTAATCC		
MIF4G eIF(iso)4G1	Z2223F	ACGAATCCCTTGGTGAGCTAGAAGAGG		PCR
	Z2224R	TGGGATCCTTACATCTCTCCCGCCTTGG		
MA3 eIF(iso)4G1	Z2225F	ACGAATCCCTCTGACCGTACCAGTCCGG		PCR
	Z2226R	TGGGATCCTTAGACCACCATCTTCTGGAACC		
MIF4G eIF(iso)4G2	Z2261F	ACGAATTCGGAGCTTTTCAGATAAAGAT		PCR
	Z2262R	TGGGATCCTTATGCACCCGGACGCATCCCAAG		
MA3 eIF(iso)4G2	Z2263F	ACGAATTCGCAGCTCCTCTGGCTGATAGC		PCR
	Z2264R	TGGGATCCTTATATCACTGCATTGAGTACGGT		

2- Matériel et méthodes

2-1 Plasmides utilisés pour le double hybride

2-1-1 Purification et digestion des plasmides recombinants

Des plasmides utilisés sont présentés dans le tableau 1. 100ng de chaque plasmide a été transformé par choc thermique (1mn) dans des bactéries thermo-compétentes. Après régénération, les bactéries ont été étalées sur LB supplémenté en Kanamycine ou Ampicilline (50mg/l). A partir des colonies bactériennes obtenues, une mini préparation est réalisée et effectuée à partir du kit QIAprep SPIN Miniprep . Cette méthode consiste à extraire une petite quantité d'ADN plasmidique (1 à 3µg) à partir de 2ml de culture bactérienne.

Les plasmides purifiés sont digérés par des enzymes de restriction correspondants.

La réaction s'effectue dans un volume total de 25µl : 500ng d'ADN plasmidique, 2,5µl de tampon 10x ; 5 unités d'enzymes correspondants. Le volume est ajusté par de l'eau mQ. Les produits de digestion sont analysés par électrophorèse sur gel et révéler sur UV à l'aide de l'agent intercalant Bromure d'Ethidium.

2-1-2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

La réaction s'effectue dans un volume total de 20µL contenant: traces d'ADN (10ng), 2µL de Tampon 10X, 1 µM de dNTPs, 1 µM de MgCl₂, 0,5 µM amorce 1 ; 0,5 µM amorce 2 2 unités d'enzyme Taq Polymérase, le volume est ajusté avec de l'eau mQ. Les couples d'amorces sont décrits sur le tableau 2. Le programme d'amplification utilisé est : 2 mn à 94°C, suivies de 30 cycles de 30s à 94°C, 30s à 52°C et 1mn à 72°C; et enfin 10mn à 72°C. Les fragments d'ADN sont séparés sur gel. Le marqueur de poids moléculaire (2-log DNA ladder) est utilisé pour distinguer la taille des différents fragments.

2-2 Double Hybride dans la levure

2-2-1 Transformation de plasmides dans des levures compétentes

Les levures utilisées sont des souches AH109(MATa) et/ou Y189 (MATα) (Figure3) pour YTHS (Yeast Two-Hybrid System) GAL4 à partir de colonies «fraîchement re-striée». Les levures compétentes sont préparées à partir d'une culture avec une absorbance entre 0,5-0,6. Les cellules sont centrifugées plusieurs fois avec de l'eau stérile puis avec du TE-LiAc 1x.

Tout le travail se fait de façon stérile. Les levures sont traitées par une solution saline alcaline comme l'acétate de lithium qui a pour effet de fragiliser les membranes, puis incubées avec du PEG (polyéthylène glycol). On ajoute le DMSO (diméthylsulfoxyde) qui permet de perméabiliser la paroi cellulaire de levure et permet d'améliorer l'absorption de l'ADN. La

A-Souches de levures utilisées pour le double hybride

Souches	génotypes	références
AH109	MATa, <i>trp1-901, leu2-3, 112, ura3-52, his3-200, gal4Ll</i> , Clontech <i>galSOLl</i> , <i>LYS2: GALl uAs-GALITATA-HIS3, GAUUASGAUTATrADE2, URA3: MELl uAs-MEL'TATA-LacZ</i>	MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual
Y187	(MATa, <i>ura3-52, 25 his3-200, ade2-101, trp1-901, leu2-3, 112, gaUA, met, gal80A, URA3:: GALlijAS-GALtata-⁷</i>)	MATCHMAKER GAL4 Two-Hybrid System 3 & Libraries User Manual

B- les vecteurs

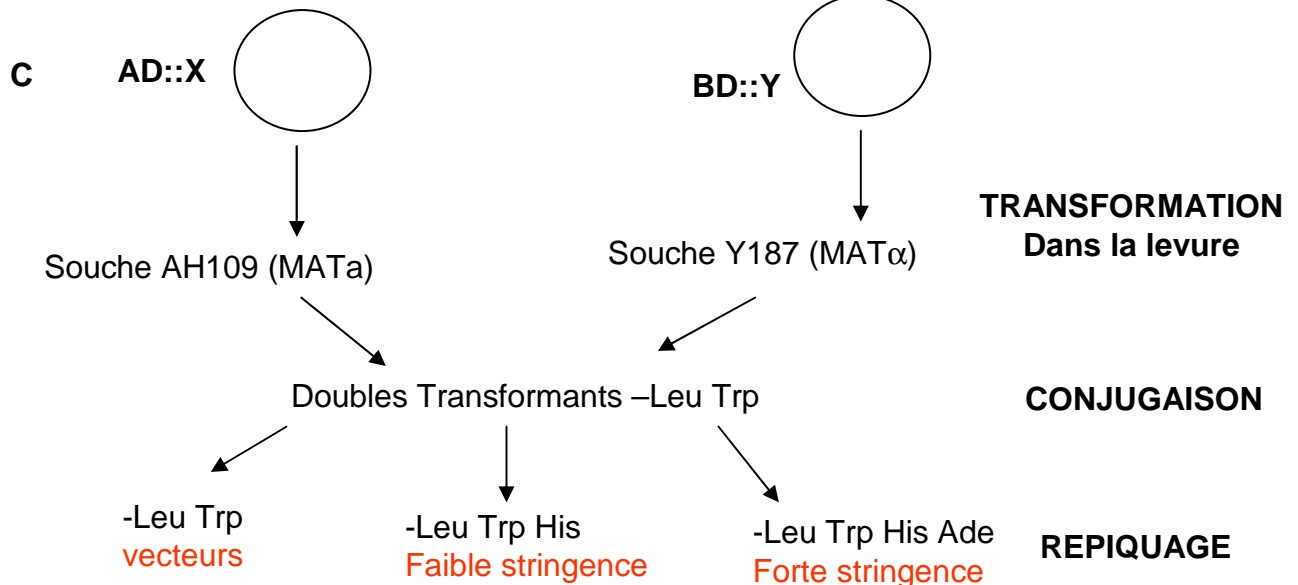
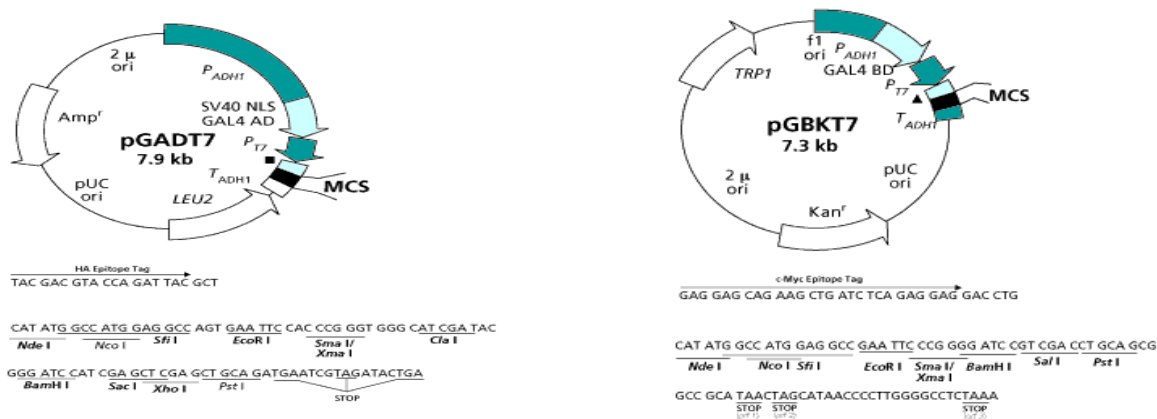


Figure 3 : description des souches de levures et de vecteurs **A** les souches de levures AH109 et Y187 et la description de leur genotype. **B** : pGADT7 réplique autonome dans *S. cerevisiae*, contient également le promoteur T7, un HA épitope, et un MC(multiple cloning site), le gène LEU2 marqueur de sélection dans la levure. Le MCS de pGADT7 a des sites de restriction unique dans le cadre avec l'extrémité 3 'de l'AD GAL4 pour construire une fusion protéine soit avec une protéine d'intérêt (ex :CP). pGBKT7 réplique autonome dans *S. cerevisiae* contient également le promoteur T7, un épitope cmc , et un MCS. Le vecteur porte le Kan *TRP1* marqueur de sélection dans la levure. pGBKT7 contient des sites de restriction unique dans le cadre avec l'extrémité 3 'du de l'ADN de GAL4-BD pour la construction de la fusion de la protéine avec une protéine appât (ex: eIF4G). **C**: les étapes du double hybride. **C** : schéma de l'expérience de double hybride menée au cours du stage.

pénétration de l'ADN dans les levures ainsi traitées est stimulée par un choc thermique. Le culot est resuspendu avec 500µl d'eau stérile puis 100µL sont étalés sur un milieu sélectif (voir annexe). Les levures **AH109** (transformées avec les constructions pGADT7 (exprimant le domaine d'activation) sont étalées dans un milieu sélectifs SD-L (Selective Dropout sans leucine) et les levures **Y187**, transformées avec les plasmides de type pGBKT7 (exprimant la fusion au domaine de liaison), sont cultivées dans le milieu SD-W (sans Tryptophane). Le milieu sélectif permet la sélection de levures en fonction de leur auxotrophie/ phototrophie

2-2-2 Conjugaison de levures et étude d'interactions

La conjugaison est le processus qui consiste à obtenir des cellules diploïdes à partir deux levures de type sexuel opposé. Elles exprimeront la protéine appât ou les protéines proies. Dans cette idée, nous avons conjugué les cellules haploïdes AH109 (MATa) contenant le pGADT7 avec les cellules Y189 (MATα) contenant les pGBKT7. Les conjugués ayant incorporé les deux types de plasmide ont été mis en cultures sur boîtes SD-LW.

Enfin, des tests d'auxotrophie par spot seront réalisés sur des cultures boîtes SD-LW, -LWH et -LWHA (annexe).

2-2-3 Western Blot

Une culture liquide est faite sur des levures transformées et les protéines totales ont été extraites par une solution NaOH 1,85M ; β-mercapto 1%. Les protéines sont précipitées par du TCA 50% qui est utilisé pour précipiter les protéines, et rincées à l'acétone. Le culot est resuspendu dans du tampon Laemmli.

Les protéines ont été déposées sur deux gels SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis). Après migration, le gel 1 est coloré avec du bleu de coomassie et le gel 2 est transféré sur membrane de nitrocellulose. Une coloration au rouge Ponceau est effectuée pour vérifier le transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose. La membrane est bloquée avec du TBS (Tris Buffered Saline) 5% lait à 4°C. Après rinçage l'anticorps primaire anti-HA (Roche) est utilisé et se fixe de façon spécifique sur les epitopes HA. Après rinçage avec du TBS Tween 0,5%, l'anticorps secondaire (anticorps anti-souris, Sigma) couplé à la peroxidase est utilisé. Après rinçage, une révélation par chemiluminescence (Lumiglo, KPL) est effectuée.

2-3 Etude de la résistance d'Arabidopsis thaliana aux Potyvirus

2-3-1 Matériel viral et protocole d'inoculation

Deux membres de la famille des Potyvirus ont été utilisés pour cette étude, le TuMV (Turnip Mosaic Virus) et le WMV (Watermelon mosaic Virus). L'inoculum viral est préparé à

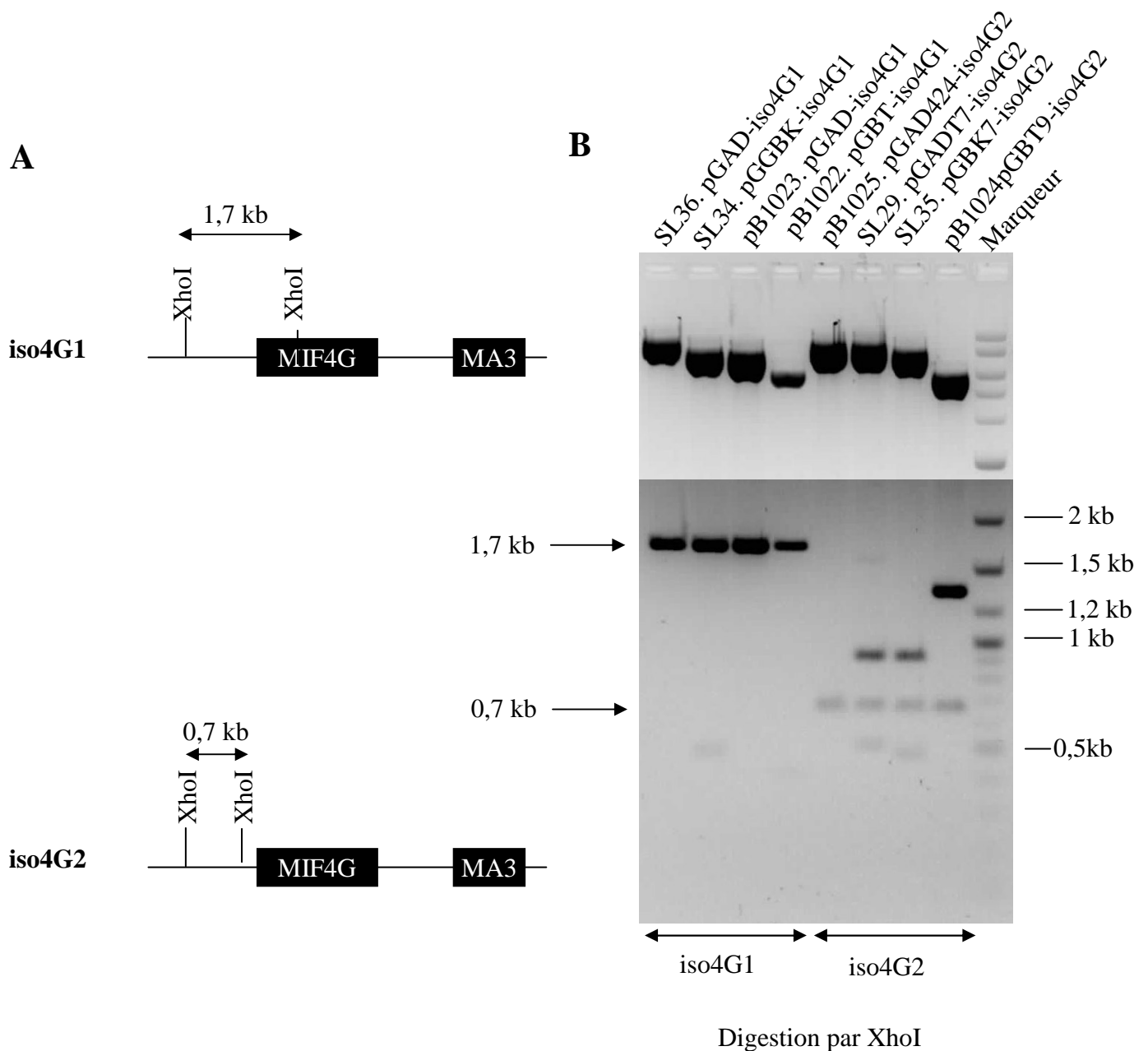


Figure 5: vérification des plasmides contenant les cDNAs de eIF(iso)4G1 et eIF(iso)4G2 par enzyme de restriction A schéma illustrant les ADNc de eIF(iso)4G1 et IFf(iso)4G2 . Les sites de coupure de l'enzyme XhoI sont représentés sur la séquence B vérification des plasmides par digestion, Les flèches montrent les fragments de restriction Xho I représenté en A. Le gel est un assemblage de 2 photos prises avec des expositions différents afin que toutes bandes apparaissent distinctement.

partir de 2g de feuilles fraîches virosées (navet pour le TuMV et Tabac pour le WMV), broyé dans 8 ml de tampon phosphate additionné de carborundum (0,16g) et de charbon actif (0,16 g). Le charbon actif permet de maintenir le virus en vie et le carborundum permet de blesser les tissus végétaux et de permettre l'entrée du virus.

Dans le cas du TuMV et du WMV quatre feuilles sont enduites et frottées très légèrement avec l'inoculum, puis rincées avec l'eau 5 minutes après l'inoculation.

2-3-2 Détection des particules virales dans les plantes par DAS-ELISA

Le test de résistance/sensibilité des différentes lignées au TuMV et WMV est réalisé à l'aide du test DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Ce test est une méthode immunochimique qui met en oeuvre successivement deux anticorps pour détecter des antigènes (virus). La plante entière (inoculée ou systémiques) a été broyée entre deux rouleaux en présence de tampon de broyage (Annexe). Les différentes étapes du test sont schématisées et expliquées sur la figure 4. La présence du virus dans le tissu végétal est révélée par l'apparition d'une coloration jaune dans les puits qui absorbe à 405nm. L'intensité de la coloration est examinée au spectrophotomètre. Le TuMV est révélé par test ELISA indirect qui consiste à mettre d'abord les extraits de plantes suivi des deux anticorps (primaire et secondaire) et le WMV par ELISA direct (Figure 4).

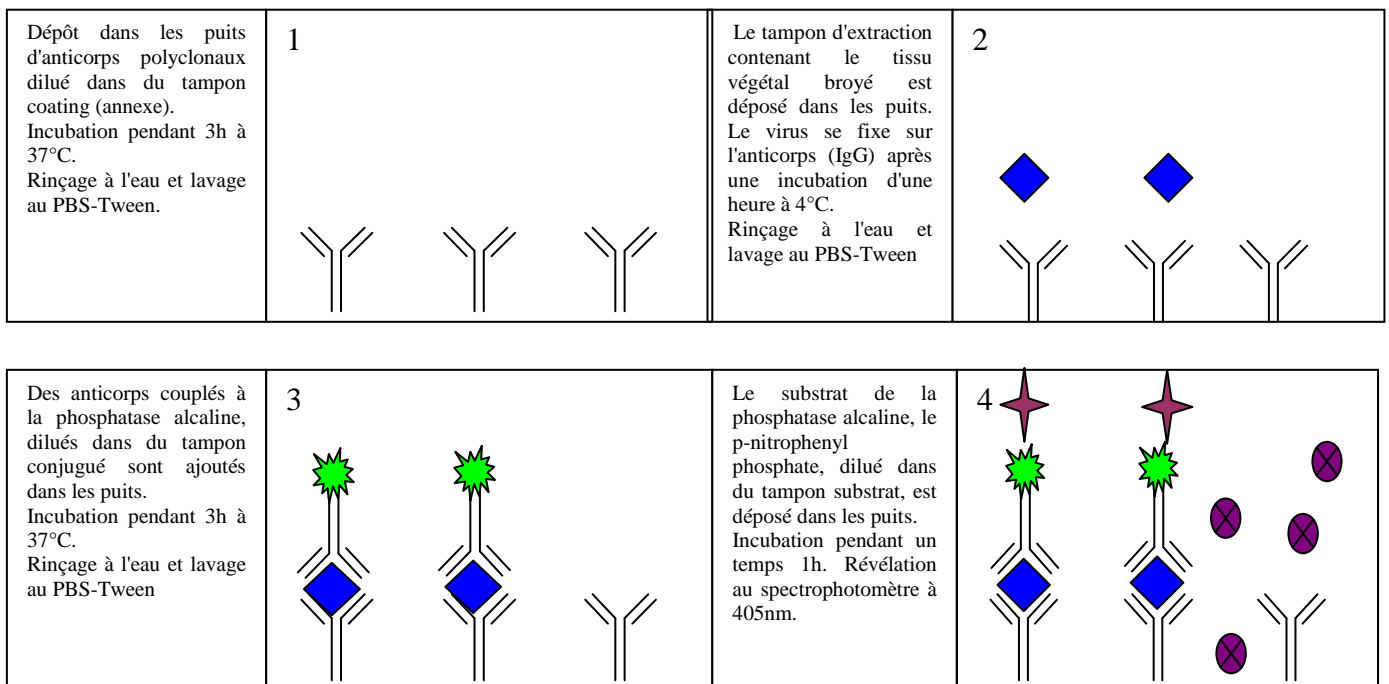


Figure 4: Déroulement du test DAS-ELISA utilisé pour la détection du WMV: Les 4 principales étapes du test sont décrites ci-dessus.

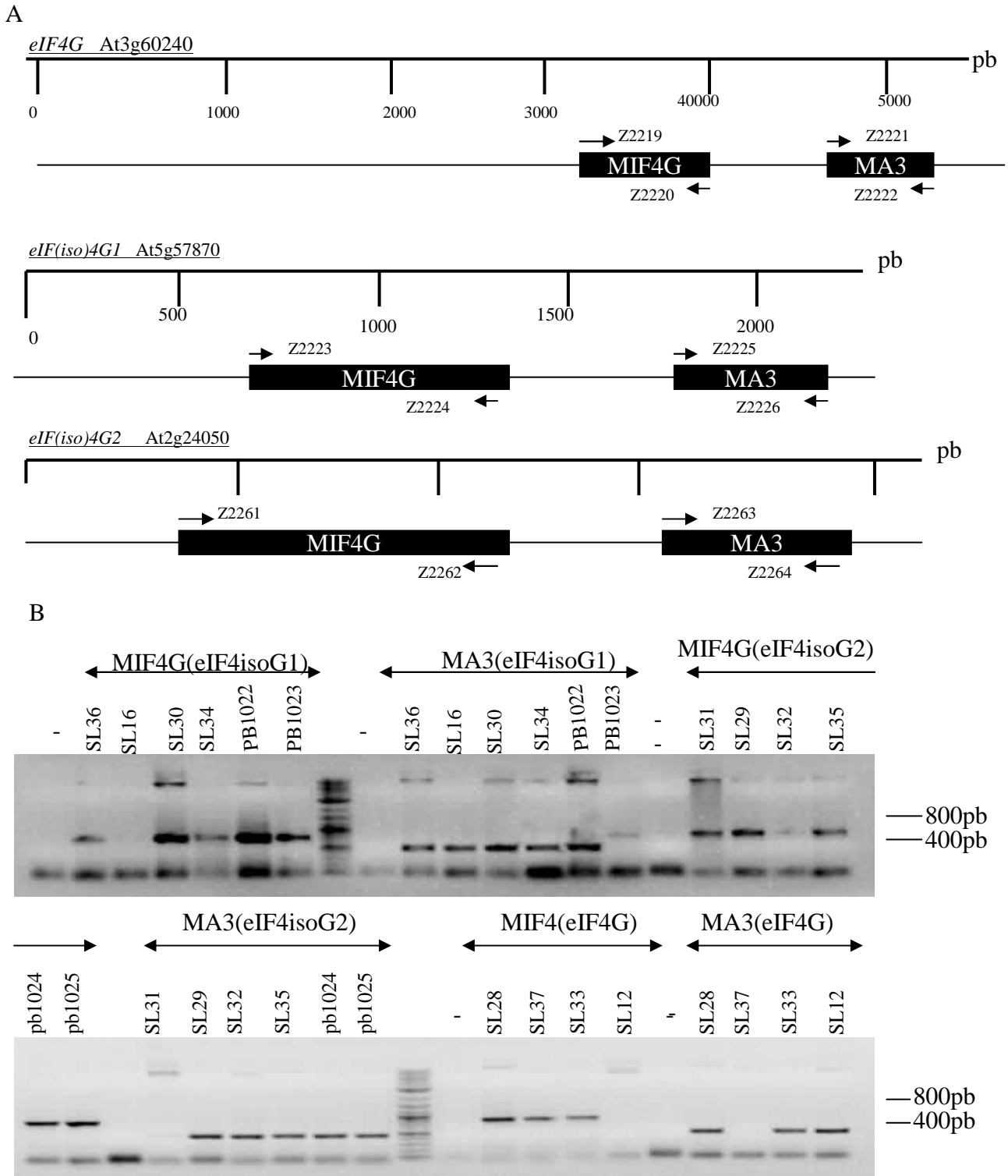


Figure 6 : vérification des plasmides utilisés par PCR: A Schémas illustrant les séquences ADNc des gènes *eIF4G*, *eIFiso4G1* et *eIFiso4G2*. MIF4G et MA3 sont des domaines conservés dans ces gènes . Les amorces décrites dans le tableau 2 sont représentées par des flèches.

B.Vérification des plasmides utilisés dans cette étude. Les plasmides décrits dans le tableau 1 ont été amplifiés par PCR avec les amorces spécifiques des domaines MIF4G et MA3 (cf tableau 2). les traits « - » indiquent les témoins négatifs « eau ».

3-Résultats et Discussions

3-1Test d'interaction entre la capsid de RBDV et les protéines eIF4G

3-1-1 Amplification et Vérification des plasmides

3-1-1-1Vérification des plasmides par digestion

Le système double hybride implique l'expression, à l'aide de vecteurs (Figure 3B), d'une protéine « X » clonée en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription Gal-4 (construction du vecteur pGBKT7 / X : protéine recombinante BD-X) ainsi que l'expression d'une protéine « Y » clonée en fusion avec le domaine d'activation du facteur de transcription Gal-4 (construction du vecteur pGADT7 / Y : protéine recombinante AD-Y) (Figure 2 et 3).

Une série de plasmides nous a été envoyée par Stuart MacFarlane, les autres ont été obtenus par Séverine Lacombe au sein de notre laboratoire (plasmides "SL") (Tableau 1). Dans un premier temps, il nous a fallu retransformer ces plasmides dans des bactéries pour les réamplifier. Ces plasmides ont été transformés par choc thermique dans des bactéries thermo-compétentes. Ces bactéries ont été cultivées dans des milieux kanamycine et ampicilline afin de sélectionner les transformants. Une purification des plasmides a été réalisée à partir de ces transformants. On a digéré les plasmides contenant l'ADNc de la capsid par des enzymes de restriction qui ont été insérées dans la construction du vecteur pour vérifier la taille du gène d'intérêt. Mais je ne présenterai qu'une seule enzyme XhoI. Le gène eIF4G n'a pas été présenté. Les plasmides contenant l'ADNc d'eIF4(iso)G1 et d'eIF4(iso)G2 ont deux sites de coupures pour XhoI (Figure 5). Les fragments issus de cette digestion ont des tailles de 1,7 kb pour eIF(iso)4G1 et de 0,7 kb pour eIF(iso)4G2 qui correspondent bien aux tailles attendues (Figure 5).

3-1-1-2Vérification de plasmides par PCR

Toujours afin de vérifier des plasmides, des expériences de PCR ont été effectuées sur les plasmides recombinants étudiés avant de les transformer dans des levures. Les domaines MIF4G et MA3 sont des domaines conservés d'eIF4G. Les amorces utilisées sont spécifiques de ces domaines (Figure 6 A et tableau 2). On observe une amplification donc la présence d'ADNc d'eIF4G dans tous les plasmides testés. Pour les plasmides ayant dans leur construction MIF4G et amplifiés avec des amorces spécifiques de ce domaine ont une bande à 800 pb ce qui correspond bien à la taille attendue. De même une bande de 400pb correspondant au domaine MA3 a bien été amplifiée (Figure 6B)

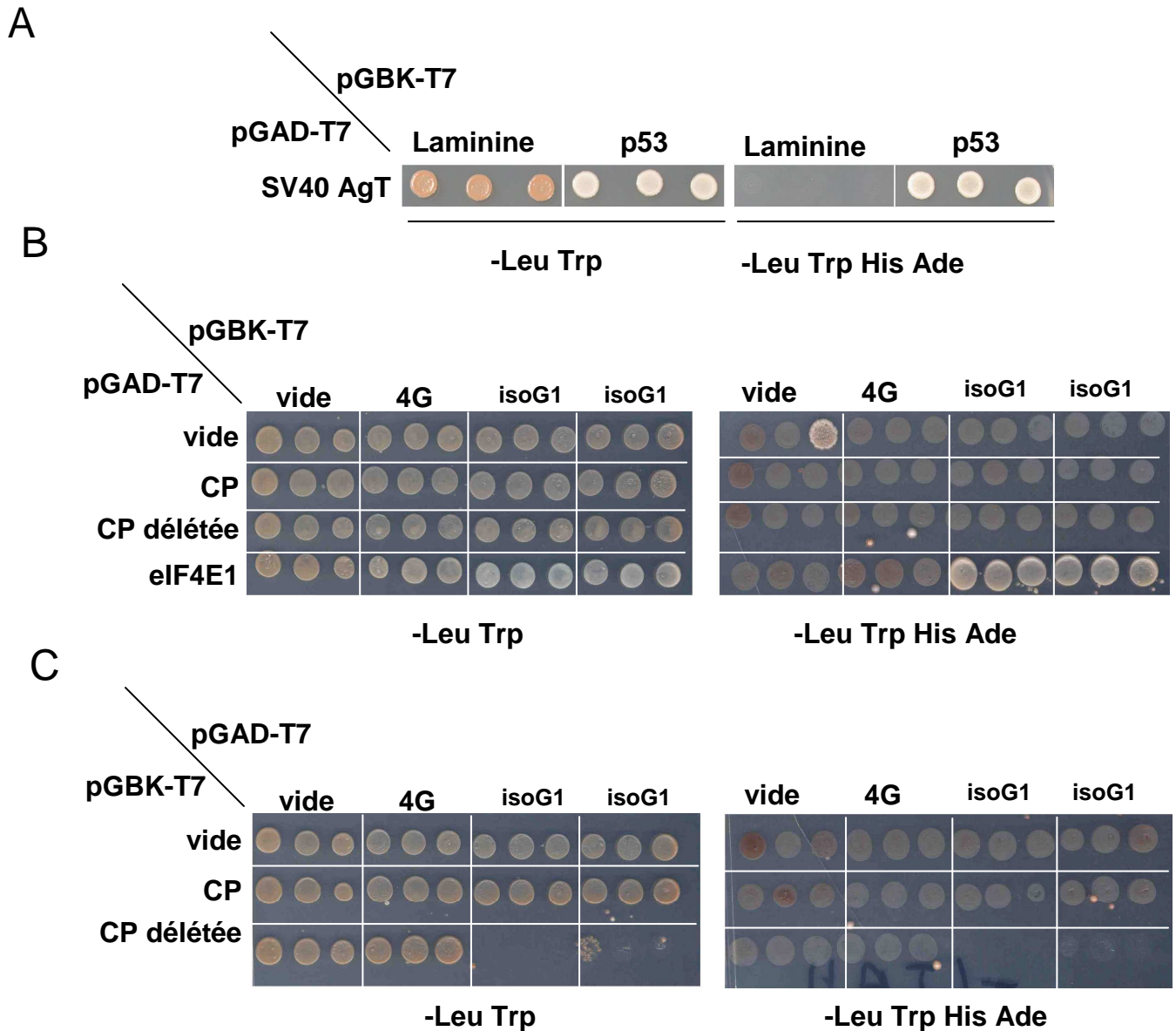


Figure 7 : Tests d'interactions par double hybride dans la levure entre la capside (CP) du RBDV et les protéines eIF4G d'arabidopsis.

Les levures conjuguées sont déposées sur milieu –Leu Trp (contrôle de croissance) et –Leu Trp His Ade (conditions stringentes d'interaction).

A- contrôle d'interaction du kit Matchmaker avec comme contrôle positif l'interaction entre l'antigène T du SV40 et la protéine p53 et en contrôle négatif l'absence d'interaction entre l'antigène T et la laminine **B-**test d'interaction entre la protéine de la capside lié au domaine d'activation et les protéines eIF4G lié au domaine au domaine de liaison. Le facteur eIF4E est utilisé comme contrôle d'interaction avec les protéines eif4G. **C** :test réciproque d'interaction avec eIF4G lié au domaine d'activation et la protéine de capside au domaine de liaison.

Les tests d'amplification et de digestion nous a permis de vérifier la présence des inserts dans les plasmides avant de les utiliser dans l'étude du double hybride. Ces plasmides peuvent ainsi utiliser pour la transformation avec les levures.

3-1-2- Test d'interaction entre la capsid et les protéines eIF4G.

Le système de double hybride en levure de la compagnie Clontech « MATCHMAKER GAL-4 TWO-HYBRID SYSTEM 3 » est utilisé afin de vérifier l'interaction directe de deux protéines, *in vivo* dans la levure (Figure 2 et 3).

Une transformation de ces plasmides dans des levures rendus compétentes a été réalisée. Les souches de levures AH109 (MAT α) ont été transformées avec les plasmides pGADT7 et les souches de levures Y187 (MAT α) avec pGBKT7. Une conjugaison a été réalisée entre les deux souches de levures et les doubles transformants dans le milieu sélectifs –Leu Trp. Un repiquage dans des milieux -Leu Trp, et -Leu Trp His Ade nous permet de conclure sur les interactions entre les protéines.

3-1-2-1 Résultats des tests d'interaction

On veut tester l'interaction entre la protéine de la capsid du RBDV et les eIF4G *d'Arabidopsis*. Les tests d'interactions sont réalisés dans les deux sens (fusion à AD et à BD).

Il a été vérifié que chaque partenaire n'autoactivait pas le système en le conjuguant à chaque fois avec un vecteur vide correspondant (Figure 7 B et C, lignes et colonnes "vide"). Toutes les interactions sont testées en trois exemplaires.

Tout d'abord, les contrôles d'interaction du kit Matchmaker ont été effectués avec comme contrôle positif l'interaction entre l'antigène T du SV40 et la protéine p53, on observe une interaction entre la protéine p53 et SV40 AgT qui se traduit par une croissance des levures dans les deux milieux (Figure 7A) et un contrôle négatif entre l'antigène T du SV40 et la laminine, on n'observe pas de croissance sur le milieu sélectif en –LWHA. Le système étudié et les milieux fonctionnaient bien dans les deux conditions.

Des études ont démontrés que la protéine eIF4E1 interagit avec les protéines eIF4G et eIF(iso)4G (Sévérine Lacombe, communication) donc eIF4E1 nous a servi de contrôle. Effectivement quand eIF4E1 et les protéines eIF4(iso)G1 et eIF4(iso)G2 sont mises en présence, on a pu observer une expression des gènes rapporteurs Ade2 et His3 (croissance dans le milieu – LWHA). Etonnamment, l'interaction entre eIF4E1 et eIF4G n'a pu être reproduite.

Le test d'interaction entre la capsid lié au domaine d'activation GAL4 (AD) et les eIF4G lié au domaine de liaison de GAL4 (BD) a ensuite été mené (Figure 7 B). On n'observe aucune croissance sur milieu sélectif stringent, donc des souches de levures transformées ne sont pas

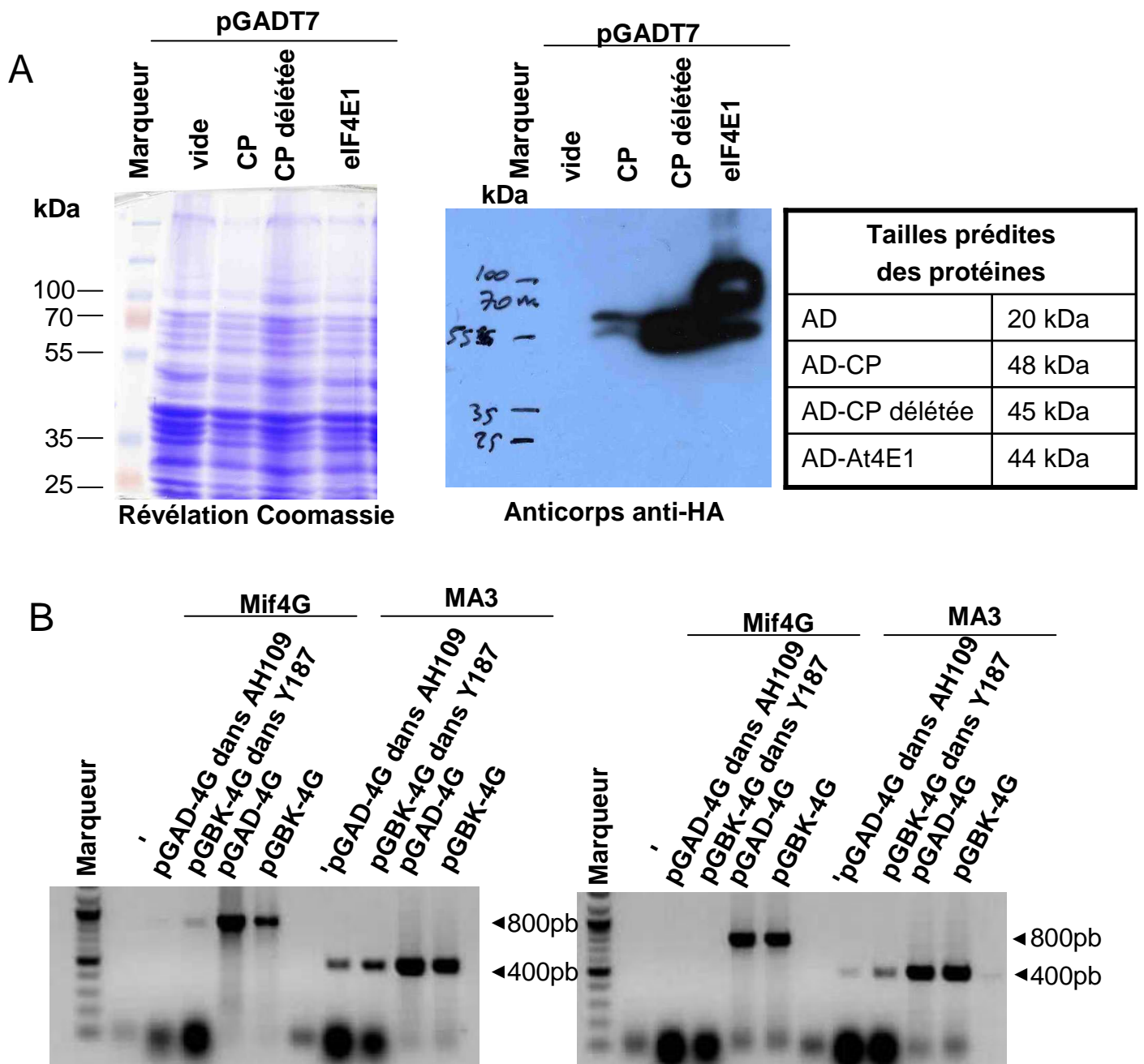


Figure 8 : vérification de levures transformées par western blot et par PCR.

A-révélation par du bleu de Coomassie des protéines totales extraites des levures transformés. Les protéines possédant l'épitope HA ont été révélées par immunoblot en utilisant l'anticorps anti-HA. Le tableau représente les tailles attendues des protéines recherchées. **B**-vérification sur levures transformées par PCR. les flèches représentent les tailles des fragments attendus correspondants aux domaines MIF4G et MA3.

phototrophe pour l'adénine et l'histidine. Donc cela veut dire que les gènes de biosynthèse d'adénine et d'histidine ne sont pas exprimés et qu'il n'y a pas d'interaction entre la capsidite et les protéines eIF4G (cf figure 7B). Cette expérience suggère qu'il ya pas d'interaction entre la protéine de capsidite et les protéines eIF4G/ eIF4(iso)G1 ni eIF4(iso)G2 (pas de croissance sur le milieu –LWHA).

Enfin, nous avons réalisé un test réciproque d'interaction avec les protéines eIF4G lié au domaine d'activation et la protéine de capsidite au domaine de liaison (Figure 7C). Aucune interaction n'a été mise en évidence entre la protéine de capsidite du RBDV et les protéines eIF4G d'*Arabidopsis thaliana*.

Nous ne disposons pas des résultats en conditions de faible stringence car les levures ont mal poussées sur le milieu –LWH. Il faudra le refaire car nous avons peut-être raté des interactions faibles. S'il n'y a pas d'interaction, c'est soit il n'y a pas d'interaction entre la protéine de la capsidite et les eIF4G soit que l'un des partenaires n'est pas exprimés. Pour choisir entre ces deux hypothèses, nous avons vérifié les levures transformés.

3-1-3- Vérification des levures

Pour vérifier que les levures ont été bien transformées avec les plasmides d'intérêt et que la conjugaison a été bien faite, des tests de western blot et de PCR sur colonies transformé ont été faite.

3-1-3-1 Par Western blot

Des protéines ont été extraites des cultures liquides de transformants portant le vecteur pGAD-T7 fusionné avec la protéine de capsidite. Dans la construction de ces vecteurs, il ya un épitope HA ce qui permet de révéler la protéine de fusion par l'anticorps anti-HA. Après migration sur le gel SDS-PAGE, la coloration au bleu de Coomassie (figure 8A), qui permet la visualisation de bandes, indique la teneur en protéines et la qualité de l'extraction.

D'autre part la révélation par western blot, nous a permis de détecter et d'identifier la protéine de fusion. On n'observe aucune bande dans les levures transformées avec un vecteur vide alors qu'on observe bien des bandes correspondants au domaine AD fusionné à la protéine capsidite, la capsidite délétée et la protéine eIF4E1. Cependant, les tailles observées sont légèrement supérieures aux tailles attendues (figure 8A). On a peut-être mal noté les tailles.

Donc les levures ont été transformées avec les plasmides contenant la protéine d'intérêt.

3-1-3-2 Par Polymerase Chain Reaction (PCR)

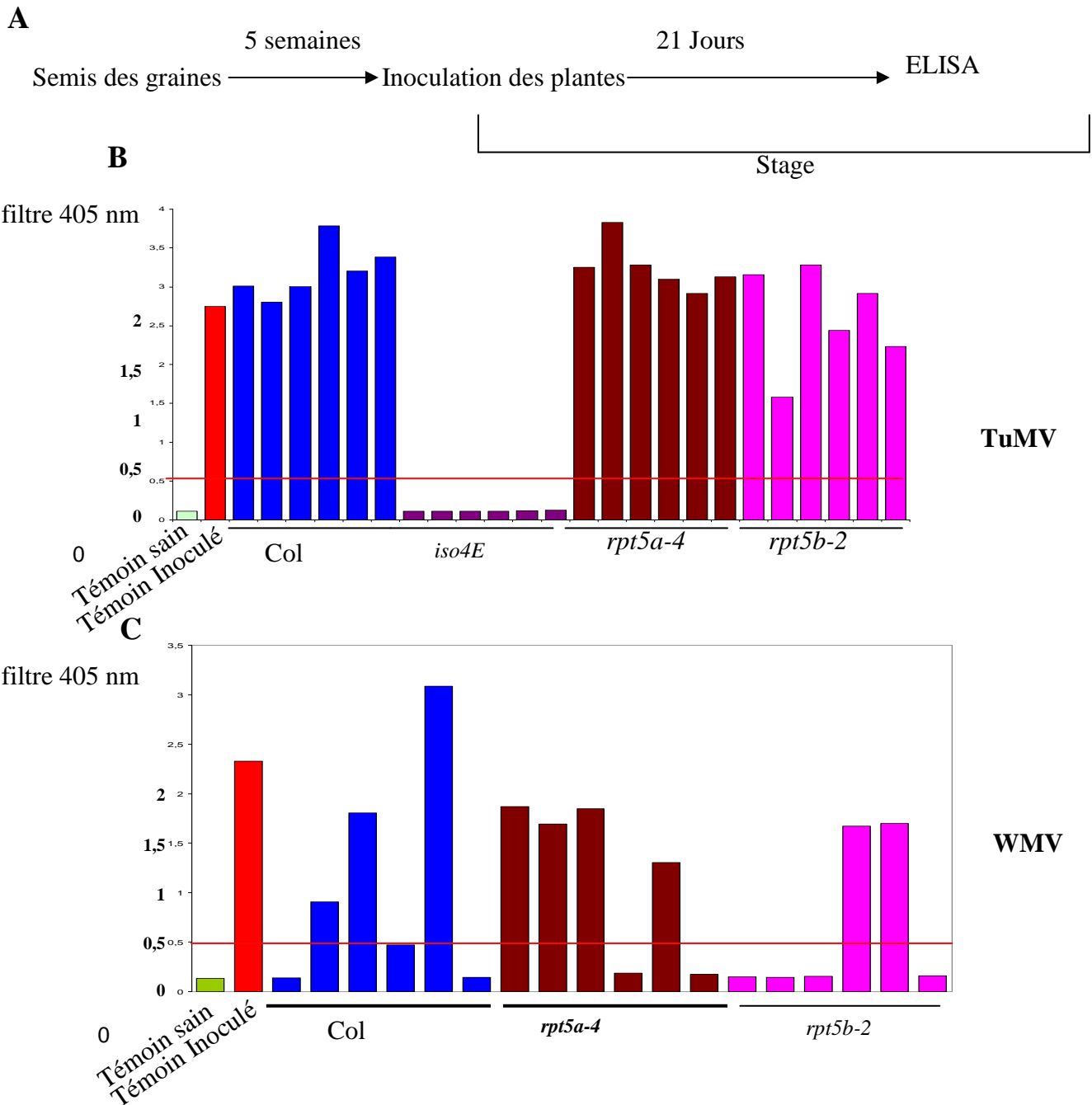


Figure 9 :test de résistance des mutants de protéasome aux potyvirus TuMV et WMV

A: la durée et le déroulement du test d'inoculation pour l'obtention de mutants infectés **B et C:** résultats d'analyse de la présence des virus dans les plantes par la méthode DAS-ELISA. Chaque barre représente une plante testée, chaque couleur désigne un type de mutant. La ligne horizontale rouge montre le seuil de sensibilité, au dessus de laquelle les plantes sont considérées comme sensibles, elle correspond à trois fois la moyenne des témoins sains. La lecture des échantillons se fait dans un spectrophotomètre avec un filtre de 405nm .Le mutant *ifiso4e* est résistant au TuMV et sert de contrôle pour ce test.

Une PCR sur des levures transformées passées au micro-onde (2mn) a été effectuée. Les plasmides pGADT7 ont servi de contrôle positif et on observe des fragments de taille 800pb pour le domaine MIF4G et 400pb pour MA3 (Figure 8 B).

Dans certaines levures on observe des amplifications avec les tailles attendues de 800 et de 400 pb. Ce test confirme bien que les levures ont été bien transformées avec les bons vecteurs pGADT7. Les levures ont été bien transformées, mais pas d'interaction ce qui suggère que la protéine de la capsid du RBDV n'interagissent pas avec les eIF4G d'*Arabidopsis thaliana* en condition stringent (-LWHA). Il faudra retester les interactions en condition de faible stringence (-LWH).

3-2 Rôle du système ubiquitin/proteasome (UPS) dans la résistance aux virus

Le système UPS est un moyen important de mécanismes de régulation cellulaire par l'élimination des protéines spécifiques: soit des protéines anormales (mal repliées ou endommagées) ou des protéines régulatrices qui ne sont plus nécessaires ou dont les fonctions doivent être mises hors circuit. Chez les plantes, comme les animaux, cette voie de régulation agit par l'intermédiaire du système ubiquitin/26S protéasome (UPS). Afin de vérifier la résistance des mutants *rpt5a-4* ou *rpt5b-2*, 4 populations de plantes ont été testées: Col, mutant *eifiso4e*, mutants *rpt5a-4* ou *rpt5b-2*. La détection des virus TuMV et WMV par DAS-ELISA a été faite sur plante entière. Les résultats sont présentés non sous forme de moyennes mais plantes par plantes (Figure 9).

Les résultats du test du TuMV montrent que les plantes Col sont bien sensibles au virus alors que les mutants *eifiso4e* sont résistants. Le test ELISA réalisé avec TuMV montre un DO élevé sur les populations mutantes *rpt5a-4* ou *rpt5b-2* ce qui suggère que ces mutants sont comme le sauvage Columbia sensibles à ce virus (Figure 9B).

Les résultats du test ELISA avec WMV (Figure 9 C) sont exploitables même si seulement 4 plantes Columbia (témoin sensible) sur 6 ont été infectées : c'est souvent le cas avec le WMV. Le mutant *rpt5a-4* est lui aussi sensible (4 plantes sur 6). En revanche, pour le mutant *rpt5b-2*, on a plus de plantes résistantes que de sensibles (2 sensibles 4 résistantes).

Les gènes *rpt5a* et *rpt5b* sont redondants on pourrait penser qu'ils jouent les mêmes rôles dans la dégradation des protéines eIF4E. Mais ces deux gènes peuvent avoir des fonctions ou interviennent différemment lors de la dégradation de la protéine eIF4E1 avec le WMV. Les mutants *RPT5a* et *RPT5b* sont sensibles pour le TuMV et partiellement pour le WMV. Le gène *RPT5b* peut ne pas jouer le même rôle vis à vis les deux virus au vu de ces résultats. Mais d'abord, il faudra refaire les tests avec un plus grand nombre échantillons avant de pouvoir conclure.

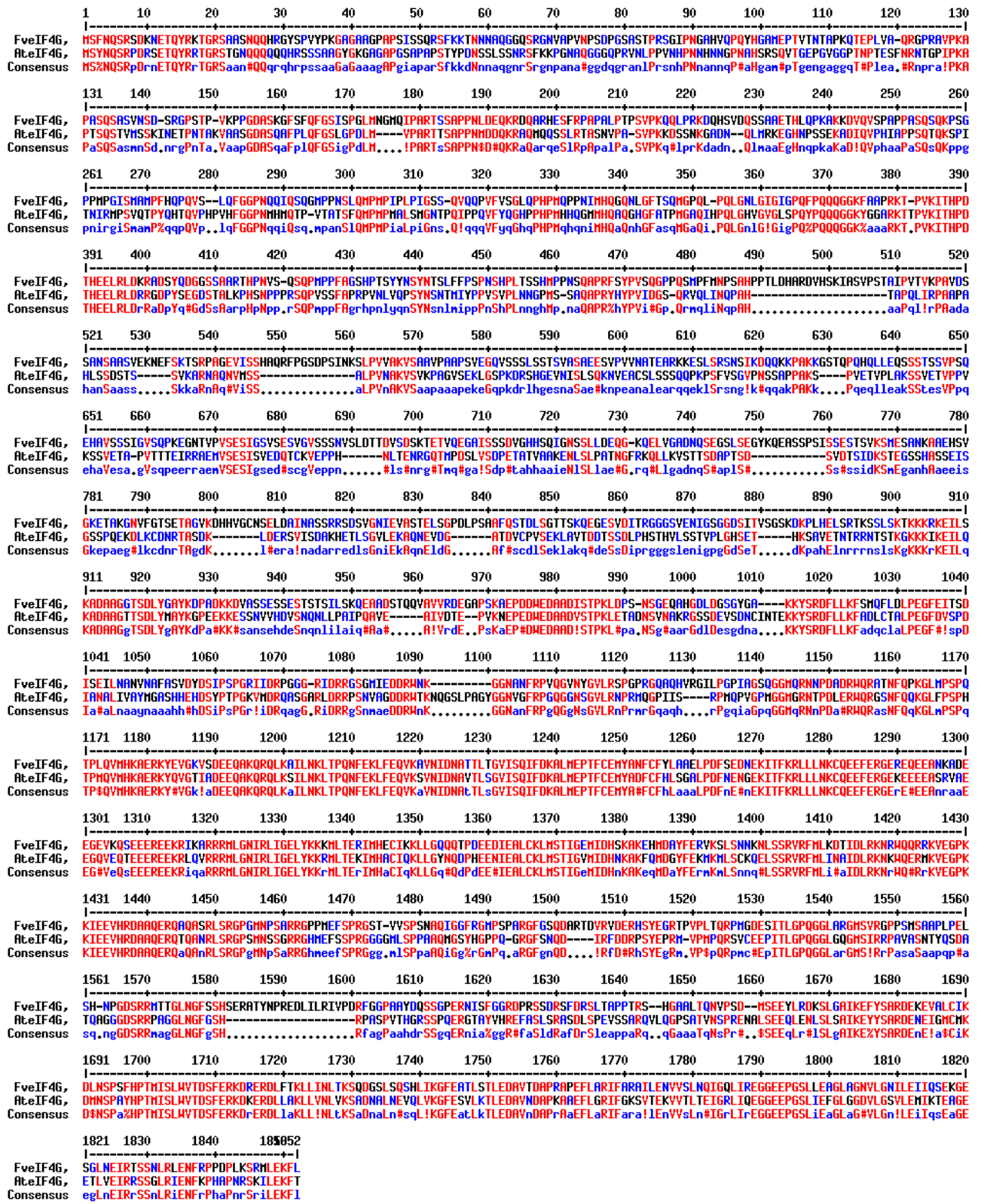


Figure 10: alignement des protéines eIF4G d'*Arabidopsis thaliana* (AteIF4G) et de la Fraise des bois (*Fragaria vesca*, FveIF4G): comparaison des deux séquences protéiques d'eIF4G par alignement. Les deux protéines présentent 46% d'identité (AA en rouges) en acides aminés et 60% de similitudes.

4-Conclusion et perspectives

La recherche de sources de résistance au RBDV, nous a conduit à tester une possible interaction entre la protéine de capsid et les protéines eIF4G. Les résultats testés suggèrent que la protéine de capsid de RBDV n'interagit pas avec les protéines eIF4G d'*Arabidopsis thaliana*.

Nous pensons qu'il faudrait faire des études bioinformatiques sur la fraise et des approches génétiques sur la framboise.

La fraise des bois a son génome séquencé depuis peu (Shulaev et al, 2011) et elle appartient à la même famille que la framboise, les rosaceae.

Nous avons recherché dans le génome de la fraise des bois des gènes eIF4G (<https://strawberry.plantanfood.co.nz/>) et avons trouvé un gène eIF4G (FveIF4G) mais pas de gènes eIF(iso)4G.

Avec Blastp, nous avons fait un alignement des séquences protéines d'eIF4G d'*Arabidopsis thaliana* et eIF4G de *Fragaria vesca* (figure 10). Avec une identité de 46%, nous pensons que la protéine eIF4G d'*Arabidopsis thaliana* n'est peut être par assez homologues à l'eIF4G de la framboise pour pouvoir interagir avec la CP du RBDV. Il vaudrait mieux faire un test d'interaction entre la capsid de RBDV et les eIF4G de la fraise des bois.

Autrement, on pourrait voir si *Arabidopsis thaliana* est sensible au RBDV. Alors, des mutants *eIF4G*, *eIF(iso)4G1* et *eIF(iso)4G2* d'*Arabidopsis* peuvent être inoculé avec le virus RBDV pour vérifier la sensibilité du virus face à ces mutants.

Dans le cadre de l'étude des comportements (résistance/sensibilités) des mutants *rpt5a-4* ou *rpt5b-2* face aux virus TuMV et WMV, le test DAS-ELISA a été réalisé. Au regard des résultats, nous pouvons conclure que la sensibilité au TuMV n'est pas affectée par ces mutations. Bien que le bilan obtenu avec l'étude du WMV ne soit pas concluant, il pourrait y avoir une résistance partielle du mutant *rpt5b-2*. Afin de mieux visualiser l'effet du mutant *rpt5b*, de nouveaux tests sont envisagés.

6- Références bibliographiques

1. **Robaglia, C., Caranta, C. (2006).** Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends Plant Science* **11**, 40–45.
2. **MacFarlane, S.A. & McGavin, W.J (2009).** Genome activation by raspberry bushy dwarf virus coat protein. *J. Gen. Virol* **90**, 747-753
3. **Krab, I.M., Caldmell, C., Gallie, D.R., Bol, J.F.(2005).** Coat protein enhances transcriptional efficiency of Alfalfa mosaic virus RNAs and interacts with the eIF4G component of initiation factor eIF4F. *J. Gen. Virol* **86**, 1841-1849
4. **Dielen, S., Sasaki, F. T., Walter, J., Michon, T., Ménard, G., Pagny, G., Krause-Sakate, R., de Gaudoy Maia, I., Badaoui, S., Le Gall, O., Candresse, T. & German-Retana, S (2010).** The 20S proteasome $\alpha 5$ subunit of *Arabidopsis thaliana* carries an RNase activity and interacts in planta with the Lettuce mosaic potyvirus HcPro protein. *Mol. Plant Pathology* **10**, 1364-3703.
5. **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**, 927–934.
6. **Castello, M.J., Carroasco, J.L. & Vera, P. (2010).** DNA-Binding protein phosphatase AtDBP1 mediates susceptibility to two potyviruses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **153**, 1521-1525.
7. **Gallois, J.L., Guyon-Debast, A., Lécureuil, A., Vezon, D., Carpentier, V., Bonhomme, S. and Guerche, P. (2009).** The *Arabidopsis* proteasome RPT5 subunits are essential for gametophyte development and show accession-dependant redundancy. *Plant Cell* **21**, 442-459
8. **Shulaev, V., et al (2011).** The genome of woodland strawberry (*Fragaria vesca*). *Nature Genetics* **43**, 109-116

ANNEXES

Milieu YPD

Milieu riche, donc non sélectif,

-Pour propager les souches, les re-strier (YPD Agar)

-Faire pousser les souches en vue de transformation (manip levures compétentes)

Difco Peptone	20g
Yeast extracts	10g
Glucose (dextrose)2%	20g
Eau milliQ	qsp 1L

Ajuster pH 6,5 (qqe gouttes NaOH 5N)

-Pour YPD Agar, rajouter 10g de bacto agar par 500ml milieu

-Pour YPDA (YPD supplémenté en adénine) rajouter 15 ml de solution 0,2% adénine hemisulfate par litre de milieu.

Milieus sélectifs sans AA

On prepare des mileux SD-L, SD_W, SD-LW, et SD-LWAH en ajoutant du -Leu,

-Trp, -Leu Trp et -Leu Trp Ade His respectivement 0,34g ; 0,37g et 0,30g

PEG LiAc

Dropout AA	X		
Nitrogen w/o amino acid	3,35g	PeG LiAc	Pour 10mL
Dextrose	10g	LiAc 10X	1mL
Eau milliQ	qsp 500ml	TE 10X	1mL
		PEG 50%	8mL

Ajuster pH 5,8 env 2 gouttes NaOH 5N

Ajouter bacto Agar 10g par 500ml de milieu

FORMULE DES DIFFERENTS TAMPONS utilisés pour l'ELISA

Tampon BROYAGE

TP BROYAGE	Pour 200mL
Na2HPO4	2,15g
DIECA	0,4g
EAU	200mL ajuster le vol

Tampon COATING :

TP COATING	Pour 250mL
H2O	200mL ajuster le vol
Na2CO3	0,40g
NaHCO3	0,74g

Tampon CONJUGUÉ:

TP CONJUGUÉ

	Pour 500mL 450mL ajuster le volume
Tampon lavage(PBS1+tween)	
NaN3	0,1g
PVP K25 de Fluka	10g
BSA (albumine bovine)	1g

Tampon SUBSTRAT

TP SUBSTRAT

	Pour 200mL
diéthanolamine	19.4mL
EAU	150mL Ajuster e volume
Diluer au moment de l'emploi 1mg de paranitrophénylphosphate par mL de tampon	