

Université de Sherbrooke

**Interférence à l'ARN chez les pêchers infectés par le  
viroïde de la mosaïque latente du pêcher (PLMVd)**

Par

Mme Patricia Landry

Département de Biochimie

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de  
*maître ès sciences* (M.Sc.) en biochimie

23 septembre 2004

## TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES .....	V
LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS .....	VIII
RÉSUMÉ .....	1
INTRODUCTION .....	4
1. LES VIROÏDES .....	4
1.1. Les viroïdes (généralités).....	4
1.2. Classification des viroïdes .....	5
1.3. Localisation cellulaire des viroïdes .....	7
1.4. Réplication des viroïdes .....	9
1.4.1. Mécanismes de réplication .....	9
1.4.2. Étape de polymérisation .....	11
1.4.3. Étape de coupure et de circularisation.....	12
2. INTERFÉRENCE À L'ARN .....	15
2.1. Historique et survol .....	15
2.2. Mécanisme de l'interférence à l'ARN.....	16
2.3. Composantes de l'interférence à l'ARN.....	18
2.3.1. Dicer .....	18
2.3.2. siRNA et miRNA .....	20
2.3.3. RISC .....	21
3. PTGS chez les plantes .....	23
3.1. Mécanisme du PTGS chez les plantes.....	23
3.2. Rôles du PTGS chez les plantes .....	24

4.	Hypothèse et objectifs de la recherche .....	26
4.1.	Contexte.....	26
4.2.	Objectifs .....	26
	RÉSULTATS .....	28
	CHAPITRE 1: Interférence à l'ARN lors de l'infection par PLMVd.....	28
1.1.	ARTICLE : The role of viroids in gene silencing: the model case of peach latent mosaic viroid .....	28
	Abstract.....	29
	Résumé .....	30
	Introduction .....	31
	Overview of the post-transcriptional gene silencing mechanism.....	32
	Viroids and PTGS.....	34
	Detection of viroid-associated siRNAs .....	36
	Double-stranded PLMVd hybrids are substrates for Dicer .....	43
	How do viroids overcome gene silencing?.....	44
	Transmission of the silencing signal .....	47
	PTGS as source of many more discoveries .....	47
	Acknowledgements .....	49
	References .....	49
	CHAPITRE 2: Initiation de l'interférence à l'ARN par Dicer chez PLMVd .....	53
2.1.	ARTICLE : Identification of the peach latent mosaic viroid hairpin that potentially activates posttranscriptional gene silencing .....	53
	Abstract.....	54
	Introduction and results .....	54
	Acknowledgements .....	62
	References .....	63

<b>DISCUSSION</b> .....	66
1. INTERFÉRENCE À L'ARN LORS DE L'INFECTION PAR PLMVd .....	66
1.1. Existence du RNAi chez les plants de pêches infectés par PLMVd .....	66
1.2. Régions de PLMVd correspondant aux siRNA.....	67
2. INITIATION DE L'INTERFÉRENCE À L'ARN.....	70
2.1. Conformation de PLMVd induisant l'interférence à l'ARN .....	70
2.2. Domaine de PLMVd responsable du recrutement de Dicer .....	71
2.3. Caractérisation de P11 en tant que substrat de Dicer .....	72
3. Perspectives .....	73
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	78
<b>RÉFÉRENCES</b> .....	79
<b>ANNEXE</b> .....	91
Protocoles expérimentaux utilisés dans les deux articles .....	91

**LISTE DES FIGURES****INTRODUCTION**

Figure 1.	Classification des viroïdes.	6
Figure 2.	Structure secondaire des <i>Pospiviroidae</i> et de PLMVd.	8
Figure 3.	Réplication en cercle roulant.	10
Figure 4.	Différents rôles de la tige P11.	14
Figure 5.	Mécanisme d'interférence à l'ARN.	17

**RÉSULTATS**

1.1. ARTICLE : The role of viroids in gene silencing: the model case of Peach latent mosaic viroid.

Figure 6. Overview of the posttranscriptional gene-silencing mechanism. 33

Figure 7. Peach latent mosaic viroid (PLMVd) rolling-circle replication and schematic secondary structure. 35

Figure 8. Autoradiograms of Northern blot hybridizations with RNA samples isolated from either healthy or Peach latent mosaic viroid (PLMVd)-infected leaves. 39

Figure 9. Analysis of the small interfering RNA (siRNA) composition, using Peach latent mosaic viroid (PLMVd)-derived oligonucleotides as probe. 42

Figure 10. Autoradiogram of a polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of Dicer activity assays performed on a wheat germ extract. 45

2.1. ARTICLE : Identification of the hairpin from peach latent mosaic viroid that activates posttranscriptional gene silencing.

Figure 11. Dicer activity assays performed using a wheat germ extract and various RNA substrates. 56

Figure 12.	Dicer activity assays performed with various PLMVd derived fragments.	59
Figure 13.	Dicer activity assays performed with various transcripts derived from P11 hairpin.	61

## DISCUSSION

Figure 14.	Méthode de clonage des siRNA et résultats obtenus.	69
Figure 15.	Comparaison de la tige P11 de PLMVd avec un pré-miRNA.	75
Figure 16.	Modèle du rôle de l'interférence à l'ARN dans la pathogénicité des viroïdes.	77

LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

A	adénosine
ADN	acide désoxyribonucléique
ADP	adénosine diphosphate
AGO2	Argonaute2
ARN	acide ribonucléique
ARNdb	ARN double-brin ( <i>dsRNA</i> )
ARNm	ARN messenger ( <i>mRNA</i> )
ASBVd	<i>avocado sunblotch viroid</i>
ATP	adénosine triphosphate
bp	base pair
C	cytosine
CCCVd	<i>coconut cadang-cadang viroid</i>
CChMVd	<i>chrysanthemum chlorotic mottle viroid</i>
CEVd	<i>citrus exocortis viroid</i>
dFXR	drosophila fragile X mental retardation protein
EBV	Epstein-Barr virus
G	guanosine
GTP	guanosine triphosphate
h	heure
hh	<i>hammerhead</i>
kDa	kilodalton
M	molaire



mCi	millicurie
min	minute
miRNA	<i>microRNA</i>
mmol	millimole
NEP	polymérase encodée au noyau
nt	nucléotide(s)
PAGE	électrophorèse sur gel de polyacrylamide
PAZ	Piwi/Argonaute/Zwille
PCR	réaction de polymérisation en chaîne
PEP	polymérase encodée au plastide
P <sub>i</sub>	phosphate inorganique
PLMVd	<i>peach latent mosaic viroid</i>
pmole	picomole
PSTVd	<i>potato spindle tuber viroid</i>
PTGS	<i>Post-transcriptional gene silencing</i>
RCC	région centrale conservée (CCR)
RdRP	RNA-dépendant RNA polymerase
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNase	ribonucléase
RNAi	interférence à l'ARN ( <i>RNA interference</i> )
RT	transcription inverse
Rz	ribozyme
siRNA	<i>small interfering RNA</i>

siRNP	small interfering ribonucleo-protein
TD	tige droite
TG	tige gauche
U	uracile
V	région variable
VIGS	<i>Virus-induced gene silencing</i>
XC	xylène cyanol
(+)	identifie la polarité positive
(-)	identifie la polarité négative
μCi	microcurie

## RÉSUMÉ

### **Interférence à l'ARN chez les pêchers infectés par le viroïde de la mosaïque latente du pêcher (PLMVd)**

Par Mme Patricia Landry

Département de biochimie

Université de Sherbrooke

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de

*maître ès sciences* (M.Sc.) en biochimie

23 septembre 2004

Les viroïdes sont de petits ARN circulaires simple-brin qui infectent les plantes supérieures, causant ainsi d'importantes pertes économiques dans le domaine agro-alimentaire. Ces ARN qui ne codent pour aucune protéine ne sont pas encapsidés et se répliquent par un mécanisme en cercle roulant. Même si plus de 30 ans se sont écoulés depuis leur découverte, leur mode de pathogénicité demeure un mystère. Par contre, depuis un peu plus d'une dizaine d'année, un nouveau mécanisme de défense contre des ARN exogènes a fait son apparition. On nomme ce phénomène interférence à l'ARN (RNAi) ou PTGS (post-transcriptional gene silencing) chez les plantes. Il est défini comme un procédé de dégradation d'un ARN de manière séquence-spécifique déclenché par un ARN double-brin. D'abord retrouvé chez les plantes, il s'est avéré présent chez plusieurs autres organismes, dont les mammifères. Des petits fragments d'ARN de 20-25 nucléotides

(siRNA) caractéristiques à ce phénomène ont été identifiés chez des plantes infectées par divers virus ainsi que par des viroïdes. Le but de ce travail était de démontrer et de mieux comprendre l'implication du viroïde de la mosaïque latente du pêcher (PLMVd) dans le phénomène d'interférence à l'ARN.

Dans un premier temps, nous avons démontré la capacité de PLMVd à induire le phénomène d'interférence à l'ARN chez les pêcheurs. Les résultats obtenus par buvardage de type Northern ont mis en évidence la présence des petits fragments caractéristiques d'ARN de 20-25 nucléotides, complémentaires aux deux polarités de PLMVd. Ces fragments ont été retrouvés dans les cultivars infectés mais non dans les cultivars sains, ce qui indique que l'infection de PLMVd déclenche le mécanisme chez la plante. Les siRNA retrouvés forment une population qui n'est pas restreinte à une seule région de PLMVd, mais qui couvre plutôt le viroïde en entier, et ce pour différents variants.

Dans un second temps, nous nous sommes attardés à l'étape d'initiation du phénomène d'interférence à l'ARN, soit le clivage d'un ARN double-brin par la ribonucléase de type III Dicer. Un essai, basé sur l'utilisation d'extrait de germe de blé, a permis de démontrer qu'un ARN double-brin formé par l'hybridation des deux polarités de PLMVd est clivé en siRNA. Les monomères de PLMVd, tant de polarité positive que négative, sont également clivés par Dicer. Comme les monomères de PLMVd sont des ARN hautement structurés et thermodynamiquement presque aussi stables que le double-brin formé par les deux polarités, il est fort probable qu'ils soient les substrats de Dicer dans la cellule. Plus spécifiquement, la tige P11 a été montrée comme responsable du recrutement de Dicer et les éléments minimum nécessaires à la coupure identifiés.

Contrairement à ce qui est répandu dans la littérature, Dicer ne requiert pas un ARN parfaitement double-brin.

En résumé, ces résultats contribuent à l'élargissement des connaissances se rapportant aux viroïdes et au phénomène d'interférence à l'ARN. De plus, ils apportent un regard nouveau en ce qui a trait à l'interaction de Dicer avec son substrat ARN double-brin.

**Mots clés :** PLMVd, interférence à l'ARN, Dicer, siRNA

## INTRODUCTION

### 1. LES VIROÏDES

#### 1.1. Les viroïdes (généralités)

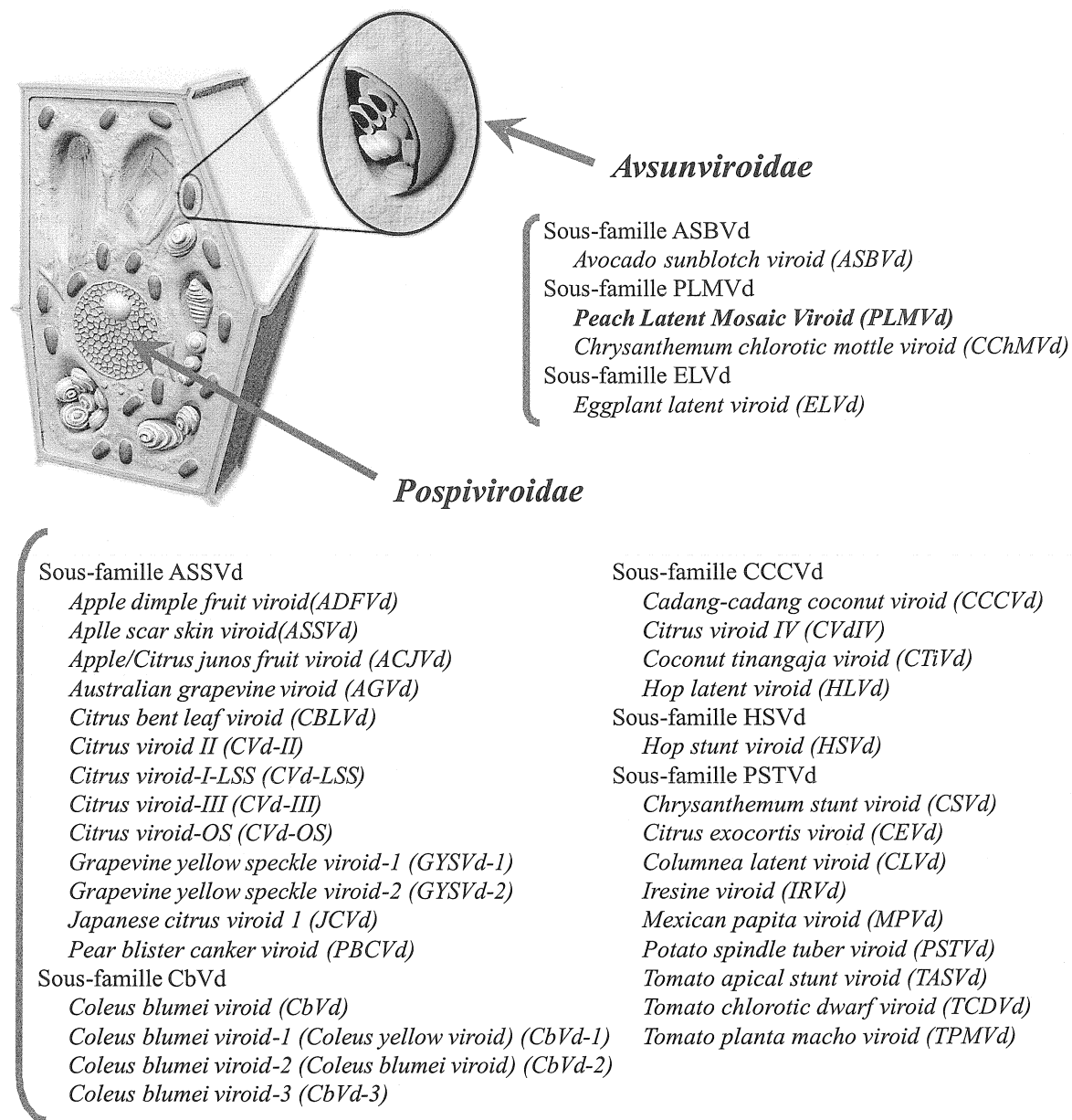
La grande simplicité des génomes viraux a longtemps fait penser que les virus étaient la forme la plus simple d'organisme pouvant exister. La découverte au début des années 1970 que l'agent causal d'une maladie retrouvée chez la pomme de terre était une petite molécule circulaire d'ARN simple-brin d'environ 360 nucléotides a rapidement relégué cette croyance aux oubliettes (Diener, 1971). En plus de cette grande simplicité génomique, ces ARN diffèrent des virus par le fait qu'ils ne sont pas encapsidés dans une enveloppe protéique, c'est-à-dire qu'ils sont détectés sous forme d'ARN libre (Diener et Raymer, 1967). Le terme viroïde fut donc proposé pour caractériser ce type d'ARN infectieux. Jusqu'à ce jour, 35 espèces différentes de viroïdes, ainsi qu'un nombre élevé de variants de séquence de ces ARN dont la longueur varie entre 120-463 nucléotides, ont été isolées (Pelchat et al. 2003). Ces ARN sont caractérisés dans la majorité des cas par une forte structure secondaire en forme de tige (Diener, 1993). Pour l'instant, les variétés de plantes susceptibles d'être infectées par ce type d'agent pathogène semblent relativement restreintes à la trentaine d'espèces de végétaux à partir desquelles les différentes souches de viroïdes ont été isolées. Par contre, il semblerait que l'éventail d'hôtes potentiels de ce type d'ARN pourrait être beaucoup plus répandu que les quelques exemples connus jusqu'à maintenant, puisque de nouvelles espèces de viroïdes sont découvertes régulièrement.

Ceux-ci semblent pour le moment restreints au monde végétal puisque la présence d'un tel type d'ARN chez les animaux n'a jamais été démontrée.

## 1.2. Classification des viroïdes

Les différentes espèces de viroïdes sont classées en deux grandes familles principales, soit la famille des *Pospiviroidae* (aussi appelée groupe B) et celle des *Avsunviroidae* (aussi appelée groupe A) (figure 1). La grande majorité des viroïdes répertoriés à ce jour appartient à la première famille, soit 31 espèces, alors que seulement quatre espèces appartiennent à la seconde (Pelchat et al. 2003). Ce système de classification est basé principalement sur la présence ou l'absence des cinq domaines caractéristiques aux viroïdes de la famille des *Pospiviroidae*. Ces domaines sont la boucle terminale gauche et droite (TG et TD respectivement), la région de pathogenèse (P), la région variable (V) et la région centrale conservée (RCC) (figure 2A) (revue par Diener, 1993). L'identité de cette dernière région permet le sous-classement des différentes espèces en 5 sous-familles. De plus, les membres de cette famille se répliquent et s'accumulent au niveau nucléaire.

Les viroïdes de la famille des *Avsunviroidae* sont caractérisés par la présence de séquences catalytiques *hammerhead* (Flores et al. 2000), ne contiennent pas de RCC et se répliquent et s'accumulent dans les chloroplastes. Les quatre différentes espèces appartenant à cette famille sont classées en trois sous-familles (avsunviroïde, elaviroïde et pelamoviroïde) sur la base de caractéristiques physiques, telles leur structure secondaire, le type de structure *hammerhead* utilisée et le contenu en G+C. ASBVd est le seul membre de la sous-famille des avsunviroïdes, ELVd est le seul membre de la sous-famille des



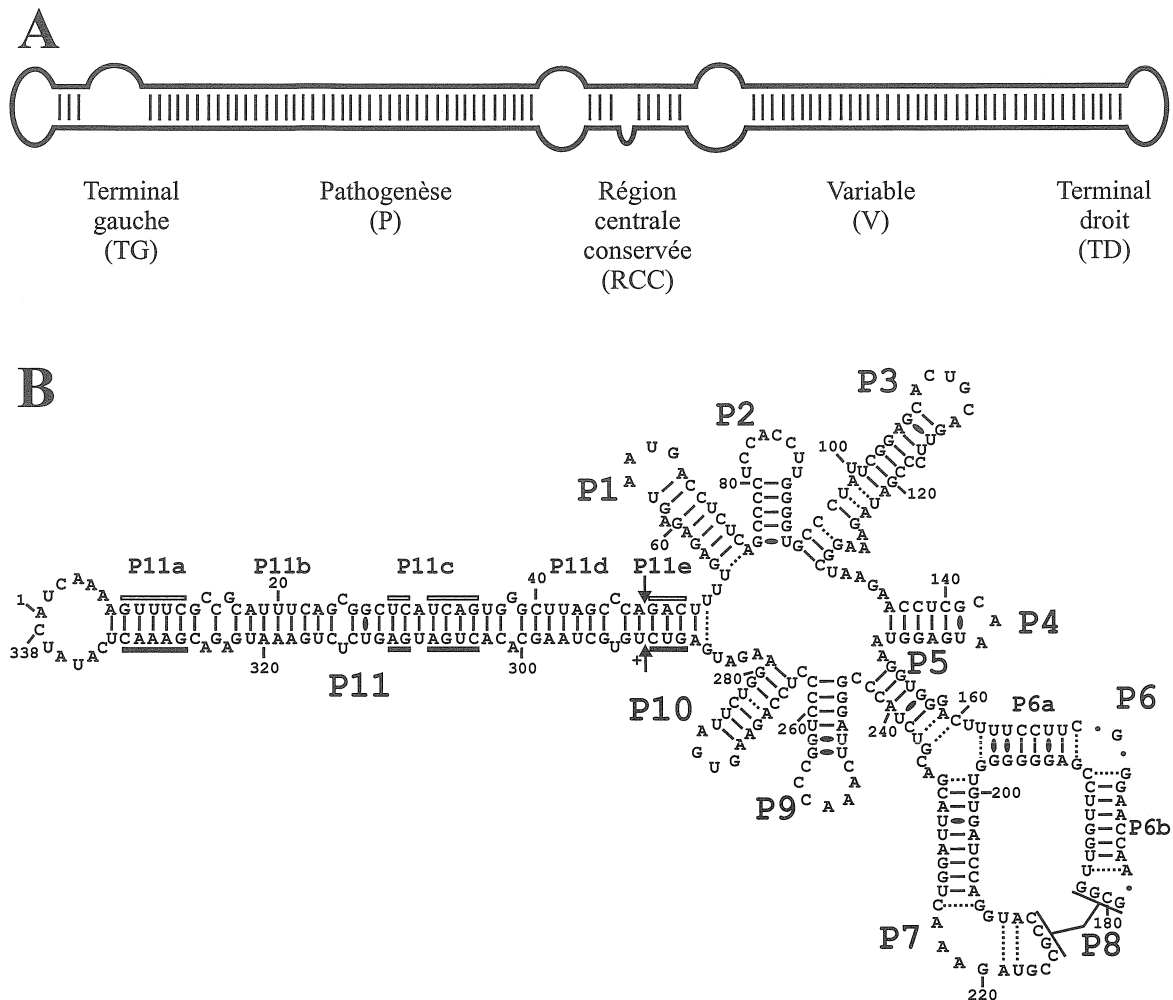
**Figure 1. Classification des viroïdes.** Les viroïdes sont divisés en deux grandes familles qui sont elles-mêmes subdivisées en plusieurs sous-familles. Les viroïdes de la famille des *Avsunviroidae* sont localisés au niveau du chloroplaste tandis que les viroïdes de la famille des *Pospiviroidae* sont localisés au niveau du noyau.



elaviroïdes alors que PLMVd et CChMVd appartiennent aux pelamoviroïdes. La forte structure secondaire branchée de ces derniers, comparativement à la structure en forme de tige des autres viroïdes, est responsable de leur insolubilité dans une solution de chlorure de lithium 2M (Navarro et Florès 1997). La structure secondaire de PLMVd a d'ailleurs été déterminée à l'aide d'essais de coupures avec diverses nucléases ainsi que par des analyses de covariation de différents variants (figure 2B) (Bussière et al. 2000, Pelchat et al. 2000). De plus, des résultats ont permis de démontrer des différences majeures dans la localisation cellulaire et dans les mécanismes de réplication utilisés par les membres des deux familles (Bussière et al. 1999).

### 1.3. Localisation cellulaire des viroïdes

Les toutes premières évidences de localisation cellulaire des viroïdes ont été rapportées il y a 15 ans grâce à des études de fractionnement cellulaire de tissus de tomates infectés par PSTVd (Harders et al. 1989). Ces études ont révélé que ce dernier s'accumulait essentiellement dans le noyau, plus précisément dans le nucléole. Par la suite, la localisation au nucléole de plusieurs membres de la famille des *Pospiviroidae* a été confirmée par hybridation *in situ* et par microscopie confocale et électronique (Bonfiglioli et al. 1996, Qi et Ding 2003). Ces mêmes techniques ont permis de démontrer que les membres de la famille des *Avsunviroidae* sont principalement localisés dans les chloroplastes de leurs hôtes (Lima et al. 1994; Bussière et al. 1999). En conséquence, il a été suggéré que la localisation cellulaire des viroïdes constituait une différence majeure permettant de classer ces espèces d'agents pathogènes. Il va de soi que cette localisation



**Figure 2. Structure secondaire des *Pospiviroidae* et de PLMVd.** (A) Représentation schématique de la structure secondaire en forme de tige retrouvée chez les viroïdes de la famille des *Pospiviroidae*. Les cinq régions caractéristiques TG, P, RCC, V et TD sont indiquées. (B) Séquence primaire et structure secondaire de PLMVd telle que déterminée par essais de coupures aux nucléases et par covariation de séquences. Les paires de bases GU de type Wobble sont représentées par des cercles noirs, tandis que les paires de bases Watson-Crick apparaissant instables ou pour lesquelles le simple- ou double-brin peuvent coexister sont illustrées par des lignes pointillées. Les rectangles vides et pleins représentent les séquences conservées des motifs *hammerhead* pour la polarité négative et positive, respectivement. Les flèches indiquent les sites de coupures.

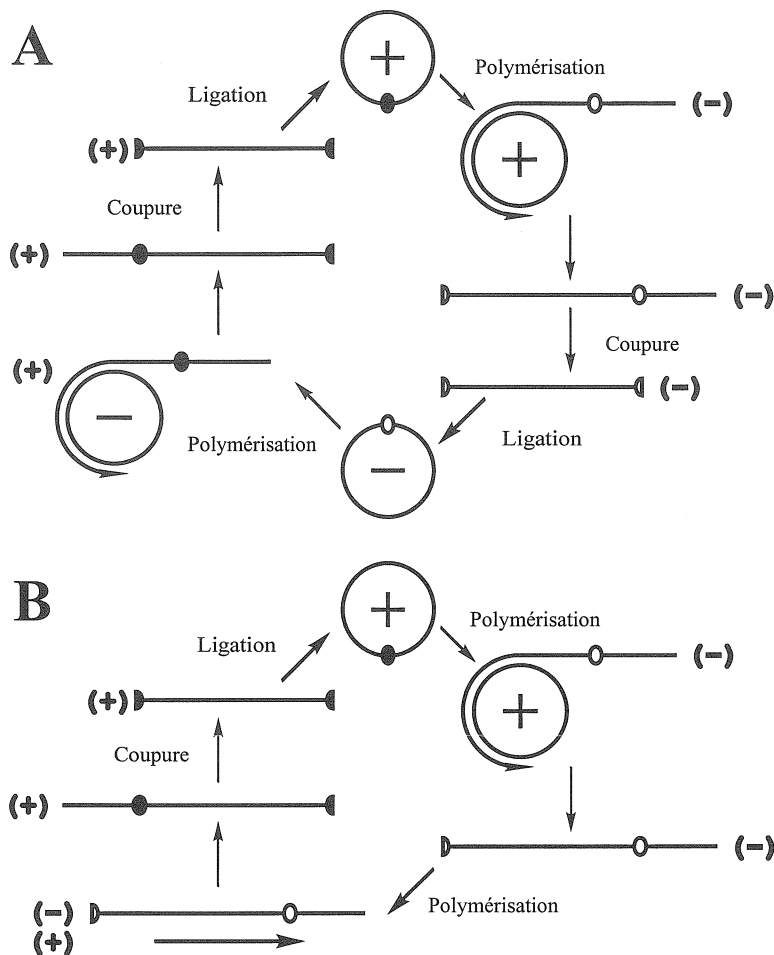
différentielle aura d'importantes répercussions sur les mécanismes utilisés durant les différentes étapes du cycle de vie de ces organismes.

#### 1.4. Réplication des viroïdes

##### 1.4.1. Mécanismes de réplication

La détection d'ARN dimériques, trimériques et de plus grands oligomères dans les tissus infectés par des viroïdes a été la première évidence démontrant l'utilisation d'un mécanisme de réplication ADN-indépendant en cercle roulant (figure 3) (Branch et Robertson 1984; Grill et Semancik 1978). Ce mécanisme de réplication est maintenant accepté, même si certaines étapes diffèrent d'un viroïde à l'autre. Par exemple, les viroïdes appartenant à la famille des *Avsunviroidae* se répliquent par un mécanisme en cercle roulant symétrique (figure 3A) (Bussière et al. 1999; Daros et al. 1994). Dans ce type de réplication, les copies monomériques circulaires de polarité positive, arbitrairement assignée, sont copiées en un brin multimérique de polarité négative. Ce dernier est ensuite clivé en monomères linéaires qui sont par la suite recircularisés afin de donner des monomères circulaires de polarité négative. Les mêmes trois étapes de polymérisation, coupure et ligation sont alors répétées afin de produire la progéniture du viroïde.

Les viroïdes de la famille des *Pospiviroidae* utilisent quant à eux un mécanisme en cercle roulant asymétrique (figure 3B) (Branch et Robertson 1981; Owens et Diener 1982; Branch et al. 1988; Feldstein et al. 1998). Dans ce cas-ci, le brin multimérique de polarité négative est directement répliqué en un brin multimérique de polarité positive. Ce dernier



**Figure 3. Réplication en cercle roulant.** Une molécule d'ARN circulaire à laquelle la polarité positive a été arbitrairement assignée, sert de matrice pour la synthèse d'ARN multimériques complémentaires de polarité négative. (A) Dans le cycle symétrique, ce multimère est clivé en monomères par un motif d'ARN autocatalytique *hammerhead*. Les monomères de polarité négative vont être ligués afin de servir à leur tour de matrice pour la synthèse de multimères de polarité positive, qui subiront ensuite les étapes de coupure et de ligation. (B) Dans le cycle asymétrique, les multimères d'ARN de polarité négative sont directement utilisés pour la synthèse des multimères de polarité positive. Ces derniers sont ensuite coupés et les monomères sont circularisés. La polarité positive et négative des différents brins est indiquée par un signe (+) ou (-) respectivement. Les sites de coupures sont représentés par des cercles alors que la flèche horizontale indique le sens de synthèse du brin complémentaire.

est ensuite coupé et les monomères recircularisés comme précédemment afin de produire la progéniture. La différence majeure entre ces deux mécanismes de réplication est donc la présence des intermédiaires monomériques linéaires et circulaires de polarité négative dans le cas du mécanisme de réplication symétrique.

#### 1.4.2. Étape de polymérisation

La démonstration que les intermédiaires de réplication et les transcrits matures des viroïdes se concentrent dans le même compartiment cellulaire supporte l'idée que le site de localisation de ces viroïdes correspond à leur site de réplication (Spiesmacher et al. 1983; Navarro et al. 1999). Dans le cas des viroïdes appartenant à la famille des *Pospiviroidae*, il a été démontré que l'étape de polymérisation est inhibée par de faibles concentrations d' $\alpha$ -amanitine, un inhibiteur connu de l'ARN polymérase II ADN-dépendante (Mühlbach et Sängler 1979; Florès et Semancik 1982; Schindler et Mülbach 1992; Rackwitz et al. 1981). L'implication de cette enzyme dans l'étape de polymérisation des viroïdes a reçu une preuve additionnelle avec la démonstration que CEVd, un membre de la même famille que PSTVd, est associé *in vivo* avec la large sous-unité de l'ARN polymérase II (Warrilow et Symons 1999).

L'absence de ce type de polymérase dans le chloroplaste et l'observation que l'étape de polymérisation des viroïdes de la famille des *Avsunviroidae* est insensible à la présence d' $\alpha$ -amanitine (Marcos et Florès 1992) impliquent nécessairement l'utilisation d'une polymérase de nature différente de celle utilisée par les *Pospiviroidae*. Le chloroplaste possède deux activités ARN polymérase ADN-dépendante majeures. La première

polymérase est encodée par le génome chloroplastique (PEP : *plastid-encoded polymerase*) et possède une structure similaire à la polymérase retrouvée chez *Escherichia coli*, une enzyme à plusieurs sous-unités. La seconde polymérase (NEP : *nuclear-encoded polymerase*) est encodée par le génome nucléaire et ne possède qu'une seule sous-unité.

Des expériences de répllication *in vitro* de ASBVd et une analyse des séquences entourant le site d'initiation suggèrent que la candidate la plus probable pour la répllication de ce viroïde serait la NEP (Navarro et al. 2000, Navarro et Flores 2000). Par contre, la PEP serait vraisemblablement l'enzyme utilisée par PLMVd pour sa répllication (Pelchat et al. 2001). La caractérisation *in vitro* d'un promoteur ARN pour l'ARN polymérase ADN-dépendante de *E. coli* a permis d'établir le domaine de PLMVd nécessaire à l'initiation spécifique de la transcription. Ce domaine est situé dans la portion terminale gauche de la tige P11, dont la structure plutôt que la séquence primaire est importante pour la transcription (figure 4A) (Pelchat et al. 2002).

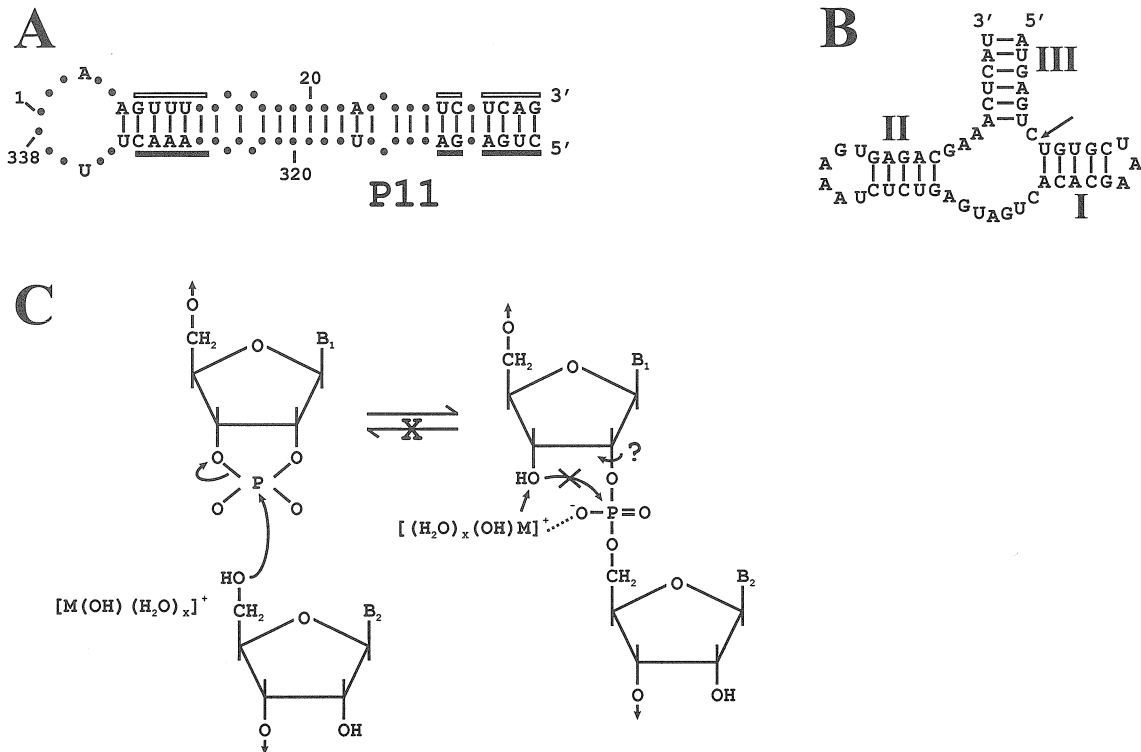
#### 1.4.3. Étape de coupure et de circularisation

Chez la famille les *Pospiviroidae*, les étapes de clivage des oligomères d'ARN et leur circularisation sont assumées par des ribonucléases et ARN ligases encodées par l'hôte. Par exemple, il a été prouvé que la ribonucléase T1 peut catalyser *in vitro* la formation de monomères circulaires de PSTVd à partir de transcrits multimériques linéaires (Tsagris et al. 1991). De plus, d'autres résultats démontrent que l'ARN ligase de germe de blé permet la circularisation des transcrits monomériques linéaires de différents viroïdes (Lafontaine et al. 1995; Branch et al. 1982; Konarska et al. 1982; Konarska et al. 1981). Il a

également été démontré que des transcrits de PSTVd étaient clivés et ligés enzymatiquement dans des extraits provenant de suspensions cellulaires de plants de pomme de terre non-infectés (Baumstark et Riesner 1995). Bien entendu, les viroïdes possèdent certains déterminants moléculaires, comme par exemple la conformation adoptée par le fragment oligomérique, qui permettent d'obtenir la spécificité du processus de maturation.

La présence de motifs autocatalytiques chez les viroïdes de la famille des *Avsunviroidae* et leur localisation chloroplastique suggèrent fortement que des mécanismes distincts de ceux mentionnés précédemment modulent les étapes de coupure et de ligation de ces organismes. En fait, certaines évidences supportent l'hypothèse que la structure *hammerhead* serait responsable, pour tous les membres de cette famille, de la coupure *in vivo* des brins multimériques (figure 4B). Une analyse des séquences formant les structures catalytiques a permis d'identifier, dans plusieurs variants de PLMVd et CChMVd, des mutations compensatoires et/ou de la covariation de séquence permettant de préserver la stabilité de cette structure (Hernandez et Florès 1992; Navarro et Flores 1997; Pelchat et al. 2000). Cette observation suggère donc l'importance de conserver l'intégrité de cette structure, supportant ainsi l'hypothèse que celle-ci joue un rôle primordial dans le cycle de vie de ces organismes. En ce qui concerne l'étape de circularisation des brins monomériques, des études effectuées suggèrent qu'il s'agirait du résultat d'une autoligation, donc un processus non-enzymatique (figure 4C) (Côté et al. 2001).

En définitive, les viroïdes sont des molécules remarquables pour l'étude structure-fonction des ARN. PLMVd constitue un exemple particulièrement intéressant puisque sa réplication est presque totalement réalisée grâce à des composantes ARN. Une ARN



**Figure 4. Différents rôles de la tige P11.** (A) Le domaine P11, pour agir comme promoteur, doit adopter une structure en épingle à cheveu et posséder une paire de base avec une uridine ( $U_{332}$ ) comme premier nucléotide en 5' adjacent à la boucle. Les nucléotides représentés sont conservés à travers 93 séquences de PLMVD des 2 polarités. Les points sont les nucléotides non-conservés. Les séquences consensus des *hammerhead* sont indiquées par les rectangles vides ou pleins, pour la polarité négative ou positive, respectivement. (B) Séquence et structure secondaire du motif *hammerhead* de polarité positive, situé dans la tige P11. Les tiges sont numérotées de I à III. La flèche indique le site de coupure. (C) Autoligation. Suite à la réaction d'autocoupeure, l'attaque de l'extrémité 5'-hydroxyle sur le 2'3'-phosphocyclique peut hydrolyser le lien 3', résultant ainsi en la formation d'une liaison 2',5'. Dans ce cas, le changement conformationnel nécessaire à la réaction de coupure ne serait pas possible et la réaction inverse est donc inhibée.



polymérase doit intervenir pour la synthèse des multimères, mais les étapes de coupure et de circularisation sont exécutées par un motif d'ARN autocatalytique et un mécanisme d'autoligation, respectivement. Plus encore, ces génomes d'ARN constituent certainement un modèle unique d'évolution puisqu'ils sont considérés comme des fossiles d'un monde pré-cellulaire.

## 2. INTERFÉRENCE À L'ARN

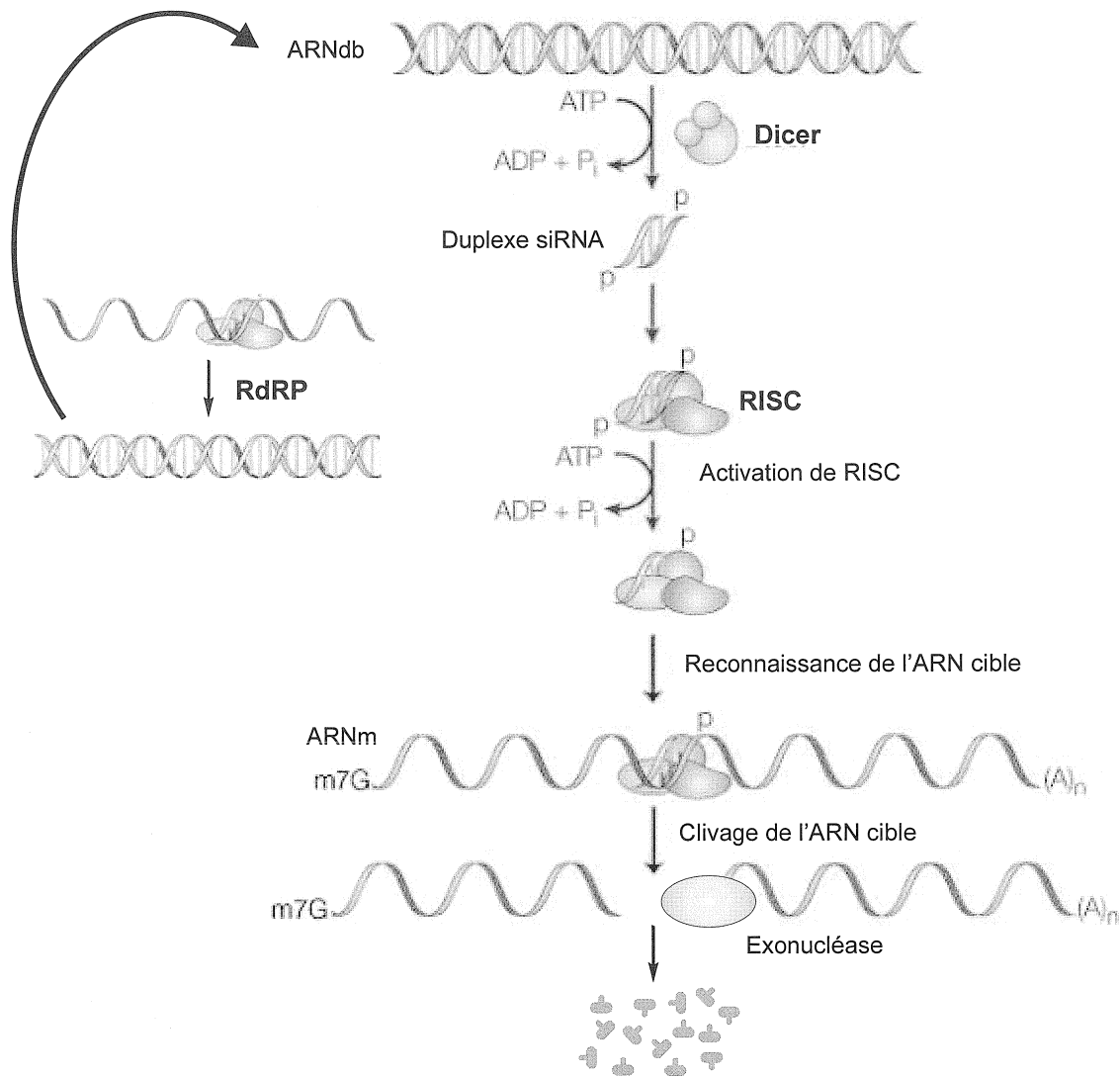
### 2.1. Historique et survol

Le début des années 1990 a vu naître un phénomène qui s'avèrera la nouvelle révolution en biologie moléculaire. Des chercheurs travaillant avec des pétunias transgéniques sont à l'origine de cette découverte. Leur but était d'étudier l'effet de la surexpression de gènes impliqués dans la pigmentation des pétunias. Dans la plupart des plants transformés, on ne retrouvait aucun phénotype mesurable. Cependant, surprise fut de constater que dans environ 25% des plants transgéniques, on observait une réduction de la pigmentation, ce qui est complètement à l'opposé des résultats attendus. De plus, cette atténuation de la coloration était accompagnée par une réduction drastique de l'expression des gènes étudiés (van der Krol et al. 1990). Par la suite, ce phénomène s'est avéré présent chez de nombreux organismes dont les moisissures (Romano et Macino 1992), *Caenorhabditis elegans* (Fire et al. 1998), les insectes (Kennerdell et Carthew 1998), la grenouille (Oelgeschlager et al. 2000) et les mammifères dont la souris et l'humain (Svoboda et al. 2000, Chiu et Rana 2002). Pour identifier ce phénomène, les termes interférence à l'ARN (RNAi) ou PTGS (post-transcriptional gene silencing) furent adoptés.

Ce nom réfère au fait qu'il s'agit d'un processus de dégradation d'un ARN de manière séquence-spécifique déclenché par un ARN double-brin. La fonction naturelle du RNAi n'est pas très bien connue mais apparaît comme un moyen de protection du génome contre des invasions par des éléments génétiques mobiles tels des transposons et des virus (Jensen et al. 1999, Ratcliff et al. 1999, Tabara et al. 1999). L'interférence à l'ARN semblerait également jouer un rôle au niveau du développement, de la répression traductionnelle, de la méthylation de l'ADN et de la modification de la chromatine (revue par Cerutti 2003). Bref, beaucoup de travail reste encore à faire pour élucider les différents aspects de ce phénomène.

## **2.2. Mécanisme de l'interférence à l'ARN**

Bien que plusieurs aspects mécanistiques de l'interférence à l'ARN demeurent obscurs, des analyses biochimiques effectuées *in vitro* à partir de lysats d'embryons de drosophile (Tuschl et al. 1999) ou d'extraits de germe de blé (Tang et al. 2003) ont permis de dévoiler les cofacteurs nucléotidiques, les changements conformationnels et l'identité des protéines impliquées dans ce mécanisme. L'élément déclencheur de tout le processus est un ARN double-brin exogène (virus, transposon) ou endogène (ARNm) qui est reconnu et clivé par une enzyme de la famille des ribonucléases de type III, appelée Dicer (figure 5). Cette étape de coupure est ATP-dépendante et mène à la formation de petits fragments d'ARN de 21-25 nucléotides (siRNA) (Zamore et al. 2000). Ces fragments sont caractéristiques de la coupure par cette enzyme et, par conséquent, du phénomène d'interférence à l'ARN. Dans un deuxième temps, les duplexes de siRNA sont incorporés



**Figure 5. Mécanisme d'interférence à l'ARN.** Un ARN double-brin (ARNdb) est d'abord reconnu et clivé par l'endoribonucléase de type III Dicer, pour former des petits fragments d'ARN (siRNA) de 21-25 nucléotides. Les duplexes de siRNA sont ensuite incorporés dans un complexe multiprotéique nommé RISC, qui subit une étape d'activation ATP-dépendante, provoquant entre autre le déroulement des siRNA. Les siRNA simple-brin sont alors utilisés comme guides pour reconnaître les ARN complémentaires. Après l'appariement du siRNA à son ARN cible, ce dernier est clivé de façon endonucléolytique, puis dégradé par des exonucléases. Chez les plantes, les siRNA peuvent également servir d'amorce à une ARN polymérase ARN-dépendante (RdRP) qui synthétise un deuxième brin d'ARN. Cet ARN peut, à son tour, servir de substrat à Dicer. Cela crée donc un phénomène d'amplification.

dans un complexe multiprotéique connu sous le nom de RISC (*RNA-induced silencing complex*) (Hammond et al. 2000). Il est proposé que le complexe RISC subit une étape d'activation ATP-dépendante qui résulte au déroulement des duplexes de siRNA (Nykänen et al. 2001). Le complexe RISC activé utilise les siRNA simple-brins comme guide afin d'identifier les ARN complémentaires. Une endoribonucléase de nature encore inconnue clive alors l'ARN cible dans la région correspondante au centre du siRNA guide. Finalement, l'ARN ainsi clivé est dégradé par des exoribonucléases (Hammond et al. 2000). La question de la localisation cellulaire pour la production des siRNA et la dégradation de l'ARN cible n'est pas encore complètement élucidée. Toutefois, la majorité des preuves accumulées jusqu'à présent convergent vers une localisation cytosolique de l'interférence à l'ARN. Par exemple, dans des ovocytes de souris et de drosophile, des ARNm maternels cytoplasmiques ont été ciblés par interférence à l'ARN (Kennerdell et Carthew 1998, Svoboda et al. 2000). En somme, ce mécanisme de base est fort probablement très semblable dans les différentes espèces où il a lieu puisque des protéines homologues ont été retrouvées chez ces espèces.

### **2.3. Composantes de l'interférence à l'ARN**

#### **2.3.1. Dicer**

Le modèle accepté de l'interférence à l'ARN implique qu'un ARN double-brin est clivé pour produire des siRNA. Ce concept a d'abord été démontré grâce à des études

menées en utilisant des extraits d'embryons de drosophile qui contenaient une activité capable de scinder de longs ARN double-brins en petits fragments d'environ 22 nucléotides (Zamore et al. 2000). L'analyse de ces derniers a permis de constater qu'ils étaient double-brins et arboraient un phosphate à leur extrémité 5', alors qu'en 3' on retrouvait un groupement hydroxyle ainsi que deux nucléotides cohésifs (Elbashir et al. 2001). Ces caractéristiques sont en fait la signature typique des endoribonucléases de type III, qui peuvent être divisées en trois classes, selon la nature des domaines présents. L'enzyme responsable du clivage des ARN double-brins lors de l'initiation de l'interférence à l'ARN appartient à la troisième classe, soit les Dicer (Bernstein et al. 2001). Cette affirmation a été appuyée par des approches génétiques et biochimiques chez les nématodes et les cellules humaines, qui ont établi la nécessité de Dicer pour le RNAi (Grishok et al. 2001, Hutvagner et al. 2001, Knight et Bass 2001). La recherche de similarités à travers les génomes de diverses espèces comme les nématodes, les levures à fission, les plantes, les insectes et les mammifères a révélé la présence de cadres de lecture ouverts semblant coder pour des ribonucléases de type III comportant une structure inhabituelle (Wilson et al. 1994, Rotondo et al. 1995, Jacobsen et al. 1999, Bernstein et al. 2001, Provost et al. 2002, Nicholson et Nicholson 2002). Une troisième classe leur fut donc assignée. Ces protéines ont une taille exceptionnellement grande (>1000 acides aminés) pour la famille des ribonucléases III. Elles possèdent un motif de liaison à l'ARN double-brin à leur extrémité C-terminale, immédiatement adjacent à deux répétitions en tandem des domaines catalytiques des ribonucléases III (Rotondo et Frendewey 1996). De plus, elles détiennent une longue extension N-terminale qui contient un motif ARN hélicase DExH/DEAH et un domaine PAZ, dont le rôle demeure indéterminé (Cerutti et al. 2000). Elles peuvent lier et

cliver un ARN double-brin indépendamment de sa séquence nucléotidique. Une étude de cristallographie a d'ailleurs permis de faire la lumière sur le mécanisme de clivage des ARN double-brins par les ribonucléases III (Blaszczyk et al. 2001). Par contre, un minimum de 21 paires de bases est requis pour obtenir une activité (Elbashir et al. 2001). En somme, beaucoup de travail reste à effectuer afin de mieux comprendre le fonctionnement de cette enzyme.

### 2.3.2. siRNA et miRNA

Le clivage d'un ARN double-brin par Dicer va mener à la formation de petits fragments d'ARN de ~21-25 nucléotides portant la signature de cette enzyme. Cependant, deux types de petits ARN peuvent être produits : les siRNA et les microRNA (miRNA). Des distinctions importantes peuvent être faites en ce qui a trait à leur origine, leur phylogénie et le type de gènes qu'ils vont atténuer (Bartel D. et Bartel D.P. 2003). Premièrement, les miRNA dérivent de *loci* génomiques distincts des gènes qu'ils vont reconnaître, tandis que les siRNA dérivent la plupart du temps d'ARNm, de transposons, de virus ou d'ADN hétérochromatique. Deuxièmement, les miRNA sont obtenus à partir de transcrits qui vont adopter une structure en épingle à cheveux, tandis que les siRNA sont obtenus à partir de longs duplexes d'ARN. Troisièmement, un précurseur de miRNA en tige-boucle va générer un seul miRNA, tandis que chaque précurseur de siRNA va générer plusieurs siRNA différents. Quatrièmement, les séquences des miRNA sont pratiquement toujours conservées dans des organismes semblables, tandis que les siRNA le sont rarement. Bien que beaucoup de choses restent à découvrir à propos des cibles biologiques

des miRNA et des siRNA, une cinquième distinction peut être faite entre ces deux classes d'ARN. Les siRNA ont typiquement tendance à « s'auto-atténuer », c'est-à-dire qu'ils spécifient l'atténuation des mêmes *locus* dont ils proviennent. En revanche, les miRNA sont produits par des gènes très différents de ceux dont ils vont spécifier l'atténuation (revue par Bartel 2004). On a aussi longtemps cru que les siRNA et les miRNA résidaient dans des complexes différents et détenaient des fonctions complètement distinctes. Des études récentes ont cependant démontrées qu'en réalité, ces ARN pouvaient avoir des rôles équivalents. Il semble que lorsque la complémentarité entre les petits ARN et leur ARN cible est partielle, le mécanisme va être dirigé vers une répression de la traduction. Par contre, si l'homologie est notable, l'ARNm cible va être clivé (Hutvagner et Zamore 2002, Doench et al. 2003).

### 2.3.3. RISC

Lors de la seconde étape du mécanisme d'interférence à l'ARN, un complexe protéine-ARN nommé RISC, dont le but est la reconnaissance et la destruction d'un ARNm cible, est assemblé. La composante ARN fut la première sous-unité du RISC identifiée : il s'agissait d'un siRNA. Des protéines associées au complexe RISC comme VIG, dFXR, TSN et Ago2 ont également été identifiées, bien que leur rôle demeure obscur (Hammond et al. 2001; Caudy et al. 2002, 2003; Ishizuka et al. 2002). Pour être fonctionnel, le RISC doit subir une étape d'activation. Le complexe RISC est d'abord assemblé sous la forme d'un précurseur de ~360 kDa. Il devient par la suite activé par l'addition d'ATP, pour former un complexe de ~100 kDa ayant la capacité de cliver son substrat, un ARNm

(Nykanen et al. 2001). Le clivage semble endonucléolytique et se produit uniquement dans la région homologue au siRNA, d'où la spécificité du phénomène. De plus, des recherches effectuées avec un complexe RISC purifié à partir de cellules S2 de drosophile suggèrent fortement la présence d'une exonucléase dans le complexe même, puisqu'aucun intermédiaire de clivage n'a jamais été observé. Une étude récente chez la drosophile a permis d'établir un modèle pour l'assemblage du RISC, où trois complexes distincts, soit R1, R2 et R3 sont formés (Pham et al. 2004). De ces complexes, R1 est le premier à s'assembler. Sa formation ne requiert pas d'ATP et il contient Dicer-2, qui lie directement les siRNA. En fait, R1 correspond au complexe siRNP de ~360 kDa identifié antérieurement. Il contient le duplexe de siRNA et est inactif en ce qui a trait à l'activité de clivage de l'ARNm cible (Nykanen et al. 2001). La fonction du complexe R2 est par contre moins claire. Il pourrait s'agir d'un intermédiaire entre R1 et R3 où se produirait notamment le déroulement du duplexe de siRNA, menant ainsi à la formation de R3. Finalement, la formation du complexe R3 est significativement augmentée par une incubation en présence d'ATP, une exigence pour l'obtention d'un RISC activé. Le complexe R3 a une taille considérable (80S), renferme les composantes protéiques identifiées auparavant et les siRNA qui lui sont associés sont simple-brin. Enfin, il possède la capacité de lier et cliver un ARNm cible (Pham et al. 2004).



### 3. PTGS chez les plantes

#### 3.1. Mécanisme du PTGS chez les plantes

Bien que le schéma général du mécanisme d'interférence à l'ARN soit très semblable entre les plantes et les autres organismes, il n'en demeure pas moins que certains points diffèrent. Comme dans tous les cas de RNAi, un ARN double-brin déclenche la cascade enzymatique en étant reconnu et clivé par Dicer. Cependant, contrairement aux embryons de drosophile ou aux cellules de mammifères, les plantes convertissent l'ARN double-brin en deux classes distinctes de siRNA, soit les courts (21-22 nucléotides) et les longs (24-25 nucléotides) siRNA (Hamilton et al. 2002). En plus de leur divergence de taille, ces deux classes de siRNA occupent des fonctions différentes. Les siRNA de 21-22 nucléotides guident le complexe RISC vers l'ARN cible à atténuer (Elbashir et al. 2001a), tandis que les siRNA de 24-25 nucléotides semblent associés à la méthylation de l'ADN et à la propagation systémique de l'atténuation (Hamilton et al. 2000). De plus, chaque classe de siRNA va être générée par le clivage endonucléolytique ATP-dépendant d'un ARN double-brin par différents Dicer (Tang et al. 2003). En effet, les génomes d'*Arabidopsis* et du riz encodent au moins quatre Dicer différents chacun. Les miRNA, des ARN non-codants de 20-24 nucléotides, sont un autre type de petits ARN retrouvés chez les plantes. Comme leurs homologues chez les animaux, les miRNA des plantes sont générés par Dicer à partir d'un précurseur en tige-boucle encodé par le génome. Par contre, contrairement à ceux des animaux, les miRNA des plantes comportent un degré d'homologie beaucoup plus important envers leur ARNm cible (Llave et al. 2002a, Reinhart et al. 2002, Rhoades et al.

2002). Finalement, tous ces petits ARN sont incorporés dans un complexe multiprotéique RISC semblable à celui retrouvé chez d'autres espèces, pour guider la dégradation de l'ARNm cible.

Une autre caractéristique du PTGS chez les plantes, mais aussi chez les nématodes, est la présence d'une ARN polymérase ARN-dépendante (RdRP) (Fire et al. 1998). Cette dernière permet la synthèse d'ARN double-brin à partir d'un ARN simple-brin et d'un siRNA qui agit comme amorce. L'ARN double-brin produit peut alors subir le clivage par Dicer et engendrer de nouveaux siRNA, créant ainsi une amplification du phénomène. Cela dit, seulement quelques molécules d'ARN double-brin sont requises pour la dégradation d'une population d'ARN beaucoup plus imposante.

### **3.2. Rôles du PTGS chez les plantes**

Depuis la découverte de l'interférence à l'ARN chez les plantes, de nombreux travaux ont révélés que ce phénomène était en fait impliqué dans plusieurs processus. Des mutations menant à l'inactivation des composantes de la machinerie du PTGS ont affecté au moins trois procédés distincts : la réponse contre les virus, la mobilité des transposons et le développement de l'organisme (Waterhouse et al. 2001). Le PTGS a tout d'abord été reconnu comme un système de défense naturel contre les virus. En effet, l'atténuation des gènes induite par des virus (VIGS) a été démontrée pour plusieurs virus ARN et ADN, avec la production de siRNA spécifiques au virus. L'idée que l'interférence à l'ARN est un moyen de défense antiviral est renforcée par l'observation d'interactions naturelles plante-virus. Premièrement, les plantes peuvent se rétablir de certaines infections virales et ces

mêmes plantes sont ensuite résistantes à une réinfection par le virus initial et des virus apparentés, dû à l'interférence à l'ARN (Covey et al. 1997, Ratcliff et al. 1997). Deuxièmement, plusieurs virus de plantes encodent des protéines qui suppriment le PTGS, suggérant ainsi une coévolution de la défense et la contre-défense entre l'hôte et le virus envahisseur (Voinnet et al. 1999). Un second rôle important du PTGS est d'assurer un contrôle de l'activité des transposons qui peuvent se déplacer dans le génome et ainsi altérer la fonction et la structure des gènes. Les transposons intégrés dans des régions euchromatiques pourraient produire des ARN double-brins ou en forme de tige-boucle, déclenchant ainsi le mécanisme d'interférence à l'ARN. D'ailleurs, plusieurs séquences de miRNA rapportées correspondent à des transposons (Llave et al. 2002b). Comme troisième rôle, les phénotypes résultant de mutations de certains gènes suggèrent que l'interférence à l'ARN agit au niveau du développement de la plante. Le haut degré de complémentarité entre des miRNA de plantes et des familles spécifiques d'ARNm importants pour le développement semble indiquer que les miRNA guident la destruction d'ARNm contrôlés lors du développement (Rhoades et al. 2002). De plus, des miRNA détectés par hybridation de type Northern affichent une variation dans leur patron d'expression spatio-temporel, démontrant que la transcription ou le traitement des miRNA de plantes sont régulés au niveau du développement (Reinhart et al. 2002, Kasschau et al. 2003). Dans le même ordre d'idée, il a été remarqué chez *Arabidopsis* que le patron de méthylation de l'ADN, et par le fait même l'expression de certains gènes, était affecté par l'interférence à l'ARN (Jones et al. 1999).

## 4. Hypothèse et objectifs de la recherche

### 4.1. Contexte

Il est dorénavant bien admis que l'interférence à l'ARN est un mécanisme général de défense antiviral chez les plantes qui entraîne la destruction d'un ARN de manière séquence-spécifique. Les viroïdes étant des particules d'ARN s'apparentant aux virus, la question à savoir s'ils induisaient le RNAi fut posée. Deux groupes de chercheurs ont d'ailleurs retrouvé des petits fragments caractéristiques d'ARN (siRNA) lors de l'infection de plants de tomates par PSTVd, un viroïde de la famille des *Pospiviroidae* (Itaya et al. 2001, Papaefthimiou et al. 2001). Cela implique donc une induction de l'interférence à l'ARN. Comme PLMVd fait partie de la famille des *Avsunviroidae*, il apparaissait intéressant de savoir s'il détenait également la capacité d'induire le RNAi. De plus, ses caractéristiques structurales et biologiques en font un excellent candidat pour l'étude de l'interférence à l'ARN dans le règne végétal.

### 4.2. Objectifs

1. Démontrer l'existence du phénomène d'interférence à l'ARN chez les pêchers infectés par PLMVd (chapitre 1);
2. Déterminer si une région particulière de PLMVd ou si le viroïde entier est responsable de l'induction du phénomène d'interférence à l'ARN (chapitre 1);

3. Vérifier quelle conformation de PLMVd, soit double-brin ou simple-brin, peut être le substrat de Dicer (chapitre 2);
4. Déterminer si un domaine particulier de PLMVd recrute Dicer (chapitre 2); et,
5. Caractériser les éléments nécessaires à la tige P11 pour servir de substrat à Dicer (chapitre 2).

## RÉSULTATS

### CHAPITRE 1:

#### Interférence à l'ARN lors de l'infection par PLMVd

##### 1.1. ARTICLE :

Patricia Landry<sup>1</sup>, Dan Thompson<sup>2</sup>, and Jean-Pierre Perreault<sup>1</sup>, (2004),

The role of viroids in gene silencing: the model case of peach latent mosaic viroid

Can. J. Plant Pathol, 26: 31-38

<sup>1</sup>RNA group/groupe ARN, Département de Biochimie, Université de Sherbrooke, Québec  
J1H 5N4, Canada

<sup>2</sup>Center for Plant Health, CFIA, Sidney, British Columbia V8L 1H3, Canada.

Running title : Landry et al. / Viroid induced RNA silencing / Peach latent mosaic viroid

#### **Implication dans le travail**

J'ai effectué la totalité des expériences décrites dans cet article. J'ai également contribué significativement à la rédaction de cet article. Le Dr Thompson n'a que fourni les échantillons de feuilles.

## Abstract

In plants, RNA silencing plays important roles in antiviral defense and host genome integrity and development. The process can be divided into RNA-mediated transcriptional gene silencing and post-transcriptional gene silencing (PTGS). The ability of viroids, which are small circular RNAs that infect higher plants and cause significant economic losses in agriculture, to induce both of these mechanisms has been demonstrated. Consequently, these RNA genomes appear to be suitable for the study of RNA silencing. In presenting useful strategies for detecting viroid-associated PTGS, as well as original results suggesting how peach latent mosaic viroid induces it, this work presents a review of the current understanding of RNA silencing, a process which constitutes the latest revolution in molecular biology. RNA silencing has gained a lot of attention as a tool for the selective inhibition of gene expression. Clearly, we are only beginning to appreciate the mechanistic complexity of this mechanism, as well as its biological diversity and potential applications.

Keywords : RNA interference (RNAi); viroid; RNA genome; post-transcriptional gene silencing (PTGS).

## Résumé

Chez les plantes, l'atténuation de l'ARN joue un rôle important dans la défense antivirale, l'intégrité du génome et le développement. Ce processus peut être divisé en ARN médiant l'atténuation transcriptionnelle de l'ARN et l'atténuation génique post-transcriptionnelle (AGPT). L'habileté des viroïdes, de petits ARN circulaires pathogènes des plantes supérieures causant des pertes significatives en agriculture, à induire ces deux mécanismes a été démontré. Conséquemment, ces génomes d'ARN sont d'excellents candidats pour l'étude de l'atténuation de l'ARN. En présentant des stratégies utiles pour la détection d'AGPT associé aux viroïdes, ainsi que des résultats originaux suggérant comment le viroïde de la mosaïque latente du pêcher l'induit, ce travail présente une revue de la compréhension actuelle de l'atténuation de l'ARN, un processus qui constitue la dernière révolution en biologie moléculaire. L'atténuation de l'ARN a gagné beaucoup d'attention par l'utilisation de ce mécanisme comme outil pour inhiber de façon sélective l'expression génique. Il est clair que nous ne commençons qu'à apprécier la complexité de ce mécanisme, sa diversité biologique ainsi que son potentiel d'application.

Mots clés : Interférence à l'ARN (ARNi); viroïde; génome à ARN; atténuation génique post-transcriptionnelle (AGPT).



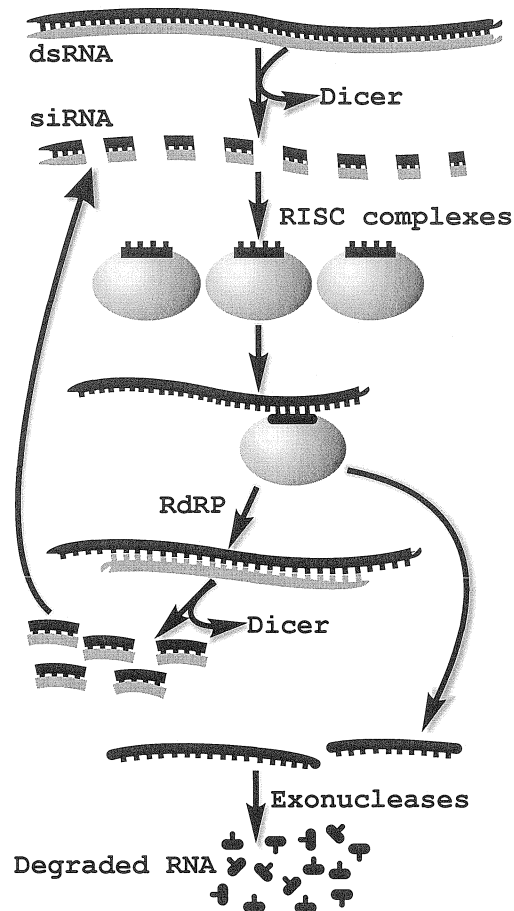
## Introduction

The engineering of transgenic petunias, performed several years ago with the goal of altering their pigmentation, led to the discovery of the latest revolution in molecular biology: RNA silencing. The introduction of exogenous transgenes did not deepen the flower colour as expected. Instead, flowers showed varied pigmentation, with some completely lacking pigment production (for a review see Jorgensen 1990). The outcome of these experiments was that not only were the transgenes inactive, but also that the added DNA sequences somehow affected the expression of the endogenous loci. Explaining these results led to the discovery of a novel gene regulation mechanism which was named cosuppression, or post-transcriptional gene silencing (PTGS).

RNA silencing, which takes place naturally in several organisms, including protozoa, fungi, plants and mammals, has gained a lot of attention as a tool for selective gene silencing. In plants, RNA silencing plays an important role in antiviral defense, genome integrity and development. It can be divided into RNA mediated transcriptional gene silencing (TGS) and post-transcriptional gene silencing (PTGS). RNA-mediated TGS occurs when double-stranded RNA (dsRNA) with sequence homology to a promoter is produced, leading to *de novo* DNA methylation of the promoter region of the structural gene (Wassenegger et al. 1994); while PTGS reduces the steady state levels of targeted host or viral cytoplasmic RNA (for a review see Hannon 2002). The ability of plant viroids to induce both mechanisms has been demonstrated, and consequently, these RNA genomes appear to be suitable for the study of RNA silencing.

## Overview of the post-transcriptional gene silencing mechanism

The molecular details of RNA silencing are becoming better understood due to the results from a combination of biochemical and genetic approaches (for reviews see Dillin 2003; and Tijsterman et al. 2002; see also Tabara et al. 2002). In plants, a biochemical framework for RNA silencing using wheat germ extract was reported recently (Tang et al. 2003; Voinnet et al. 2003). A key feature uniting the RNA silencing pathways in different organisms is the importance of double-stranded RNA (dsRNA) either as a trigger or as an intermediate (Fig. 6). The dsRNA is cleaved by a ribonuclease of the RNase III family (called Dicer) into small interfering RNAs (siRNAs), of both polarities. *In vitro* experiments using wheat germ extract showed that plant siRNAs arose as two distinct species, 21 and 25 nucleotides (nt) in length, confirming earlier *in vivo* observations in tobacco and *Arabidopsis* (Hamilton et al. 2002). These RNA species are double-stranded and possess two nucleotides long 3' overhangs and 5' phosphates that are the hallmarks of Dicer cleavage products. The two siRNA classes are most likely produced by two distinct Dicers (Tang et al. 2003). At least four Dicer homologues have been found in both the rice and *Arabidopsis* genomes (Finnegan et al. 2003). The siRNAs produced by Dicer are incorporated into a multisubunit protein complex, the RNAi-induced silencing complex (RISC), that acts as a guide directing the RNA degradation machinery to the target RNAs. Consequently, a plant virus can be both the inducer and the target of RNA silencing. In some organisms, including plants and nematodes, the siRNA can serve as a primer for an RNA-dependent RNA polymerase (RdRP), thereby creating many more siRNAs (Fire et al. 1998). The action of an RdRP provides an amplification phenomenon in the sense that only a few dsRNA molecules are required to degrade a much larger population of RNAs.

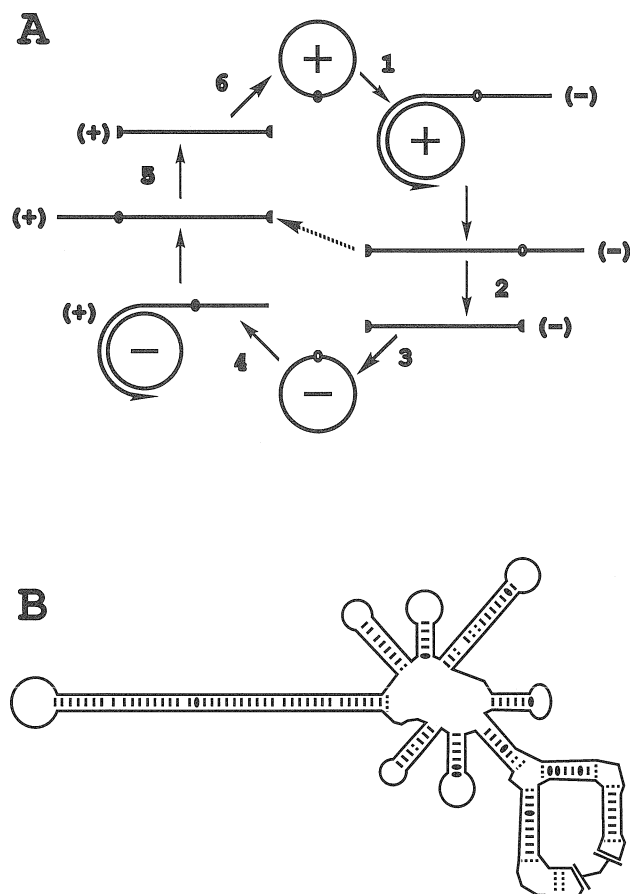


**Fig. 6.** Overview of the post-transcriptional gene silencing mechanism. Double-stranded RNAs are cleaved by Dicer into 21- to 25-nt siRNAs which are then complexed with the RNAi-induced silencing complex (RISC). Once the siRNA/RNA template hybrids form, the target RNA can be cleaved and the products degraded by exonucleases. Alternatively, a copy of the target can be synthesized by the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) by extension of the siRNA, which, therefore, leads to the production of more siRNAs.

According to this mechanism, RNA silencing is believed to play a role in the host defense against pathogen infection, as well as in inactivating the expression of undesired host genes.

### **Viroids and PTGS**

Viroids are the smallest nucleic acid-based pathogens currently known (for a review see Flores et al. 2000). They are small (~240-460 nt), single-stranded, circular RNAs that infect higher plants and cause significant economic losses in agriculture. In infected cells, viroids replicate in a DNA-independent manner through a rolling circle mechanism that adopts either a symmetric or an asymmetric mode (Bussière et al. 1999). According to the symmetric mode (Fig. 7) the infecting circular monomer (which is assigned plus polarity by convention) is replicated into linear multimeric minus strands which are then cleaved and ligated, yielding minus circular monomers. Using the latter RNA as template, the same three steps are then repeated to produce the progeny. In contrast in the asymmetric mode, the linear, multimeric, minus strands serve directly as the template for the synthesis of linear multimeric plus strands which are then cleaved and ligated to produce the progeny. Viroids have been classified in two families (*Pospiviroidae* and *Avsunviroidae*) based primarily on sequence conservation (Flores et al. 2000), as well as on biological and molecular hallmarks (Bussière et al. 1999). *Pospiviroidae* members, which are frequently represented by the *potato spindle tuber viroid* (PSTVd), share a conserved central region. These viroids replicate in the nucleus via the asymmetric mode in a process that appears to involve host proteins catalyzing each step (Bussière et al. 1999). Conversely, *Avsunviroidae* members replicate in chloroplasts via the symmetric mode. They are represented by *peach*



**Fig. 7. PLMVd rolling-circle replication and schematic secondary structure.** **A.** The polymerization, hammerhead mediated self-cleavage and ligation steps are numbered 1-4, 2-5 and 3-6, respectively. The polarities of the strands are indicated in parentheses. The dotted arrow shows the different step of the asymmetric mode. In the latter case, the multimer RNA strands of minus polarity are used as templates for the synthesis of the plus polarity strands without further processing. **B.** The schematic secondary structures for the PLMVd strands according to the model published previously (Bussière et al. 2000; Pelchat et al. 2000).

*latent mosaic viroid* (PLMVd), a viroid of 338 nt that is the causal agent of peach latent mosaic disease (Hernandez and Flores, 1992). The multimeric intermediates of PLMVd replication are processed by self-catalytic hammerhead motifs, while the circularization of the monomeric linear strands has been suggested to result from a non-enzymatic self-ligation (Côté et al. 2001). These mechanisms have led to the proposal that the replication of *Avsunviroidae* members is based primarily on a viroid RNA-based mechanism, rather than on the involvement of host proteins (Côté et al. 2001). The differential subcellular localization of the *Pospiviroidae* and *Avsunviroidae* viroids has been suggested to be source of their distinct replication mechanisms (Bussière et al. 1999).

Based on the detection of the characteristic siRNAs of 21 nt to 25 nt, representing different domains of the viroid genome, species of both *Pospiviroidae* and *Avsunviroidae* groups were suggested to induce PTGS (Itaya et al. 2001; Martinez de Alba et al. 2002; Papaefthimiou et al. 2001). Based on the subcellular compartmentation of viroid replication, it has been suggested that PTGS might take place in both the nucleus and the chloroplasts (Martinez de Alba et al. 2002). The later proposition appears highly improbable, yet all evidence, including the localization of the Dicer enzyme (Provost et al. 2002), indicates that PTGS occurs via a cytoplasmic mechanism. Clearly, the detailed mechanism of how a viroid induces PTGS remains to be revealed. By presenting useful strategies to detect viroid-associated PTGS, and for how PLMVd induces it, this work reviews the role of these infectious RNAs in gene silencing.

#### **Detection of viroid-associated siRNAs**

The initial step of any study that aims to demonstrate the induction of PTGS by a

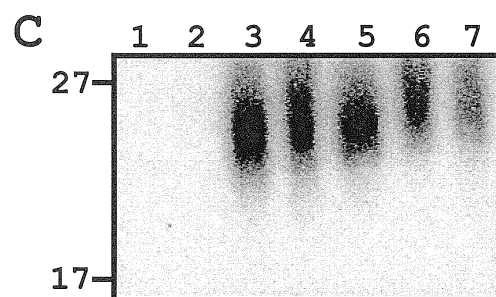
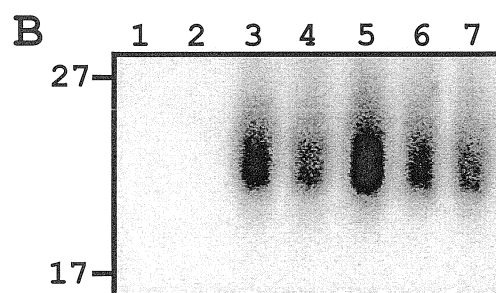
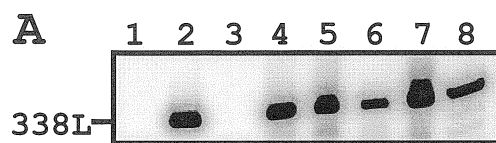
viroid must be the detection of both the viroid and the siRNAs, which are the hallmarks of this biological mechanism, in infected leaves. This is best performed by Northern blot hybridization using isolated RNA samples fractionated by polyacrylamide gel electrophoresis. For example, RNA samples from one healthy and five PLMVd-infected peach cultivars grown on the west coast of Canada were isolated using a published procedure (Pelchat et al. 2000). The RNA samples were fractionated on polyacrylamide gels of varying acrylamide concentrations in order to be able to resolve the distinct RNA species (21-25 nt and 338 nt). The nucleic acids were transferred to positively charged nylon filters and then probed as described previously (Bussière et al. 1999). In all cases the riboprobes of both the plus and minus polarities used for the Northern blot hybridizations were full-length  $^{32}\text{P}$ -internally labelled linear PLMVd transcripts. These were synthesized using the StripEZ transcription kit (Ambion, Austin TX) in order to obtain probes that can be stripped under mild washing conditions, thereby permitting multiple probings of the same membrane. The transcription reactions were performed in the presence of 50  $\mu\text{Ci}$  of  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$  (3,000 Ci/mmol) using the recombinant plasmid pPD1 that possesses two tandemly repeated PLMVd sequences inserted between the RNA T7 and T3 promoters (Beaudry et al. 1995). During transcription, RNAs of both polarities possessing hammerhead sequences were produced and self-cleaved efficiently, yielding 338-nt monomeric transcripts. The Northern membranes were analyzed by autoradiography.

Typical examples of the autoradiograms obtained are illustrated in Fig. 8. A concentration of 5% acrylamide was used for the fractionation of the replicational intermediates, which are 338 nt in size. The linear PLMVd strands were found to be the predominant conformers accumulating in the leaves (Fig. 8A, lanes 4-8; see also Bussière

et al. 1999). This autoradiogram corresponds to a hybridization performed using the PLMVd strands of plus polarity as probe, meaning that we are detecting the accumulated PLMVd monomeric strands of minus polarity within the leaves. Lane 1 shows that no cross-hybridization occurs, even if PLMVd is composed of several complementary domains. Similar results were obtained using a probe of minus polarity with which the PLMVd strands of plus polarity are detected (data not shown). The 21-25 nt siRNAs were detected using 12% polyacrylamide gels. The probe of plus polarity allowed the detection of siRNAs of minus polarity and *vice et versa* (Fig. 8B and 8C, respectively), indicating that both strands of the viroid participate in the mechanism. siRNA species were only detected in the samples isolated from the PLMVd-infected peach leaves. These complex mixtures of RNA species, which vary in terms of size (21-25 nt) and sequence composition, have varying electrophoretic mobilities, resulting in the observation of thin bands. Interestingly, lane 2 corresponds to a mixture of synthetic PLMVd strands of plus polarity added to the RNA sample isolated from a healthy plant during the extraction procedure. In this case, no small RNA species were detected, indicating that the siRNAs were not simple degradation products of longer species. More importantly, this experiment demonstrated that replicating PLMVd is accompanied by siRNAs of both polarities. Since the presence of the small RNAs maybe considered as an indicator of PTGS in plants, these results suggest that the PLMVd is responsible for the initiation of the silencing mechanism; however, a definitive confirmation remains to be ascertained.

In order to investigate whether or not a specific region, or the entire viroid molecule, induces the siRNA mechanism, Northern blot hybridizations were performed using PLMVd-derived oligodeoxynucleotides of both polarities of sizes varying from 25 nt

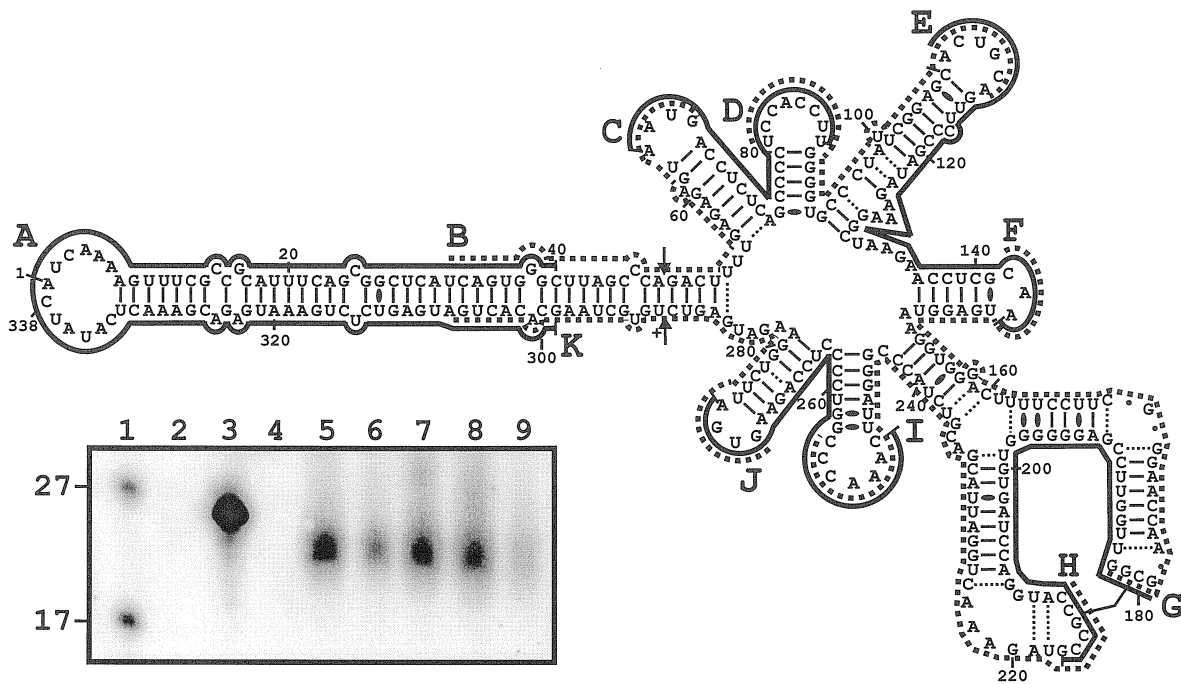




**Fig. 8. Autoradiograms of Northern blot hybridizations with RNA samples isolated from either healthy, or PLMVd-infected, leaves.** **A.** RNA samples were fractionated on a 5% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) prior to being transferred to a nylon filter. The hybridization was performed using  $^{32}\text{P}$ -labelled PLMVd strands of plus polarity. Only the portion showing the monomeric linear strands, according to the position of synthetic, linear PLMVd transcripts (338L) used as a size marker, is illustrated. Lanes 1 and 2 are synthetic, monomeric PLMVd strands of either plus or minus polarity showing the absence of cross-hybridization. Lane 3 is an RNA sample from healthy leaves. Lanes 4 to 8 are RNA samples from PLMVd-infected leaves of peach 'Harrow Beauty', 'Agua', 'Redgold', 'Siberian C' and 'Hardired', respectively. **B.** and **C.** RNA samples were fractionated on 12% denaturing PAGE gels prior to being transferred to nylon filters. The hybridizations were performed using  $^{32}\text{P}$ -labelled PLMVd strands of both plus (**B.**) and minus (**C.**) polarity, respectively. Only the portions showing the small RNA species are shown. For both autoradiograms the samples loaded on the gel were identical : lanes 1 and 2 are RNA samples from healthy leaves either with, or without, synthetic, monomeric PLMVd transcripts of polarity complementary to the probe, respectively; and lanes 3 to 7 are RNA samples from PLMVd-infected leaves of peach 'Harrow Beauty', 'Agua', 'Redgold', 'Siberian C' and 'Hardired', respectively. Adjacent to the gel the positions of deoxyoligonucleotides of 17 and 27 nt used as markers.

to 40 nt. The ensemble of these oligodeoxynucleotides completely covers the PLMVd RNAs (Fig. 9). When  $^{32}\text{P}$ -labelled at their 5'-end, all of these oligodeoxynucleotides detected siRNAs in RNA samples extracted from PLMVd-infected peach trees, but not from healthy ones (see Fig. 9, inset, compared lane 4 to lanes 5-9). Clearly, accumulated siRNAs form a population of sequences that are not restricted to a specific PLMVd region(s), but rather represent the entire viroid molecule. This is in agreement with the demonstration that two different PLMVd-derived probes detected siRNAs in one PLMVd-infected sample (Martinez de Alba et al. 2002). Furthermore, this conclusion receives physical evidence from the cloning of siRNAs species isolated from PLMVd-infected samples which permitted the identification of several sequences corresponding to different domains of the viroid (data not shown). This experiment also revealed that the populations of small RNAs were composed of 21-nt to 25-nt species, supporting the implication of more than one Dicer-like enzyme.

Together, these experiments constitute the original demonstration that PTGS induced by a viroid is not restricted to only one PLMVd variant (the five tested differed in terms of sequence; see Pelchat et al. 2000), but rather appears to be generalized to all variants. We attempted, unsuccessfully, to establish various correlations between PLMVd replication, the levels of siRNAs detected and the accumulation of the siRNAs (in terms of quantity with the polarity of the PLMVd probes). However, this does not exclude that these correlations may exist, for example between the silencing RNA mechanism and the pathogenesis.



**Fig. 9.** Analysis of the siRNA composition using PLMVd-derived oligonucleotides as probe. Eleven oligonucleotides, ranging from 25 to 40 nt, covering the full of the PLMVd RNA of plus polarity, as well as the corresponding oligonucleotides of minus polarity, were synthesized and individually used to probe the Northern blots of the siRNAs retrieved from PLMVd-infected RNA samples isolated from peach leaves. The sequences of the oligonucleotides are represented by the full and dotted lines on the secondary structure of PLMVd shown, while the letters identify the oligonucleotides. In the inset is a typical example of an autoradiogram obtained with the oligonucleotide-I of plus polarity. Lane 1 is two radioactive deoxyoligonucleotides of 17 and 27 nt, respectively, that served as electrophoretic mobility controls. Lanes 2 and 3 correspond to the oligonucleotide-I of either plus or minus polarity, respectively. Lane 4 is an aliquot of RNA isolated from healthy leaves, while lanes 5 to 9 were samples isolated from PLMVd-infected leaves.

### Double-stranded PLMVd hybrids are substrates for Dicer

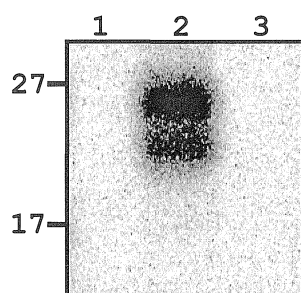
The RNA interference mechanism is induced by the presence of non-specific dsRNA structures which are substrates for the ribonuclease Dicer. The dsRNA structures should be composed of at least 21 consecutive base pairs. The secondary structure of PLMVd strands of plus polarity has been determined by computer prediction and analysis of base pair covariation using an extensive collection of natural variants, and has been further confirmed *in vitro* by nuclease mapping experiments coupled with binding shift assays using oligonucleotides (see Fig. 9; Bussière et al. 2000; Pelchat et al. 2000). Visual inspection of this secondary structure did not indicate the presence of any stretch of more than 12 consecutive base pairs. Similarly, the analysis of computer-assisted secondary structure predictions of the minus polarity RNA strands did not suggest the presence of any double-stranded region long enough to activate Dicer (data not shown). Therefore, it appears likely that dsRNA complexes formed by intermolecular base-pairing of PLMVd strands of both plus and minus polarities must serve as the substrates for Dicer.

In order to verify this hypothesis, we adopted an assay based on the wheat germ extract containing Dicer-like enzymes that convert dsRNA into siRNAs (Tang et al. 2003). Initially, <sup>32</sup>P-internaly labelled PLMVd transcripts of both plus and minus polarities synthesized *in vitro* were heat denatured at 85°C for 2 min and then slowly cooled to room temperature in order to favor the formation of dsRNA. An aliquot of the resulting mixture was incubated either with or without the wheat germ extract according to the manufacturer's recommendations (Promega, Madison WI) for 3 hours at 25°C. The reaction was stopped by proteinase K treatment (15 min at 65°C) followed by phenol extraction, and the nucleic acids were then ethanol-precipitated and fractionated on

denaturing (7M urea) polyacrylamide (8%) gels. The double-stranded PLMVd structure induced Dicer activity, resulting in the formation of 21- to 25-nt siRNAs (Fig. 10, lane 2). If the wheat germ extract was inactivated by heat denaturation (5 min in boiling water) prior to the addition of the double-stranded PLMVd, no product was detected, even after over-exposure of the gel (Fig. 10, lane 3). Together, these observations indicate that if PLMVd strands of both plus and minus polarities fold into a double-stranded duplex in a cellular context, then the resulting dsRNA might become a substrate for Dicer. However, the results of this experiment does not exclude definitively that a PLMVd strand alone (i.e. either of plus or minus polarity) may also be a substrate for the Dicer enzymes.

#### **How do viroids overcome gene silencing?**

The answer to this question remains a mystery; however, several hypotheses can be considered. First, the subcellular localization of a viroid might allow it to evade PTGS induction. Attempts to detect PSTVd- and PLMVd-related siRNAs in tomato nuclear and peach chloroplast RNA preparations, respectively, have failed so far (Papaefthimiou et al. 2001; and data not shown). Dicer enzyme had been localized in the cytoplasm (Provost et al. 2002), while *Pospiviroidae* and *Avsunviroidae* viroids have been shown to replicate in the nucleus and chloroplasts, respectively (Bussière et al. 1999). Therefore, it is reasonable to believe that PTGS induction has to wait for the cytoplasmic phase of the viroid life cycle to occur. The viroid RNA is present in the cytoplasm as it moves from cell to cell and spreads systemically in the entire plant. Second, viroids exist primarily as single-stranded circular RNAs that fold into highly stable secondary structures. As shown above for PLMVd, such a structure does not contain any dsRNA stretches of 21 nt or greater in



**Fig. 10.** Autoradiogram of a PAGE gel of Dicer activity assays performed using a wheat germ extract. <sup>32</sup>P-internaly labelled PLMVd transcripts of both plus and minus polarities synthesized *in vitro* were heat denatured at 85°C for 2 min, and then slowly cooled to room temperature. An aliquot of the resulting mixture was then incubated either without, or with, the wheat germ extract according to the manufacturer's recommendations (Promega) for 3 hours at 25°C (lanes 1 and 2, respectively). The reactions were halted by proteinase K treatment (15 min at 65°C) followed by phenol extraction, and the nucleic acids ethanol precipitated and fractionated on a 8% denaturing PAGE gel (7M urea). The conditions in lane 3 were identical to those of lane 2, except that the wheat germ extract was deactivated by heat treatment prior to the incubation. Adjacent to the gel the positions of deoxyoligonucleotides of 17 and 27 nt used as markers.

length; therefore, the final form of the viroid would be an unlikely substrate for a Dicer-like enzyme. Formation of PLMVd dsRNA hybrids, which have been shown to be substrates for Dicer activity, is highly improbable (i.e. almost accidental) since the single-stranded structure of the viroid is almost as stable as the double-stranded conformer. It would be surprising for the formation of dsRNA hybrids to be related to the viroid titer since it has been demonstrated that *avocado sunblotch viroid* infection, in which the dsRNA hybrid accumulates in large concentrations, did not result in the detection of siRNAs (Martinez de Alba et al. 2002). The reason that this viroid infection did not lead to siRNA accumulation remains to be determined. Third, viroids may be bound to cellular proteins, which would protect them from Dicer hydrolysis. Finally, viroids may actively suppress RNA silencing either by activating host protein suppressors of RNA silencing, or by directly silencing host genes in the pathway. Such a mechanism has only been described for viral and cellular proteins so far. For example, *turnip crinkle virus* coat protein has been demonstrated to mediate the suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*, while a protein of the replication mechanism of the *tomato mosaic virus* has been shown to possess an equivalent activity (Thomas et al. 2003; Kubota et al. 2003). Therefore, viruses are not only a potential target for RNA silencing, they can also activate the process and encode protein suppressors. Viroids do not encode proteins; consequently, it is unclear how they might suppress PTGS. However, it is possible to imagine that a viroid might either interact with a host component (i.e. a protein or a nucleic acid), or modulate (i.e. up- or down regulate) the expression of a host component, yielding a suppression of RNA silencing.



### **Transmission of the silencing signal**

Another important issue of the PTGS mechanism is the transmission of the silencing signal, if indeed such a phenomenon exists. So far, we refer solely to a mechanism that involves cell-autonomous amplification of the silencing signal. In other words, the viroid has to replicate in the cell in order to eventually induce the Dicer enzyme and PTGS. Such a mechanism does not involve transmission of silencing signal, but rather transmission of the viroid itself. Conversely, the possibility cannot be excluded that the siRNAs themselves, or double-stranded viroid hybrids, might be transmitted between cells. Furthermore, two types of transmission must be considered (for a review see Hannon, 2002). The first is short-range, cell-to-cell transmission. The plant cells are connected through cytoplasmic bridges called plasmodesmata. The movement of RNA and proteins via these cell-cell junctions is well known, and it is likely that either viroids (Zhu et al. 2002), long dsRNA, or siRNAs could pass through these connections. The silencing signal might also pass through the plant vasculature (Voinnet et al. 1998). Studies of the viral silencing inhibitor Hc-Pro have provided evidence against siRNAs being critical for the systemic silencing in plants. It has been shown that Hc-Pro expression in a silenced rootstock relieves silencing and inhibits siRNA production, but that a systemic signal can still be passed from this rootstock to an engrafted section lacking Hc-Pro expression (Kasschau et al. 2003). Clearly, the spread of viroids and the silencing signal in plants are intriguing questions that need to be investigated.

### **PTGS as source of many more discoveries**

Many questions concerning the PTGS mechanism remain unsolved, and many

aspects have not yet been investigated. Regardless, RNA interference is becoming a powerful tool. Because target identification depends upon Watson-Crick base-pairing interactions, the PTGS machinery can be both flexible and exquisitely specific. For example, it may be used for specific gene function targeting. In the nematode *Caenorhabditis elegans*, testing of the functions of individual genes by RNA interference has now been extended to analysis of nearly all of the worm's predicted ~19 000 genes (Hannon, 2002). Similar strategies are being pursued in other organisms, including plants. Furthermore, cells adopt a similar strategy to control mRNA expression. Plants contain many small transcripts, called miRNAs (micro RNA), that have identical, or nearly so, complementary sequences in their mRNA collection (Rhoades et al. 2002). Interestingly, the majority of the target mRNAs are transcription factors that regulate developmental events, and the region complementary to the miRNA is almost invariably placed within the coding region. These observations lead to speculation that plant miRNAs function as siRNAs and mediate the specific destruction of target mRNAs. It remains to be experimentally shown whether or not this is indeed the case. Therefore, genetic engineering to manipulate gene expression, based on the use of siRNAs, has the potential of providing new characteristics such as virus resistance to plant cells through mRNA destruction. In conclusion, we are just beginning to appreciate the mechanistic complexity of RNA silencing and its biological diversity and potential in plants.

## Acknowledgements

We thank Dr. Rudra Singh and our laboratory colleagues for critical comments and helpful suggestions. This research was supported by grants from the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada. The RNA group is supported by a Canadian Institute of Health Research (CIHR) grant. P.L. was recipient of an institutional studentship (Université de Sherbrooke). J.P.P. is a CIHR investigator.

## References

- Beaudry, D., Bussière, F., Lareau, F., Lessard, C., and Perreault, J.P. 1995. The RNA of both polarities of the peach latent mosaic viroid self-cleaves *in vitro* solely by single hammerhead structures. *Nucleic Acids Res.* 23: 745-752.
- Bussière, F., Lehoux, J., Thompson, D.A., Skrzeczkowski, L.J., and Perreault, J.P. 1999. Subcellular localization and rolling circle replication of peach latent mosaic viroid: hallmarks of group A viroids. *J. Virology* 73: 6353-6360.
- Bussière, F., Ouellet, J., Côté, F., Lévesque, D., and Perreault, J.P. 2000. Mapping in solution shows the peach latent mosaic viroid to possess a new pseudoknot in a complex, branched secondary structure. *J. Virology* 74: 2647-2654.
- Côté, F., Lévesque, D., and Perreault, J.P. 2001. Natural 2',5'-phosphodiester bonds found at the ligation sites of peach latent mosaic viroid. *J. Virology* 75: 19-25.
- Dillin, A. 2003. The specifics of small interfering RNA specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 6289-6291.
- Finnegan, E.J, Margis, R., and Waterhouse, P.M.. 2003. Posttranscriptional gene silencing is not compromised in the *Arabidopsis* Carpel factory (*Dicer-Like1*) mutant, a

- homolog of Dicer-1 from *Drosophilla*. *Current Biology* 13: 236-240.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- Flores, R., Randles, J.W., Bar-Joseph, M., and Diener, T.O. 2000. Viroids : In : van Regenmortel M.H.V, Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carsten, E.B., Estes, M.K., Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R. and Wickner, R.B. (eds) *Virus taxonomy, 7th Rep Intern Com taxon Viruses* (pp. 1009-1024) Academic Press, San Diego.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L., and Baulcombe, D. 2002. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J.* 21: 4671-4679.
- Hannon, G.J. 2002. RNA interference. *Nature*, 418: 244-251.
- Hernandez, C., and Flores, R. 1992. Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave *in vitro* via hammerhead structures. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3711-3715.
- Itaya, A., Folimonov, A., Matsuda, Y., Nelson, R. S., and Ding, B. 2001. Potato spindle tuber viroid as inducer of RNA silencing in infected tomato. *Mol. Plant-Microbe Inter.* 14: 1332-1334.
- Jorgensen, R. 1990. Altered gene expression in plants due to trans interactions between homologous genes. *Trends Biotechnol.* 8: 340-344.
- Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Liave, C., Chapman. E. J., Krizan, K. A., and Carrington, C. 2003. P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with *Arabidopsis* development and miRNA function. *Developmental Cell* 4: 205-217.

- Kubota, K., Tsuda, S., Tamai, A., and Meshi, T. 2003. Tomato mosaic virus replication protein suppress virus-targeted posttranscriptional gene silencing. *J. Virology* 77: 11016-11026.
- Martinez de Alba, A.E., Flores, R., and Hernandez, C. 2002. Two chloroplastic viroids induce the accumulation of small RNAs associated with posttranscriptional gene silencing. *J. Virology* 76: 13094-13096.
- Papaefthimiou, I., Hamilton, A.J., Denti, M.A., Baulcome, D.C., Tsagris, M., and Tabler, M. 2001. Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Res.* 29: 2395-2400.
- Pelchat, M., Lévesque, D. Ouellet, J., Laurendeau, S., Lévesque, S., Lehoux, J., Thompson, D.A., Eastwell, K.C., Skrzeczkowski, L.J., and Perreault, J.P. 2000. Sequencing of peach latent mosaic viroid variants from nine North American peach cultivars shows that this RNA folds into a complex secondary structure. *Virology* 271: 37-45.
- Provost, P., Dishart, D., Doucet, J., Frendewey, D., Samuelsson, B., and Radmark. O. 2002. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *EMBO J.* 21: 5864-5874.
- Rhoades, M.W., Reinhart, B.J., and Bartel, D.P. 2002. Prediction of plant microRNA targets. *Cell* 110: 513.
- Tabara, H., Yigit, E., Siomi, H. and Mello, C.C. 2002. The dsRNA binding protein RDE-4 interacts with RDE-1, DCR-1, and a DExX-box helicase to direct RNAi in C. elegans. *Cell* 109: 861-871.

- Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, D.P., and Zamore, P.D. 2003. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Development* 17: 49-63.
- Thomas, C.L., Leh, V., Lederer, C., and Maule, A.J. 2003. Turnip crinkle virus coat protein mediates suppression of RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Virology* 306: 33-41.
- Tijsterman, M., Ketting, R.F., and Plasterk, R.H.A. 2002. The genetics of RNA silencing. *Annu. Review Genetics* 36: 489-519.
- Voinnet, O. 2003. RNA silencing bridging the gaps in wheat extracts. *Trends Plant Sci.* 8: 307-309.
- Voinnet, O., Vain, P., Angell, S., and Baulcombe, D.C. 1998. Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* 95: 177-187.
- Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L., and Sanger, H.L. 1994. RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* 76: 567-576.
- Zhu, Y., Qi, Y., Xun, Y., Owens, R., and Ding, B. 2002. Movement of potato spindle tuber viroid reveals regulatory points of phloem-mediated RNA traffic. *Plant Physiology* 130: 138-146.

**CHAPITRE 2:****Initiation de l'interférence à l'ARN par Dicer chez PLMVd**

## 2.1. ARTICLE :

Patricia Landry and Jean-Pierre Perreault, (2004),

Identification of the peach latent mosaic viroid hairpin that potentially activates posttranscriptional gene silencing. En révision pour *J. Virol.*

RNA Group/Groupe ARN, Département de Biochimie, Faculté de Médecine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, J1H 5N4, Canada.

Running title: Viroid PTGS and Dicer specificity

Submitted June 1st, 2004

**Implication dans le travail**

J'ai effectué la totalité des expériences décrites dans cet article. J'ai également contribué significativement à la rédaction de cet article.

## Abstract

The ability of several viroids to induce posttranscriptional gene silencing has been demonstrated, but the structure that recruits the Dicer enzyme that is responsible for the initiation of this mechanism remains a mystery. Here we show that the hairpin known to be associated with the replication of peach latent mosaic viroid appears to be the domain that triggers the Dicer enzyme. This domain, which is composed of a succession of several small stems separated by symmetrical bulges, is reminiscent of the precursor micro-RNAs. Characterization of the structural features that contribute to defining an RNA substrate for this enzyme is presented.

## Introduction and results

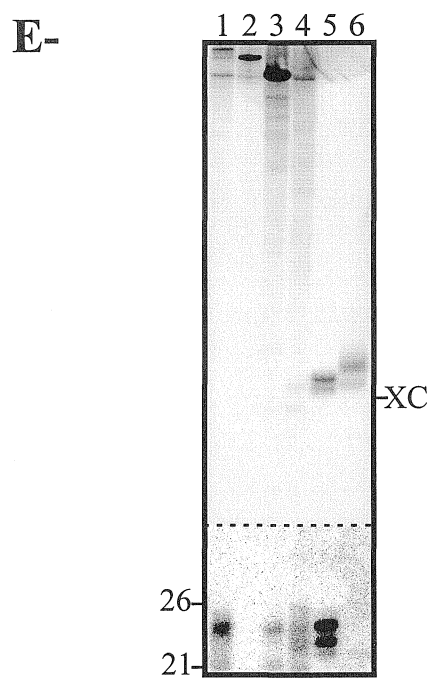
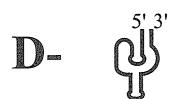
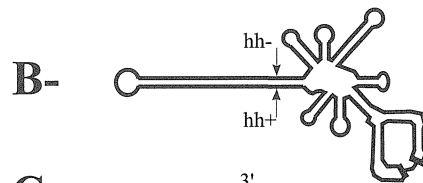
Viroids are small (~240-460 nucleotides, nt), single-stranded, circular RNA pathogens that infect higher plants and cause significant economic losses in the agricultural industry (9). Viroids have been classified into two families (*Pospiviroidae* and *Avsunviroidae*) based primarily on sequence conservation, as well as on biological and molecular characteristics (3,9). These RNA species have been shown to induce posttranscriptional gene silencing (PTGS), a process known to play an important role in antiviral defense in plants (12,20). PTGS is triggered by double-stranded RNAs (dsRNA) that are then cleaved by a ribonuclease of the RNase III family (named Dicer) (7,18). This cleavage leads to the formation of single-stranded RNAs, 21 to 25 nt in length, called small interfering RNAs (siRNA). The siRNAs can serve as primers for an RNA-dependent RNA polymerase, thereby causing an amplification phenomenon. Moreover, the siRNAs are incorporated into



a multisubunit protein complex, the RNA-induced silencing complex (RISC), and act as a guide to direct this RNA degradation machinery to its target RNAs.

Based on the detection of siRNAs of 21- to 25-nt, representing different regions of the viroid genome, species of both *Pospiviroidae* and *Avsunviroidae* families have been shown to induce PTGS (6,10,12,14,15,19). It appears likely that dsRNA complexes formed by intermolecular base-pairing of viroid strands of both plus and minus polarities serve as substrates for Dicer (10,12,14,15). In this report, we show how the peach latent mosaic viroid, which belongs to the *Avsunviroidae* family, recruits Dicer in order to initiate PTGS.

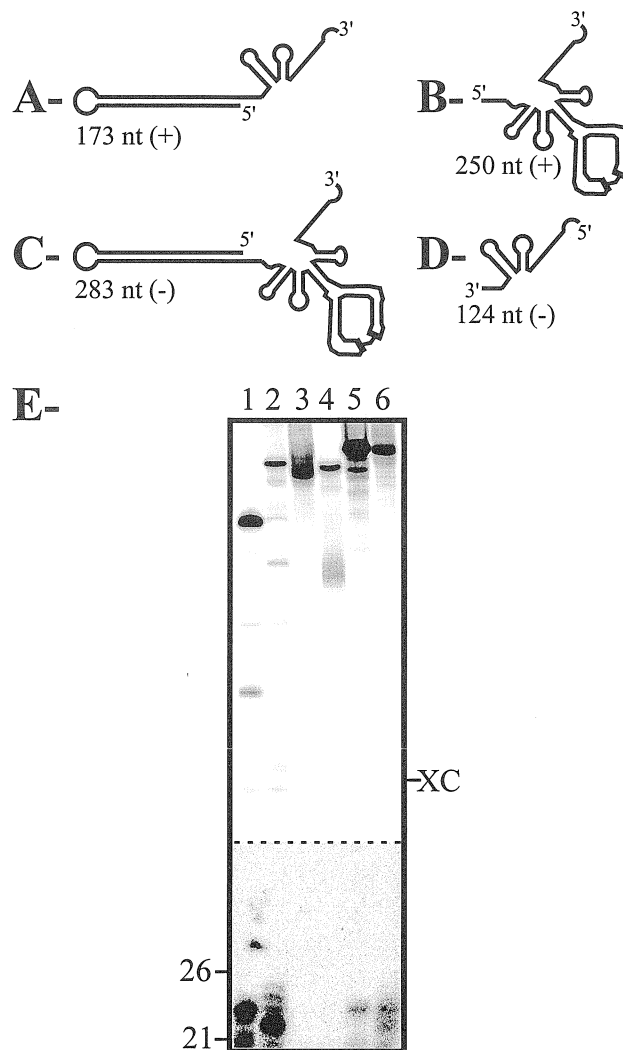
In order to achieve this task an assay based on a wheat germ extract that contains Dicer-like enzymes that convert dsRNA into siRNAs was adopted (17). Initially, <sup>32</sup>P-radiolabelled PLMVd transcripts of both plus and minus polarities were synthesized *in vitro* in the presence of 50 μCi of [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]GTP (3,000 Ci/mmol) from the recombinant plasmid pPD1 that possesses two tandemly repeated PLMVd sequences inserted between the RNA polymerase T7 and T3 promoters (2). During transcription, RNAs of both polarities possessing hammerhead sequences were produced and self-cleaved efficiently, yielding 338-nt monomeric transcripts. Purified transcripts (0,5 pmol) of both polarities were then heat denatured at 85°C for 2 min and slowly cooled to room temperature in order to favor the formation of dsRNA (Fig. 11A). The resulting mixture was incubated with the wheat germ extract according to the manufacturer's recommendations (Promega) for 3 hr at 25°C. The reaction was stopped by proteinase K treatment (15 min at 65°C) followed by phenol extraction. The nucleic acids were ethanol precipitated and fractionated on denaturing 10% denaturing polyacrylamide gels containing 7M urea. The double-stranded PLMVd structure induced Dicer activity resulting in the formation of 21- to 25-nt siRNAs, confirming a



**FIG. 11** Dicer activity assays performed using a wheat germ extract and various RNA substrates. A- to D- are schematic representations of the secondary structures of the tested RNAs. A- Duplex of PLMVd strands of plus and minus polarity; B- Single PLMVd strand of either plus or minus polarity. The hammerhead cleavage sites are identified by hh, and the +/- symbols designate their polarities; C- Model hairpin including a 27 bp stem; D- *Trans*-acting *delta* ribozyme (the nucleotide sequences of the latter two RNA substrates can be retrieved elsewhere (11,13); and, E- Autoradiogram of a PAGE gel of Dicer activity assays performed using a wheat germ extract. Lanes 1 and 2 are duplexes of the PLMVd strands as shown in A. The reaction conditions were identical except that the wheat germ extract was inactivated by heat treatment prior to the incubation for lane 2. Lanes 3 and 4 are PLMVd strands of either plus or minus polarity, respectively. Lanes 5 and 6 are the assays with the model hairpin (R31-27) and *delta* ribozyme (Rz-12), respectively (11,13). Adjacent to the gel the positions of the RNA markers of 21 and 26 nt are indicated. XC indicates xylene cyanol. The bottom part (below the dashed line) has been overexposed in order to reveal the bands corresponding to the small products.

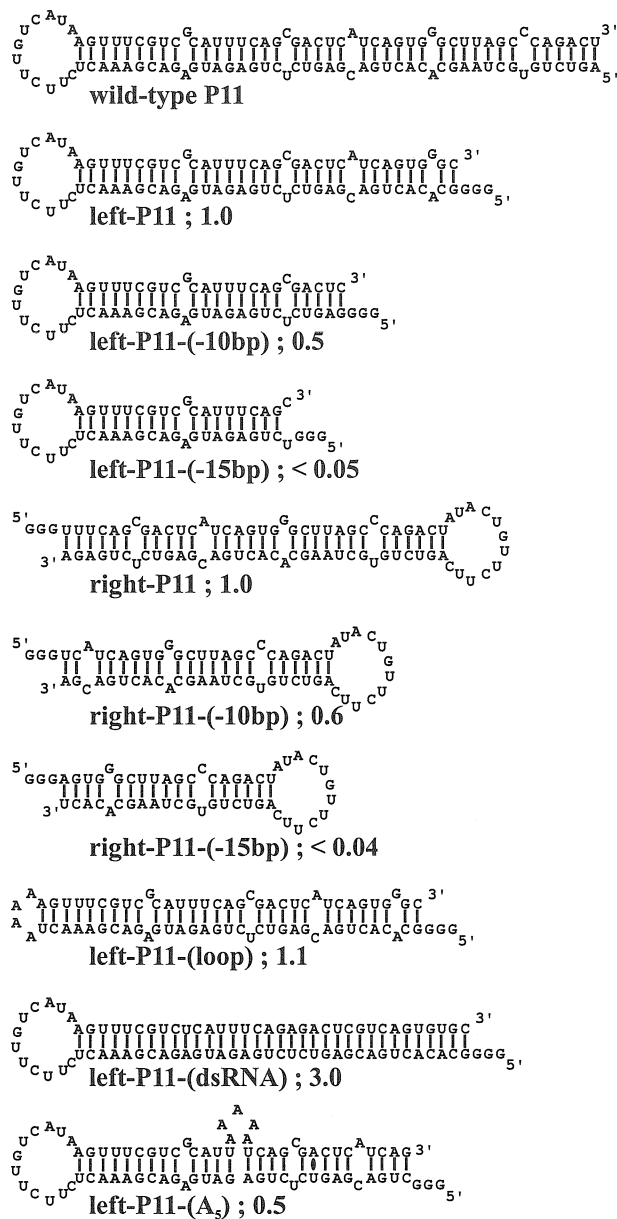
recent report (12). Conversely, no cleavage product was observed if the wheat germ extract was inactivated prior the addition of the dsRNA (Fig. 11E, lanes 1-2). As viroids are highly structured RNA molecules, the intrinsic thermodynamic stability of two independently folded strands is almost comparable to that of the corresponding duplex. Consequently, it appears relatively improbable that such a dsRNA structure can be adopted in a cell. Therefore, we examined the possibility that PLMVd strands alone may be a substrate for Dicer. The incubation of PLMVd transcripts of either plus or minus polarity, which adopted branched secondary structures (Fig. 11B; 4,16), with the yeast germ extract resulted in the detection of siRNAs (Fig. 11E, lanes 3-4). This demonstrates that a viroid need not necessarily fold into an intermolecular dsRNA structure in order to be a substrate for Dicer. As controls, a characteristic hairpin formed by a 27 base pairs (bp) stem was efficiently cleaved, while a delta ribozyme motif that does not include a stem longer than 7 bp was not (Fig. 11C-D and 11E, lanes 5 and 6).

Subsequently, we investigated which region(s) of PLMVd was(were) a substrate for Dicer. Transcripts containing two different regions of PLMVd for both polarities were synthesized from the pPD1 plasmid and their ability to be cleaved by Dicer-like enzymes assessed. Regardless of the polarity of the transcripts, only those including the long P11 hairpin domain of PLMVd resulted in the production of siRNAs (Fig. 12). The P11 hairpin is composed of a succession of small stems separated by symmetrical bulges (Fig. 13). Dicer-like enzymes cleave primarily dsRNAs composed of at least 21 bp, regardless of their sequence composition (8). However, it has been shown that they may also cleave dsRNA substrates that include bulges, for example the precursors of micro-RNA (pre-miRNA; 1,5).



**FIG. 12** Dicer activity assays performed with various PLMVd derived fragments. A- to D- are schematic representations of the PLMVd fragments tested of plus (A,B) and minus (C,D) polarity, respectively. The length, in nucleotides, is indicated for each fragment. E- Autoradiogram of a PAGE gel of Dicer activity assays performed as described above. Lanes 1 to 6 are the 173-nt (lanes 1), 283-nt (lane 2), 250-nt (lane 3), 124-nt (lane 4) and 338-nt fragments of plus and minus polarity (lanes 5 and 6), respectively. Adjacent to the gel the positions of the RNA markers of 21 and 26 nt are indicated. XC indicates xylene cyanol. The bottom part (below the dashed line) has been overexposed in order to reveal the bands corresponding to the small products.

In order to identify the important structural features of the P11 stem that trigger the Dicer-like enzyme, several cleavage experiments were performed using substrates derived from the P11 hairpin of plus polarity (Fig. 13). We arbitrarily assigned a value of 1.0 to the relative cleavage level of the left-P11 substrate which corresponds to the left portion of the P11 hairpin and contains 34 bp (if we consider that the bulged nucleotides adopt a stacked, non-Watson-Crick basepairing structure). The cleavage level was reduced by one-half with a decrease of 10 bp in the stem length, while removal of a further 5 bp resulted in an uncleaved substrate (left-P11-(-10bp) and left-P11-(-15bp), respectively). The latter substrate only included a 19 bp stem region, which is smaller than the 21 bp required for Dicer activity (8). Similar results were obtained when using the right portion of the P11 stem to which a loop allowing the two strands to connect together (right-P11, right-P11-(-10bp) and right-P11-(-15bp)) was added. The sequence composing the loop was also shown to be unimportant for cleavage to occur (i.e. 1.1 for left-P11-(loop)). A substrate in which the bulged nucleotides from the upper strands were substituted by residues permitting the formation of Watson-Crick basepairs (i.e. forming a perfect 34-bp stem) was cleaved significantly more efficiently than the initial imperfect stem (i.e. 3.0 for the left-P11-(dsRNA)), demonstrating Dicer's preference for dsRNA. Conversely, replacing a bulged nucleotide by five single-stranded adenosines, thus interrupting one strand, decreased the level of cleavage (i.e. 0.5 for the left-P11-(A<sub>5</sub>)). Similar results were obtained when repeating the experiments using transcripts derived from the P11 hairpin of minus polarity (data not shown). Taken together, these data demonstrated that Dicer-like enzymes preferred dsRNA at least 21 bp in length, regardless of their sequence, and can also tolerate the presence of bulged nucleotides that do not perturb the helix too much.



**FIG. 13** Dicer activity assays performed with various transcripts derived from the P11 hairpin. The sequence and secondary structure of the wild-type P11 hairpin is illustrated on the top. Three guanosines were added at the 5' end of each transcript so as to ensure efficient transcription from the oligonucleotides. The Dicer assays were performed as described above. The cleavage levels were determined and are reported as relative values in comparison to a value of 1.0 that was arbitrarily assigned to the left-P11 substrate.

In summary, this study identifies the P11 hairpin of PLMVd as the domain that recruits the Dicer enzyme, thereby initiating the RNA silencing mechanism. Interestingly, the structure of P11 recalls that of the pre-miRNAs, which are bulged hairpins about 80 nt long that are cleaved by Dicer to give miRNAs (1,5). These miRNAs subsequently interact with specific mRNAs in order to regulate their translation. It seems reasonable to suggest that this mechanism might be involved in the pathogenesis of this viroid since a recent study has shown that PTGS seems to be responsible for the symptoms of infection in plants (19). More generally, it is interesting that only a small domain of PLMVd is responsible for initiating PTGS; while the accumulated siRNAs form a population of sequences that are not restricted to a specific PLMVd region(s), but rather represent the entire viroid molecule (12,14). This phenomenon is most likely the result of the amplification mechanism involving the RNA-dependent RNA polymerase that uses the initial siRNAs as primers.

### **Acknowledgements**

This work was supported by a grant from the Canadian Institute of Health Research (CIHR) to J.P.P. The RNA group is supported by grants from both the CIHR and Fonds FCAR (Québec). J.P.P. is an investigator from the CIHR.



## References

1. **Bartel, D.** 2004. MicroRNAs : Genomics, Biogenesis, Mechanism and Function. *Cell* **116**:281-297.
2. **Beaudry, D., Bussière, F., Lareau, F., Lessard, C., and J. P. Perreault.** 1995. The RNA of both polarities of the peach latent mosaic viroid self-cleaves *in vitro* solely by single hammerhead structures. *Nucleic Acids Res.* **23**:745-752.
3. **Bussière, F., Lehoux, J., Thompson, D. A., Skrzeczkowski, L. J., and J. P. Perreault.** 1999. Subcellular localization and rolling circle replication of peach latent mosaic viroid: hallmarks of group A viroids. *J. Virology* **73**:6353-6360.
4. **Bussière, F., Ouellet, J., Côté, F., Lévesque, D., and Perreault, J. P.** 2000. Mapping in solution shows the peach latent mosaic viroid to possess a new pseudoknot in a complex, branched secondary structure. *J. Virology* **74**:2647-2654.
5. **Carmell, M. A., and Hannon, G. J.** 2004. RNase III enzymes and the initiation of gene silencing. *Nature Struc. Mol. Biol.* **11**:214-218.
6. **Denti, M. A., Boutla, A., Tsagris, M., and Tabler, M.** 2004. Short interfering RNAs specific for potato spindle tuber viroid are found in the cytoplasm but not in the nucleus. *Plant J.* **37**:762-769.
7. **Dillin, A.** 2003. The specifics of small interfering RNA specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:6289-6291.
8. **Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T.** 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* **15**:188-200.
9. **Flores, R., Randles, J. W., Bar-Joseph, M., and Diener, T. O.** 2000. Viroids : In : van Regenmortel M.H.V, Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Carsten, E.B., Estes, M.K .,

- Lemon, S.M., Maniloff, J., Mayo, M.A., McGeoch, D.J., Pringle, C.R. and Wickner, R.B. (eds) *Virus taxonomy*, 7th Rep Intern Com taxon Viruses (pp. 1009-1024) Academic Press, San Diego.
10. **Itaya, A., Folimonov, A., Matsuda, Y., Nelson, R. S., and B. Ding.** 2001. Potato spindle tuber viroid as inducer of RNA silencing in infected tomato. *Mol. Plant-Microbe Inter.* **14**:1332-1334.
  11. **Lamontagne, B., and Abou Elela, S.** 2004. Evaluation of the RNA determinants for bacterial and yeast RNase III binding and cleavage. *J. Biol. Chem.* **279**:2231-2241.
  12. **Landry, P., Thompson, D., and J. P. Perreault.** 2004. The role of viroids in gene silencing : the model case of Peach latent mosaic viroid. *Can. J. Plant Pathol.* **26**:1-8.
  13. **Lévesque, D., Choufani, S., and Perreault, J. P.** 2002. Delta ribozyme benefits from a good stability in vitro that becomes outstanding in vivo. *RNA* **8**:464-477.
  14. **Martinez de Alba, A.E., Flores, R., and C. Hernandez.** 2002. Two chloroplastic viroids induce the accumulation of small RNAs associated with posttranscriptional gene silencing. *J. Virology* **76**:13094-13096.
  15. **Papaefthimiou, I., Hamilton, A.J., Denti, M.A., Baulcome, D.C., Tsagris, M., and M. Tabler.** 2001. Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Res.* **29**:2395-2400.
  16. **Pelchat, M., Lévesque, D. Ouellet, J., Laurendeau, S., Lévesque, S., Lehoux, J., Thompson, D. A., Eastwell, K. C., Skrzeczkowski, L. J., and Perreault, J. P.** 2000. Sequencing of peach latent mosaic viroid variants from nine North American peach cultivars shows that this RNA folds into a complex secondary structure.

Virology 271:37-45.

17. **Tang, G., Reinhart, B.J., Bartel, D.P., and P. D. Zamore.** 2003. A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Development* 17:49-63.
18. **Voinnet, O.** 2003. RNA silencing bridging the gaps in wheat extracts. *Trends Plant Sci.* 8:307-309.
19. **Wang, M. B., Bian, X. Y., Wu, L. M., liu, L. X., Smith, N. A., Isenegger, D., Wu, R. M., Masuta, C., Vance, V. B., Watson, J. M., Rzaian, A., Dennis, E. S., Waterhouse, P. M.** 2004. On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:3275-3280.
20. **Waterhouse, P. M., Wang, M. B., Lough, T.** 2001. Gene silencing as an adaptative defense against viruses. *Nature* 411:834-842.

## DISCUSSION

### 1. INTERFÉRENCE À L'ARN LORS DE L'INFECTION PAR PLMVd

#### 1.1. Existence du RNAi chez les plants de pêches infectés par PLMVd

Depuis la découverte de l'interférence à l'ARN, de nombreux rôles dans la cellule lui ont été attribués. Cela permet, entre autre, de mieux comprendre comment les plantes pouvaient se défendre contre des virus et même devenir résistantes à des infections subséquentes par le même virus ou des virus apparentés. Les viroïdes étant des particules d'ARN avec des propriétés semblables aux virus, la question à savoir s'ils étaient en mesure de déclencher de l'interférence à l'ARN fut soulevée. La réponse obtenue fut affirmative. Deux groupes de chercheurs ont retrouvé, chez des plants de tomates infectés par PSTVd, un membre de la famille des *Pospiviroidae*, les petits fragments d'ARN de 21-25 nucléotides caractéristiques du phénomène (Itaya et al. 2001, Papaefthimiou et al. 2001). Les viroïdes semblaient donc vraisemblablement avoir la capacité d'induire le phénomène. Afin de vérifier si les viroïdes de la famille des *Avsunviroidae* détenaient également cette aptitude, des travaux avec PLMVd ont été réalisés (chapitre 1).

L'étape initiale fut la détection des siRNA correspondant à PLMVd. La méthode adoptée fut le buvardage de type Northern en utilisant comme sondes des transcrits de PLMVd des deux polarités. Les résultats obtenus démontrent fortement que PLMVd peut déclencher l'interférence à l'ARN. En effet, des petits fragments d'ARN de la longueur attendue, soit 21-25 nucléotides, ont été décelés dans les extraits d'ARN provenant de

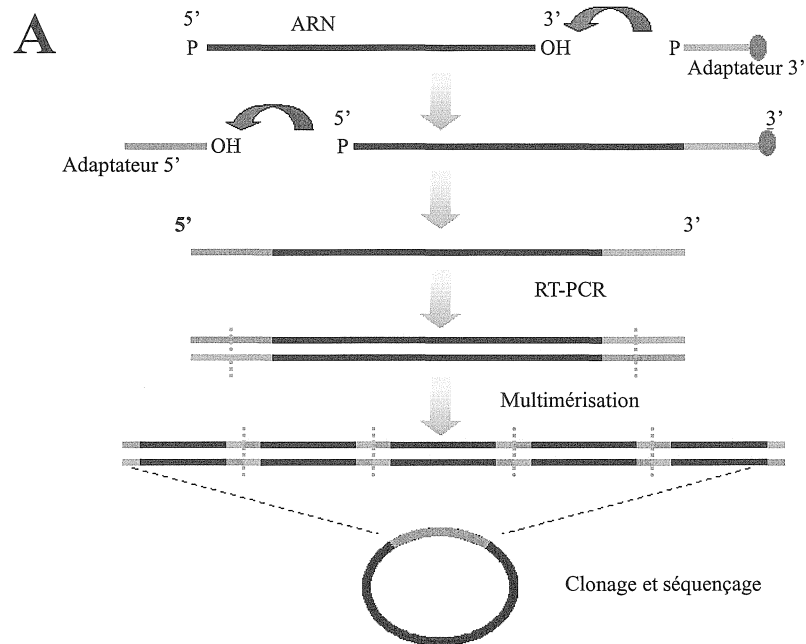
plants infectés, contrairement à aucun dans les plants sains (figure 8). De plus, les deux brins du viroïde participent au mécanisme, puisque la sonde de polarité positive a pu détecter des siRNA de polarité négative et vice versa. Enfin, l'utilisation d'extraits d'ARN provenant de feuilles de cultivars distincts, par conséquent, porteurs de différents variants de PLMVd, a démontré que le phénomène n'est pas exclusif à un seul variant. Malheureusement, aucune corrélation n'a pu être établie entre l'intensité de l'interférence à l'ARN et les variants utilisés. La virulence ainsi que le stade d'infection des variants de PLMVd n'étant pas connus, cela ne permet pas de tirer de conclusion. Par contre, il est possible d'affirmer que la séquence nucléotidique du viroïde ne semble pas primordiale au déclenchement du mécanisme.

## **1.2. Régions de PLMVd correspondant aux siRNA**

Après avoir identifié que PLMVd pouvait induire le mécanisme d'interférence à l'ARN, la question suivante était de savoir si les siRNA retrouvés dans les plants infectés correspondaient à une région particulière de PLMVd. Cette interrogation a été élucidée en faisant appel à des buvardages de type Northern (chapitre 1). Les sondes utilisées correspondaient à onze oligonucléotides d'ADN couvrant le génome de PLMVd en entier, et ce, pour les deux polarités, c'est-à-dire 22 oligonucléotides en totalité. Les résultats ont démontré que les siRNA formaient une population de séquences qui n'étaient pas restreintes à une seule région de PLMVd mais représentaient plutôt le viroïde dans son entier, et ce, pour les deux polarités (figure 9). Ces résultats sont en accord avec les observations d'une autre équipe de chercheurs (Martinez de Alba et al. 2002) qui tirait des

conclusions semblables avec l'utilisation de sondes provenant de deux régions distinctes de PLMVd. Malencontreusement, comme ce fut le cas avec les sondes de PLMVd entier, aucune corrélation n'a pu être établie entre le niveau de siRNA pour les différentes régions de PLMVd, la quantité de viroïde présent ou un variant particulier.

Les résultats obtenus par buvardage de type Northern ont également été corroborés par le clonage de siRNA provenant de feuilles de pêchers infectées par PLMVd (figure 14A). Pour ce faire, l'ARN total extrait de ces feuilles était séparé sur un gel dénaturant de polyacrylamide. Une bande correspondant à des ARN de 20-25 nucléotides fut excisée et les ARN récupérés par élution. Comme les extrémités des ARN isolés sont inconnues, deux adaptateurs, un oligonucléotide pour l'extrémité 5' et l'autre pour l'extrémité 3', leur ont été ligués. Cela a permis les étapes subséquentes de transcription inverse, d'amplification par PCR, de clonage et de séquençage. De cette manière, un total de quarante séquences différentes ont été retrouvées et parmi celles-ci, quatre correspondaient à différentes parties de PLMVd (figure 14B). Malheureusement, la continuité de ce projet a été reportée à plus tard dû à des problèmes de multimérisation des fragments obtenus. En effet, la formation de multimères qui pourrait ensuite être clonés serait beaucoup plus avantageuse pour le séquençage subséquent.

**B**

Séquence	Nombre	Polarité
PLMVd	4	3 (+), 1(-)
Autres	36	—

**Figure 14. Méthode de clonage des siRNA et résultats obtenus.** (A) Après avoir isolé les ARN ayant une longueur de 20-25 nucléotides, des adaptateurs sont ligués en 3' et en 5' pour permettre le clonage puisque la séquence des ARN est inconnue. L'ARN est converti en ADN par transcription inverse, puis cet ADN est amplifié par PCR (RT-PCR). Les molécules d'ADN double-brin obtenues sont multimérisées, clonées dans un vecteur et finalement séquencées. (B) Tableau résumé des résultats obtenus. Quatre séquences sur un total de quarante correspondent à PLMVd. Les séquences retrouvées proviennent de différentes parties du viroïde ainsi que des deux polarités.

## 2. INITIATION DE L'INTERFÉRENCE À L'ARN

### 2.1. Conformation de PLMVd induisant l'interférence à l'ARN

L'élément déclencheur de l'interférence à l'ARN est un ARN double-brin, d'une longueur minimale de 21 paires de bases, qui est reconnu et clivé par une ribonucléase de type III nommée Dicer. Des petits fragments d'ARN caractéristiques de la coupure par cette enzyme, et par le fait même de l'interférence à l'ARN, sont produits (Zamore et al. 2000). Le fait est que PLMVd a la capacité d'induire le phénomène mais la conformation de ce viroïde ciblée par Dicer est inconnue. Comme le cycle de vie de PLMVd passe par des intermédiaires ARN de deux polarités, deux possibilités de substrats sont envisageables. Le premier pourrait être un ARN double-brin constitué de chacune des polarités du viroïde. Le second serait plutôt chacun des monomères séparés, puisqu'ils sont des ARN hautement structurés (figure 2B) (Bussière et al. 2000, Pelchat et al. 2000). Par contre, l'inspection visuelle de la structure secondaire de PLMVd permet rapidement de se rendre compte qu'elle ne contient aucune tige avec plus de 12 paires de bases consécutives, ce qui est en deçà des exigences connues pour Dicer.

Les essais dans de l'extrait de germe de blé, qui contient tous les éléments nécessaires à l'interférence à l'ARN, sont venus éclaircir ce point litigieux (chapitre 2). Il s'est avéré que l'ARN double-brin formé par les deux polarités de PLMVd était un bon substrat de Dicer puisqu'il était clivé en fragments de 21-25 nucléotides. Il n'en demeure pas moins que les monomères de PLMVd ont également été clivés, et ce, malgré qu'aucune tige ne détienne les pré-requis de Dicer établis dans la littérature (figure 2B) (Elbashir et al.



2001a). Dû à leur forte structure secondaire thermodynamiquement quasi aussi stable que le double-brin formé à partir des deux polarités, les monomères de PLMVd sont fort probablement les substrats de Dicer dans la cellule. En effet, pour une stabilité équivalente, les liaisons intramoléculaires vont être préférées aux liaisons intermoléculaires, dû à leur plus grande proximité, donc leur formation plus rapide. Ceci dit, il est raisonnable de penser que la cellule doit contenir une quantité considérable de monomères comparé aux duplexes formés des deux polarités. Par conséquent, les monomères deviennent une cible préférentielle pour Dicer.

## **2.2. Domaine de PLMVd responsable du recrutement de Dicer**

La démonstration que les monomères de PLMVd peuvent induire l'interférence à l'ARN implique qu'une ou plusieurs régions du viroïde interagissent avec la ribonucléase Dicer. Dans cet ordre d'idée, des essais de coupure dans l'extrait de germe de blé ont été réalisés en utilisant comme substrat pour Dicer deux domaines différents de PLMVd (chapitre 2). Un domaine est constitué de la partie gauche du viroïde et l'autre, de la partie droite, et ce, pour les deux polarités (figure 12). Curieusement, seulement les transcrits contenant la tige P11 furent coupés, indépendamment de la polarité du brin. Comme mentionné précédemment, la structure de PLMVd ne contient aucune région avec 21 paires de bases consécutives, qui sont normalement préférées par Dicer. La plus longue région double-brin est la tige P11, qui est constituée d'une succession de petites tiges séparées par des bulges symétriques de un ou deux nucléotides (figure 13). Il est donc possible que Dicer ne soit pas aussi sélective que ce qui est décrit dans la littérature et qu'elle puisse

admettre quelques bulges, s'ils ne perturbent pas de façon importante l'hélicité de la tige. Par contre, l'absence de coupure dans le domaine droit de PLMVd n'exclut pas totalement l'idée qu'il puisse tout de même servir de substrat à Dicer *in vivo*. Le simple fait de séparer les deux domaines de PLMVd *in vitro* peut engendrer des changements conformationnels qui vont mener à un repliement de l'ARN inhibant toute possibilité de coupure.

### 2.3. Caractérisation de P11 en tant que substrat de Dicer

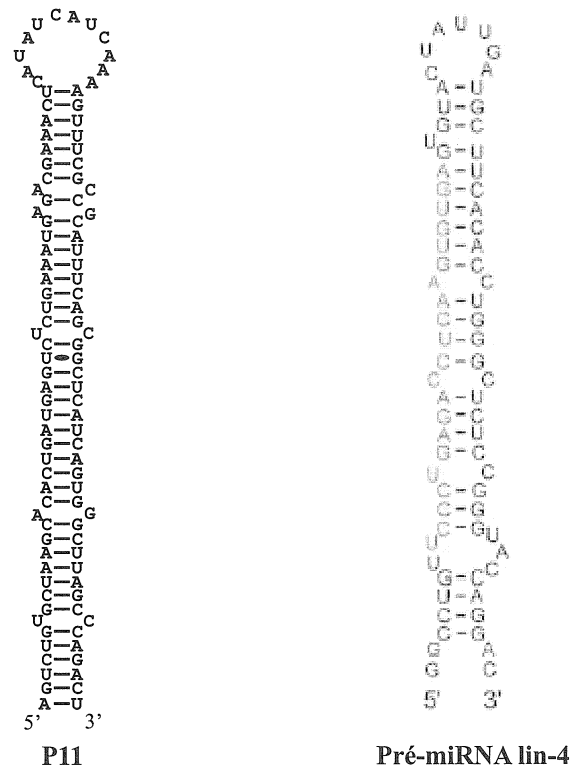
De toute évidence, la tige P11, malgré ses quelques bulges, semble être le substrat de Dicer, donc l'élément déclencheur de l'interférence à l'ARN dans le cas de PLMVd. Cependant, une lacune existant dans la littérature actuellement est le manque d'informations en ce qui concerne la caractérisation des différentes enzymes impliquées dans l'interférence à l'ARN, puisqu'il s'agit d'un phénomène plutôt récent. Il a donc paru important d'identifier les caractéristiques structurales de la tige P11 nécessaires pour le clivage par Dicer. Des essais de coupures dans de l'extrait de germe de blé en utilisant divers substrats dérivés de la tige P11, ont servi à faire la lumière sur ce point (figure 13). Les données recueillies ont pu démontrer que Dicer préférait un ARN double-brin d'un minimum de 21 paires de bases, peu importe la séquence, mais qu'elle pouvait tolérer la présence de bulges qui ne perturbaient pas trop l'hélice. De plus, cela introduit un nouveau rôle à la tige P11, déjà connu pour être le domaine d'initiation de la transcription, de l'autocoupure (motif *hammerhead*) et de l'autoligation (Pelchat et al. 2002, Côté et al. 2001).

### 3. Perspectives

Malgré les avancées faites dans le domaine des viroïdes et de l'interférence à l'ARN, plusieurs questions demeurent. Une de ces questions concerne la contradiction entre la localisation de l'interférence à l'ARN et celle de PLMVd et des viroïdes en général. Basé sur la localisation cellulaire de la réplication des viroïdes, il a été suggéré que l'interférence à l'ARN puisse prendre place au noyau ainsi qu'aux chloroplastes (Martinez de Alba et al. 2002). Cependant, cette proposition semble hautement improbable puisque toutes les évidences à ce jour, incluant la localisation de Dicer (Provost et al. 2002), indiquent que le mécanisme a un emplacement cytoplasmique. De plus, des tentatives pour détecter des siRNA dans ces compartiments cellulaires se sont avérées infructueuses. Par exemple, PSTVd est un viroïde qui se réplique au noyau via des intermédiaires ARN double-brins qui sont sujets au clivage par Dicer. Des analyses biochimiques ont démontré que des siRNA spécifiques au viroïde s'accumulaient dans le cytoplasme, mais demeuraient indétectables dans le noyau (Denti et al. 2004). Ces évidences semblent indiquer que les viroïdes seraient susceptibles à l'interférence à l'ARN lors d'un séjour dans le cytoplasme, comme par exemple lors de l'entrée dans la cellule ou lors de la propagation d'une cellule à une autre.

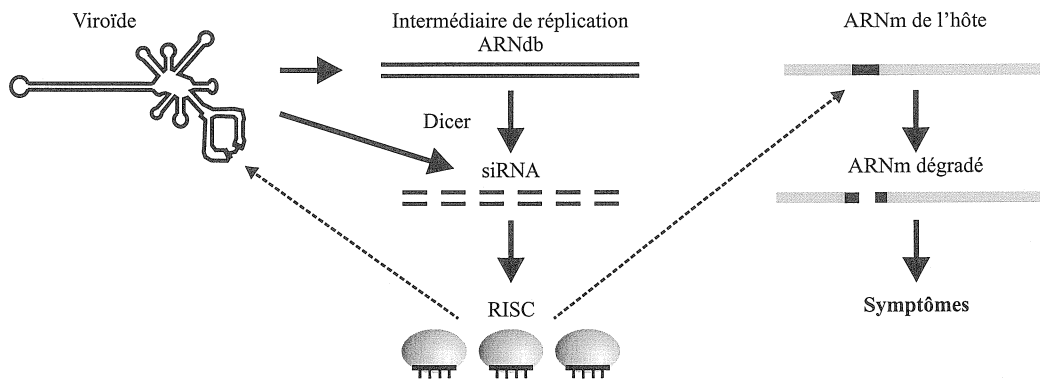
Une intrigante caractéristique des viroïdes est leur habileté à induire des symptômes dans leur plante hôte, sans coder pour aucune protéine. Plusieurs modèles impliquant des caractéristiques de la séquence primaire ou de la structure secondaire de ces génomes d'ARN ont été proposés pour expliquer leur pathogénicité (Garcia-Arenal et Palukaitis 1999, Markarian et al. 2003). Bien que l'interférence à l'ARN serve normalement aux

plantes de système de défense contre des ARN exogènes, il est possible de se demander si ce phénomène ne pourrait pas être à l'origine des symptômes lors d'une infection par un viroïde. Par exemple, la structure secondaire de PLMVd, plus particulièrement la tige P11 n'est pas sans rappeler les précurseurs des miRNA (figure 15). Longs d'environ 80 nucléotides, ces précurseurs de miRNA adoptent la forme d'une longue tige-boucle parsemée de bulges (Bartel 2004) et sont encodés par la cellule. Ils sont ensuite exportés dans le cytoplasme, où ils vont être clivés par Dicer. Ils serviront finalement à atténuer divers gènes en ciblant l'ARNm. Les siRNA produits par PLMVd et par les autres viroïdes pourraient donc causer des symptômes en ciblant des ARN importants pour la cellule (figure 16). Une étude récente supporte cette hypothèse. Elle démontre entre autre que des plants de tomates exprimant une tige-boucle d'ARN non-infectieuse dérivée de PSTVd développaient des symptômes similaires à ceux induits par le viroïde (Wang et al. 2004). Cette même étude a également démontré que, chez le tabac, lorsque le mécanisme d'interférence à l'ARN est contrecarré à l'aide d'un suppresseur, il se produit une réduction notable des symptômes causé par l'ARN satellite Y du virus de la mosaïque du concombre. De plus, le virus EBV, et probablement d'autres virus de la même famille des herpes virus, contient des miRNA et exploite le mécanisme d'interférence à l'ARN comme méthode de régulation de ses gènes viraux ainsi que des gènes de l'hôte (Pfeffer et al. 2004). Ce mécanisme de pathogenèse pourrait également expliquer pourquoi la mutation d'un seul nucléotide dans la séquence d'un viroïde peut rendre une souche beaucoup plus virulente qu'elle ne l'était auparavant. En modifiant la séquence du siRNA, la cible qu'il reconnaît peut être changée et ceci peut avoir un impact drastique sur la plante.



**Figure 15.** Comparaison de la tige P11 de PLMVd avec un pré-miRNA. En comparant la tige P11 de PLMVd et le précurseur de miRNA lin-4, on remarque immédiatement leur grande similarité. Ce sont deux structures en forme d'épingle à cheveux dont la tige est interrompue par des bulges.

Enfin, les résultats présentés dans ce mémoire ont permis d'éclaircir plusieurs points concernant les viroïdes et l'interférence à l'ARN. Dans un premier temps, les résultats ont démontrés que PLMVd, un viroïde de la famille des *Avsunviroidae*, était en mesure de déclencher le phénomène d'interférence à l'ARN et que les siRNA retrouvés formaient une population qui couvrait entièrement le génome de PLMVd. Dans un deuxième temps, les résultats ont révélé que les monomères de PLMVd servaient de substrat à Dicer, et plus particulièrement la tige P11. Les caractéristiques de cette dernière ont été étudiées afin de mieux comprendre l'interaction de Dicer et de son substrat. Somme toute, comme les viroïdes sont un fléau dans le domaine agro-alimentaire, il est important de continuer de les étudier pour percer leur mystère et ainsi pouvoir mieux les enrayer ou du moins, les contrôler. En ce sens, l'interférence à l'ARN pourrait être un moyen d'y parvenir.



**Figure 16.** Modèle du rôle de l'interférence à l'ARN dans la pathogénicité des viroïdes. Les viroïdes, de par leur structure secondaire importante, peuvent être directement reconnus et clivés par Dicer en petits fragments d'ARN de 21-25 nucléotides (siRNA). Cela pourrait également se produire lors de l'appariement des intermédiaires de réplication de polarité positive et négative, qui sont complémentaires. Les siRNA sont incorporés dans le complexe multiprotéique RISC. S'il existe une similitude significative entre les séquences du viroïde et une région d'un ARNm de l'hôte, RISC va cibler le gène de l'hôte pour la dégradation, ce qui va mener à l'apparition de symptômes. RISC peut également cibler le viroïde pour le conduire à être dégradé.

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier tout d'abord le Dr Jean-Pierre Perreault de m'avoir accueilli dans son laboratoire et de m'avoir guidé et encouragé pendant ma maîtrise. Je veux également dire un gros merci à tous les membres du laboratoire pour leur support tant scientifique que moral. Finalement, je tiens à remercier ma famille qui m'a supporté et encouragé tout au long de mes études, dans les bons comme les moins bons moments.



## RÉFÉRENCES

- Bartel, B., and Bartel, D. P. (2003). MicroRNAs: at the root of plant development? *Plant Physiol* **132**(2), 709-17.
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**(2), 281-97.
- Baumstark, T., and Riesner, D. (1995). Only one of four possible secondary structures of the central conserved region of potato spindle tuber viroid is a substrate for processing in a potato nuclear extract. *Nucleic Acids Res* **23**(21), 4246-54.
- Bernstein, E., Caudy, A. A., Hammond, S. M., and Hannon, G. J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**(6818), 363-6.
- Blaszczyk, J., Tropea, J. E., Bubunenko, M., Routzahn, K. M., Waugh, D. S., Court, D. L., and Ji, X. (2001). Crystallographic and modeling studies of RNase III suggest a mechanism for double-stranded RNA cleavage. *Structure (Camb)* **9**(12), 1225-36.
- Bonfiglioli, R. G., Webb, D.R., Symons, R.H. (1996). Tissue and intra-cellular distribution of coconut cadang cadang viroid determined by *in situ* hybridization and confocal laser scanning and transmission electron microscopy. *Plant Journal* **9**, 457-465.
- Branch, A. D., Benenfeld, B. J., and Robertson, H. D. (1988). Evidence for a single rolling circle in the replication of potato spindle tuber viroid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 9128-9132.
- Branch, A. D., and Robertson, H. D. (1981). Longer-than-unit-length viroid minus strand are present in RNA from infected plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 6381-6385.

- Branch, A. D., and Robertson, H. D. (1984). A replication cycle for viroids and other small infectious RNA's. *Science* **223**(4635), 450-5.
- Branch, A. D., Robertson, H. D., Greer, C., Gegenheimer, P., Peebles, C., and Abelson, J. (1982). Cell free circularization of viroid progeny by RNA ligase from wheat germ. *Science* **217**, 1147-1149.
- Bussiere, F., Lehoux, J., Thompson, D. A., Skrzeczkowski, L. J., and Perreault, J. (1999). Subcellular localization and rolling circle replication of peach latent mosaic viroid: hallmarks of group A viroids. *J Virol* **73**(8), 6353-60.
- Bussiere, F., Ouellet, J., Cote, F., Levesque, D., and Perreault, J. P. (2000). Mapping in solution shows the peach latent mosaic viroid to possess a new pseudoknot in a complex, branched secondary structure. *J Virol* **74**(6), 2647-54.
- Caudy, A. A., Ketting, R. F., Hammond, S. M., Denli, A. M., Bathoorn, A. M., Tops, B. B., Silva, J. M., Myers, M. M., Hannon, G. J., and Plasterk, R. H. (2003). A micrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. *Nature* **425**(6956), 411-4.
- Caudy, A. A., Myers, M., Hannon, G. J., and Hammond, S. M. (2002). Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. *Genes Dev* **16**(19), 2491-6.
- Cerutti, H. (2003). RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? *Trends Genet* **19**(1), 39-46.
- Cerutti, L., Mian, N., and Bateman, A. (2000). Domains in gene silencing and cell differentiation proteins: the novel PAZ domain and redefinition of the Piwi domain. *Trends Biochem Sci* **25**(10), 481-2.

- Chiu, Y. L., and Rana, T. M. (2002). RNAi in human cells: basic structural and functional features of small interfering RNA. *Mol Cell* 10(3), 549-61.
- Cote, F., Levesque, D., and Perreault, J. P. (2001). Natural 2',5'-phosphodiester bonds found at the ligation sites of peach latent mosaic viroid. *J Virol* 75(1), 19-25.
- Covey, S. N., Al-Kaff, N. S., Lángara, A., and Turner, D. S. (1997). Plants combat infection by gene silencing. *Nature* 385, 781.
- Daros, J. A., Marcos, J. F., Hernandez, C., and Flores, R. (1994). Replication of avocado sunblotch viroid: evidence for a symmetric pathway with two rolling circles and hammerhead ribozyme processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(26), 12813-7.
- Denti, M. A., Boutla, A., Tsagris, M., and Tabler, M. (2004). Short interfering RNAs specific for potato spindle tuber viroid are found in the cytoplasm but not in the nucleus. *Plant J* 37(5), 762-9.
- Diener, T. O. (1971). Potato spindle tuber "virus". IV. A replicating, low molecular weight RNA. *Virology* 45(2), 411-28.
- Diener, T. O. (1993). The viroid: big punch in a small package. *Trends Microbiol* 1(8), 289-94.
- Diener, T. O., and Raymer, W. B. (1967). Potato spindle tuber virus: a plant virus with properties of a free nucleic acid. *Science* 158(799), 378-81.
- Doench, J. G., Petersen, C. P., and Sharp, P. A. (2003). siRNAs can function as miRNAs. *Genes Dev* 17(4), 438-42.
- Elbashir, S. M., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001a). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev* 15(2), 188-200.
- Elbashir, S. M., Martinez, J., Patkaniowska, A., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001b).

- Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *Embo J* **20**(23), 6877-88.
- Feldstein, P. A., Hu, Y., and Owens, R. A. (1998). Precisely full length, circularizable, complementary RNA: an infectious form of potato spindle tuber viroid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(11), 6560-5.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., and Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**(6669), 806-11.
- Flores, R., Daros, J. A., and Hernandez, C. (2000). Avsunviroidae family: viroids containing hammerhead ribozymes. *Adv Virus Res* **55**, 271-323.
- Flores, R., and Semancik, J. S. (1982). Properties of a cell free system for synthesis of citrus exocortis viroid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 6285-6288.
- Garcia-Arenal, F., and Palukaitis, P. (1999). Structure and functional relationships of satellite RNAs of cucumber mosaic virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **239**, 37-63.
- Grill, L. K., and Semancik, J. S. (1978). RNA sequences complementary to citrus exocortis viroid in nucleic acid preparations from infected *Gynura aurantiaca*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **75**, 896-900.
- Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D. L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C. C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* **106**(1), 23-34.
- Hamilton, A., Voinnet, O., Chappell, L., and Baulcombe, D. (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *Embo J* **21**(17), 4671-9.

- Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D., and Hannon, G. J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**(6775), 293-6.
- Hammond, S. M., Boettcher, S., Caudy, A. A., Kobayashi, R., and Hannon, G. J. (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* **293**(5532), 1146-50.
- Harders, J., Lukacs, N., Robert-Nicoud, M., Jovin, T. M., and Riesner, D. (1989). Imaging of viroids in nuclei from tomato leaf tissue by in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. *Embo J* **8**(13), 3941-9.
- Hernandez, C., and Flores, R. (1992). Plus and minus RNAs of peach latent mosaic viroid self-cleave in vitro via hammerhead structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(9), 3711-5.
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Balint, E., Tuschl, T., and Zamore, P. D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* **293**(5531), 834-8.
- Hutvagner, G., and Zamore, P. D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* **297**(5589), 2056-60.
- Ishizuka, A., Siomi, M. C., and Siomi, H. (2002). A *Drosophila* fragile X protein interacts with components of RNAi and ribosomal proteins. *Genes Dev* **16**(19), 2497-508.
- Itaya, A., Folimonov, A., Matsuda, Y., Nelson, R. S., and Ding, B. (2001). Potato spindle tuber viroid as inducer of RNA silencing in infected tomato. *Mol Plant Microbe Interact* **14**(11), 1332-4.
- Jacobsen, S. E., Running, M. P., and Meyerowitz, E. M. (1999). Disruption of an RNA

- helicase/RNase III gene in Arabidopsis causes unregulated cell division in floral meristems. *Development* **126**(23), 5231-43.
- Jensen, S., Gassama, M. P., and Heidmann, T. (1999). Taming of transposable elements by homology-dependent gene silencing. *Nat Genet* **21**(2), 209-12.
- Jones, L., Hamilton, A. J., Voinnet, O., Thomas, C. L., Maule, A. J., and Baulcombe, D. C. (1999). RNA-DNA interactions and DNA methylation in post-transcriptional gene silencing. *Plant Cell* **11**(12), 2291-301.
- Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E. J., Krizan, K. A., and Carrington, J. C. (2003). P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev Cell* **4**(2), 205-17.
- Kennerdell, J. R., and Carthew, R. W. (1998). Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* **95**(7), 1017-26.
- Knight, S. W., and Bass, B. L. (2001). A role for the RNase III enzyme DCR-1 in RNA interference and germ line development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* **293**(5538), 2269-71.
- Konarska, M., Filipowicz, W., Domdey, H., and Gross, H. J. (1981). Formation of a 2'-phosphomonoester, 3',5'-phosphodiester linkage by a novel RNA ligase in wheat germ. *Nature* **293**(5828), 112-6.
- Konarska, M., Filipowicz, W., and Gross, H. J. (1982). RNA ligation via 2'-phosphomonoester, 3',5'-phosphodiester linkage: requirement of 2',3'-cyclic phosphate termini and involvement of a 5'-hydroxyl polynucleotide kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(5), 1474-8.

- Lafontaine, D., Beaudry, D., Marquis, P., and Perreault, J. P. (1995). Intra- and intermolecular nonenzymatic ligations occur within transcripts derived from the peach latent mosaic viroid. *Virology* **212**(2), 705-9.
- Lima, M. I., Fonseca, M. E., Flores, R., and Kitajima, E. W. (1994). Detection of avocado sunblotch viroid in chloroplasts of avocado leaves by in situ hybridization. *Arch Virol* **138**(3-4), 385-90.
- Llave, C., Kasschau, K. D., Rector, M. A., and Carrington, J. C. (2002b). Endogenous and silencing-associated small RNAs in plants. *Plant Cell* **14**(7), 1605-19.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K. D., and Carrington, J. C. (2002a). Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* **297**(5589), 2053-6.
- Marcos, J. F., and Flores, R. (1992). Characterization of RNAs specific to avocado sunblotch viroid synthesized in vitro by a cell-free system from infected avocado leaves. *Virology* **186**(2), 481-8.
- Markarian, N., Li, H. W., Ding, S. W., and Semancik, J. S. (2004). RNA silencing as related to viroid induced symptom expression. *Arch Virol* **149**(2), 397-406.
- Martinez de Alba, A. E., Flores, R., and Hernandez, C. (2002). Two chloroplastic viroids induce the accumulation of small RNAs associated with posttranscriptional gene silencing. *J Virol* **76**(24), 13094-6.
- Muhlbach, H. P., and Sanger, H. L. (1979). Viroid replication is inhibited by alpha-amanitin. *Nature* **278**(5700), 185-8.
- Navarro, B., and Flores, R. (1997). Chrysanthemum chlorotic mottle viroid: unusual structural properties of a subgroup of self-cleaving viroids with hammerhead

- ribozymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(21), 11262-7.
- Navarro, J. A., Daros, J. A., and Flores, R. (1999). Complexes containing both polarity strands of avocado sunblotch viroid: identification in chloroplasts and characterization. *Virology* **253**(1), 77-85.
- Navarro, J. A., and Flores, R. (2000). Characterization of the initiation sites of both polarity strands of a viroid RNA reveals a motif conserved in sequence and structure. *Embo J* **19**(11), 2662-70.
- Navarro, J. A., Vera, A., and Flores, R. (2000). A chloroplastic RNA polymerase resistant to tagetitoxin is involved in replication of avocado sunblotch viroid. *Virology* **268**(1), 218-25.
- Nicholson, R. H., and Nicholson, A. W. (2002). Molecular characterization of a mouse cDNA encoding Dicer, a ribonuclease III ortholog involved in RNA interference. *Mamm Genome* **13**(2), 67-73.
- Nykanen, A., Haley, B., and Zamore, P. D. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell* **107**(3), 309-21.
- Oelgeschlager, M., Larrain, J., Geissert, D., and De Robertis, E. M. (2000). The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling. *Nature* **405**(6788), 757-63.
- Owens, R. A., and Diener, T. O. (1982). RNA intermediates in potato spindle tuber viroid replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 113-117.
- Papaefthimiou, I., Hamilton, A., Denti, M., Baulcombe, D., Tsagris, M., and Tabler, M. (2001). Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *Nucleic*



*Acids Res* 29(11), 2395-400.

- Pelchat, M., Cote, F., and Perreault, J. P. (2001). Study of the polymerization step of the rolling circle replication of peach latent mosaic viroid. *Arch Virol* 146(9), 1753-63.
- Pelchat, M., Grenier, C., and Perreault, J. P. (2002). Characterization of a viroid-derived RNA promoter for the DNA-dependent RNA polymerase from *Escherichia coli*. *Biochemistry* 41(20), 6561-71.
- Pelchat, M., Levesque, D., Ouellet, J., Laurendeau, S., Levesque, S., Lehoux, J., Thompson, D. A., Eastwell, K. C., Skrzeczkowski, L. J., and Perreault, J. P. (2000). Sequencing of peach latent mosaic viroid variants from nine North American peach cultivars shows that this RNA folds into a complex secondary structure. *Virology* 271(1), 37-45.
- Pelchat, M., Rocheleau, L., Perreault, J., and Perreault, J. P. (2003). SubViral RNA: a database of the smallest known auto-replicable RNA species. *Nucleic Acids Res* 31(1), 444-5.
- Pfeffer, S., Zavolan, M., Grasser, F. A., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., John, B., Enright, A. J., Marks, D., Sander, C., and Tuschl, T. (2004). Identification of virus-encoded microRNAs. *Science* 304(5671), 734-6.
- Pham, J. W., Pellino, J. L., Lee, Y. S., Carthew, R. W., and Sontheimer, E. J. (2004). A Dicer-2-dependent 80s complex cleaves targeted mRNAs during RNAi in *Drosophila*. *Cell* 117(1), 83-94.
- Provost, P., Dishart, D., Doucet, J., Friendewey, D., Samuelsson, B., and Radmark, O. (2002). Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human Dicer. *Embo J* 21(21), 5864-74.

- Qi, Y., and Ding, B. (2003). Differential subnuclear localization of RNA strands of opposite polarity derived from an autonomously replicating viroid. *Plant Cell* **15**(11), 2566-77.
- Rackwitz, H. R., Rohde, W., and Sanger, H. L. (1981). DNA-dependent RNA polymerase II of plant origin transcribes viroid RNA into full-length copies. *Nature* **291**(5813), 297-301.
- Ratcliff, F., Harrison, B. D., and Baulcombe, D. C. (1997). A similarity between viral and gene silencing in plants. *Science* **276**, 1558.
- Ratcliff, F. G., MacFarlane, S. A., and Baulcombe, D. C. (1999). Gene silencing without DNA. rna-mediated cross-protection between viruses. *Plant Cell* **11**(7), 1207-16.
- Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B., and Bartel, D. P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev* **16**(13), 1616-26.
- Rhoades, M. W., Reinhart, B. J., Lim, L. P., Burge, C. B., Bartel, B., and Bartel, D. P. (2002). Prediction of plant microRNA targets. *Cell* **110**(4), 513-20.
- Romano, N., and Macino, G. (1992). Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Mol Microbiol* **6**(22), 3343-53.
- Rotondo, G., and Frendewey, D. (1996). Purification and characterization of the Pac1 ribonuclease of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res* **24**(12), 2377-86.
- Schindler, I. M., and Muhlbach, H. P. (1992). Involvement of nuclear DNA-dependant RNA polymerase in potato spindle tuber viroid replication: a reevaluation. *Plant Science* **84**, 221-229.
- Spiesmacher, E., Muhlbach, H. P., Schnolzer, M., Haas, B., and Sanger, H. L. (1983).

- Oligomeric forms of potato spindle tuber viroid (PSTV) and of its complementary RNA are present in nuclei isolated from viroid-infected potato cells. *Biosci Rep* **3**(8), 767-74.
- Svoboda, P., Stein, P., Hayashi, H., and Schultz, R. M. (2000). Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. *Development* **127**(19), 4147-56.
- Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W. G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., and Mello, C. C. (1999). The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell* **99**(2), 123-32.
- Tang, G., Reinhart, B. J., Bartel, D. P., and Zamore, P. D. (2003). A biochemical framework for RNA silencing in plants. *Genes Dev* **17**(1), 49-63.
- Tsagris, M., Tabler, M., and Sanger, H. L. (1991). Ribonuclease T1 generates circular RNA molecules from viroid-specific RNA transcripts by cleavage and intramolecular ligation. *Nucleic Acids Res* **19**(7), 1605-12.
- Tuschl, T., Zamore, P. D., Lehmann, R., Bartel, D. P., and Sharp, P. A. (1999). Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev* **13**(24), 3191-7.
- van der Krol, A. R., Mur, L. A., Beld, M., Mol, J. N., and Stuitje, A. R. (1990). Flavonoid genes in petunia: addition of a limited number of gene copies may lead to a suppression of gene expression. *Plant Cell* **2**(4), 291-9.
- Voinnet, O., Pinto, Y. M., and Baulcombe, D. C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**(24), 14147-52.
- Wang, M. B., Bian, X. Y., Wu, L. M., Liu, L. X., Smith, N. A., Isenegger, D., Wu, R. M.,

- Masuta, C., Vance, V. B., Watson, J. M., Rezaian, A., Dennis, E. S., and Waterhouse, P. M. (2004). On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9), 3275-80.
- Warrilow, D., and Symons, R. H. (1999). Citrus exocortis viroid RNA is associated with the largest subunit of RNA polymerase II in tomato in vivo. *Arch Virol* 144(12), 2367-75.
- Waterhouse, P. M., Wang, M. B., and Lough, T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* 411(6839), 834-42.
- Wilson, R., Ainscough, R., Anderson, K., Baynes, C., Berks, M., Bonfield, J., Burton, J., Connell, M., Copsey, T., Cooper, J., and et al. (1994). 2.2 Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature* 368(6466), 32-8.
- Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A., and Bartel, D. P. (2000). RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 101(1), 25-33.

## ANNEXE

### Protocoles expérimentaux utilisés dans les deux articles

#### Extraction d'ARN de feuilles de pêcher

- Broyer 200 mg de feuilles dans de l'azote liquide.
- Ajouter 1 mL de Trizol (Gibco) et procéder selon les instructions du fabricant.
- Resuspendre l'ARN dans de l'eau et doser la quantité obtenue avec la  $DO_{260nm}$ .

N.B. PLMVd (+) (contrôle pour démontrer que les petits ARN ne sont pas des produits de dégradation) est ajouté immédiatement après l'étape de broyage des feuilles et avant l'ajout du Trizol.

#### Buvardage de type Northern pour la détection des petits fragments d'ARN

- Migrer 40  $\mu$ g d'ARN total de feuilles sur un gel de polyacrylamide 12% dénaturant (7 M urée)
- Transfert de l'ARN sur une membrane de nylon
- Réticulation aux UV et séchage de la membrane
- Pré-hybridation 3h30 à 58°C dans le tampon suivant : 5X SSC, 5X Denhardt, 1% SDS, 100  $\mu$ g/mL ADN de sperme de saumon.
- Hybridation 16h à 58°C avec une sonde radiomarquée au  $^{32}P$  de façon interne.
- Lavages : 2 x 5min dans 2X SSC à température pièce  
2 x 30 min dans tampon 2X SSC, 0,1% SDS à 58°C.

### Transcription des sondes

- Digestion du plasmide pPD1 par *EcoRI* (PLMVd -) ou par *BamHI* (PLMVd +) qui servira de matrice pour la transcription *in vitro*.
- Transcription *in vitro* de PLMVd - (ARN polymérase T7) et PLMVd + (ARN polymérase T3) en utilisant le StripEZ transcription kit (Ambion, Austin TX). La transcription est réalisée en présence de 50  $\mu\text{Ci}$  de  $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{GTP}$  (3000 Ci/mmol).

### Essai de coupure dans de l'extrait de germe de blé

- 0,5 pmol d'ARN transcrits *in vitro* et marqués de façon interne avec du  $^{32}\text{P}$  sont dénaturés 2 min à 85°C et lentement refroidis jusqu'à température ambiante, afin de favoriser un bon repliement.
- Incuber l'ARN en présence d'extrait de germe de blé selon les recommandations du manufacturier (Promega, Madison WI) pendant 3h à 25°C.
- Arrêter la réaction par un traitement à la protéinase K 15 min à 65°C suivi d'une extraction phénol/chloroforme.
- Précipiter à l'éthanol et migrer sur gel de polyacrylamide 10% dénaturant (7M urée).

N.B.

1. La structure secondaire adoptée par PLMVd est fort probablement celle illustrée dans la figure 11, puisqu'elle a été déterminée à l'aide d'essais de coupures avec diverses nucléases ainsi que par des analyses de covariation de différents variants (figure 2B) (Bussière et al. 2000, Pelchat et al. 2000). En ce qui concerne les fragments de PLMVd, il est admis qu'ils

adoptent les structures proposées à la figure 12. Cependant, aucun essai biochimique n'a été effectué afin de valider ces structures.

2. Un contrôle d'ARN simple-brin a été ajouté à l'extrait de germe de blé, mais s'est avéré inutilisable en raison de sa dégradation. En effet, l'extrait de germe de blé contient plusieurs ribonucléases et malgré l'ajout d'inhibiteur de ribonucléase dans l'extrait, l'ARN simple-brin est complètement dégradé. Ce contrôle a donc été remplacé par l'incubation du ribozyme *delta*, qui est un ARN structuré, donc plus résistant aux ribonucléases mais qui ne comporte pas de région double-brin assez longue pour être la cible de Dicer.