



ÉTUDE DES RÉPONSES DE DÉFENSE MISES EN PLACE CHEZ LA PLANTE EN RÉACTION À LA  
SUPPRESSION DE L'ARN D'INTERFÉRENCE

par

Raphaël Sansregret

thèse présentée au Département de biologie en vue  
de l'obtention du grade de docteur ès sciences (Ph.D.)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, mai 2015

Le 22 mai 2015

*le jury a accepté la thèse de Monsieur Raphaël Sansregret  
dans sa version finale.*

Membres du jury

Professeur Kamal Bouarab  
Directeur de recherche  
Département de biologie

Professeur Pere Mestre  
Évaluateur externe  
INRA Colmar

Professeur Peter Moffett  
Évaluateur interne  
Département de Biologie

Professeur Vincent Burrus  
Président-rapporteur  
Département de biologie

## Sommaire

Les plantes, comme tous les êtres vivants, subissent les assauts de différents agents pathogènes. Elles doivent donc entre autres se protéger des microbes et, pour ce faire, déploient deux mécanismes immunitaires actifs : la reconnaissance des éliciteurs et l'interférence à l'ARN (ARNi). Dans le cadre de la reconnaissance des éliciteurs, il y a premièrement l'immunité induite par les PAMP (PTI). Cette immunité de faible envergure permet à la plante de se protéger de la plupart des microbes indésirables. Afin de surpasser cette PTI, un pathogène bien outillé pour infecter une plante déploie des facteurs de virulence nommés effecteurs. Dans ce cas, pour se défendre, la plante devra arborer un gène de résistance dominant qui produira une protéine de résistance. Cette protéine reconnaîtra de manière spécifique l'effecteur du pathogène et mettra en place une réponse de défense hautement efficace, l'immunité induite par un effecteur (ETI). Le deuxième mécanisme immunitaire, l'ARNi, est un mécanisme principalement antiviral qui permet à la plante de cibler les génomes viraux de manière séquence spécifique. À l'image de la PTI, les virus ont évolué afin de contourner l'ARNi en produisant des protéines spécialisées qui altèrent le fonctionnement de l'ARNi. C'est ce que l'on nomme des suppresseurs viraux de l'ARNi ou VSR. J'ai démontré durant ma thèse que la protéine P19, un VSR qui séquestre les petits ARN (siARN), était reconnue chez certains cultivars de tabac. Cette reconnaissance induit une réponse de type ETI. Cette réponse, nécessitant l'action conjointe de l'acide salicylique et de l'éthylène, est caractérisée par la production de protéines reliées à la pathogénèse et par la mise en place d'une réaction hypersensible. Cette réponse de défense est si efficace que, dans le cadre d'une infection virale, il n'y a pas de lésion macroscopique et microscopique. Cette situation se nomme la résistance extrême. Qui plus est, cette réponse de défense nécessite la capacité de liaison de la P19 à un petit ARN. Mes travaux ont aussi démontré l'implication de certaines protéines clés de la machinerie de l'ARNi dans la mise en place de la réponse de défense contre les VSR. La plante pourrait donc percevoir les dommages causés par les VSR à la machinerie de l'ARNi via des protéines clés de ce mécanisme. Ces recherches à terme permettront de mieux documenter le système immunitaire des plantes, ce qui permettra par la

suite de mieux sélectionner les cultivars mis en culture et de diminuer l'impact des pathogènes sur les cultures tout en réduisant l'utilisation des pesticides.

Mots Clés : plante, virus, interférence à l'ARN, réponse de défense, résistance extrême, réaction hypersensible, P19.



## Remerciements

Je tiens à remercier premièrement mon directeur de recherche, Kamal Bouarab. Malgré les hauts et les bas durant mes études supérieures, tu es resté une figure toujours présente et compréhensive. Merci également à mes conseillers, Peter Moffett et Vincent Burrus, pour le temps, les conseils et l'énergie que vous avez consacrés à mon projet. Merci à Pere Mestre pour avoir accepté d'examiner mon manuscrit et de faire partie de mon jury. Je tiens aussi à remercier les membres du laboratoire, ceux toujours présents et ceux qui sont partis, Rocio Maria Gonzalez Lamothe, Taha Abdel Rahman, Salma El Mnouchi, Mohammed El Oirdi, Vanessa Dufour, et tous ceux qui n'ont fait que passer pour un bref instant. J'aimerais aussi remercier les membres du laboratoire d'Olivier Voinnet à l'IBMP de Strasbourg, plus particulièrement Gregory Schott, Christophe Himber et surtout Patrice Dunoyer.

Je tiens aussi à remercier les organismes subventionnaires qui ont permis la réalisation de mes travaux. Merci au Conseil de recherche en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), au Centre SÈVE et au Fonds de recherche du Québec en nature et en technologies (FRQNT).

Je souhaite aussi remercier mes amis, plus particulièrement Pierre-Luc Mallet et Pascal Viens. Votre amitié, nos discussions, nos soirées tranquilles et nos parties de chasse aux chevreuils et aux oiseaux migrateurs ont sûrement joué un rôle positif dans mes études.

Je tiens aussi à remercier ma famille, mon père, ma mère, la famille Sansregret, la famille Adam et ma belle-famille. Durant les dernières années, j'ai été beaucoup moins présent que j'aurais voulu, surtout dans les moments plus difficiles. Je tiens aussi à te remercier, Jessica Simard, ma conjointe, pour ton amour, ton support, tes encouragements, pour les sacrifices que tu as faits et surtout pour m'avoir offert un beau garçon. Rémi, mon garçon, merci d'avoir illuminé ma vie avec tes sourires et tes câlins.

« Les sciences sont un labyrinthe où l'on s'enfonce plus avant au moment même où l'on croyait en sortir. »

François-René de Chateaubriand

## Table des matières

Sommaire .....	i
Remerciements .....	iv
Table des matières .....	vi
Liste des abréviations .....	x
Liste des tableaux .....	xiii
Liste des figures .....	xiv
Introduction.....	1
1 Les facteurs de stress chez les plantes .....	1
2 Les mécanismes de défense chez les plantes.....	3
2.1 La reconnaissance des éliciteurs .....	3
2.1.1 Concepts généraux .....	4
2.1.2 Les MAMP.....	6
2.1.3 Les récepteurs des PAMP .....	6
2.1.4 Les effecteurs .....	8
2.1.5 Les protéines de résistance.....	9
2.2 La réponse de défense induite .....	11
2.2.1 Les messagers secondaires.....	12
2.2.2 Mise en place de la réponse de défense .....	14
2.2.3 La réaction hypersensible .....	15
2.3 L'interférence à l'ARN .....	15
2.3.1 Mécanisme généraux de l'interférence à l'ARN .....	16
2.3.1.1 La transitivity et l'amplification du signal antivirale.....	17
2.3.1.2 Les Argonautes .....	17
2.3.1.3 Argonaute1 et sa régulation .....	18

2.3.1.4	Les protéines DICER-LIKES .....	20
2.3.1.5	La voie des micro-ARN.....	21
2.3.2	Mécanisme antiviral de l'interférence à l'ARN.....	22
2.4	La suppression de l'interférence à l'ARN.....	24
2.4.1	Les supprimeurs qui ciblent les argonautes.....	24
2.4.2	Les supprimeurs qui ciblent les petits ARN.....	25
2.4.3	La protéine P19 des tombusvirus.....	26
2.5	Les virus chez les plantes.....	27
2.5.1	Le virus X de la pomme de terre.....	28
2.5.2	Le virus de la mosaïque du tabac.....	28
2.5.3	Le virus du rabougrissement de la tomate .....	29
3	Objectif du projet de Recherche.....	30
Chapitre 2.....		33
1	ABSTRACT .....	36
2	AUTHOR SUMMARY .....	37
3	INTRODUCTION.....	38
4	RESULTS.....	42
4.1	P19 is required to trigger an ETI-like resistance against TBSV in <i>N. tabacum</i> .....	42
4.2	Salicylic acid and ethylene are required for extreme resistance induced by P19 .....	46
4.3	sRNAs binding by P19 is necessary for P19-mediated elicitation of defense .....	48
4.4	RNA silencing suppression and sRNAs binding are not sufficient, <i>per se</i> , to trigger HR-like lesions in <i>N. tabacum</i> .....	50

4.5	Co-expression of unrelated VSRs compromise the onset of HR elicited by P19, but not resistance conferred by Rx against PVX.....	51
5	DISCUSSION.....	56
6	MATERIALS AND METHODS .....	60
6.1	Plant conditions and transgenic lines .....	60
6.2	Transient expression.....	60
6.3	Protein extraction and gel blot analysis .....	61
6.4	Quantitative PCR.....	61
6.5	Virus infections .....	62
6.6	Northern analysis.....	62
6.7	Trypan blue staining.....	63
6.8	Immunoprecipitation experiments.....	63
6.9	Salicylic acid quantification .....	64
7	ACKNOWLEDGMENTS .....	64
8	REFERENCES .....	65
	Chapitre 3.....	77
1	Matériel et méthodes .....	77
1.1	Condition de croissance des plantes.....	77
1.2	Agroinfiltration.....	77
1.3	VIGS.....	78
1.4	Extraction des protéines totales.....	79
1.5	Immunobuvardage de type western.....	79
1.6	PCR en temps réel .....	80
1.7	Immunobuvardage de type Northern.....	81
2	Résultats .....	82

2.1	Mise en contexte.....	82
2.2	Implication d'AGO1 dans la mise en place de la HR induite par des VSR.....	87
2.3	Impact du VIGS dirigé contre AGO1 sur la mise en place de la HR induite par un VSR.....	92
3	Discussion et conclusion .....	97
	Annexe 1 .....	105
	Annexe 2.....	110
	Bibliographie .....	1111

## Liste des abréviations

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AGO</b>	Argonaute
<b>AJ</b>	Acide jasmonique
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ARNdb</b>	Acide ribonucléique double brin
<b>ARNg</b>	Acide ribonucléique génomique
<b>ARNi</b>	Interférence à l'acide ribonucléique
<b>ARNsb</b>	Acide ribonucléique simple brin
<b>ARNsg</b>	Acide ribonucléique sous-génomique
<b>ARNm</b>	Acide ribonucléique messenger
<b>ARNt</b>	Acide ribonucléique total
<b>ARNv</b>	Acide ribonucléique viral
<b>AS</b>	Acide salicylique
<b>Avr</b>	Protéine d'avirulence
<b>BWYV</b>	Virus de la jaunisse de la betterave de l'Ouest
<b>CC</b>	Domaine protéique en faisceau d'hélices
<b>CDPK</b>	Protéine kinase dépendante du calcium
<b>CMV</b>	Virus de la mosaïque du concombre
<b>DAMP</b>	Motif moléculaire associé au dommage
<b>DCL</b>	Protéine « dicer-like »
<b>ET</b>	Éthylène
<b>ETI</b>	Immunité induite par les effecteurs
<b>ETS</b>	Susceptibilité induite par les effecteurs
<b>GUS</b>	Bêta-glucuronidase
<b>hpp</b>	Heure postpulvérisation
<b>HR</b>	Réaction hypersensible
<b>kb</b>	Kilobase
<b>kDa</b>	Kilo Dalton
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LRR</b>	Domaine protéique riche en répétition de leucine
<b>MAMP</b>	Motif moléculaire associé au pathogène
<b>MAPK</b>	« Mitogen-Activated Protein Kinase »

<b>miARN</b>	Micro-ARN
<b>miARN*</b>	Brin complémentaire du miARN
<b>MID</b>	Domaine « Middle »
<b>NB</b>	Domaine de liaison aux nucléotides
<b>NB-LRR</b>	Protéine avec un domaine NB et LRR
<b>nt</b>	Nucléotide
<b>PAMP</b>	« Pathogen associated molecular pattern »
<b>PAZ</b>	Domaine protéique « PIWI-ARGONAUTE-ZWILLE »
<b>pb</b>	Paire de base
<b>PIWI</b>	Domaine «P-element induced wimpy testies»
<b>pré-miARN</b>	miARN préliminaire
<b>pri-miARN</b>	miARN primaire
<b>PR</b>	Associé à la pathogénèse
<b>PRR</b>	« Pattern recognition receptor »
<b>PTI</b>	Immunité induite par les PAMP
<b>PVX</b>	Virus X de la pomme de terre
<b>RdRp</b>	ARN polymérase dépendante de l'ARN
<b>RDRv</b>	ARN polymérase dépendante de l'ARN viral
<b>RISC</b>	« RNA-induced silencing complexe »
<b>RLK</b>	« Receptor like kinase »
<b>RLP</b>	« Receptor like protein »
<b>ROS</b>	Espèce activée d'oxygène
<b>RPM</b>	Rotation par minute
<b>RSA</b>	Résistance systémique acquise
<b>siARN</b>	Petit ARN d'interférence
<b>tasi-ARN</b>	« Trans-activating » siARN
<b>TCV</b>	Virus du gondolement du navet
<b>TGB</b>	Bloc de gène triple
<b>TMV</b>	Virus de la mosaïque du tabac
<b>TRV</b>	Virus du bruissement du tabac
<b>TTSS</b>	Système de sécrétion de type 3
<b>TIR</b>	Domaine similaire au récepteur « toll interleukine-1 »
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b>VIGS</b>	« Virus induced gene silencing »

**VSR**  
**VTS**

Suppresseur de l'interférence à l'ARN viral  
Susceptibilité induite par un VSR

## Liste des tableaux

- 1 Tableau des combinaisons d'antibiotiques utilisées pour l'expression de chacune des constructions 75

## Liste des figures

1. Modèle en zigzag qui représente la co-évolution de la relation de susceptibilité et de résistance entre plante et pathogène.....	5
2. Structure des RLP et des RLK ainsi que le fonctionnement de la reconnaissance de la flagelline. ....	7
3. Similarités et différences lors de la mise en place de l'ETI et de la PTI.....	11
4. Illustration des différents domaines des protéines Dicer-like et Argonautes .....	18
5. Régulation du transcrit d'AGO1 par le miR168.....	19
6. Voie des micr-ARN.....	22
7. Le mécanisme de l'ARNi antiviral.....	23
8. Organisation du génome de PVX.....	28
9. Organisation génomique du TMV.....	29
10. Organisation génomique et sub-génomique du TBSV .....	30
11. Modèle Zigzag adapté à la réponse de défense antivirale.....	31
12. Exemple de supresseurs de la PTI qui sont perçus par la plante via leurs dommages.....	83
13. Hypothèse où la suppression de la PTI induit l'ETI.....	85

14. Hypothèse spécifique stipulant que les dommages causés à l'ARNi pourraient être perçus via la protéine AGO1 .....	86
15. Accumulation du miR168 en réponse à la P19.....	88
16. Figure 16: Effet du miR168 sur l'accumulation de l'ARNm d'AGO1. ....	89
17. Impact du miR168 sur la HR induite par P19 et CP/Rx. ....	90
18. Impact de l'expression du miR168 sur la réponse de défense induite par P50 chez deux espèces de tabac .....	91
19. Impact du VIGS d'AGO1 sur la réponse de défense de CP/Rx .....	93
20. Impact du VIGS d'AGO1 sur la HR induite par P50/N .....	94
21. Impact de deux VSR affectant AGO1 sur la HR induite par P19-myc et P50-myc chez Ntx .....	96
22. Modèle intégrant les résultats .....	102
23. Impact de l'absence de certaines DCL sur la mise en place de la HR induite par CP/Rx.....	105
24. Impact de l'absence des protéines DCL sur la mise en place de la HR induite par P19-myc.....	106
25. Impact de l'absence de certaines DCL sur la mise en place de la HR induite par P50-myc.....	107

26. Quantification du transcrit d'AGO1 par qPCR suite à l'induction de la production de la P19 ..... 110

## Introduction

### 1 Les facteurs de stress chez les plantes

Les plantes sont exposées dans leur environnement à une multitude de stress pouvant potentiellement attenter à leur vie. Il y a deux types de stress : abiotiques et biotiques. Les stress abiotiques sont principalement causés par des facteurs physicochimiques induisant des conditions adverses à la plante lorsqu'ils sont hors des capacités biologiques de cette dernière. Le taux d'humidité, les minéraux, les métaux lourds, la luminosité et le rayonnement ultraviolet (UV) peuvent tous causer des stress abiotiques (Qureshi *et al.*, 2007). Les facteurs de stress biotiques sont, quant à eux, issus de la prédation ou des attaques effectuées par différents organismes sur la plante. Ainsi, les insectes, les nématodes, les protozoaires, les champignons, les bactéries, les virus et les viroïdes sont tous des agents de stress biotiques (Dreher et Callis, 2007). Les plantes, ne pouvant fuir devant le danger, ont dû développer des stratégies de défense efficaces pour contrer ces périls. La seule chose que les plantes peuvent donc faire c'est moduler l'expression de leurs gènes afin de produire une réponse de défense qui les protégera contre l'agresseur (Kumar, 2014). La plante ne subira pas de dommage si la réponse qu'elle aura mise en place est adéquate. Par contre, si la réponse de défense est inefficace ou si l'agent pathogène réussit à la contourner, il y aura apparition de symptômes et d'une maladie qui peut potentiellement conduire à la mort de la plante.

Les dommages causés par les agents de stress biotiques ne s'arrêtent pas seulement aux plantes en milieu naturelle. Les agents pathogènes s'attaquent aussi aux plantes utilisées dans nos systèmes de production agricole. Un bon exemple est la perte de la récolte de l'orge brassicole québécois de l'année 2014 causée par des conditions propices au développement de la fusariose de l'orge. Cette maladie fait frémir les agriculteurs de l'Écosse qui doivent produire des grains impeccables afin d'alimenter la très célèbre industrie écossaise du whisky (Nielsen *et al.*, 2014). Les dommages aux champs causent des maux de tête aux agriculteurs qui, pour éviter d'avoir des pertes de production et donc des pertes économiques, vont utiliser

des pesticides. L'utilisation des pesticides est de plus en plus remise en question; ce choix met un poids économique supplémentaire sur la production et ne se fait pas sans risques

Or, au Québec, l'utilisation des pesticides a connu une ascension fulgurante depuis la révolution agricole des années 1970. C'est en 1976, après l'élection du Parti québécois, que Jean Garon, alors ministre de l'Agriculture (de 1976 à 1985), fera passer l'agriculture au 21<sup>e</sup> siècle. Les fermiers deviendront successivement des agriculteurs et, de nos jours, des producteurs agricoles. Ce développement de la production agricole industrielle est principalement fait en utilisant la mécanisation, les fertilisants et les pesticides. Un rapport de 2010 indique que 3 846 052 kilogrammes d'ingrédients actifs ont été utilisés au Québec. L'utilisation en milieu agricole compte maintenant pour près de 87% de l'utilisation total. En excluant les foins, l'utilisation est passée de 2,48 kg en 2004 à 3,14 kg d'ingrédients actifs par hectare en 2010, ce qui représente une augmentation de presque 27% en seulement 5 ans (Gorse et Balg, 2013). Il faudrait être naïf pour croire qu'épandre autant de produit chimique ne produit aucun tort à l'environnement. Une étude réalisée au Québec a permis de constater que l'on peut facilement détecter dans les communautés benthiques des rivières les composés utilisés par la production agricole. Dans certains cas, ces composés se trouvent même à des niveaux supérieurs que ceux considérés sécuritaires par les normes gouvernementales québécoises (Richard et Giroux, 2004). On sait aussi que ces ingrédients actifs peuvent avoir des effets néfastes sur les populations d'amphibiens, de poissons et d'oiseaux (Tellier, 2006).

Ces composés ne sont pas seulement dangereux pour l'environnement; ils sont aussi nocifs pour la santé humaine. Certaines molécules épandues au champ font effectivement augmenter la prévalence de plusieurs cancers comme celui de la prostate, du pancréas et de leucémie (Infante-Rivard et Weichenthal, 2007; Koutros *et al.*, 2010; Santibanez *et al.*, 2010). Il a aussi été démontré que l'exposition à ces molécules cause des problèmes reproducteurs, dont une baisse de la fertilité chez l'homme (Gallegos-Avila *et al.*, 2010).

Il est donc important de trouver des solutions de remplacement qui soient novatrices, plus efficaces et moins nocives pour l'environnement et la santé humaine. Notre stratégie retenue serait de stimuler le système immunitaire de la plante afin que cette dernière soit capable de se défendre avec peu ou sans apport d'intrant chimique. Pour développer une telle stratégie qui

soit efficace, il faut bien comprendre le système immunitaire de la plante et le dialogue entre la plante et les agents pathogènes. Mieux comprendre ces interactions, les mécanismes de reconnaissance et la mise en place de la réponse de défense, est la seule manière de pouvoir concrétiser cette approche. C'est donc dans cette optique que ma thèse se situe. Quels sont les mécanismes de reconnaissance des agents pathogènes? Comment la plante reconnaît-elle l'agent infectieux ? Comment perçoit-elle les molécules effectrices des agents pathogènes et quelles sont les réponses de défense mises en place?

Les travaux réalisés dans le cadre de ma thèse ont pour but d'élucider les mécanismes moléculaires utilisés par la plante afin de percevoir les agressions causées par les infections virales.

## **2 Les mécanismes de défense chez les plantes**

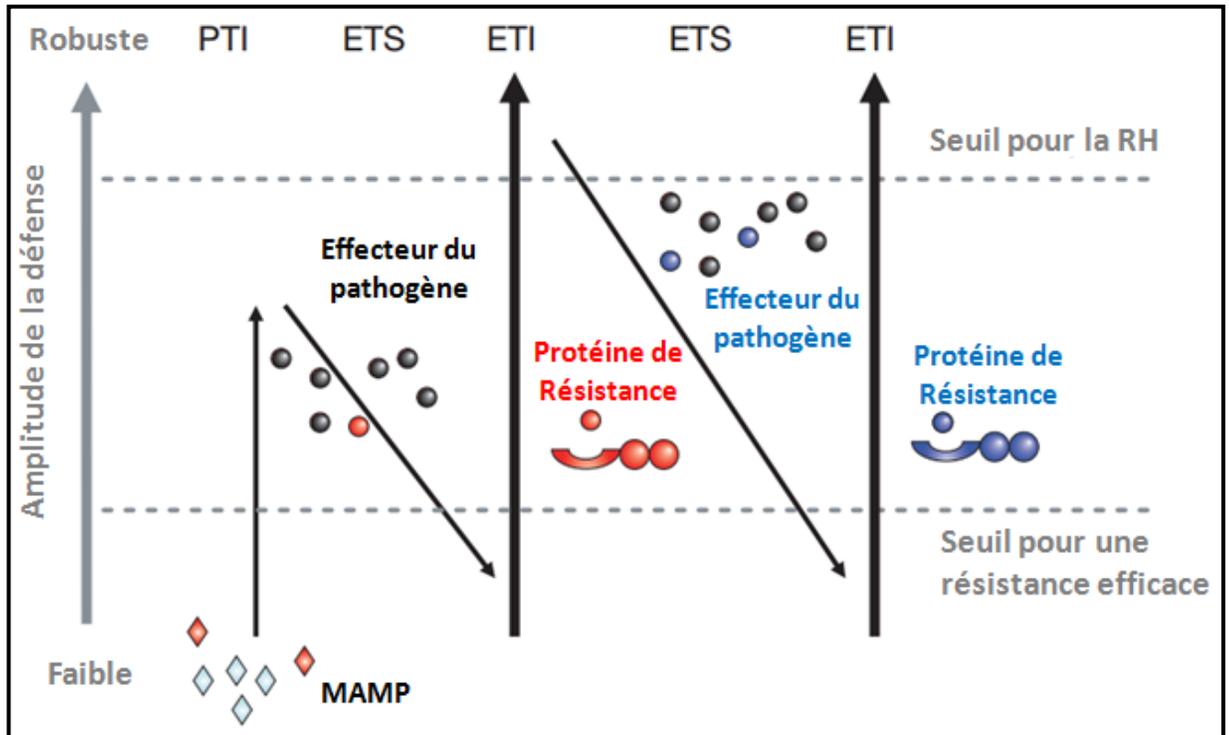
Les maladies chez les plantes ne sont pas la norme. La plupart du temps, la plante est saine puisqu'elle réussit à se protéger efficacement des assauts des différents agresseurs. On considère généralement qu'il y a deux types d'immunité : l'immunité constitutive et l'immunité induite. L'immunité constitutive est une défense qui est déjà présente lors de l'arrivée de l'agent infectieux. On parle ici de barrière physique et de métabolites préformés (Osbourn, 1996). Ainsi, cette barrière protège la plante contre toute attaque de pathogènes sans discrimination à l'égard de la nature de ce dernier. Afin de causer une infection, un agresseur devra donc d'abord surmonter cet obstacle. S'il est suffisamment outillé pour outrepasser cette barrière, il devra faire face à la réponse de défense induite. L'immunité induite est un processus actif qui se met en branle lorsque la plante perçoit un danger. Il est possible de la diviser en deux mécanismes distincts, la reconnaissance des éliciteurs et l'interférence à l'ARN. C'est seulement lorsque l'agent infectieux est capable de contourner l'ensemble des lignes de défense de la plante qu'il y aura apparition d'une maladie. Dans la section suivante, je traiterai tout d'abord de la reconnaissance des éliciteurs (2.1), de la mise en place de la réponse de défense (2.2) et ensuite de l'interférence à l'ARN (2.3).

### **2.1 La reconnaissance des éliciteurs**

### 2.1.1 Concepts généraux

Le concept de reconnaissance en soi est un concept relativement simple. Un agent pathogène produit quelque chose qui est reconnu par la plante. La plante induit une réponse de défense à la suite de cette reconnaissance, ce qui, à terme, détruira l'agent infectieux. Concrètement, c'est plus complexe et plus subtil. Lorsqu'un pathogène entre en contact avec la plante, il doit d'abord surmonter l'immunité constitutive. S'il n'y parvient pas, c'est la fin. S'il y parvient, il s'expose à la réponse de défense basale. La réponse de défense basale est déclenchée par les éliciteurs généraux. Dans les éliciteurs généraux, on dénombre les MAMP (Microbe Associated Molecular Patterns) et les DAMP (Damage Associated Molecular Patterns). Les MAMP, arborés par les microbes, sont des motifs conservés chez un grand nombre de familles de pathogènes. Les DAMP sont quant à eux des motifs moléculaires issus du dommage à la plante, par exemple la dégradation de la paroi cellulaire. Dans les deux cas, ces motifs sont reconnus par des récepteurs de motifs que l'on nomme les PRR (Pattern Recognition Receptor). L'activation de ces PRR induira la réponse de défense basale ou l'immunité induite par les motifs moléculaires (PTI). C'est une réponse de défense de faible envergure, mais qui est néanmoins suffisante pour se débarrasser de la grande majorité des microbes problématiques (Jones et Dangl, 2006). Par contre, il est possible qu'un agent infectieux soit outillé pour surpasser cette réponse de défense basale. Dans ce cas, l'agent pathogène déploie des facteurs de virulence, aussi nommé effecteur, qui vont lui permettre de passer outre la réponse PTI (Chisholm *et al.*, 2006; Guo *et al.*, 2009). La plante doit donc se protéger de ces effecteurs et des pathogènes qui leur sont associés. Or, l'évolution a doté la plante, exposée à ces agents pathogènes, de gènes de résistance dominants qui produisent des protéines de résistance. Ces protéines de résistance sont en fait des récepteurs qui reconnaissent spécifiquement les effecteurs ou leurs actions (Collier et Moffett, 2009). La reconnaissance d'un agent pathogène via une protéine de résistance induit une forte réponse de défense qui va éliminer l'organisme indésirable. C'est ce que l'on nomme l'immunité induite par les effecteurs ou l'ETI (Jones et Dangl, 2006).

Cette co-évolution entre les agents pathogènes et les plantes est conceptualisée dans le modèle zigzag (figure 1). Bien que ce modèle soit simple, il résume relativement bien cette course aux armements entre les plantes et leurs agresseurs (Jones et Dangl, 2006).



**Figure 1: Modèle en zigzag qui représente la co-évolution de la relation de susceptibilité et de résistance entre plante et pathogène.** Dans le modèle en zigzag, on schématise les relations entre pathogène et plante. Il y aura donc initialement une reconnaissance de l'agent pathogène via un MAMP. Cette reconnaissance induira la PTI et débarrassera la plante de l'agresseur. Cet agresseur reviendra à la charge avec un effecteur qui lui permettra de surpasser la PTI. Ainsi, nous obtiendrons une susceptibilité induite par un effecteur (ETS). La plante développera à son tour une protéine de résistance afin de reconnaître cet effecteur et mettre en place l'ETI. La plante redeviendra donc résistante. À son tour, le pathogène redéveloppera donc un effecteur, ce qui rendra la plante susceptible à nouveau. Le cycle continuera ainsi indéfiniment dans ce que l'on décrit comme étant une course aux armements entre plantes et pathogènes (Adapté de Jones et Dangl, 2006).

La plante au finale possède donc deux systèmes de défense induits par les éliciteurs : la PTI et l'ETI. Je traiterai d'abord plus spécifiquement dans les sections suivantes des éliciteurs

généraux et de leurs récepteurs, pour ensuite traiter des effecteurs et des protéines de résistance.

### **2.1.2 Les MAMP**

Les éliciteurs généraux sont des motifs moléculaires bien conservés à travers les différents règnes des pathogènes. Du point de vue de la plante, plus le motif est conservé, meilleur est le MAMP. Tout type de molécule bien conservé peut servir de MAMP. Ainsi, un ensemble de variétés de molécules distinctes ont été identifiées comme induisant la PTI chez la plante. À titre d'exemple, on note que des oligogalacturonides, des lipopolysacharrides, des ergostérols ainsi que des protéines et même un fragment de protéine peuvent induire la PTI (Granado *et al.*, 1995; Newman *et al.*, 2000; Beliën *et al.*, 2006; Galletti *et al.*, 2008). En effet, le peptide flg22 de la flagelline est nécessaire et suffisant afin d'induire chez la plante la PTI (Boller et Felix, 2009).

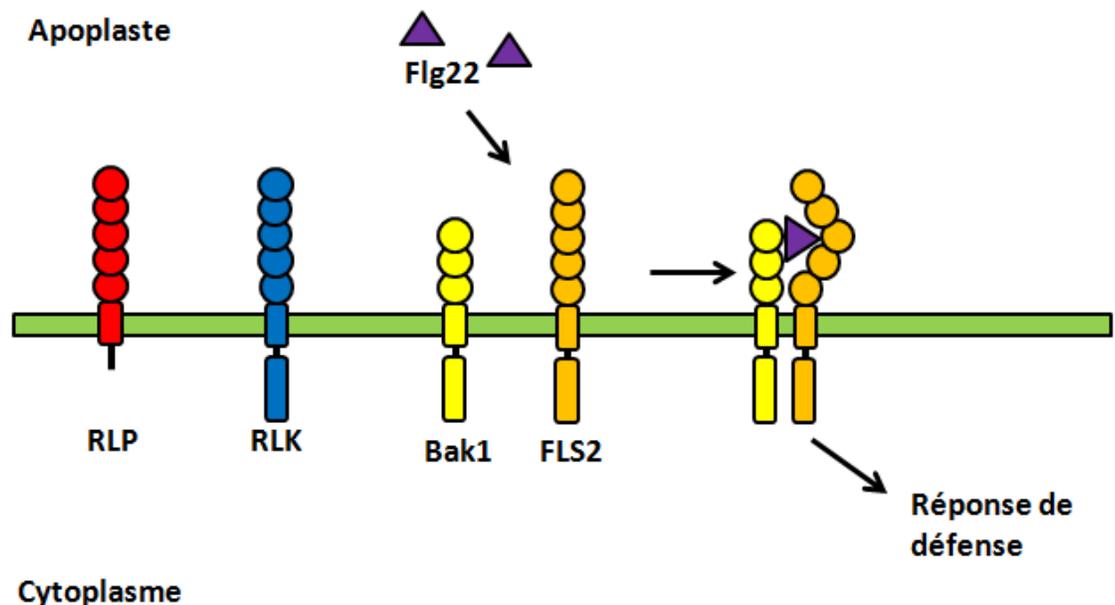
Les DAMPS sont quant à eux des molécules issues du travail des enzymes lytiques que les pathogènes produisent. Ces molécules issues du travail enzymatique agiront comme des inducteurs de la réponse de défense. Elles sont normalement générées dans l'apoplaste. Par exemple des fragments de membrane cellulaire ou des monomères de cutine peuvent éliciter une réponse de défense de type PTI (Malinovsky *et al.*, 2014). Plusieurs pathogènes possèdent des cutinases servant à dégrader la cuticule. Du point de vue du pathogène, c'est la première barrière à franchir. Le travail de ces enzymes peut induire la germination de la spore et la production de plus de cutinases pour favoriser l'infection. En contrepartie, la plante reconnaîtra aussi les monomères de cutine et induira la PTI pour se débarrasser du pathogène (Metraux *et al.*, 2014).

### **2.1.3 Les récepteurs des PAMP**

Les PRR sont des récepteurs de surface que les plantes utilisent pour reconnaître les MAMP ou les DAMP. Ces récepteurs sont divisés en deux familles, les RLK (Receptor Like Kinase) et les RLP (Receptor Like Protein). Les RLK sont des protéines avec un domaine transmembranaire, qui dans l'apoplaste arbore un domaine putatif de reconnaissance du ligand

ainsi qu'un domaine intracellulaire sérine/thréonine kinase. Les RLP possèdent eux aussi un domaine extracellulaire de reconnaissance du ligand et un domaine transmembranaire. Par contre, le domaine cytosolique des RLP diffère des RLK. C'est un court domaine qui ne possède pas d'activité de signalisation kinase (Kopp et Medzhitov, 2003; Monaghan et Zipfel, 2012).

Dans certains cas, les PRR nécessitent la présence d'un corécepteur afin de pouvoir percevoir le MAMP et induire la signalisation. Dans le cas de FLS2, le récepteur reconnaissant la flagelline, il nécessite la présence de BAK1, un co-récepteur de type RLK. Normalement, ils ne sont pas associés dans la cellule. À la suite de la reconnaissance de flg22 par FLS2, le domaine de FLS2 changera de conformation et pourra s'associer à BAK1 (Figure 2). Cette association permettra au domaine intracellulaire d'entrer en contact et induire la signalisation de la PTI (Boller et Felix, 2009; Chinchilla *et al.*, 2009).



**Figure 2: Structure des RLP et des RLK ainsi que le fonctionnement de la reconnaissance de la flagelline.** Les RLP et les RLK possèdent tous deux des structures similaires. Soit, un domaine transmembranaire ainsi qu'un domaine extracellulaire de reconnaissance du ligand. Les RLK possèdent un domaine supplémentaire. Il s'agit d'un

domaine sérine/thréonine kinase intracellulaire servant à la signalisation. Cette figure illustre ici l'exemple classique de la reconnaissance du peptide flg22 de la flagelline. BAK1 s'associera physiquement avec FLG2 lors de la reconnaissance de ce peptide afin d'induire la signalisation nécessaire à la mise en place de la PTI.

La reconnaissance par la plante des éliciteurs généraux via les PRR induira une cascade de signalisations et ultimement la mise en place de la PTI. Cette réponse de défense est caractérisée entre autre par le dépôt de callose, la production de protéines PR (Pathogenesis Related), la production de métabolites secondaire, etc. Elle peut même culminer par la mise en place d'un type de mort cellulaire programmé appelé réaction hypersensible (HR) (Boller et Felix, 2009).

#### **2.1.4 Les effecteurs**

Outre les MAMP et les DAMP, les éliciteurs spécifiques peuvent aussi induire une réponse de défense dans la reconnaissance des éliciteurs. Les effecteurs sont bien souvent des facteurs de virulence. Ils ne sont donc pas nécessaires à la viabilité de l'organisme. Ils peuvent varier ou même être absents d'une souche microbienne à l'autre (Jones et Dangl, 2006). Les agents pathogènes les produiront pour surpasser la PTI et affecter la cellule végétale afin de faciliter la propagation de l'agent infectieux dans la plante. Par exemple, *Pseudomonas syringae* utilise son système de sécrétion de type 3 (TTSS) afin d'injecter plusieurs chez la cellule hôte. De ces protéines injectées, plusieurs ont été identifiées comme étant des facteurs de virulence qui suppriment la PTI. Un bon exemple de cette fonction est la protéine HopF2 qui cible BAK1, le coreccepteur de FLS2. FLS2 est impliqué dans la reconnaissance de la flagelline. En ciblant BAK1, le pathogène affecte donc la mise en place de la PTI induite par flg22 (Zhou *et al.*, 2014). D'autres exemples de l'action des effecteurs est celui des protéines AvrRpt2, AvrRpm1 et AvrB. Ces trois protéines ciblent RIN4, une protéine impliquée dans la fermeture des stomates lors de la défense contre les agents pathogènes. En gardant les stomates ouverts, ces effecteurs facilitent l'entrée du pathogène dans la feuilles (Liu *et al.*, 2009). Plusieurs des effecteurs injectés par *P. syringae* sont aussi reconnus par la plante et induisent une ETI lorsque la plante possède le gène de résistance correspondant. C'est le cas de AvrRpm1 et

AvrPt2, qui sont respectivement reconnus par RPM1 et RPS2 (Mackey *et al.*, 2002; Axtell et Staskawicz, 2003).

Chez les oomycète, il n'y a pas de TTSS. Les effecteurs vont plutôt posséder un peptide signal et un motif RxLR. Ils permettent respectivement l'expression dans l'apoplaste et l'entrée dans la cellule végétale par endocytose. Certains effecteurs d'oomycète ne possèdent pas ces motifs et leurs mécanismes d'entrée dans la cellule sont pour l'instant peu connus (Jones et Dangl, 2006). Dans certain cas, il est aussi possible que les effecteurs soient apoplastiques. *Cladosporium fluvium* sécrète dans l'apoplaste des effecteurs classiques (Avr2, Avr4 et Avr9). Avr4, par exemple, lierait la chitine afin de prévenir la dégradation par les chitinases de la plante (Rivas et Thomas, 2005; van Esse *et al.*, 2007).

Chez les virus, les choses sont légèrement différentes. Les virus ne portent pas de facteurs de virulence classiques ou d'effecteurs classiques. Toute protéine virale peut donc être potentiellement reconnue par la plante et induire une ETI. Dans la mesure où les génomes viraux ne possèdent que très rarement de l'information non-essentielle, la plante a donc le choix de ces cibles. Des protéines de la capsid, les protéines de mouvement et même des fragments de polymérase, ont été identifiées comme étant des éliciteurs spécifiques qui induisent une ETI (Zvereva et Pooggin, 2012).

À une certaine époque, les effecteurs ont été nommés des protéines d'avirulence (Avr). Leur présence rendait l'agent pathogène avirulent lorsque la plante hôte possédait le gène de résistance correspondant. En l'absence de cette Avr chez le pathogène ou du gène de résistance chez la plante, la maladie se développait. De ce point de vue, la présence de l'effecteur rendait le pathogène avirulent vis-à-vis de la plante, bien qu'en réalité, ce gène d'avirulence soit en fait un gène de virulence. C'est donc de ce terme d'avirulence que vient souvent le préfixe Avr chez les effecteurs.

### **2.1.5 Les protéines de résistance**

Les protéines de résistance sont une des protéines responsables de la résistance dominante dans la reconnaissance des effecteurs. Les membres de cette famille de protéines sont très

nombreux. Chez *Arabidopsis thaliana*, on en compte un minimum de 151, alors que chez d'autres espèces, comme le riz ou la vigne, on peut en retrouver plus de 450 (Meyers *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010). La base de leur structure reste en général toujours similaire. Il s'agit d'une structure en NB-LRR avec un domaine en N-terminal variable. Le domaine NB ou « nucleotide binding » est un domaine avec une fonction ATPase et un domaine de liaison aux nucléotides. C'est ce domaine qui serait responsable de la signalisation induite par le récepteur (Rairdan *et al.*, 2008). Le domaine LRR est quant à lui un domaine riche en répétition de leucine. Le domaine LRR est un domaine de liaison aux protéines. Il servirait à donner une certaine spécificité quant à la reconnaissance de l'effecteur et il conserverait le NB-LRR en conformation inactive dans l'attente d'un pathogène et de l'interaction avec l'effecteur (Ellis *et al.*, 1999; Rairdan et Moffett, 2006; Collier et Moffett, 2009).

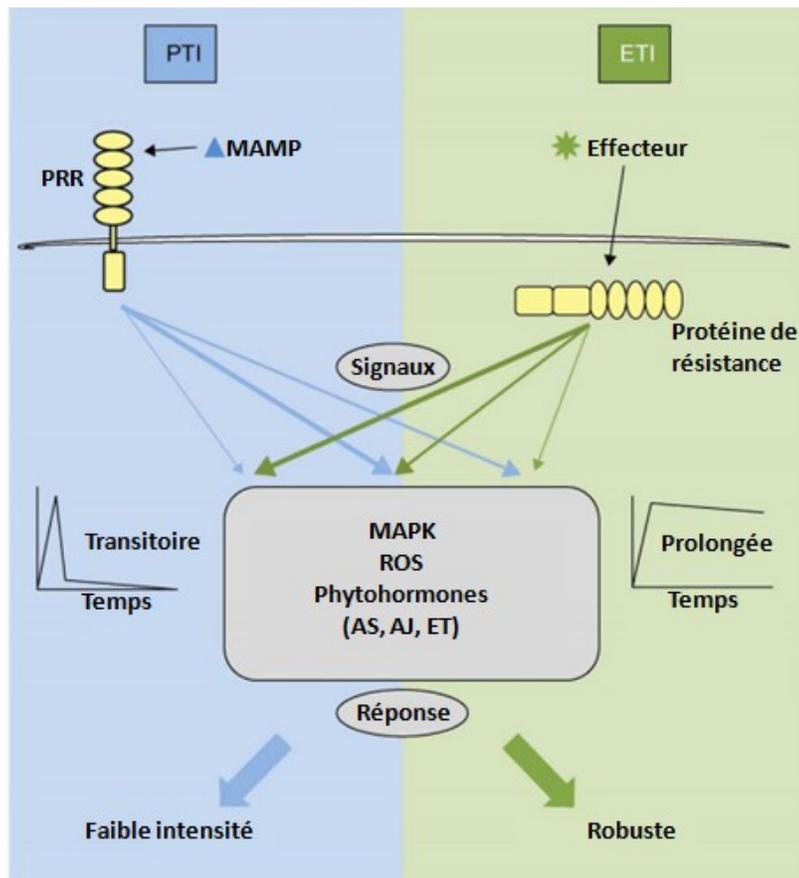
On subdivise actuellement cette famille en fonction de la structure de leur domaine N-terminal. Le premier groupe est le groupe des TIR, puisque leur domaine N-terminal présente des homologies avec le récepteur toll interleukine-1. Le deuxième groupe est constitué de protéines ayant un domaine N-terminal en CC (coiled-coil) et le troisième est constitué des domaines N-terminaux atypiques. On considère normalement que les domaines N-terminaux sont impliqués dans la signalisation issue des NB-LRR. En effet, l'expression de domaines N-terminaux chez la plante peut induire l'apparition d'une mort cellulaire (Collier *et al.*, 2011). Par contre, certains domaines N-terminaux ont aussi été identifiés comme étant impliqués dans la reconnaissance des effecteurs (Collier et Moffett, 2009).

La reconnaissance faite via les protéines de résistance peut se faire de manière directe, mais de plus en plus de données démontrent qu'elle se fait surtout de manière indirecte. Dans la reconnaissance indirecte, il y a deux cas de figure. La protéine de résistance interagira soit avec une protéine qui est la cible cellulaire de l'effecteur (protéine de garde), soit avec une protéine appât qui va mimer la cible de l'effecteur (appât moléculaire) (Collier et Moffett, 2009). Dans les deux cas, c'est l'action de l'effecteur sur la protéine garde/appât qui sera perçue par la protéine de résistance. Cette dernière sonnera l'alarme et déclenchera la

signalisation qui induira une réponse de défense très efficace, la réponse de défense de type ETI.

## 2.2 La réponse de défense induite

Il y a donc deux types de réponse de défense : la PTI et l'ETI. La première est une réponse de défense de faible intensité et transitoire alors que la seconde est plus intense et dure plus longtemps (Boller et Felix, 2009). Dans les deux cas, bien que les récepteurs diffèrent par leurs formes et leurs structures, il semble que les deux types de défense utilisent des voies de signalisation qui se chevauchent (Tsuda et Katagiri, 2010). En définitive, les événements qui mèneront à l'apparition de la réponse de défense se ressemblent (figure 3).



**Figure 3: Similarités et différences lors de la mise en place de l'ETI et de la PTI**

La PTI et l'ETI partagent des voies de signalisation communes ainsi que les acteurs principaux des réponses de défense (au centre). La différence entre les deux voies se situe principalement

au niveau des protéines servant à faire cette reconnaissance et à l'intensité de la réponse induite suite à la reconnaissance. La réponse de défense induite par la PTI sera plus faible en intensité, alors que celle induite par l'ETI sera plus robuste. L'ETI aura aussi tendance à perdurer plus longtemps dans le temps.

Les événements qui mèneront à la mise en place de la PTI ou de l'ETI sont similaires. À la suite de la reconnaissance d'un éliciteur, soit par un PRR, soit par une protéine de résistance, les signaux seront similaires, mais seront utilisés de manières différentes. L'activation de kinases ainsi que l'accumulation de ROS (espèce activé d'oxygène) et de phytohormones induiront la mise en place des réponses de défense. Dans le cas de la PTI, la réponse est faible et transitoire, alors que dans le cas de l'ETI, elle est forte et robuste (adapté de Tsuda et Katagiri, 2010).

Dans les deux cas, il y aura rapidement un changement cationique au niveau de la membrane. Ce changement permettra l'entrée massive d'ions  $Ca^{++}$  dans la cellule et il sera couplé avec un efflux de  $H^+$  et de  $K^+$ . Un des effets de cet influx de calcium est l'activation de la voie des CDPK (protéine kinase dépendante du calcium). Cette dernière est responsable de l'activation de certains gènes reliés à la défense (Mur *et al.*, 2008; van Doorn *et al.*, 2011). Les événements précoces de la PTI sont aussi caractérisés par une accumulation d'espèces activées d'oxygène. Les ROS seraient impliqués dans la signalisation et pourraient agir comme des agents antimicrobiens (Torres *et al.*, 2006). Durant l'ETI, l'accumulation de ROS est aussi présente. Elle se fait par contre en deux phases, une première de faible intensité suivie d'une seconde plus forte et soutenue (Torres *et al.*, 2006). Dans les deux types de réponse, il y a activation de cascades de signalisation des MAPK et, éventuellement, accumulation des hormones classiques liées à la défense, soit l'acide salicylique (AS), l'acide jasmonique (AJ) et l'éthylène (ET) (Mur *et al.*, 2008; Muthamilarasan et Prasad, 2013).

### **2.2.1 Les messagers secondaires**

L'AS, l'AJ et l'ET sont des phytohormones et les messagers secondaires classiques de la réponse de défense. Ce sont de petites molécules qui modulent et transmettent les signaux issus par la reconnaissance des éliciteurs. L'acide salicylique est de manière générale utilisée

contre les agents pathogènes biotrophes (qui nécessitent une cellule vivante) et les hémibiotrophes (courte phase biotrophe suivie d'une phase nécrotrophe), alors que l'acide jasmonique et l'éthylène sont impliqués dans la réponse de défense contre les nécrotrophes (qui nécessitent des tissus morts) (Robert-Seilaniantz *et al.*, 2011). Ces deux voies peuvent être antagonistes dépendamment de la concentration des messagers secondaires l'AS, l'éthylène et l'AJ (Koornneef *et al.*, 2008; Leon-Reyes *et al.*, 2009; Leon-Reyes *et al.*, 2010; Van der Does *et al.*, 2013). De manière générale, si on favorise la défense contre un biotrophe, on diminue *de facto* la résistance contre un nécrotrophe et vice-versa (Glazebrook, 2005). Puisqu'il est question dans cette thèse de défense antivirale et que les virus sont des biotrophes, c'est de la voie de l'AS dont il sera surtout question.

Dans le cadre de l'ETI ou de la PTI, bien que l'AJ puisse aussi être impliqué, on considère généralement que c'est la voie de l'AS qui est mise en place (Truman *et al.*, 2007; Halim *et al.*, 2009). L'AS est aussi impliqué dans la mise en place de la résistance systémique acquise (RSA). Cette résistance peut être induite par un contact avec un pathogène, par une HR locale ou par une application exogène d'acide salicylique. La RSA est une réponse de défense qui se propage dans la totalité de la plante. Elle est donc activée pour préparer la plante à une seconde vague d'agression, par exemple. Des chercheurs ont mis en évidence l'implication de l'AS dans la RSA en utilisant des plantes transgéniques exprimant l'enzyme bactérienne NahG. Cette enzyme convertit l'AS en cathécol. En convertissant l'AS, la plante devient plus susceptible aux pathogènes (Friedrich *et al.*, 1995; Fu et Dong, 2013).

L'accumulation de l'AJ se fait à la suite de stress biotiques ou abiotiques, comme les blessures physiques, le broutage et les agents phytopathogènes. Son accumulation permet l'expression de gènes de défensine, de thionine et de gènes de défense (Glazebrook *et al.*, 2003). Comme je l'ai dit précédemment, il est surtout impliqué dans la réponse au nécrotrophe.

L'ET est quant à lui impliqué dans des processus physiologiques divers, comme la maturation des fruits, la germination, la sénescence de feuilles et de fleurs. Dans la réponse de défense, l'ET serait impliqué dans la mise en place de barrières physiques, de métabolites secondaires et la production de protéines PR. L'accumulation de l'ET serait surtout reliée à la réponse de

défense contre les nécrotrophes. Cependant, chez le tabac par exemple, l'éthylène est aussi impliqué dans la mise en place de la HR en concomitance avec l'acide salicylique durant l'ETI (Mur *et al.*, 2008). Une étude récente chez le tabac a effectivement démontrée l'implication de la voie de l'AJ et de l'ET dans le cadre de la réponse de défense induite contre le virus de la marbrure des nervures du piment (Chilli veinal mottle virus), alors que l'implication de l'AS est de second plan. Dans cette même étude, il est démontré que la diminution de l'expression de gènes en aval de l'AJ favorise fortement la croissance du virus (Zhu *et al.*, 2014).

Il existe donc une relation complexe entre ces différentes phytohormones qui peuvent être exprimées de diverses manières en fonction des pathogènes rencontrés et de la plante hôte à laquelle fait face l'agent pathogène. En revanche, les pathogènes, n'hésitent pas à reprogrammer la plante en stimulant la réponse immune qui leur est favorable. Le nécrotrophe *Botrytis cinerea*, par exemple, déjouera le système immunitaire en produisant un exopolysaccharide qui induit la voie de l'AS et inhibant du même coup la voie de l'AJ. Cette ingénieuse supercherie permet au champignon de croître à son aise dans la plante (El Oirdi *et al.*, 2011).

### **2.2.2 Mise en place de la réponse de défense**

Que ce soit pour la PTI ou l'ETI, la mise en place de la réponse de défense est similaire. Il pourrait y avoir renforcement de la barrière physique, par exemple avec un dépôt de callose, une lignification de la membrane ou un dépôt de subérine (Lamb et Dixon, 1997; Huckelhoven, 2007; So Young *et al.*, 2014). La plante, dans certains cas, produit des composés qui vont fermer les stomates (Bednarek, 2012). Le tout sera fait dans le but de compliquer l'entrée du pathogène dans la cellule. La guerre chimique, ou la synthèse de métabolites secondaires et de composés antimicrobiens, est aussi mise en place. Ainsi, la plante produit des phytoalexines, comme la scopoletine ou la camalexine, qui peuvent par exemple déstabiliser la membrane cellulaire des bactéries (Rogers *et al.*, 1996; Ahuja *et al.*, 2012; Bednarek, 2012).

Durant la réponse de défense, la plante produit des protéines associées à la pathogénèse (PR). Ces protéines, que l'on classe en 17 familles, sont des protéines pouvant être produites durant

les stress biotiques ou abiotiques. Les protéines PR possèdent des activités qui sont très différentes d'une famille à l'autre. En outre, on dénote des activités glucanase, chitinase et ribonucléase (Van Loon *et al.*, 2006). Ces protéines sont souvent utilisées comme marqueurs de la mise en place de l'immunité. La famille des PR-1 est un bon exemple d'utilisation de protéines PR comme marqueurs de l'immunité médiée par l'AS (Van Loon *et al.*, 2006).

### **2.2.3 La réaction hypersensible**

Dans le cadre de plusieurs interactions plantes-pathogènes, le point culminant de la réponse de défense est la réaction hypersensible. La HR est un processus cellulaire nécessitant une cellule active et qui aboutit éventuellement à une mort cellulaire (Gilchrist, 1998). Essentiellement, il semble que cette mort cellulaire serve à confiner l'agent pathogène au point d'entrée et à signaler la présence d'un envahisseur aux cellules avoisinantes (Zhang *et al.*, 2003). Lors de la mise en place de la HR, on peut remarquer un ensemble de phénomènes liés à une mort cellulaire programmée, comme la perturbation des chloroplastes, une condensation chromatique, le largage du cytochrome C, etc. (Mur *et al.*, 2008). La HR n'est par contre pas toujours la solution. Dans le cas de l'intrusion d'un agent nécrotrophe, la HR facilitera la tâche du pathogène. Certains pathogènes peuvent même manipuler ce phénomène afin de faciliter leur infection (Govrin et Levine, 2000; El Oirdi et Bouarab, 2007).

Dans certains cas, il est possible qu'un éliciteur exprimé constitutivement puisse induire une HR alors que l'utilisation de l'agent pathogène correspondant ne provoque aucune lésion, et ce, tant au niveau macro que microscopique. Ce phénomène se nomme résistance extrême. Cette réponse de défense est en fait si rapide et si efficace que la plante n'a pas besoin de mettre en place la HR pour éliminer l'agent pathogène. Cette réponse est souhaitable par la plante, puisqu'elle ne produit pas de dommage (Bendahmane *et al.*, 1999; Ghazala et Varrelmann, 2007; Tameling et Baulcombe, 2007).

### **2.3 L'interférence à l'ARN**

L'interférence à l'ARN est un phénomène qui est relativement nouveau en biologie. Ce sont des expériences chez le pétunia qui ont permis d'observer le phénomène pour la première fois.

En tentant de surexprimer le gène de la chalcone synthase, responsable de la coloration de la fleur, ils ont observé le résultat inverse. L'ARNm du transgène et de l'endogène étaient sous-exprimés, ce qui donnait à la plante une coloration blanche. Ce mécanisme fut alors nommé co-suppression. L'implication de ce mécanisme fut ensuite démontrée dans la réponse antivirale. Par la suite, il a été mis en évidence que ce phénomène antiviral pouvait être utilisé afin de diminuer l'expression des gènes de la plante, un mécanisme que l'on nomma VIGS ou « Virus Induced Gene Silencing » (Kumagai *et al.*, 1995; Covey, 1997; Ratcliff *et al.*, 1997). C'est par contre une étude chez le nématode qui permit de découvrir que la molécule effectrice du processus était de l'ARN double brin (ARNdb). Cette découverte valut en 2006 le prix Nobel de physiologie et de médecine à Andrew Z. Fire et Craig C. Mello (Fire *et al.*, 1998).

### **2.3.1 Mécanismes généraux de l'interférence à l'ARN**

L'interférence à l'ARN est un mécanisme de régulation endogène dirigé par de petites molécules d'ARNdb qui sont pour leur part utilisées comme des riborégulateurs négatifs d'acides nucléiques. L'ARNdb peut provenir de différentes origines. Il peut provenir de séquences répétées inversées repliées sur elles-mêmes, d'hybridation de séquences d'ARN sens et antisens ou d'ARN viral double brin (Bologna et Voinnet, 2014). Peu importe la provenance, l'ARNdb sera reconnu et clivé par les endonucléases Dicer-like (DCL). Les DCL sont des RNase de type III et leur action sur les ARNdb génère de petits duplex d'ARN de 21 à 24 nt. Ces petits duplex seront ensuite recrutés dans le complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex) via une protéine Argonaute (AGO). La protéine AGO prendra en charge le duplex, se départira d'un des brins et utilisera le brin restant pour aller reconnaître l'homologie de séquence sur un acide nucléique. Dans le cas d'un ARNm, le complexe RISC ira soit cliver le brin, soit inhiber la traduction. Dans les deux cas, il y aura une diminution de la protéine issue de l'ARNm ciblé.

Ce mécanisme très efficace de régulation est aussi un mécanisme de défense antiviral. Chez les plantes, la majorité des virus sont à ARNs (+). Ils doivent donc obligatoirement passer par un stade d'ARNdb afin de pouvoir se répliquer. C'est cette ARNdb qui va initier le processus.

Les enzymes DCL viennent cliver l'ARNdb viral. Cette action génère de petits fragments d'ARNdb de 21 à 24 nucléotides (nt). C'est petits fragments seront à leur tour recrutés dans le complexe RISC via une protéine AGO. Le complexe utilisera encore une fois l'homologie de séquence afin de cibler l'ARN viral. L'action du complexe RISC conduira donc éventuellement à la dégradation du génome viral.

### **2.3.1.1 La transitivity et l'amplification du signal antivirale**

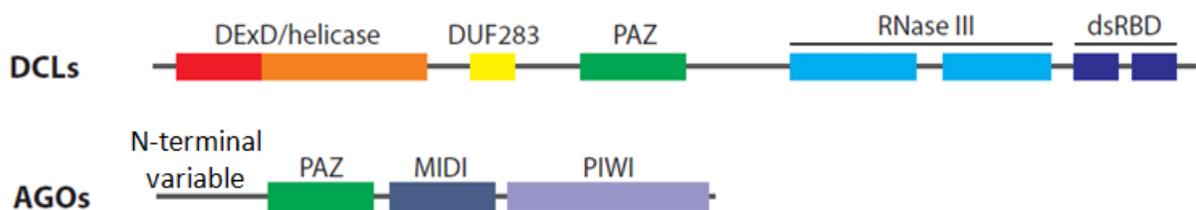
La transitivity est le nom donné au mécanisme qui permet, à la suite du clivage de l'ARN par le complexe RISC, de produire de petits siARN secondaires. Les siARN secondaires sont issus de la séquence entourant la séquence cible du complexe RISC et vont nécessiter des polymérase dépendantes de l'ARN (RdRp). La RdRp de la plante viendra synthétiser le brin secondaire de l'ARN soit en utilisant une séquence afin d'amorcer le processus, soit directement à partir de l'extrémité coupé 3'. Dans les exemples connus de ce mécanisme, on compte par exemple le mécanisme antiviral ou les tasi-ARN (trans activating siRNA). Ces derniers sont en fait des petits ARN secondaires issus d'un transcrit ciblé par un micro-ARN (miARN).

Le phénomène de transitivity est présent dans l'ARNi antivirale. À la suite d'une dégradation primaire par les DCL, les RdRp utiliseront les petits ARN relâchés comme amorce afin de générer le brin complémentaire sur l'ARN virale (Wassenegger et Krczal, 2006). La synthèse de ce nouveau double brin subira à nouveau l'action des DCL, ce qui amplifiera considérablement le signal antiviral et permettra la propagation du signal dans la plante.

### **2.3.1.2 Les Argonautes**

Les protéines Argonautes sont les protéines effectrices du complexe RISC. Il y a 10 membres de cette famille chez Arabidopsis. Ce sont des protéines de grande taille qui oscillent entre les 90 et 100 kDa. Elles possèdent trois domaines conservés et un domaine variable : un domaine PIWI (P-element Induced Wimpy testies), un domaine PAZ (PIWI, ARGONAUTE-

ZWILLE), un domaine MID (Middle) et un domaine variable en N-terminal tel qu'illustré dans la figure 4. Les protéines Argonautes sont les protéines en charge du petit ARN et de l'activité effectrice du complexe RISC. La diversité des AGO fait aussi la diversité des fonctions. Par exemple, AtAGO4 et AtAGO6 sont impliqués dans la voie de la méthylation de l'ADN par l'ARN, alors qu'AtAGO2 est chargé des petits ARN issus des tasi-ARN et issus des répétitions inversées. AtAGO7 serait aussi impliqué dans la voie des tasi-RNA, mais au niveau de la biogénèse (Montgomery *et al.*, 2008; Jouannet *et al.*, 2012). Dans la réponse antivirale, c'est AtAGO1 et AtAGO7 pour lesquels l'implication a initialement été démontrée (Qu *et al.*, 2008). Maintenant, on sait qu'AtAGO2 a aussi une activité antivirale contre plusieurs virus, dont le virus de la mosaïque du concombre (CMV), le virus du gondolement du navet (TCV) et du virus X de la pomme de terre (PVX) (Harvey *et al.*, 2011; Jaubert *et al.*, 2011). Une étude a permis de démontrer qu'AtAGO1, 2, 3, 5 et NbAGO1 avaient la capacité d'inhiber la réplication virale du virus du rabougrissement de la tomate (TBSV) dans un système *in vitro*. Cette étude permet de penser qu'elles sont potentiellement impliquées dans la réponse antivirale (Schuck *et al.*, 2013). C'est donc dire qu'il y a une diversité et une redondance des fonctions des différentes protéines AGO, ce qui rend l'étude de leurs fonctions d'autant plus complexe. Encore beaucoup de travaux seront nécessaires afin de bien comprendre la fonction de chacune des protéines de cette famille.



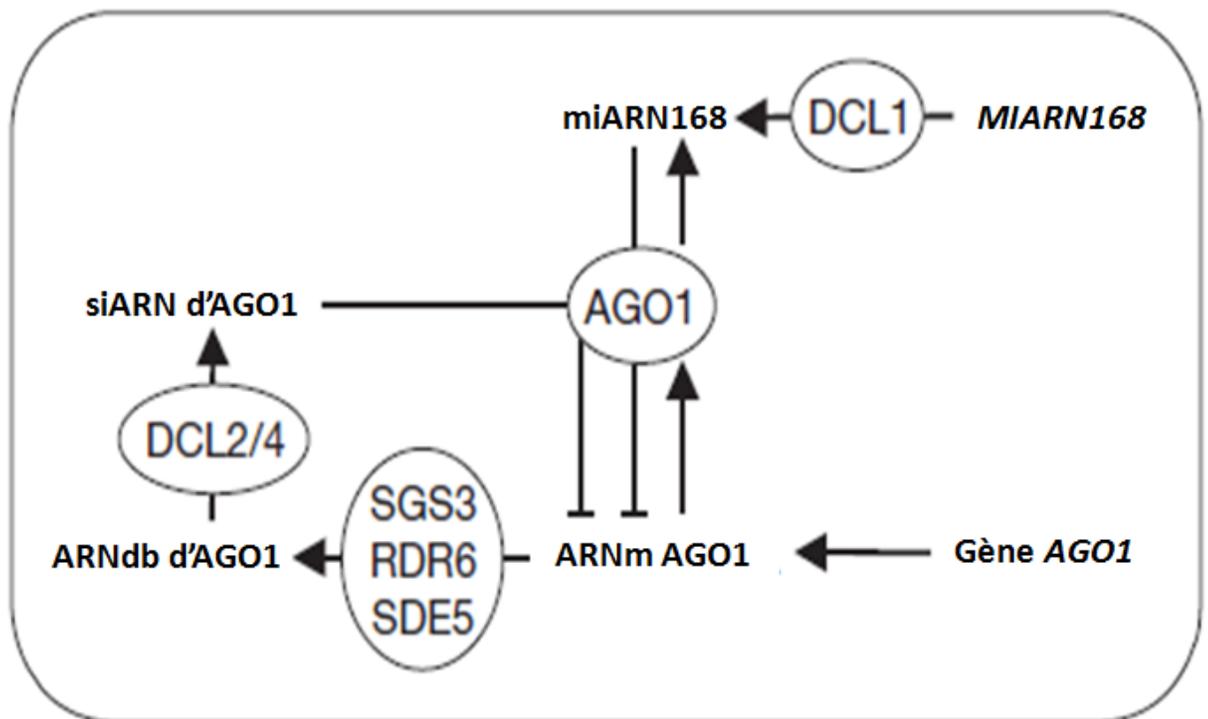
**Figure 4: Illustration des différents domaines des protéines Dicer-like et Argonautes**

Cette figure adaptée de Bologna et Voinnet présente les différents domaines des protéines DCL et des protéines AGO (Bologna et Voinnet, 2014).

### 2.3.1.3 Argonaute1 et sa régulation

La protéine AGO1 est la protéine la mieux caractérisée et la plus étudiée de la famille des AGO. Elle a été identifiée dans une multitude de mécanismes cellulaires en plus de la réponse

antivirale, dont le développement, l'inflorescence, la voie des micro ARN, etc. (Mallory *et al.*, 2009; Mallory et Vaucheret, 2010; Bologna et Voinnet, 2014). Puisqu'elle est très importante pour la plante, la protéine doit être régulée de manière très stricte (figure 5). La régulation fine d'AGO1 nécessite 2 espèces du miR168 (une de 21 et une de 22nt), la voie des miARN et la voie des siARN. Le miR168 induit le clivage de l'ARNm d'AGO1 via AGO1 et l'accumulation du miR168 est plus grande lorsqu'AGO1 est en plus grande quantité (Vaucheret *et al.*, 2006; Mallory et Vaucheret, 2009; Vaucheret, 2009). À la suite du clivage de l'ARNm d'AGO1, il y aura production de siARN secondaires. Cette production de siARN secondaires requière la présence de SGS3 (Suppressor of Gene Silencing 3), de RDR6 (RNA Dependent RNA Polymerase 6), de SDE5 (Silencing DEfective 5), de DCL2 et de DCL4 (Mallory and Vaucheret 2009). AGO10 est aussi impliquée dans la régulation d'AGO1; elle fait une répression traductionnelle de l'ARNm d'AGO1 avec la complicité du miR168. Outre la régulation issue de l'ARNi, AGO1 subit l'action de régulateurs protéiques positifs et négatifs, comme par exemple SQN et FBW2, sans oublier l'implication du mécanisme d'autophagie dans son turnover normal (Earley *et al.*, 2010; Derrien *et al.*, 2012).



**Figure 5: Régulation du transcrit d'AGO1 par le miR168.** Cette figure représente de manière schématique les interactions entre l'accumulation du transcrit d'AGO1, de la

protéine et ainsi que du miR168. On peut donc bien visualiser que l'accumulation de la protéine induit la production du miR168 qui, elle, nécessite DCL1. Ce dernier ciblera le transcrit d'AGO1 et le clivera via AGO1. Il y aura production de siARN secondaires issue du clivage du transcrit. Cette accumulation nécessitera SGS3, RDR6 et SDE5. Cet ARNdb subira ensuite l'action de DCL2 et 4. Enfin, ces petits ARN seront utilisés afin de cibler à nouveau le transcrit d'AGO1 (Adapté de Mallory et Vaucheret, 2009).

#### **2.3.1.4 Les protéines DICER-LIKES**

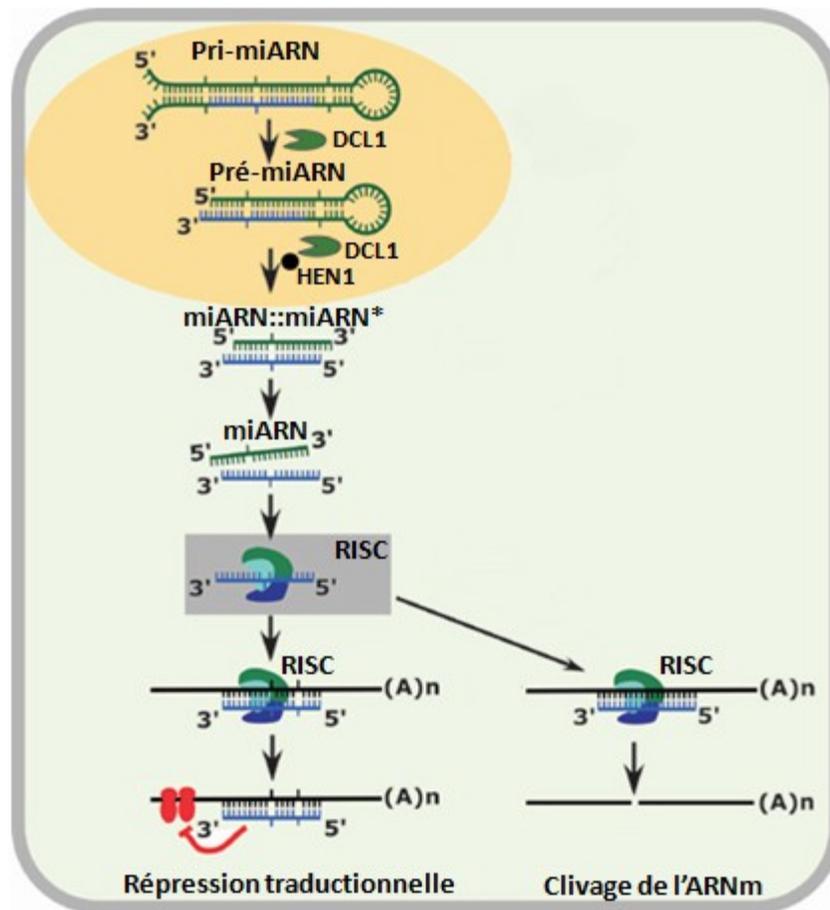
Il y a quatre protéines Dicer-like chez *Arabidopsis* et chez le tabac. Ces enzymes sont des RNase de type III qui ont une activité endonucléolytique. Elles ont une structure similaire, soit un domaine DExD-box/helicase, un domaine DUF283 qui a été proposé comme liant les ARNdb, un domaine PAZ, RNaseIII et un domaine de liaison à l'ARNdb (Dlakić, 2006; Margis *et al.*, 2006). Ces domaines sont illustrés dans la figure 4. Ces enzymes ont comme fonction de cliver les grands ARNdb en petits fragments d'ARNdb. Il semble maintenant évident que chacune des DCL a son rôle spécifique à jouer. Ainsi, DCL1 est impliquée dans la biogénèse des miARN dans laquelle elle va traiter les tiges boucles du pri-miARN afin d'en dégager un fragment d'ARNdb de 21 nt. Ce petit fragment sera éventuellement méthylé avant d'être incorporé au complexe RISC via une protéine AGO. Les trois autres DCL, soit DCL2, DCL3 et DCL4, vont être impliquées dans la dégradation des longs ARNdb. Respectivement, ils produiront des petits ARN de 22 nt, 24 nt et 21 nt (Henderson *et al.*, 2006). Bien qu'elles ciblent toutes de longs ARN double brin, elles ont des cibles préférentielles. Ainsi, DCL4 est celle qui est le plus fortement impliquée dans la dégradation d'ARNdb issue de génome viral. Mutant nul de DCL4 a permis de révéler que lorsque DCL4 est absente, c'est DCL2 qui prendra le relais dans la défense antivirale (Deleris *et al.*, 2006). Pour ce qui est de DCL3, elle est principalement impliquée dans le processus de méthylation de l'ADN. Ainsi, elle utilise surtout les ARNdb provenant des éléments génétiques mobiles qui subissent l'action de RDR2 (Pontes *et al.*, 2006).

Certains auteurs ont générées des mutations inactivant les différentes DCL d'*A. thaliana*. Ils ont par la suite réalisé des combinaisons entre les différents mutants. Leurs résultats montrent

qu'il y aurait un continuum dans la fonction des DCL. Elles auraient la capacité de cliver n'importe quel ARNdb. C'est la localisation et l'extrémité 5' des ARNdb qui seraient responsable du choix de la DCL. (Henderson *et al.*, 2006; Mari-Ordonez *et al.*, 2013).

### **2.3.1.5 La voie des micro-ARN**

Le mécanisme de l'ARNi est impliqué dans la régulation des ARNm. C'est ce que l'on nomme la voie des micro-ARN (figure 6). Le processus débutera dans le noyau avec la production d'un petit transcrit qui contient une séquence répétée inversée. Cet ARN formera naturellement une structure secondaire en tige boucle. C'est dans la portion double brin de la tige boucle que la séquence de notre miARN est contenue. Toujours dans le noyau, la protéine DCL1 viendra dégager le fragment de 21 nt correspondant au miARN. Ce petit fragment de 21 nt d'ARNdb sera ensuite méthylé par HEN1. Cette méthylation aura pour effet de stabiliser le duplex miARN/miARN\* avant son exportation vers le cytoplasme (le miARN\* est la séquence complémentaire du miARN). Une fois exporté au cytoplasme, le duplex sera pris en charge par la protéine AGO qui se débarrassera du miRNA\*. La protéine AGO utilisera ensuite le miARN comme guide afin de reconnaître l'homologie de séquence sur un ARNm. Un fois l'ARNm reconnu, il peut y avoir deux cas de figure. Si l'homologie est forte, AGO clivera l'ARNm. Dans le cas où l'homologie de séquence est plus faible, il y aura inhibition de la traduction de l'ARNm. Dans les deux cas, la production de la protéine issue de cet ARNm sera diminuée.

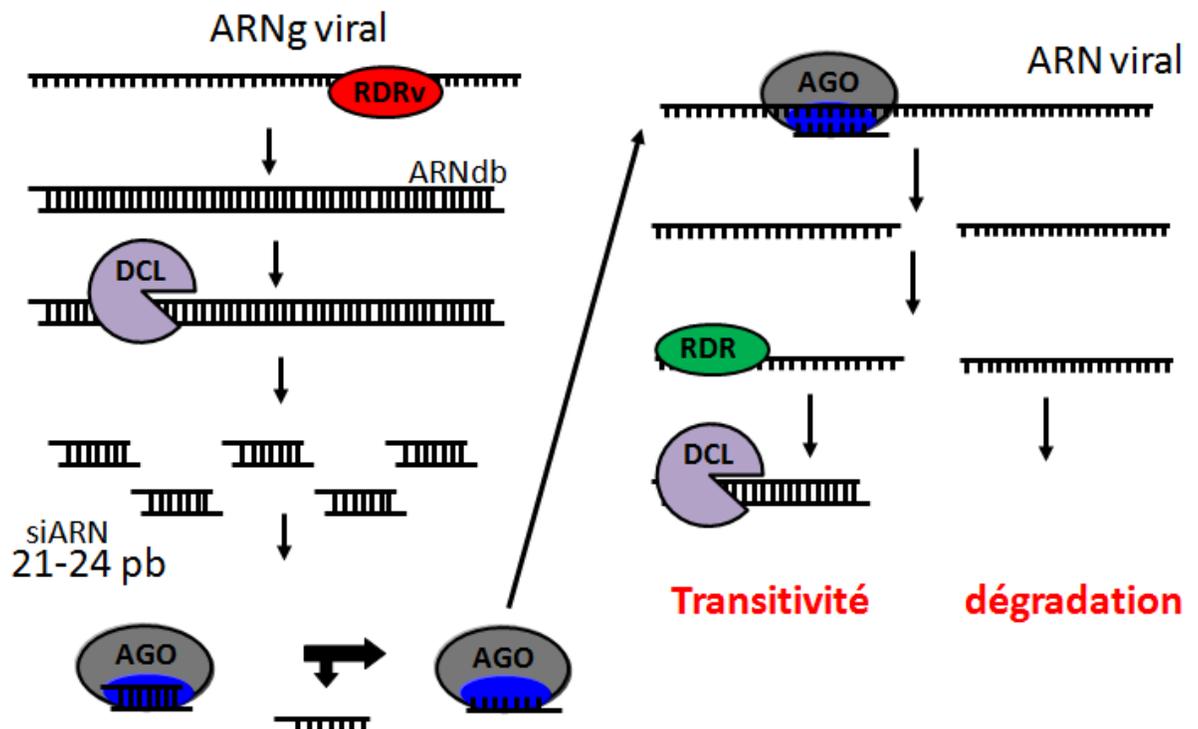


**Figure 6: Voie des micro-ARN.** Cette figure illustre la voie des micro-ARN. Au noyau : Production du Pri-miARN et clivage par DCL1 du Pri et du pré-miARN. Méthylation du duplex et exportation au cytoplasme. Au cytoplasme : Chargement dans le complexe RISC et largage du miARN\*. Le complexe RISC ciblera ensuite l'ARNm pour soit faire une répression traductionnelle, soit cliver le brin. Dans la majorité des cas chez les plantes, il y aura un clivage de l'ARNm. Adapté de Chellappan *et al.*, 2005.

### 2.3.2 Mécanisme antiviral de l'interférence à l'ARN

L'interférence à l'ARN antiviral est un mécanisme permettant à la plante de se défendre contre un grand nombre de virus (figure 7). Chez les plantes, la majorité des virus sont à ARNs (+) (Waterhouse *et al.*, 2001; Roossinck, 2013). Ils doivent donc obligatoirement passer par un stade d'ARNdb afin de pouvoir se répliquer. C'est cette ARNdb qui initie le processus. Il est aussi possible que des structures secondaires dans le génome viral puissent

servir de plateforme au démarrage du processus (Wassenegger et Krczal, 2006). Ce sont les enzymes DCL qui viendront cliver l'ARNdb. Dans ce processus, c'est DCL4 qui fait principalement le travail et elle générera donc des petits fragments de 21 nt. Dans le cas où DCL4 ne peut effectuer son travail efficacement, c'est DCL2 qui prendra la relève et qui générera des petits fragments de 22 nt (Deleris *et al.*, 2006). Ces petits fragments seront recrutés dans le complexe RISC via une protéine AGO. Le complexe utilisera encore une fois l'homologie de séquence afin de cibler l'ARN viral. Le mécanisme de transitivity se mettra également en branle et conduira à l'amplification du signal et à la dégradation du génome viral. Ce mécanisme de défense est très polyvalent puisqu'il utilise la séquence génomique du pathogène comme outil de reconnaissance et comme cible. Il s'adapte donc très facilement à tout virus infectant une plante.



**Figure 7: Le mécanisme de l'ARNi antiviral.** À la suite de l'infection, la RDRv (Viral RNA Dependent RNA Polymerase) synthétise le brin complémentaire. L'ARNdb est pris en charge par les DCL qui le clivent en petits fragments d'ARN. Ces petits ARN sont ensuite recrutés dans le complexe RISC via une protéine AGO qui se débarrassera d'un des deux brins. Elle ira ensuite reconnaître l'homologie de séquence sur l'ARN viral et cliver le

brin. Ensuite, il y a deux possibilités : soit le brin clivé se dégradera, soit le phénomène de transitivity se mettra en branle afin d'amplifier le signal.

## **2.4 La suppression de l'interférence à l'ARN**

L'interférence à l'ARN viral est donc un mécanisme très efficace afin de se protéger des infections virales. Les virus auront développé des stratégies afin de se prémunir de ce mécanisme de défense. Les virus arboreront des protéines spécialisées qui cibleront et altéreront la voie de l'ARNi. On nomme ces protéines les supprimeurs viraux de l'interférence à l'ARN ou VSR. Une grande quantité de supprimeurs ont été identifiés chez les virus de plantes et les virus affectant les eucaryotes en général (Voinnet, 1999; Bivalkar-Mehla *et al.*, 2011).

On note jusqu'à présent deux mécanismes principaux d'évasion de l'ARNi. Le premier consiste à cibler les protéines AGO afin de les empêcher de faire leur travail de manière efficace. Le deuxième consiste à cibler les petits ARN issus de l'ARNi afin de les rendre indisponibles pour le complexe RISC. Quelle que soit la stratégie utilisée par le VSR, l'objectif sera le même, soit surmonter l'ARNi. Il est à noter que d'autres stratégies peuvent aussi être utilisées par des virus pour éviter les effets de l'ARNi, ce n'est, par contre, pas utile à la compréhension de cette thèse.

### **2.4.1 Les supprimeurs qui ciblent les argonautes**

Il existe plusieurs exemples de l'action de VSR sur les protéines argonautes. Je ne présenterai pas ici une liste exhaustive, mais seulement les protéines que j'ai utilisées dans le cadre de mon doctorat.

La première de ces protéines que nous avons utilisées est la P25 de PVX. La P25 est une protéine de mouvement qui a été identifiée en 2000 comme étant un supprimeur de l'ARNi (Voinnet *et al.*, 2000). Il a été démontré que cette protéine prévient le mouvement de cellule à

cellule du signal de l'ARNi (Bayne *et al.*, 2005). Cette protéine a la capacité de lier quelques protéines argonautes (AGO1, AGO2, AGO3 et AGO4) et elle induirait la dégradation d'AGO1 en la dirigeant vers le protéasome (Chiu *et al.*, 2010).

La protéine P0 du virus de la jaunisse de la betterave de l'ouest (BWYV) a été identifiée comme étant un VSR. Puisque cette protéine possède un motif F-Box, on a cru initialement qu'elle pouvait induire la dégradation des protéines argonautes via la voie de l'ubiquitination (Bortolamiol *et al.*, 2007). Des études ont ensuite démontré que la dégradation d'AGO1 induite par la P0 était en fait indépendante du protéasome (Baumberger *et al.*, 2007). La P0 induirait une déstabilisation d'AGO1 en liant une protéine du complexe RISC et en empêchant son incorporation dans le complexe. Ce phénomène va diriger la protéine vers la voie de l'autophagie. Cette voie est impliquée dans le turnover normal d'AGO1. Elle affecterait donc seulement la formation de nouveaux complexes RISC (Csorba *et al.*, 2010; Derrien *et al.*, 2012).

La protéine de la capsid P38 de TCV a été identifiée comme étant un suppresseur de l'ARNi. Initialement, c'est un domaine de liaison à l'ARN identifié comme interagissant avec l'ARN du génome à l'intérieur de la particule virale qui avait été identifiée comme étant essentielle à son activité (Thomas *et al.*, 2003). L'effet de suppression de la P38 fut ensuite attribué à son activité sur les DCL. En effet, on avait remarqué des changements de profil des petits ARN dans des plantes infectées avec TCV. Cela indiquait que les DCL impliqués dans la dégradation du génome n'étaient plus les mêmes (Deleris *et al.*, 2006). Cet effet sur les DCL fut ensuite attribué à son activité sur AGO1. La P38 interagirait avec AGO1 via des motifs GW et empêcherait AGO1 d'incorporer le complexe RISC. La séquestration d'AGO1 hors du complexe induirait un changement dans l'homéostasie des DCL et favoriserait ainsi l'infection du virus (Azevedo *et al.*, 2010).

## **2.4.2 Les suppresseurs qui ciblent les petits ARN**

Afin de surmonter les effets de l'ARNi, les virus sont aussi capables, via leur VSR, d'agir directement sur les petits ARN. Il a été démontré que plusieurs VSR ont cette capacité *in vitro*

de lier les petits ARN issus de la machinerie de l'ARNi, soit la P14 des aureovirus, la P15 du « peanut clump virus », la p21 du « beet yellow virus » et Hc-Pro du « tobacco etch virus » (Dunoyer *et al.*, 2002; Reed *et al.*, 2003; Mérai *et al.*, 2005). Certaines de ces protéines lieraient de manière préférentielle les siARN de 21 nt. C'est le cas de la P15, de la P21 et de Hc-Pro, alors que la P14 lierait tous les ARNdb sans préférence de taille (Merai *et al.*, 2006). Il est à noter que les études *in vitro*, bien qu'elles démontrent la capacité à lier les petits ARN, ne démontrent pas nécessairement l'implication biologique de cette interaction.

### **2.4.3 La protéine P19 des tombusvirus**

La P19 fait aussi partie de ces VSR qui ciblent les petits ARN. Ce VSR est un des plus étudiés et utilisés. C'est une petite protéine qui a été originellement identifiée comme étant un déterminant des symptômes induits par les tombusvirus chez les plantes et impliqués dans le mouvement (Dalmay, 1993; Scholthof *et al.*, 1995; Scholthof, 1995). Cette petite protéine se dimérise et lie les petits ARNdb de 21 à 24 nucléotides issus du travail des DCLs (Silhavy, 2002). La P19 a toutefois une préférence pour les petits ARNdb de 21nt arborant un groupement phosphate en 5' et une extrémité saillante en de 2 nt en 3'. Ce sont en fait les caractéristiques des petits ARN issus de l'activité de DCL4, qui est la DCL impliquée dans l'activité antivirale. Elle protège donc le virus de la machinerie de l'ARNi. Cette interaction ne se limite pas aux petits ARN de 21nt. Elle est aussi capable de lier, toutefois avec une plus faible affinité, les siARN de 20 nt à 24nt. Par contre, plus on s'éloigne de sa taille préférentielle de 21nt, plus l'affinité diminue, et ce, avec une diminution plus marquée lorsque le siARN devient plus petit (Vargason *et al.*, 2003). Puisqu'elle est bien étudiée et que son activité VSR est forte, elle fut utilisée dans une multitude de systèmes et de modèles différents, en plus d'être utilisée pour diminuer l'impact de l'ARNi dans des systèmes exprimant des transgènes (Qiu *et al.*, 2002; Silhavy *et al.*, 2002; Voinnet *et al.*, 2003; Cheng *et al.*, 2007). C'est probablement le représentant le plus célèbre des VSR et son activité d'inhibition de l'ARNi n'est donc plus à démontrer.

## 2.5 Les virus chez les plantes

Les virus sont des parasites obligatoires qui nécessitent une cellule vivante afin de pouvoir se répliquer. C'est d'ailleurs chez les plantes que l'on isole pour la première fois un virus. C'est Martinus Willem Beijerinck, un microbiologiste Néerlandais, qui, en 1898, démontre que le filtrat issu de plantes atteintes de la mosaïque du tabac était infectieux. On dû attendre jusqu'en 1935, avec la cristallisation du virus de la mosaïque du tabac (TMV), avant de pouvoir apercevoir pour la première fois un virus. On déterminera seulement qu'après la Deuxième Guerre mondiale que ce sont les acides nucléiques qui sont en fait responsables de l'infection ou le véhicule de l'information virale.

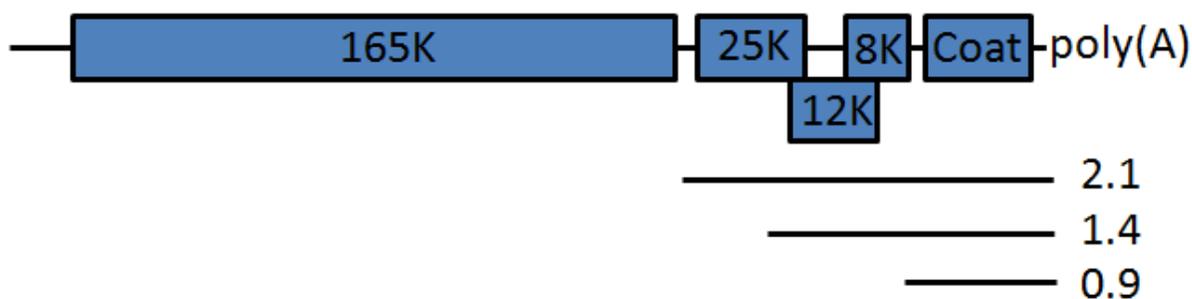
Les phytovirus doivent se disséminer. Puisque les plantes ne se déplacent pas et qu'elles ne génèrent pas vraiment de liquide corporel infectieux comme une expectoration nasale, les phytovirus utilisent d'autres méthodes afin de se répandre. Il y a tout d'abord la transmission verticale qui est la transmission d'une génération à l'autre, via les semences par exemple. La transmission horizontale est le second mode de transmission. Cette dernière peut être réalisée via un frottement direct entre plantes, la manipulation par l'homme ou via un vecteur. Chez les plantes, le moyen de dissémination le plus fréquent est définitivement l'utilisation d'insectes comme vecteur (Blanc *et al.*, 2011).

Actuellement, dans la taxonomie, on dénombre 900 espèces de phytovirus, la plus grande proportion infectant des plantes utilisées en agriculture (Roossinck, 2012). C'est en fait un biais de la virologie végétale. Cette dernière ne s'intéresse actuellement qu'aux cultures à incidence économique. Des études de métagénomique présentement en cours devraient permettre de corriger ce biais d'échantillonnage (Roossinck et Stobbe, 2014).

En général, chez les plantes, les virus sont à ARN et, qui plus est, à ARNsb+. La plupart d'entre eux ont une structure hélicoïdale ou icosaédrique. Dans une faible mesure, on retrouve des particules virales enveloppées. Je traiterai donc, dans les sections suivantes, des virus que j'ai utilisés durant ma thèse.

### 2.5.1 Le virus X de la pomme de terre

Le phytovirus PVX est un potexvirus qui fait partie de la famille des alphaflexiviridae. Il possède un génome à ARNs<sup>b+</sup> et une structure hélicoïdale. Son génome est petit, d'une taille d'environ 6.5 kb. Son génome code pour 5 protéines : une RdRp de 165kda, 3 protéines de mouvement et la protéine de la capsid. La RdRp est essentielle à la réplication alors que les trois protéines de mouvement sont requises pour le mouvement, l'encapsidation et la réplication. Pour l'expression des protéines, outre la RdRp qui possède son propre cadre de lecture, les autres protéines seront produites par trois ARNm se chevauchant tel qu'indiqué dans la figure 8 (Morozov *et al.*, 1991). Les trois protéines de mouvement qui se chevauchent font partie de ce que l'on appelle chez les potexvirus le TGB (triple gene bloc) et leur expression requiert 2 ARNm sous-génomiques (ARNsg) (Verchot *et al.*, 1998). La P25 produite dans ce TGB par PVX est le VSR dont il a déjà été question précédemment.

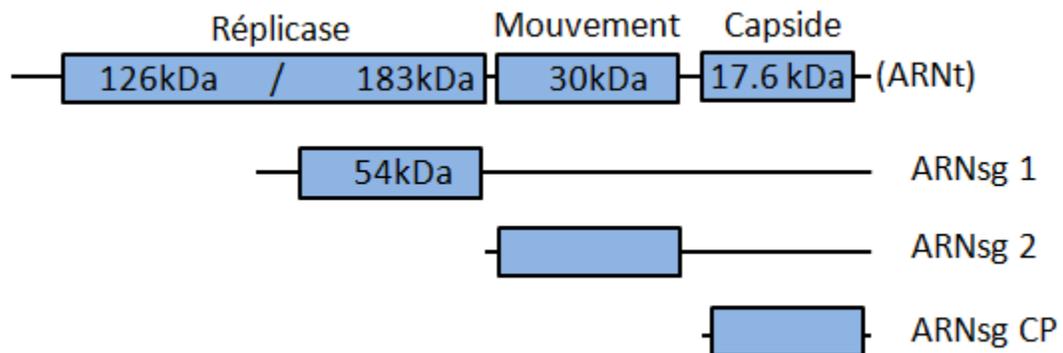


**Figure 8: Organisation du génome de PVX.** Outre le cadre de lecture de la réplicase, on peut voir ici les trois ARNsg responsables de l'expression des protéines de mouvement et de la protéine de la capsid.

### 2.5.2 Le virus de la mosaïque du tabac

Le virus de la mosaïque du tabac fait partie des tobamovirus et possède une structure hélicoïdale. Son génome à ARNs<sup>b(+)</sup> oscille autour de 6400 nt. Il possède une coiffe en 5' et une structure d'ARN secondaire ressemblant à un ARN de transfert en 3'. Le génome code pour une protéine de capsid de 17.6 kilo Dalton (kDa), une protéine impliquée dans le mouvement de 30 kDa et une portion réplicase. La portion réplicase exprime une protéine de

126 kDa qui serait une méthyltransférase/ hélicase et une RdRp de 183 kDa (Buck, 1999) (figure 9). Certains auteurs ont démontré qu'il était possible de détecter une protéine de 54 kDa issue de la portion réplacase de TMV avec des anticorps dirigés contre la réplacase dans des tissus infectés (Osman et Buck, 1997). Cette petite protéine de 50 kDa issue de la portion 126 kDa est reconnue par la protéine de résistance N. Cette reconnaissance est responsable d'une résistance contre le TMV. Des études récentes ont mis en évidence l'activité VSR de cette protéine (Wang *et al.*, 2012).

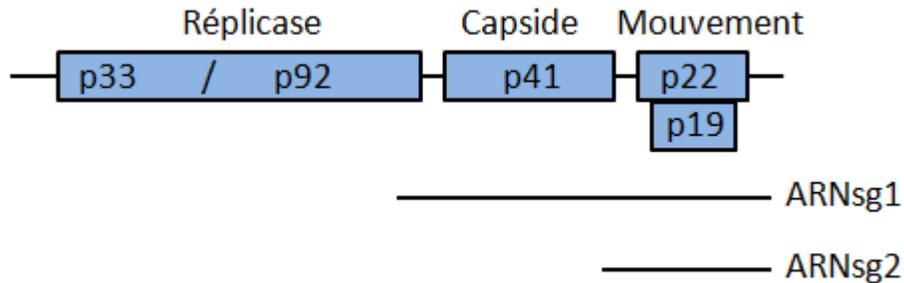


**Figure 9: Organisation génomique du TMV.** Le TMV, en plus de l'ARN génomique (ARNg), possède trois ARNsg responsables de l'expression de ses protéines.

### 2.5.3 Le virus du rabougrissement de la tomate

Le virus du rabougrissement de la tomate est un petit virus à ARNs<sup>b+</sup> qui a une structure icosaédrique et qui fait partie des tombusvirus. Il possède un génome de 4800 nt qui code pour 5 gènes (figure 10). La portion réplacase contient deux protéines, la p33 et la p92 (en traduction ininterrompue). La P92 est la réplacase, alors que la P33 et une protéine auxiliaire essentielle à la réplacase. Cette dernière assure plusieurs fonctions durant la réplacase. Elle se dimérise et lie l'ARN<sub>v</sub>, elle agit comme une chaperonne de l'ARN et défait les structures secondaires de l'ARN<sub>v</sub>, elle interagit avec la polymérase P92 afin de promouvoir son activité RdRp et elle interagirait avec un grand nombre de protéines de l'hôte afin de permettre la formation de complexes viraux de réplacase (Nagy *et al.*, 2012). Le reste du génome contient la capside et deux protéines de mouvement. Les deux protéines de mouvement sont des déterminants génétiques de la résistance au TBSV chez les espèces de tabac. Il y a une

reconnaissance d'une ou de l'autre des protéines en fonction des variétés de tabac (Angel et Schoelz, 2013). La P22 est une protéine impliquée dans le mouvement de cellule à cellule et elle serait associée à la membrane (Scholthof, 1995). La P19 est quant à elle le VSR bien caractérisé dont j'ai traité précédemment. En plus de l'ARNg, durant l'infection, il y aura production de deux espèces d'ARNsg qui produiront la capsidie et les protéines de mouvement.



**Figure 10: Organisation génomique et sub-génomique du TBSV.** Le TBSV possède 1 ARNg et deux ARNsg. Les ARNsg permettent respectivement d'exprimer la protéine de la capsidie ainsi que les protéines de mouvements.

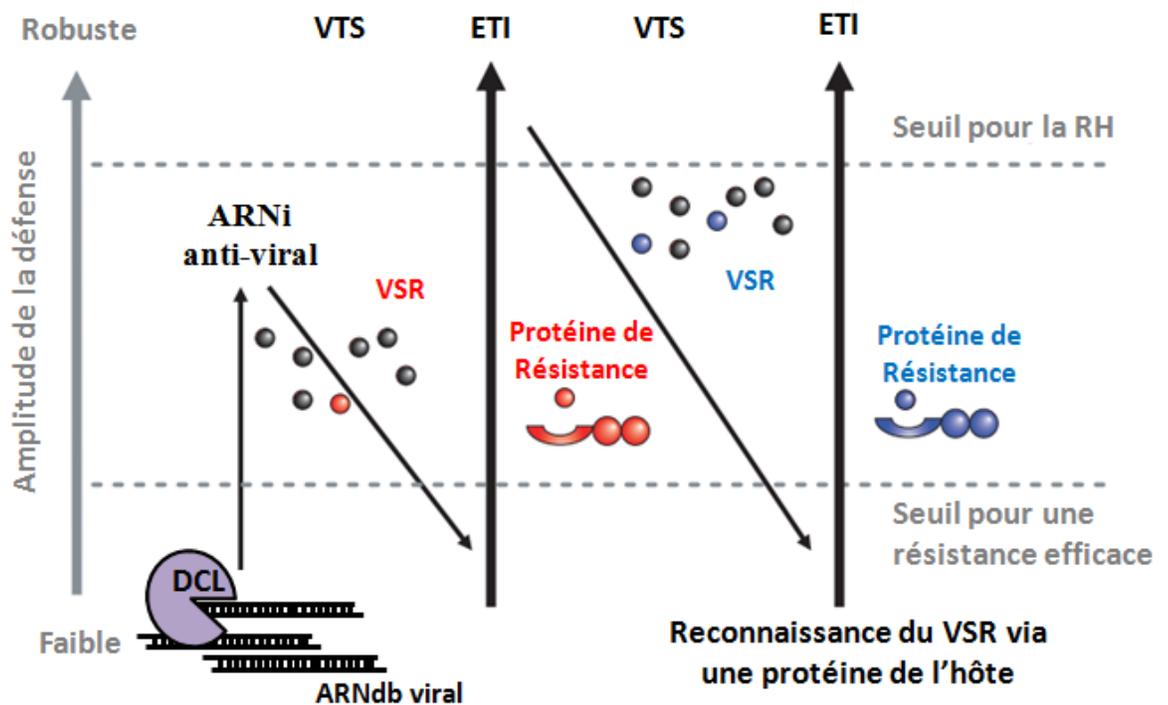
### 3 Objectif du projet de Recherche

Les plantes déploient donc deux types de réponse de défense, la PTI et l'ETI. La PTI est une réponse de faible envergure qui permet à la plante de se débarrasser de la plupart des microbes indésirables. Les agents pathogènes pour survivre ont donc développé des effecteurs qui leur permettent de surpasser cette réponse de défense. A son tour, la plante s'est dotée de gène de résistance lui permettant de reconnaître les effecteurs et de se débarrasser des agents pathogènes. Cette course aux armements est illustrée dans le modèle en zigzag de la figure 1.

Dans la réponse de défense antivirale, on considère de plus en plus que l'ARNi fait office de PTI. Il est donc possible de conceptualiser la course aux armements entre les virus et les plantes avec un modèle zigzag modifié (Figure 11). Dans ce modèle, il est donc stipulé que la plante mettra en place l'ARNi afin de se protéger des virus. Les virus vont donc se prémunir de l'ARNi en produisant des VSR, ce qui rendra la plante susceptible à l'infection dans ce que l'on nomme une susceptibilité induite par un VSR (VTS). La plante devra donc posséder un

gène de résistance reconnaissant ce VSR et mettra en place une ETI ou ETI-like afin de se protéger.

Notre hypothèse de départ est donc que la plante est capable de percevoir le dommage à la machinerie de l'ARNi afin d'induire une réponse de type ETI. Pour ce faire, nous avons donc besoin d'un modèle. La protéine sélectionnée est la P19 des tombusvirus. Cette protéine a été démontrée comme étant un VSR et elle induit une lésion similaire à une HR. C'est donc une protéine idéale afin de valider notre hypothèse. Mon premier objectif était donc de démontrer que la P19 était bel et bien un éliciteur et qu'elle induisait une réponse de défense de type ETI. Mon deuxième objectif était de démontrer que la plante reconnaissait la P19 par son action VSR. Comme son activité VSR passe par la liaison aux siARN, par conséquent, démontrer l'importance des siARN dans la mise en place de la HR.



**Figure 11: Modèle Zigzag adapté à la réponse de défense antivirale.** Le modèle Zigzag adapté pour les virus stipule que c'est l'interférence à l'ARN viral qui jouerait le rôle de la défense basale. Pour surpasser cette défense, les virus produiront des VSR. Ces VSR induiront une susceptibilité qui sera contrecarrée par la présence d'un gène de résistance. Ce gène de résistance reconnaîtra le VSR afin de permettre une résistance efficace. Figure adaptée de Jones et Dangle (2006) et Nakahara et Msauta (2014).

Pour mon troisième objectif, notre hypothèse est que la plante est capable de percevoir les dommages causés à la machinerie de l'ARNi. Pour ce faire la plante utiliserait des protéines clé de l'ARNi afin de sentir ces dommages. Mon troisième objectif est donc de démontrer l'implication de protéines clés de l'ARNi dans la mise en place de la HR induite par des VSR.

## **Chapitre 2**

### **La résistance extrême comme réponse à la suppression virale de l'interférence à l'ARN**

Cet article décrit comment un VSR des tombusvirus est reconnu chez le tabac. Cette réponse de défense est une réponse de défense qui exhibe plusieurs marqueurs de l'ETI. En outre, cette réponse de défense est caractérisée par une HR lorsque le VSR est exprimé seul et aucune lésion lors de l'infection virale, des caractéristiques de la résistance extrême. Cet article décrit aussi la nécessité d'avoir une activité VSR afin que la plante puisse mettre en place la HR.

Ces observations supportent l'hypothèse selon laquelle durant les interactions plantes-virus la voie de l'ARNi et la voie de l'ETI travaillent de concert afin de mettre en place une réponse de défense efficace. Ce travail est aussi le premier à mettre en évidence que la liaison au petit ARN est essentielle, mais pas suffisant afin de reconnaître un VSR et induire une HR. Ces travaux sont d'autant plus intéressants qu'ils posent des questions qui méritent réponse. Premièrement est-ce que la reconnaissance de l'activité de suppression de l'ARNi est un mécanisme conservé à travers les plantes? La deuxième est issue du fait que la P15 est incapable de compétitionner avec la P19 pour les petit ARN, mais qu'elle inhibe la HR induite par la P19. Cela laisse croire que la liaison au petit ARN est un prérequis à une interaction subséquente qui est aussi essentiel à la RH. Ces résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse qu'il existe une ou des protéines de résistance qui protégeraient les acteurs clés de la machinerie de l'ARNi. Quelles sont ces interactions et quelles sont les joueurs clés impliqués ? Mieux comprendre ce mécanisme constituerait une avancée majeure dans le domaine de la virologie végétale et de la phytopathologie en permettant la sélection de variétés plus résistantes aux virus et aux pathogènes en général.

J'ai réalisé la majorité des expériences présentées dans cet article, à l'exception des résultats de la figure 6 qui ont été réalisés par Dr. Patrice Dunoyer dans le laboratoire du Dr Olivier Voinnet et du dosage de l'AS qui a été réalisé par Fouad Dayyf. Vanessa Dufour a généré les plantes transgéniques exprimant la P19 de type sauvage. Mathieu Langlois a réalisé les

expériences représentées dans la figure S3. J'ai participé à la rédaction du manuscrit avec le Dr. Kamal Bouarab et le Dr. Olivier Voinnet.

Cet article a été accepté et publié dans le journal Public Library Of Science Pathogens en juin 2013.

**Note** : Cet article a été rétracté à cause du montage erroné fait dans la figure 6 qui nous a été fourni par le Dr Patrice Dunoyer (coauteur de l'article, IBMP, Strasbourg, France). Il est important de noter que les données originales qui sont censées être utilisées pour monter la figure 6 sont bonnes. La conclusion tirée à partir de ces données originales est exactement similaire à celle faite dans l'article. De plus, toutes les autres conclusions faites dans l'article demeurent valides.

**Extreme resistance as a host counter-counter defense against viral suppression of  
RNA silencing**

Raphaël Sansregret<sup>†</sup>, Vanessa Dufour<sup>†</sup>, Mathieu Langlois<sup>†</sup>, Fouad Daayf<sup>‡</sup>, Patrice Dunoyer<sup>§</sup>,  
Olivier Voinnet<sup>§††¶</sup>, and Kamal Bouarab<sup>†¶</sup>

<sup>†</sup>Centre SEVE, Département de Biologie, Faculté des Sciences, Université de Sherbrooke,  
2500 Boulevard de l'Université, Sherbrooke, QC, J1K 2R1, Canada

<sup>‡</sup>Department of Plant Science, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba R3T 2N2,  
Canada

<sup>§</sup>Institut de Biologie Moléculaire des Plantes du CNRS, Université de Strasbourg, 67084  
Strasbourg Cedex, France.

<sup>††</sup>Department of Biology, Swiss Federal Institute of Technology (ETH), Zurich, Switzerland

**¶Corresponding authors:** Kamal Bouarab, Université de Sherbrooke, 2500 BLD de  
l'Université, Sherbrooke, J1K2R1 (Canada), Phone: 18198218000 # 62966; Fax:  
18198218049; E-mail: Kamal.Bouarab@USherbrooke.ca.

Or:

Olivier Voinnet, Department of Biology, Swiss Federal Institute of Technology (ETH),  
Zurich, Switzerland, Phone: Phone: +41 44 633 93 60; Fax: +41 44 632 10 81; E-mail:  
voinneto@ethz.ch.

## 1 ABSTRACT

RNA silencing mediated by small RNAs (sRNAs) is a conserved regulatory process with key antiviral and antimicrobial roles in eukaryotes. A widespread counter-defensive strategy of viruses against RNA silencing is to deploy viral suppressors of RNA silencing (VSRs), epitomized by the P19 protein of tombusviruses, which sequesters sRNAs and compromises their downstream action. Here, we provide evidence that specific *Nicotiana* species are able to sense and, in turn, antagonize the effects of P19 by activating a highly potent immune response that protects tissues against *Tomato bushy stunt virus* infection. This immunity is salicylate- and ethylene-dependent, and occurs without microscopic cell death, providing an example of “extreme resistance” (ER). We show that the capacity of P19 to bind sRNA, which is mandatory for its VSR function, is also necessary to induce ER, and that effects downstream of P19-sRNA complex formation are the likely determinants of the induced resistance. Accordingly, VSRs unrelated to P19 that also bind sRNA compromise the onset of P19-elicited defense, but do not alter a resistance phenotype conferred by a viral protein without VSR activity. These results show that plants have evolved specific responses against the damages incurred by VSRs to the cellular silencing machinery, a likely necessary step in the never-ending molecular arms race opposing pathogens to their hosts.

## 2 AUTHOR SUMMARY

Multiple and complex layers of defense help plants to combat pathogens. A first line of defense relies on the detection, via dedicated host-encoded receptors, of signature molecules (so called pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) produced by pathogens. In turn, this PAMP-triggered immunity (PTI) may be itself antagonized by adapted pathogens that have evolved virulence effectors to target key PTI components. Host plants react to PTI suppression by producing disease resistance (R) proteins that recognize virulence effectors and activate highly specific resistance called Effector Triggered Immunity (ETI).

It has been noted that RNA silencing, a sequence-specific antiviral defense response based on the production of virus-derived 21-24nt small RNAs on the one hand, and its suppression by virulence effectors, called viral suppressors of RNA silencing (VSRs) on the other, are conceptually similar to PTI. Here we provide strong support to this hypothesis by showing that extreme resistance is indeed activated following detection, in specific host species, of the VSR activity of a viral virulence effector. The ensuing antiviral immunity displays many characteristics of ETI, suggesting that one or several R proteins must sense the integrity of the host silencing machinery.

### 3 INTRODUCTION

Plants fight microbial attacks using both constitutive and induced defenses, which include basal and highly specific resistance (Jones and Dangl 2006). Basal resistance, or PTI (for PAMP-Triggered Immunity), often relies on the detection of highly conserved signature molecules that include fungal polysaccharides or bacterial flagellin, collectively termed pathogen-associated molecular patterns (PAMPs; (Jones and Dangl 2006, Zipfel 2009)). To circumvent this first layer of defense, many host-adapted microbes produce effector proteins that suppress various steps of PTI (Dodds and Rathjen 2010). As a counter-response, plants have, in turn, evolved classes of specialized receptors called resistance (R) proteins that directly detect pathogen's encoded suppressors of PTI, or that sense the molecular consequences of their adverse action on defense-related host factors.

R protein activation triggers potent defense responses collectively named Effector Triggered Immunity (ETI) that often –albeit not always (see below) culminate in Hypersensitive Response (HR), a rapid and localized cell death process thought to limit or preclude pathogens' growth (Jones and Dangl 2006, Zipfel 2009). As a consequence of the gene-for-gene type of interaction linking these two components, plant R genes and their corresponding pathogen-encoded virulence factors evolve constantly and rapidly, so that HR, a common and ultimate manifestation of ETI, is usually only observed in specific plant species infected with specific pathogen strains. The plant hormones salicylic acid (SA), ethylene and jasmonic acid (JA) are crucially implicated in signaling networks underpinning both PTI and ETI (Jones and Dangl 2006, van Loon, Rep et al. 2006, Bent and Mackey 2007, Zipfel 2009); antimicrobial pathogenesis-Related Proteins (PRs), which include taumatine-like proteins and chitinases, are also often induced by both pathways and constitute, therefore, typical molecular markers of pathogen-induced defenses (Fritig, Heitz et al. 1998). Although the occurrence of HR is classically used to discern PTI from ETI during bacterial or fungal infections (Oh, Park et al. 2010), an HR-independent process known as Extreme Resistance (ER) is activated by a number of R proteins during ETI against viruses; ER is characterized by the lack of detectable accumulation of the triggering virus, and is accompanied by the onset of a broad-spectrum antiviral state in the absence of macroscopic or microscopic cell death lesions (Bendahmane,

Kanyuka et al. 1999, Kang, Yeam et al. 2005, Eggenberger, Hajimorad et al. 2008, Wen, Khatabi et al. 2013).

RNA silencing is a conserved regulatory process that has evolved as an antiviral and antimicrobial defense mechanism in plants and animals (Katiyar-Agarwal, Morgan et al. 2006, Navarro, Dunoyer et al. 2006, Ding and Voinnet 2007, Katiyar-Agarwal and Jin 2007, Katiyar-Agarwal and Jin 2010, Zhang, Jiang et al. 2011). Common features of RNA silencing across organisms include the involvement of double-stranded (ds)RNA as an initiator molecule, and accumulation of 21-24nt small (s)RNAs that are processed from dsRNA by the RNase III-like enzyme Dicer (Hamilton and Baulcombe 1999, Bernstein, Caudy et al. 2001, Elbashir, Lendeckel et al. 2001). sRNAs are then incorporated into Argonaute (AGO)-containing effector complexes termed RNA-induced Silencing Complexes (RISCs) and, in case of extensive sequence complementarity between sRNA guide and target, AGO catalyses cleavage of the target RNA. *Arabidopsis thaliana* possesses four Dicer-like (DCLs) and ten AGO proteins (Hammond, Bernstein et al. 2000), among which DCL4 and its surrogate DCL2, as well as AGO1 and AGO2, play essential roles as processors and effectors of virus-derived short interfering (si)RNAs, respectively (Bucher, Lohuis et al. 2006, Deleris, Gallego-Bartolome et al. 2006, Qu, Ye et al. 2008, Harvey, Lewsey et al. 2011, Jaubert, Bhattacharjee et al. 2011, Scholthof, Alvarado et al. 2011, Wang, Jovel et al. 2011, Garcia, Garcia et al. 2012). DCL1- and AGO1-dependent micro (mi)RNAs produced from endogenous loci regulate the expression of many transcripts displaying miRNA sequence-complementarity, including mRNAs for transcription factors, enzymes, and regulators of PTI induced, notably, by bacteria (Navarro, Dunoyer et al. 2006, Ruiz-Ferrer and Voinnet 2009, Voinnet 2009, Katiyar-Agarwal and Jin 2010, Zhang, Jiang et al. 2011).

As a consequence of these multiple RNA silencing-based defense layers, plant viruses, pathogenic bacteria, oomycetes and, possibly, fungi, have evolved suppressors of RNA silencing (SRs) that apparently target many steps of the siRNA and miRNA pathways (Anandalakshmi, Pruss et al. 1998, Brigneti, Voinnet et al. 1998, Voinnet, Pinto et al. 1999, Baulcombe and Molnar 2004, Ding and Voinnet 2007, Navarro, Jay et al. 2008, Qiao, Liu et al. 2013). SRs are highly diverse in sequence, structure, and activity, and single SRs may

target multiple points in RNA silencing pathways (Ding and Voinnet 2007, Ruiz-Ferrer and Voinnet 2009). Several viral SRs (VSRs) are known to affect AGO1 function (Ding and Voinnet 2007). For example, The *Beet western yellows virus* P0 protein was suggested to act as an F-box protein targeting AGO proteins for degradation, thereby preventing RISC assembly (Baumberger, Tsai et al. 2007, Bortolamiol, Pazhouhandeh et al. 2007, Csorba, Lozsa et al. 2010). *Turnip crinckle virus* P38 was recently shown to bind directly and specifically AGO1 through mimicry of host-encoded glycine/tryptophane (GW)-containing proteins normally required for RISC assembly/function in diverse organisms (Azevedo, Garcia et al. 2010, Schott, Mari-Ordonez et al. 2012). Physical sequestration of siRNAs is another common property of VSRs *in vitro* (Vargason, Szittyta et al. 2003, Lakatos, Csorba et al. 2006, Merai, Kerenyi et al. 2006, Csorba, Bovi et al. 2007, Hemmes, Lakatos et al. 2007), although the extent to which this specific feature contributes to effective RNA silencing suppression *in vivo* remains unclear (Schott, Mari-Ordonez et al. 2012). The most compelling example of active silencing suppression mediated by siRNA binding is provided by the tombusvirus P19 protein, of which the closely related *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) and *Carnation Italian Ringspot virus* (CIRV; 97% identity) are the type representatives. Following its original discovery as a VSR (Voinnet, Pinto et al. 1999), P19 was co-crystalized as a head-to-tail homodimer in direct association with an siRNA duplex (Vargason, Szittyta et al. 2003, Ye, Malinina et al. 2003). Supporting a direct and critical contribution of homodimerization and siRNA binding to the P19 VSR activity, stable point mutant alleles of the proteins lacking either property display complete loss-of-VSR-function phenotypes in both virus-infected and transgenic plants (Vargason, Szittyta et al. 2003, Lakatos, Szittyta et al. 2004, Omarov, Sparks et al. 2006, Scholthof 2006). siRNA binding by P19 also explains why its constitutive expression in *Arabidopsis* promotes developmental defects resembling those of plants carrying mutations in miRNA pathway components. Indeed, it was shown that P19 binds endogenous siRNAs and miRNAs, incurring, in the process, misregulation of the cognate endogenous targets of these molecules (Jay, Wang et al. 2011, Schott, Mari-Ordonez et al. 2012).

Remarkable parallels can be drawn between the general framework of silencing activation and its suppression by pathogens on the one hand, and the classical PTI-ETI scheme for resistance, on the other. This has prompted the suggestion that the two processes might be, in fact,

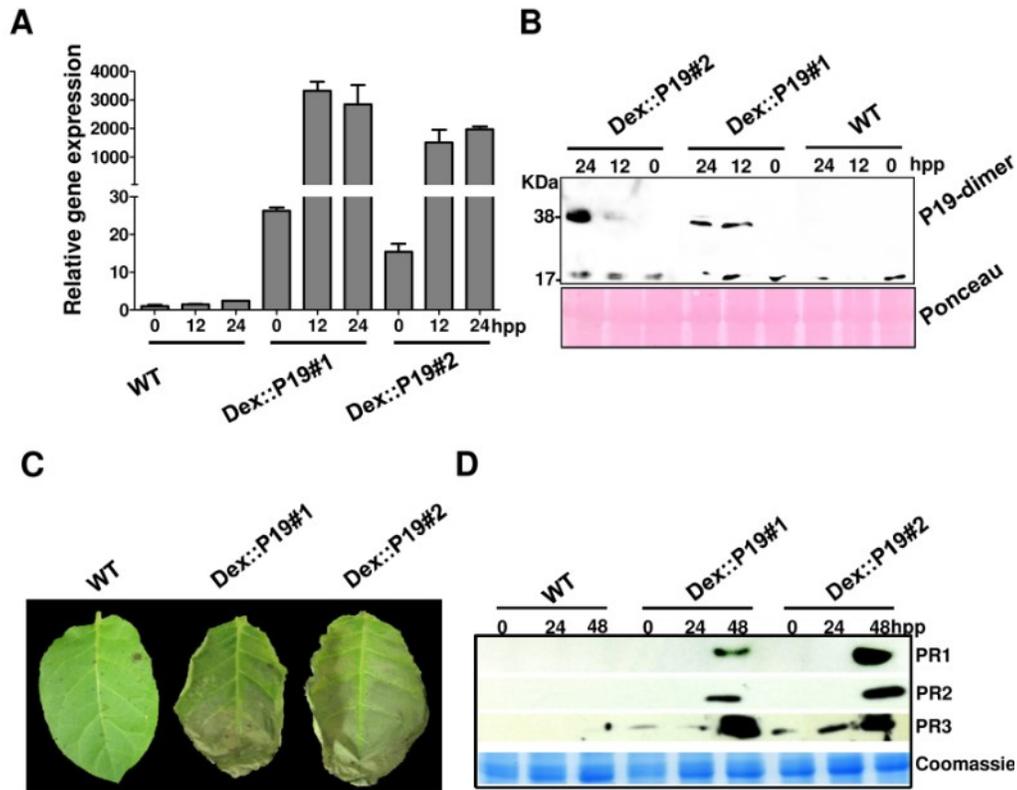
manifestations of similar, if not identical, phenomena (Li, Lucy et al. 1999, Ruiz-Ferrer and Voinnet 2009). In the case of (+)-stranded RNA viruses, for example, viral-derived dsRNA can be assimilated to a PAMP because this molecule is a mandatory product of viral replication. Similarly, the Dicer/AGO consortium orchestrating the antiviral reaction may be conceptually compared to the first defense layer underlying PTI (Ruiz-Ferrer and Voinnet 2009). Pursuing the comparison one step further and taking into account that VSRs are virulence effectors, it can be anticipated that the damages incurred by VSRs to the cellular silencing machinery may be sensed by host-encoded functions comprising, perhaps, dedicated R genes; the effects of such functions would thus be diagnosed, at least partly, by the typical outputs of ETI, including HR (Ruiz-Ferrer and Voinnet 2009). Supporting this notion, at least three VSR proteins from distinct virus families are known to trigger HR-like lesions in a host-specific manner (Scholthof, Scholthof et al. 1995, Li, Lucy et al. 1999, Chu 2000, Choi, Qu et al. 2004, Angel, Hsieh et al. 2011, Angel and Schoelz 2013). It remains largely unknown, however, if these responses are stimulated by intrinsic silencing suppression properties or by other, unrelated functions of the viral proteins involved. Also unclear is whether virus resistance is effectively triggered upon recognition of these VSRs in these specific hosts, and to what extent the output of the induced defense compares with that of classical ETI.

The present series of experiments was aimed at addressing these various issues using the well-characterized P19 VSR in tobacco. The results support the idea that RNA silencing and its suppression by viruses can be effectively rationalized within the frame of PTI-ETI, since we demonstrate, in authentic infection contexts, that (i) tombusviral virulence (ii) suppression of RNA silencing and (iii) induction of an ER-type of resistance with molecular features of ETI are all dependent upon the ability of P19 to bind sRNAs. Collectively, the data support the existence of host-encoded sensors that monitor the status/integrity of key RNA silencing components in plants. We propose, consequently, that perturbation of these components by pathogen-encoded SRs may activate potent ETI-like resistance responses. This proposed host counter-counter defensive layer likely constitutes an important driver in the evolution and diversification of SRs from viruses and perhaps other parasites.

## 4 RESULTS

### 4.1 P19 is required to trigger an ETI-like resistance against TBSV in *N. tabacum*

TBSV P19 was shown to induce a HR-like response in *N. tabacum* and other *Nicotiana* species; a host-specific response strongly evocative of R gene-mediated ETI (Scholthof, Scholthof et al. 1995, Chu 2000, Angel, Hsieh et al. 2011, Angel and Schoelz 2013). To ascertain further if, indeed, P19 acts as an elicitor of immune responses, we generated transgenic *N. tabacum* cv. Xanthi lines expressing P19 under the GVG glucocorticoid inducible promoter, which is activated by dexamethazone (Dex::P19;(Aoyama and Chua 1997)). The expression of P19 was quantified in two independent lines 0, 12 and 24 hours post Dex application (hpp); non-transgenic plants sprayed with DEX provided a negative control. While very low P19 transcript accumulation was observed before DEX treatment in the two transgenic lines, it was up to 4000 times higher following DEX application, at 12 and 24 hpp, compared to 0 hpp and to DEX-treated non-transgenic plants (Figure 1A). Accumulation of the P19 protein, mostly under homodimeric form, was also detected by Western analysis in the DEX-induced transgenic lines, but not in non-transgenic lines, using a polyclonal P19 antibody (Figure 1B). Accumulation of P19 following DEX induction correlated with the onset of three key markers of plant defense responses: (i) the progressive development of HR-like lesions in the sprayed areas of leaves, (ii) the accumulation of distinct PR proteins, PR1, PR2 and PR3, at 24 and 48 hpp (Figures 1C-D), and (iii) the accumulation of salicylic acid (SA) which was 4-5 times higher following DEX application at 24 hpp in the DEX-induced transgenic lines compared to 0 hpp and to DEX-treated non-transgenic plants (Figure S1). Collectively, therefore, the results presented in Figure 1 and Figure S1 suggest that in *N. tabacum*, P19 effectively acts as an elicitor of plant defense responses displaying at least superficial characteristics of ETI.

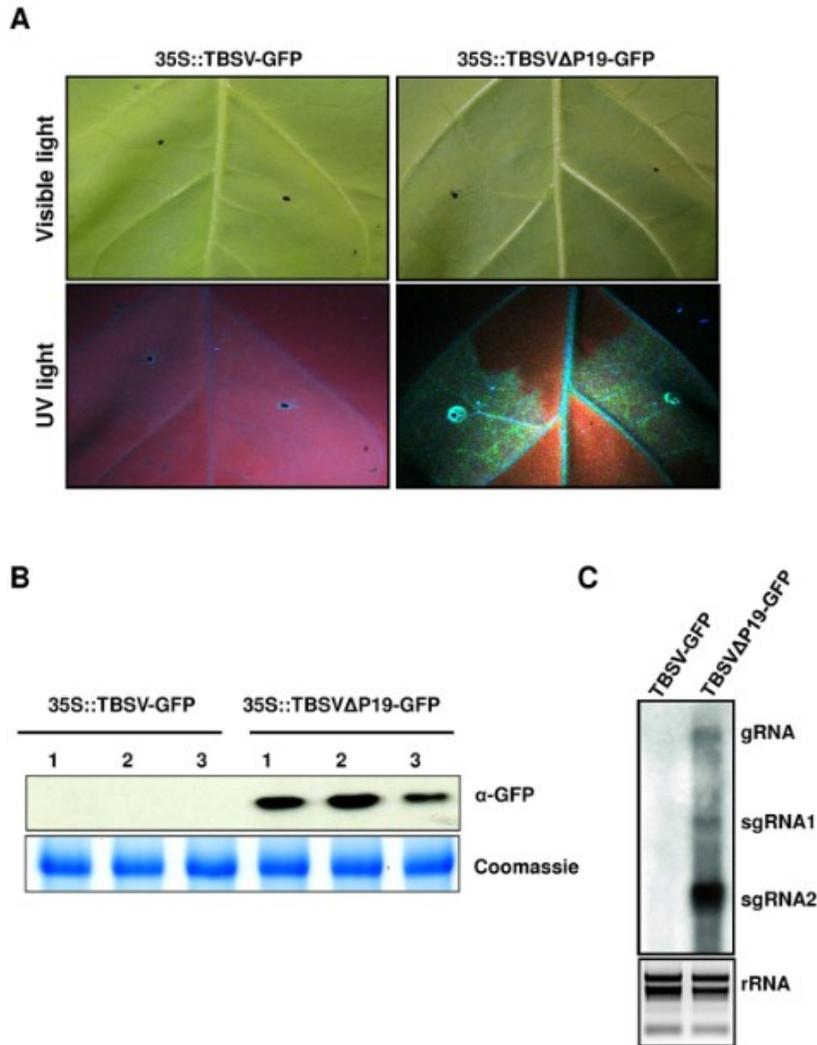


**Figure 1. DEX::P19 transgenic plants display defense responses following DEX application.**

(A-B) Leaves of five week old DEX::P19 transgenic and wild type plants (*N. tabacum* cv. Xanthi) were sprayed with DEX and the kinetics of P19 accumulation at transcript (A) and protein (B) levels was subsequently analyzed by qPCR and Western analysis, respectively. Actin was used as an internal control. (C) DEX::P19 transgenic or wild type plants were sprayed with DEX, and appearance of HR was assessed 5 days post-DEX application. We observed two and sometimes three bands for P19 dimers. These additional bands appear when P19 is expressed in *N. tabacum* but not in *N. benthamiana*. We believe that these additional bands are due to post-translational regulation of P19 by *N. tabacum*; this regulation might have a biological significance but evidence of this is not known yet. (D) PR protein accumulation at 0, 1 and 2 days post DEX application in wild type and DEX::P19 transgenic lines. Western analysis was conducted using anti-PR1, -PR2 and -PR3 antibodies. Coomassie or ponceau staining of the same extracts is shown to demonstrate equal protein loading. Experiments were repeated three times and showed similar results.

To test if P19 effectively induces resistance against TBSV in *N. tabacum*, Agrobacterium strains expressing either TBSV-GFP or TBSV $\Delta$ P19-GFP, which is unable to express P19 (Scholthof, Alvarado et al. 2011), were used to inoculate leaves of 5-week old *N. tabacum*. At 5 days post-infiltration (dpi), virus accumulation was monitored under UV light via the appearance of green fluorescence in infiltrated leaves, and by Western analysis using an anti-GFP antibody. Viral replication was assessed directly in parallel by Northern analysis, using a GFP DNA fragment as a probe, which detects both genomic and sub-genomic RNAs of TBSV-GFP. We found that the presence or absence of P19 expression from TBSV-GFP had dramatically contrasted consequences on virus replication. Thus, GFP was not observed (Figure 2A-B) and the viral RNAs were below detection limits of Northern analyses (Figure 2C) in TBSV-GFP-inoculated leaves. In sharp contrast, however, both GFP accumulation and viral RNA replication were readily detectable in TBSV $\Delta$ P19-GFP-infiltrated leaves at 5 dpi (Figures 2A-C). To further characterize the P19-mediated defense response, we used trypan blue staining as a diagnostic of cell death. Leaves were thus inoculated either with TBSV-GFP, P50 from *Tobacco mosaic virus* (TMV), which induces an HR in *N. tabacum* carrying the resistance gene N (as a positive control), or GUS as a negative control. We found that the visible and microscopic HR observed in P50-treated plants was absent from TBSV-GFP-infected and control leaves (Figure S2). These results strongly suggest that extreme resistance (ER) was triggered in TBSV-GFP-inoculated leaves of *N. tabacum*, and implicate, therefore, P19 as the elicitor of this defense. In fact, the results obtained here with P19 in tobacco are highly reminiscent of the well-studied interaction between *Potato virus X* coat protein (CP) and the Rx resistance protein in *Solanum tuberosum* or tobacco (Bendahmane, Kanyuka et al. 1999). Indeed, while Rx typically confers ER to PVX in the context of authentic virus infections, isolated and prolonged production of CP, for instance *via* Agrobacterium-mediated transient expression, does trigger an HR in Rx potato genotypes (Bendahmane, Kanyuka et al. 1999, Kang, Yeam et al. 2005), as seen previously and here upon transient and transgenic expression of P19 in specific *Nicotiana* species (Figure 1B-C, (Angel and Schoelz 2013)). With both PVX and TBSV, the potent antiviral state accompanying the ER (e.g. Figure 2C) probably stops virus replication before the CP or P19 have reached the levels required to trigger an HR (Bendahmane, Kanyuka et al. 1999, Kang, Yeam et al. 2005), a phenomenon

presumably bypassed when both elicitors are produced in a virus replication-independent manner.

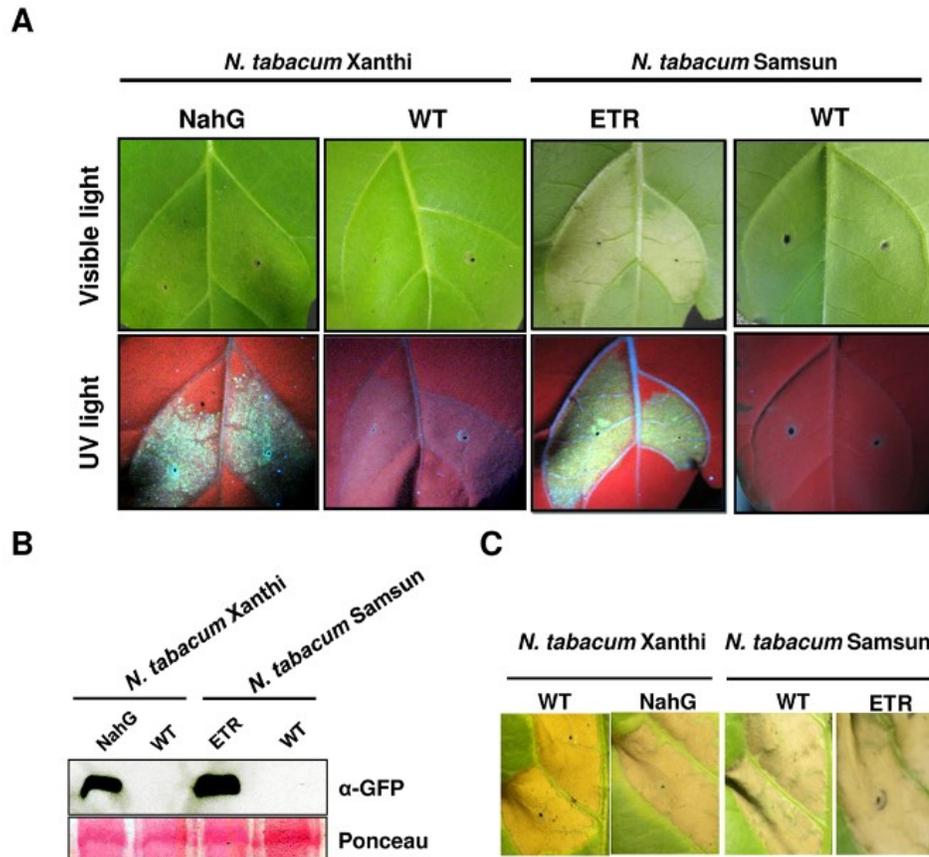


**Figure 2. P19 is required for extreme resistance of *N. tabacum* against TBSV.**

(A) Leaves of 5 weeks old *N. tabacum* cv. Xanthi plants were infiltrated with *Agrobacterium* expressing TBSV-GFP or TBSVΔP19-GFP. Pictures of infiltrated leaves were taken 5 dpi under transmitted light and UV. (B) GFP accumulation in infiltrated leaves from three independent plants. Western analysis was carried out using an anti-GFP antibody. Coomassie staining of the same extracts is shown to demonstrate equal protein loading. (C) Northern analysis of TBSV-GFP and TBSVΔP19-GFP RNA accumulation in infected plants at 5 dpi, using a GFP DNA fragment as a radioactive probe. Viral genomic and subgenomic RNAs are indicated; ribosomal RNA was used to demonstrate equal RNA loading. Experiments were repeated three times and showed similar results.

## 4.2 Salicylic acid and ethylene are required for extreme resistance induced by P19

The potent (Figure 2C) and broad-spectrum (Bendahmane, Kanyuka et al. 1999) antiviral state triggered by ER is suspected to underlie the production of defense-related hormones, including SA, which possesses demonstrated antiviral activities (Ji and Ding 2001, Alamillo, Saénz et al. 2006, Wang, Jovel et al. 2011). The gaseous hormone ethylene is also important for induction of plant immunity (van Loon, Rep et al. 2006). To investigate the possible roles of these compounds in the ER-like resistance induced by P19 against TBSV, SA-deficient transgenic tobacco plants expressing NahG (Salicylate hydroxylase; (Friedrich, Vernooij et al. 1995)) and plants insensitive to Ethylene (ETR; (Knoester, van Loon et al. 1998)) were inoculated with TBSV-GFP using *Agrobacterium*-mediated delivery. At 5 dpi, leaves were observed under UV and samples were harvested for Western analysis using the anti-GFP antibody. Unlike WT plants, both transgenic plants failed to display resistance against TBSV (Figure 3A-B) and, accordingly, the P19-dependent induction of PR proteins was compromised in NahG plants ((Cordelier, de Ruffray et al. 2003, Ménard, Alban et al. 2004); Figure S3). Overall, these results indicate that SA and ethylene are required for the ER induced by P19 against TBSV. We then investigated if the HR-like lesions induced by P19 in tobacco leaves (Figure 1C) were SA- and/or ethylene-dependent. As seen in Figure 3C, necrosis was as extensive in leaves of NahG and ETR plants as it was in their non-transgenic counterparts at 5 dpi (Figure 3C), indicating that the HR triggered by P19, unlike the induced antiviral state, is neither SA- nor ethylene-dependent.

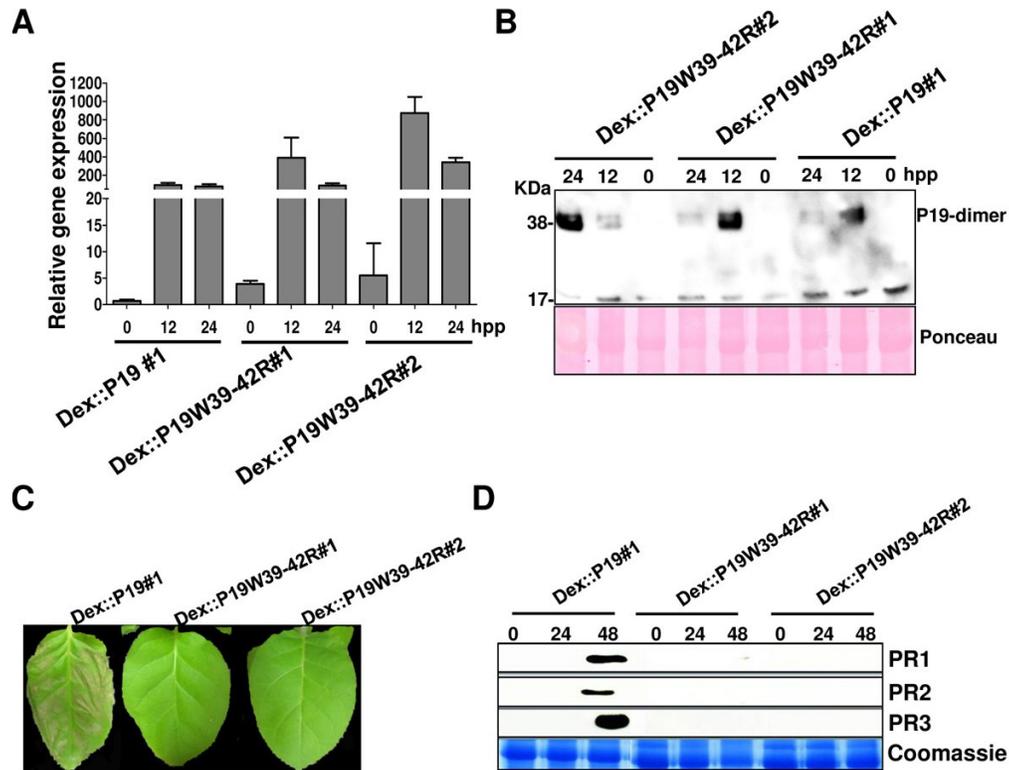


**Figure 3. Salicylic acid and ethylene are required for extreme resistance induced by P19 against TBSV**

(A) Leaves of SA-deficient and ethylene-insensitive plants, or their corresponding WT counterparts, were infiltrated with *Agrobacterium tumefaciens* expressing TBSV-GFP. Leaves were observed under optical light and GFP fluorescence was visualized under UV at 5 dpi. (B) Western analysis was conducted to detect TBSV-GFP accumulation in the infiltrated leaves depicted in (A), using an anti-GFP antibody. Ponceau staining of the membrane is shown to demonstrate equal protein loading. (C) *A. tumefaciens* expressing P19 triggers an HR response in all depicted genotypes at 5 dpi. Experiments were repeated three times and showed similar results.

### 4.3 sRNAs binding by P19 is necessary for P19-mediated elicitation of defense

Resolving the crystal structure of the P19-siRNA complex granted the identification of point mutations that debilitate the protein's VSR function without impacting its stability (Vargason, Szittyá et al. 2003). It was notably shown that a double mutation affecting tryptophan residues 39 and 42 (W39-42R) was sufficient to abolish siRNA binding by P19 *in vitro*, with the resulting stable mutant allele being unable to suppress RNA silencing *in planta* (Vargason, Szittyá et al. 2003). Using the same allele, we thus tested if the capacity of P19 to sequester siRNAs was required for the elicitation of ER in *N. tabacum*. We generated transgenic *N. tabacum* cv. Xanthi lines expressing CIRV P19W39-42R under the DEX inducible promoter (DEX::P19W39-42R). Expression of P19W39-42R was quantified in two independent lines 0, 12 and 24 hours after DEX application; transgenic line Dex::P19#1, expressing WT P19 (Figure 1B), was used as a reference for functional P19 levels in these experiments. Upon DEX application onto leaves of five week old plants, quantification of both mRNA (Figure 4A) and protein (Figure 4B) levels showed that accumulation of the P19 mRNA and of P19 homo-dimers was similar in the two independent DEX::P19W39-42R tobacco lines tested and in the Dex::P19#1 reference line (Figure 4A-B). Remarkably, P19W39-42R was neither able to induce SA accumulation, HR-like symptoms nor to promote accumulation of PR1, PR2 and PR3 compared to WT P19 (Figure 3C-D and Figure S1), suggesting that small RNA binding by P19 is necessary to trigger the onset of defense in *N. tabacum*. The results also show that defense elicitation can occur independently of virus infection, suggesting that binding of endogenous sRNAs by P19 is prerequisite for elicitation.



**Figure 4. Binding of small RNAs is mandatory for induction of plant immune responses by P19**

(A-B) Leaves of five week old Dex::P19, Dex::P19W39-42R transgenic lines (*N. tabacum* cv. Xanthi) were sprayed with DEX and the kinetics of P19W39-42R accumulation at transcript (A) and protein (B) levels was analysed by qPCR and Western analysis, respectively. Actin was used as an internal control. (C) The transgenic lines described above were sprayed with DEX and appearance of an HR was assessed 5 day post-DEX application. (D) PR proteins accumulation at 0, 1 and 2 days post DEX application in Dex::P19 and Dex::P19W39-42R transgenic lines. Western analysis was conducted using anti-PR1, -PR2 and -PR3 antibodies. Coomassie or ponceau staining of the same extracts is shown to demonstrate equal protein loading. Experiments were repeated three times and showed similar results.

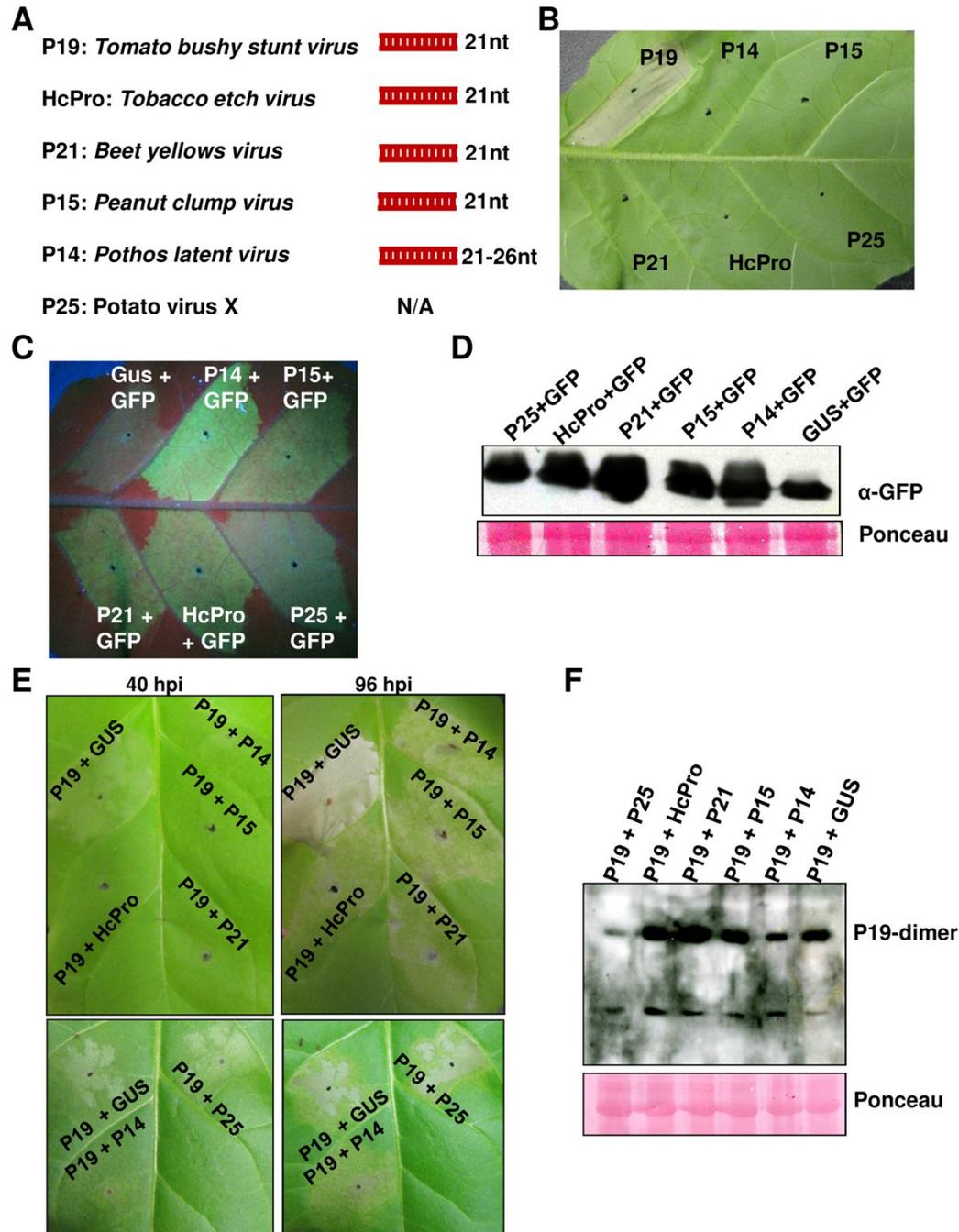
#### **4.4 RNA silencing suppression and sRNAs binding are not sufficient, *per se*, to trigger HR-like lesions in *N. tabacum***

The above results prompted us to investigate if silencing suppression via sRNA binding was sufficient, *per se*, to trigger the HR-associated defense response elicited by P19 in *N. tabacum*. To that aim, we used Agrobacterium strains producing various VSRs unrelated to P19. Hc-Pro from *Tobacco etch virus*, P15 from *Peanut clump virus* and P21 from *Beet yellows virus* are all known to bind sRNAs *in vitro*, with high affinity for 21nt-long species (Figure 5A; (Merai, Kerenyi et al. 2006)). In the same *in vitro* assay, P14 from *Pothos latent virus* was shown to bind different sizes of sRNAs ranging from 21nt to 26 nt, while P25 from PVX was, by contrast, devoid of sRNA binding activity (Figure 5A; (Merai, Kerenyi et al. 2006)).

We found that, unlike P19, neither of the above VSRs was able to trigger the HR-like response at 5dpi following their transient expression in leaves of *N. tabacum* (Figure 5B). Nonetheless, in a well-established silencing suppression assay based on transient co-expression of a silencing GFP target transgene with VSRs (Himber, Dunoyer et al. 2003), all of these proteins were clearly able to stabilize GFP accumulation, as assessed under UV illumination (Figure 5C) and by Western analysis (Figure 5D). By contrast, GFP accumulation remained low in tissues co-infiltrated with a control Agrobacterium strain expressing the GUS reporter gene (Figure 5C-D). Thus, all the VSRs tested were able to suppress GFP RNA silencing in this assay. The results indicate that the failure of the P19-unrelated VSRs to trigger an HR-like response cannot be explained by their inability to suppress RNA silencing in *N. tabacum*. Therefore, RNA silencing suppression is, in itself, insufficient to trigger this response. Moreover, given the documented high affinity of some of the VSRs used for siRNAs (Dunoyer, Lecellier et al. 2004, Merai, Kerenyi et al. 2006, Schott, Mari-Ordonez et al. 2012) the data suggest that sRNA binding *per se* is also insufficient to promote defense in *N. tabacum*. The most parsimonious interpretation of these results entails, therefore, that P19-mediated elicitation of host defenses in *Nicotiana* species involves the specific recognition of P19-sRNA complexes, or of downstream molecular events triggered by the specific association of both components.

#### **4.5 Co-expression of unrelated VSRs compromise the onset of HR elicited by P19, but not resistance conferred by Rx against PVX**

Even though none of the above-tested VSRs triggered, on its own, a defense response in *N. tabacum*, the intrinsic abilities of most of these proteins to bind sRNAs predicted that their co-expression with P19 would compromise the onset of HR-like lesions observed in *Agrobacterium*-infiltrated tissues (Figure 1C). As shown in Figure 5E, this was indeed the case: the appearance of necrotic tissues was significantly delayed and less extensive at 96 hours in leaf patches that had received the P19-VSR co-treatments compared to leaves co-treated with P19 and GUS as a negative control (Figure 5E). Remarkably, the delayed onset of HR was not observed in co-treatments involving P19 and the P25 protein of PVX, which, unlike all the other VSRs tested, does not bind sRNAs *in vitro* ((Merai, Kerenyi et al. 2006); Figure 5E). Western analyses employing a P19 antibody also confirmed that the delayed onset of HR was unlikely to be a consequence of altered levels of P19 homodimers in the P19-VSR co-treated leaves, compared to control leaves (Figure 5F).



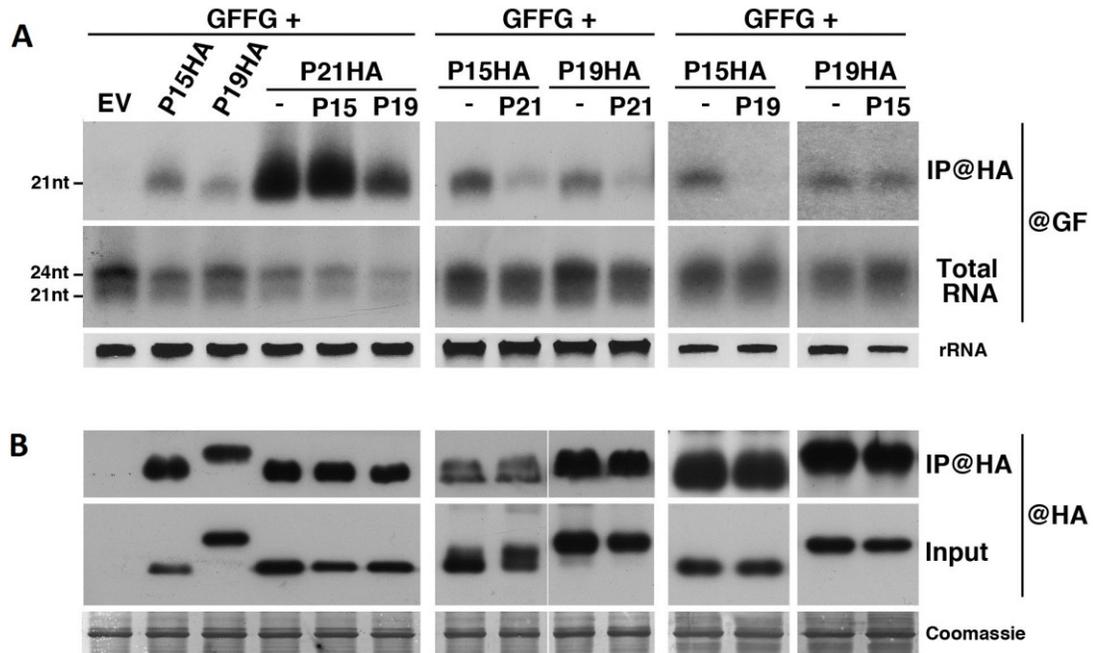
**Figure 5. Effects of VSRs unrelated to P19.**

(A) List of VSRs used in this study alongside their preferential sRNA binding sizes, as established *in vitro*. P25 is unable to bind sRNAs *in vitro*. Leaves of five week-old *N. tabacum* cv. Xanthi were transiently infiltrated with *Agrobacterium tumefaciens* expressing either P19, P14, P15, P21, P25 or Hc-Pro. (B) HR response as evaluated 5 days post infiltration of the

various VSRs listed in (A). (C-D) Leaves of *N. tabacum* cv. Xanthi were infiltrated with a mixture of Agrobacteria containing either P14, P15, P21 or Hc-Pro together with a GFP transgene used as a visual and molecular reporter of the onset of RNA silencing in the co-infiltrated tissues. GFP fluorescence was visualized 4 days post-infiltration under UV light (C) and by Western analysis using an anti-GFP antibody (D). Ponceau staining of the same extracts is depicted to demonstrate equal protein loading. (E) Leaves of five week-old *N. tabacum* cv. Xanthi were infiltrated with *A. tumefaciens* strains expressing P19 in combination with either P14, P15, P21, Hc-Pro, P25 or the GUS reporter gene. Appearance of P19-triggered HR lesions was monitored at 40 hpi (Left panel) and 96 hpi (Right panel). Experiments were repeated three times with similar results. (F) Western analysis of P19 protein levels in P19-VSR co-treatments. Proteins extracts from P19-VSRs or P19-GUS co-treated leaves were subjected to anti-P19 immunoblotting after 48 h. Ponceau staining of the membrane is shown to demonstrate equal protein loading. Experiments were repeated three times and showed similar results.

Given that P14, P15, P21 and Hc-Pro are all known to bind sRNA, at least *in vitro* (Merai, Kerenyi et al. 2006), we assessed whether the compromised HR-like cell death phenotype observed upon concomitant expression of P19 with these VSRs resulted from a direct competition for sRNA binding, potentially decreasing the amount of P19-siRNA complexes. To address this point we transiently expressed, in *N. benthamiana*, a HA-tagged version of P19 (P19HA), either alone or in combination with P15 or P21 (Figure 6). As a source of siRNAs, we used a 35S promoter-driven inverted-repeat (IR) construct, corresponding to the 5' part ('GF') of the GFP sequence, which is processed into 21nt- and 24nt-long siRNAs. Northern analysis of the sRNA fraction of P19HA immunoprecipitates showed that, as expected, P19 specifically bound the 21nt-long GF siRNAs. Both P15HA and P21HA displayed the same 21nt siRNA size preference as P19 for binding. However, P21 sequestered 21nt siRNAs significantly more efficiently than the two other VSRs, as shown by the much stronger signal detected in P21HA immunoprecipitates (Figure 6). This most likely explains the decreased GF siRNA levels observed in P19HA and P15HA immunoprecipitated fractions when these VSRs were concomitantly expressed with P21 (Figure 6). However, in contrast to P21, P15 did not alter the amount of siRNA bound by P19 whereas P19 prevented P15 siRNA

binding and competed with P21 siRNA binding (Figure 6). Therefore, in the case of P15, the compromised P19-triggered HR-like cell death phenotype is unlikely to result from a reduction in the amount of formed P19-siRNA complexes. Overall, these results show that, although necessary, the siRNA binding capacity of P19 is not sufficient for host defense elicitation in *N. tabacum*, suggesting that the onset of ER is intrinsically linked to the VSR function of P19 and not just the formation of P19-siRNA complexes per se (Figure 3).

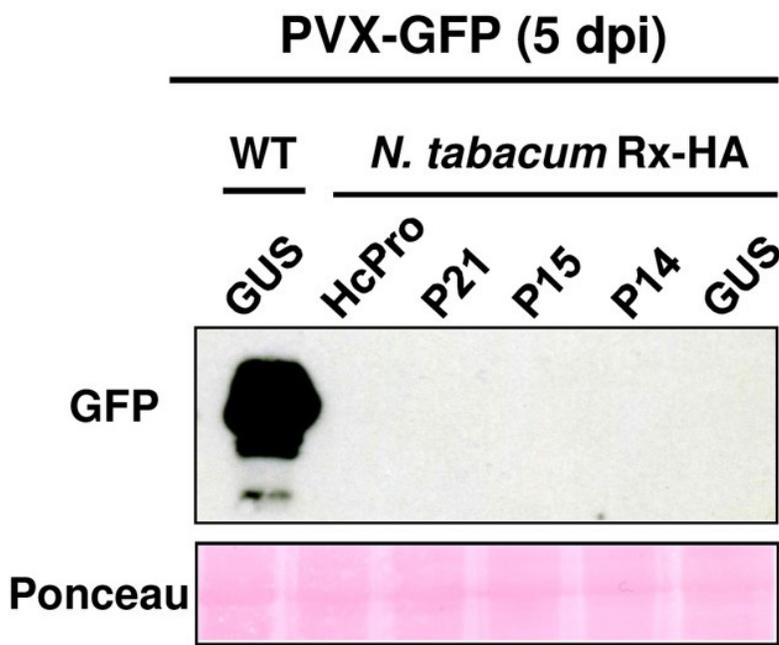


**Figure 6. Differential effects of co-expressed VSRs on P19 siRNA-binding capacity.**

(A) RNA gel blot analysis of GF siRNA accumulation (@GF) in total RNA and HA immunoprecipitated fractions from *Nicotiana benthamiana* infiltrated leaves expressing HA-tagged P15, P19 or P21 VSRs, either alone (-) or in combination with untagged VSRs. Ethidium bromide staining of ribosomal RNA (rRNA) is used as loading control. (B) Protein blot analysis of HA-tagged VSRs accumulation (@HA) in total (input) or immunoprecipitated fractions (IP@HA) of the samples described in (A). Coomassie staining of the membrane was used to verify equal loading after western blotting. EV: empty vector. Experiments were repeated three times and gave similar results.

To further ascertain this idea, we took advantage of the fact that Rx-mediated ER is triggered by the PVX-encoded CP protein, which does not display any intrinsic VSR activity (Voinnet,

Lederer et al. 2000). Moreover, Rx-mediated ER can be recapitulated in transgenic *N. tabacum* upon inoculation of PVX-GFP using leaf-infiltration of *Agrobacterium*. We reasoned that, unlike in the above example where resistance was highly dependent upon the VSR function of the P19 elicitor, Rx-mediated resistance would remain unaffected by co-expression of VSRs with PVX-GFP. As shown in Figure 7, accumulation of *Agrobacterium*-delivered PVX-GFP was abolished in leaves of plants expressing transgenic Rx, compared to non-transgenic plants. Furthermore, this pattern remained unaffected by transient co-expression of Hc-Pro, P21, P15, P14 VSRs, or a control GUS transgene (Figure 7).



**Figure 7. VSRs that bind small RNAs *in vitro* do not compromise resistance mediated by Rx against PVX.**

Leaves of five week-old *N. tabacum* expressing the Rx gene and its corresponding counterpart lacking this R gene was infiltrated with of *A. tumefaciens* strains expressing PVX-GFP together with a strain expressing P14, P15, P21, P25, Hc-Pro or the GUS reporter gene. GFP accumulation in infiltrated leaves was detected by Western analysis using an anti-GFP antibody. Ponceau staining of the membrane is shown to demonstrate equal protein loading. Experiments were repeated three times and gave similar results.

## 5 DISCUSSION

Cross-talk between RNA silencing pathways and both PTI and ETI pathways has been established experimentally in the case of bacterial pathogens (Katiyar-Agarwal, Morgan et al. 2006, Navarro, Dunoyer et al. 2006). In all cases so far, PAMP recognition activates endogenous RNA silencing pathways to target negative regulators of disease resistance, leading to potentiation of basal defense (Katiyar-Agarwal, Morgan et al. 2006, Navarro, Dunoyer et al. 2006, Ruiz-Ferrer and Voinnet 2009). Bacterial-encoded SRs, in turn, target this basal defense by inhibiting various, and perhaps multiple, steps of host silencing pathways.

The work presented here describes how the activity of the viral suppressor P19 is sensed in specific *Nicotiana* species to induce immunity against the P19-producing virus. This immunity displays several key attributes of ETI, including the involvement of SA and ethylene, as well as the production of PR proteins. The timing of P19 homodimers accumulation correlates with the extent of cell death and PR proteins production; this is in agreement with data showed previously in which the authors used the same inducible promoter as the one we used in this study (Kim, Geng et al. 2009). Remarkably, antiviral immunity is also accompanied by a lack of visible HR-like lesions, at least in the context of authentic tombusvirus infection, a phenomenon highly reminiscent of extreme resistance (ER) observed, for instance, during the CP-Rx interaction in PVX-infected plants. Further supporting the analogy between P19-mediated defense and the ER triggered by Rx, strong and isolated expression of their respective elicitors (i.e. P19 or CP, respectively) promotes the appearance of HR-like lesions in both cases. Nonetheless, a marked difference between the Rx-CP and the P19 systems is the reliance of the latter upon RNA silencing suppression, a function not associated with the CP of PVX (Voinnet, Lederer et al. 2000).

Our findings were, in fact, not completely unprecedented. Hence, the P38 capsid protein of *Turnip crinkle virus* binds AGO to inhibit its loading with sRNAs (Azevedo, Garcia et al. 2010, Dunoyer, Brosnan et al. 2010, Schott, Mari-Ordonez et al. 2012). P38 was also shown to induce HR-associated defense responses in the Arabidopsis ecotype Dijon-0 and its inbred derivative Dijon-17 (Oh, Kong et al. 1995, Zhao, DelGrosso et al. 2000), a level of host specificity that strongly evokes an ETI-type of response. The elicitor of the *N* resistance gene,

which confers ETI to TMV, had been also mapped to the p50 helicase subunit of the viral replicase, p126. Remarkably, the same domain of p126 was recently identified as being sufficient to suppress RNA silencing in *N. benthamiana* (Wang, Lin et al. 2012). Moreover, the helicase enzymatic activity of p50 was found dispensable for both N-mediated resistance and silencing suppression, suggesting that the VSR activity of P50 might stimulate ETI via the activation of N. Seminal work carried out more than a decade ago also provided key insights into the potential contribution of the 2b protein from *Tomato aspermy cucumovirus* (TAV2b) to the induction of ETI, possibly through its VSR activity. Indeed, when expressed from recombinant TMV, TAV2b was found to activate strong host resistance in tobacco, typical of the gene-for-gene interaction linking R proteins to their elicitors (Li, Lucy et al. 1999). Moreover, the N-terminal region of TAV2b was found critical for both VSR activity and resistance elicitation, suggesting that the same or overlapping domains of the protein are involved (Li, Lucy et al. 1999). Interestingly, Chen et al. (Chen, Yang et al. 2008) recently showed that Tav2b effectively binds sRNAs, highly reminiscent of the situation presented here with P19.

The seminal observation made with TAV2b led the authors to suspect that RNA silencing and its suppression on the one hand, and ETI on the other, were probably linked phenomena, at least in some cases; this view became strongly substantiated through subsequent work conducted with plant pathogenic bacteria (reviewed in (Ruiz-Ferrer and Voinnet 2009)). The data obtained in this manuscript add further strength to this idea by showing the importance of RNA silencing suppression in the resistance mediated by P19, because immunity to TBSV was only achieved if the protein retained its capacity to suppress gene silencing, for which sRNA binding is a prerequisite. We suspect that the reported ETI-like response triggered by P19 in the absence of visible HR might also strongly contribute to its additional, albeit poorly understood, role as a host-specific determinant of systemic viral movement (Silhavy, Molnar et al. 2002, Scholthof 2006). This hypothesis is particularly appealing given the involvement of SA and ethylene in the P19-elicited response in *N. tabacum*. Indeed both hormones are known to mediate, directly or indirectly, systemic, in addition to localized, defense responses.

Immune signaling pathways seem to be widely conserved across fungal, bacterial and viral interactions that lead to ETI in plants. The fact that P19-mediated resistance was compromised by many unrelated VSRs, unlike resistance activated by Rx argues, therefore, against an interference at the level of disease resistance signaling. Moreover, the PVX coat protein (elicitor of Rx) does not possess VSR function (Voinnet, Lederer et al. 2000). The fact that the integrity of the P19 binding domain is required for defense elicitation, together with the failure of PVX P25, among the VSR tested here, to alter the P19-mediated HR response, suggests that sRNA binding, required for VSR function, is a key component for defense activation in *N. tabacum*. It is, however unlikely to be sufficient, because none of the other VSRs tested was able to recapitulate, on its own, the defense phenotype induced by P19 when transiently expressed, despite that many of them bind sRNA *in vitro* and probably *in vivo*. Additionally, P15 could suppress the P19-mediated HR even though it did not outcompete P19 for siRNA binding in the *N. benthamianan* transient expression assay. The simplest interpretation of these results, therefore, is that P19 dimers complexed with sRNAs initiate a signal that is specifically sensed in *N. tabacum* to trigger extreme resistance against TBSV or that a conserved motif or structure important for sRNA binding by P19 is sensed in the plant. A non-mutually exclusive possibility holds that sensing occurs downstream, as a consequence of specific P19-sRNA association in a manner suppressed by the action of VSRs such as P15, which may share downstream silencing targets with P19 including AGOs. Interestingly, HR-like lesions and *PR* proteins accumulation could be triggered by P19 in the absence of a viral infection, suggesting that endogenous sRNAs, including siRNAs and miRNAs, which are effectively bound by P19 together with viral-derived siRNAs during infection (Papp, Mette et al. 2003, Vargason, Szittyta et al. 2003, Dunoyer, Lecellier et al. 2004, Lakatos, Szittyta et al. 2004), form one component of the trigger. Hence, a recent study in transgenic Arabidopsis shows that binding of endogenous miRNAs by VSRs is much less widespread than was originally anticipated. In fact, P19 was, among many VSRs tested (including several used in the present study), the only protein to prevent loading of miRNAs into AGO1. By contrast, all of the VSRs tested could effectively prevent loading of exogenous siRNAs into AGO1 (Schott, Mari-Ordonez et al. 2012). This peculiarity may contribute to explain the specific ability of P19 to trigger HR-like lesions and ER in *N. tabacum*. It is also possible that the binding of P19 to si/miRNAs promotes a specific change in the integrity or conformation of

silencing effector proteins, including AGOs, and that these changes are sensed in a host-specific manner.

miRNAs have roles in plant basal and race-specific resistance against bacterial pathogens (Navarro, Dunoyer et al. 2006, Katiyar-Agarwal and Jin 2010, Zhang, Zhao et al. 2011). Furthermore, some plant miRNAs appear to have evolved to control R gene expression presumably to prevent the known fitness cost of their constitutive expression in the absence of pathogens (Zhai, Jeong et al. 2011, Li, Pignatta et al. 2012, Shivaprasad, Chen et al. 2012). For example, nta-miR6019 (22-nt) and nta-miR6020 (21-nt) guide the cleavage of the TIR-NB-LRR *N* transcript from tobacco, which confers resistance to *Tobacco mosaic virus* (Li, Pignatta et al. 2012). Likewise, Sl-miR482 attenuates expression of a large family of NBS-LRR genes from tomato and its accumulation is decreased in plants infected with *Turnip crinkle virus*, *Cucumber mosaic virus*, *Tobacco rattle virus* and *Pst* DC3000 (Shivaprasad, Chen et al. 2012). Therefore, given the above context, miRNA sequestration by P19 might generally enhance host immune responses induced by virulent and avirulent pathogens. Interestingly, however, miR168, which targets the antiviral silencing effector AGO1, is specifically not sequestered and, in fact, induced by P19, suggesting that, in this case, miRNA binding by P19 favours viral infection without activating immune responses (Varallyay, Valoczi et al. 2010).

We have shown here, with the P19-*N. tabacum* model, that the general scheme of silencing induction and suppression by plant viruses can be readily accommodated within the classical frame of ETI/PTI. In particular, our study sheds light on an additional layer of defense, whereby hosts can sense and respond to the damages caused by VSRs to the cellular silencing machinery. The existence of this additional layer is also consistent with the fast evolving and highly diverse nature of VSRs. Indeed, potent host counter-counter-defense measures probably impose strong selective pressure on pathogens to accelerate or refine the modeling of their virulence factors, thereby contributing further to the never-ending arms race opposing parasites to their hosts. A future challenge will be to assess the extent to which the phenomenon described here is shared not only among plant-virus, but also plant-bacteria, plant-fungal and plant-oomycetes interactions, and how elucidation of its biochemical and

genetic underpinnings might improve our understanding of PTI and ETI at large. Finally, and most importantly, a strong -albeit still speculative- implication of our results is the existence of dedicated host-encoded R proteins that should monitor the status of key RNA silencing components in plants, and perhaps other organisms. Identifying these elusive silencing-associated R proteins and their guardees would certainly constitute a major breakthrough in the field.

## **6 MATERIALS AND METHODS**

### **6.1 Plant conditions and transgenic lines**

Wild type and transgenic plants were grown under conditions of 8h darkness at 19°C, 16 h light at 22°C, with 70% relative humidity. Independent tobacco (*N. tabacum*) transgenic lines carrying the wild type P19 and its mutant P19W39-42R under Dex inducible promoter (Aoyama and Chua 1997) were generated using the *Agrobacterium tumefaciens* leaf disc transformation method (Horsh, Fry et al. 1985). The disarmed pTA7001-Dex-P19, pTA7001-Dex-P19W39-42R were used for transformation. The transgenic plants generated were named Dex::P19 and Dex::P19W39-42R.

### **6.2 Transient expression**

*A. tumefaciens* strains containing the constructs P19 (Voinnet, Pinto et al. 1999), P25 (Voinnet, Lederer et al. 2000), P15 (Dunoyer, Pfeffer et al. 2002), Hc-Pro (Dunoyer, Lecellier et al. 2004), P14 and P21 (Merai, Kerényi et al. 2006) were grown overnight at 28°C in Luria-Bertani (LB) broth supplemented with 50 µg/ml kanamycine, 10 µg/ml rifampicine and 25 µg/ml gentamycine. Bacterial cultures were then pelleted at 4 500 x g for 15 min and the

supernatant was discarded. Pellets were resuspended in 10 mM MgCl<sub>2</sub> supplemented with 200 µM acetosyringone and brought to an OD 0.5. These bacterial suspensions were infiltrated in the plant leaves using a syringe. Co-agroinfiltration of mGFP and VSRs were done at 0.5 OD.

### **6.3 Protein extraction and gel blot analysis**

For transgenic plants, a solution of 25 µg/ml Dexametasone supplemented with 0.1% v/v Silwet L-77 was sprayed onto leaves of 5 week-old transgenic plants. Samples were harvested at 0, 12, 24 and 48 hours after DEX application, immediately frozen in liquid nitrogen, and kept at -80 °C before extraction.

Total proteins were extracted from 100 to 200 mg of frozen leave in 200 µl of extraction buffer [25 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% glycérol, 5 mM dithiothreitol (DTT)] and supplemented with plant protease inhibitor cocktail (Sigma). The crude extract was centrifuged at 12000 g for 15 min. The supernatant was kept and total proteins were quantified by Bradford assay (Bio-Rad Laboratories, Ontario). Samples were diluted in Leammli buffer and boiled for 5 minutes before separation on 12% SDS-PAGE. 50 µg of proteins of each sample was used for Western analysis. Proteins were subjected to gel blot analysis using a rabbit polyclonal PR1, PR2 or PR3 antibodies, at a dilution of 1 : 8000 (Cordelier, de Ruffray et al. 2003). For detection of the GFP, a rabbit polyclonal IgG antibody was used at 1/3000 (GFP (FL), sc-8334, Santa Cruz Biotechnology). For detection of P19, we used an affinity purified rabbit polyclonal IgG antibody obtain from GeneScript and raised against a synthetic peptide of the P19 protein (GNDAREQANSERWDC). It was used at 1/300. Coomassie Blue or red ponceau staining were used to confirm equal protein loading. Horse Radish Peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG was used as secondary antibody at 1 : 14500 (Sigma Aldrich). Immunodetection was conducted with chemiluminescent substrate (Bio-Rad, immun-star kit) followed by X-ray film exposure.

### **6.4 Quantitative PCR**

Total RNA was extracted from tobacco tissues using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen Science, Maryland, USA) according to the manufacturer's instructions. 2 µg of each RNA

samples were reverse transcribed into cDNA using SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen). Samples were diluted 1/5 in DEPC water and qPCR was performed using POWER SYBR Green (Applied Biosystems, Warrington, UK) according to the manufacturer's instruction. Primers used were: qPCR NTAC1F 5'-CTGTACTACTCACTGAAGCACCTC-3, qPCR NTAC1R 5'-GGCGACATATCATAGCAGGA -3, qPCR P19F 5'-TTGGTTTCAAGGAAAGCTG-3, qPCR P19R 5'-GATCCAAGGACTCTGTGCA-3, qPCR1.

## 6.5 Virus infections

*A. tumefaciens* strains containing the constructs 35S::TBSV-GFP or 35S::TBSV $\Delta$ P19-GFP (Kindly provided by Herman B. Scholthof (Scholthof, Alvarado et al. 2011)) were grown overnight at 28°C in Luria-Bertani (LB) broth supplemented with 50 µg/ml kanamycin, 10 µg/ml rifampicin and 25 µg/ml gentamicin. Bacterial cultures were then pelleted at 4 500 x g for 15 min and the supernatant was discarded. Pellets were resuspended in 10 mM MgCl<sub>2</sub> brought to 0.5 OD and supplemented with 200 µM acetosyringone. Bacterial suspensions were then incubated at room temperature for 1-3 hours before being infiltrated into young leaves of 5 week-old *Nicotiana tabacum* plants, using a syringe. Inoculated plants were grown under conditions of 8h darkness at 18°C, 16 h light at 20°C with 70% relative humidity. Viral infection was monitored over time under U.V. illumination and samples were collected at 6 dpi, frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C before extraction of protein or RNA. *A. tumefaciens* strain containing the construct 35S::PVX-GFP (Peart, Cook et al. 2002) was used for PVX assays. Infections were conducted as described above, except that the final OD used was 0.25. VSR were co-agroinfiltrated at final OD of 0.25.

## 6.6 Northern analysis

Total RNA was extracted using TRI reagent (Sigma), precipitated with isopropanol and the RNA pellet was resuspended in 50% deionized Formamide. Analysis was performed as described (Himber, Dunoyer et al. 2003). The signal was detected using X-ray films.

## **6.7 Trypan blue staining**

Samples were boiled for 5 minutes in the staining solution [10 ml of lactic acid, 10 g of phenol, 10 ml of glycerol, 10 ml of water, 10 mg of trypan blue, mixed 1:1 with ethanol]. Samples were then destained using chloral hydrate as previously described (Bouarab, Melton et al. 2002, El Oirdi and Bouarab 2007).

## **6.8 Immunoprecipitation experiments**

The cassettes for transient expression of GFFG dsRNA and silencing suppressors have been described previously (Himber, Dunoyer et al. 2003, Dunoyer, Lecellier et al. 2004). Agrobacterium-mediated transient expression in *N. benthamiana* leaves was as described previously (Hamilton, Voinnet et al. 2002).

For immunoprecipitation experiments, 400 mg of frozen tissue harvested 5 days post-infiltration was ground in liquid nitrogen and homogenized in 3 ml/g of extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10% glycerol, 0.1% NP-40 and complete protease inhibitor cocktail (Roche) for 30 min at 4°C. Cell debris was removed by centrifugation at 12000 g at 4°C for 30 min. Extracts were pre-cleared by incubation with Protein A-agarose (Roche) at 4°C for 1h. Pre-cleared extracts were then incubated with anti-HA polyclonal antibody (Sigma) and protein A-agarose overnight at 4°C. Immunoprecipitates were washed three times (15 min each) in extraction buffer. Aliquots of the inputs and immunoprecipitates were collected for protein blot analysis. For RNA analysis, immune complex were subjected to Tri-Reagent extraction (Sigma).

## 6.9 Salicylic acid quantification

An amount of one to one v/w of cold 80% MeOH was added to finely ground plant tissue (300-500 mg) for extraction of phenolic compounds. Samples were vortexed then shaken overnight at 4°C. The following morning, the samples were vortexed and centrifuged 16,000 g for 10 min. The supernatant was transferred to a new Eppendorf tube, filtered through a 0.22- $\mu$ m syringe filter and 50 to 100  $\mu$ l injected into HPLC. Samples were injected using Waters 2695 separation module (Waters Corp.) and a Lichrospher RP-18 (5  $\mu$ m) column (4 mm x 250 mm) at 30°C, and compounds detected with a Waters 996 diode array scanning 200 nm-400 nm, followed, in tandem, by a Waters 2475 Fluorescence detector, with an excitation wavelength of 290 nm emission and a scan of 300-500 nm. The maximum expected emission for free salicylic acid using this excitation wavelength was at 390-400 nm. The HPLC system was controlled and data analysed with the Empower2 software. Standard free salicylic acid (Sigma 84210) standards were prepared at 100 ng/ml, 250 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml and injected under the same conditions. The solvents were acidified water (solvent A: 0.1% Phosphoric acid in nanopure water) and acetonitrile HPLC grade (solvent B) with an elution flow rate of 1 mL/min. The gradient used was as follows: time (min)/%A/%B: 0/100/0, 5/95/5, 10/95/5, 14/90/10, 20/80/20, 23/80/20, 30/65/35, 35/ 65/35, 43/50/50, 48/25/75, 55/0/100 and 60/0/100. The injected volume was 50  $\mu$ L for each sample. Three biological replicates for each treatment/time point were extracted and injected independently into the HPLC. Linear regressions were generated between compound concentration (independent variable) and peak areas (dependent variable). The equations obtained were used to calculate the concentration of each phenolic compound in the analyzed samples. Every sample was also spiked with 0.8  $\mu$ g/ml free salicylic acid and injected independently to confirm the quantities determined by the software.

## 7 ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. David Baulcombe and Sainsbury laboratory for providing suppressors of RNA silencing, Dr Chua for pTA plasmid, and Drs Dietrich and Linthorst, respectively, for seeds of

NahG and ETR plants. We also thank Dr Kauffmann for providing antibodies for PR proteins, Dr Herman Scholtoff for TBSV constructs and Dr Moffett for PVX constructs.

## 8 REFERENCES

1. Jones JD, Dangl JL (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
2. Zipfel C (2009) Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol* 12: 414-420.
3. Dodds PN, Rathjen JP (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* 11: 539-548.
4. van Loon LC, Rep M, Pieterse CMJ (2006) Significance of Inducible Defense-related Proteins in Infected Plants. *Annu Rev Phytopathol* 44: 135-162.
5. Bent AF, Mackey D (2007) Elicitors, effectors, and R genes: The new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annu Rev Phytopathol* 45: 399-436.
6. Fritig B, Heitz T, Legrand M (1998) Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Curr Opin Immunol* 10: 16-22.
7. Oh H-S, Park DH, Collmer A (2010) Components of the *Pseudomonas syringae* Type III Secretion System Can Suppress and May Elicit Plant Innate Immunity. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 727-739.

8. Bendahmane A, Kanyuka K, Baulcombe DC (1999) The Rx Gene from Potato Controls Separate Virus Resistance and Cell Death Responses. *Plant Cell* 11: 781-792.
9. Kang B-C, Yeam I, Jahn MM (2005) Genetics of Plant Virus Resistance. *Annu Rev Phytopathol.* 43: 581-621.
10. Eggenberger AL, Hajimorad MR, Hill JH (2008) Gain of Virulence on Rsv1-Genotype Soybean by an Avirulent Soybean mosaic virus Requires Concurrent Mutations in Both P3 and HC-Pro. *Mol Plant Microbe Interact* 21: 931-936.
11. Wen RH, Khatabi B, Ashfield T, Maroof MAS, Hajimorad MR (2013) The HC-Pro and P3 Cistrons of an Avirulent Soybean mosaic virus Are Recognized by Different Resistance Genes at the Complex Rsv1 Locus. *Mol Plant Microbe Interact* 26: 203-215.
12. Katiyar-Agarwal S, Morgan R, Dahlbeck D, Borsani O, Villegas A, et al. (2006) A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proc Natl Acad of Sci USA* 103: 18002-18007.
13. Katiyar-Agarwal S, Jin H (2007) Discovery of Pathogen-Regulated Small RNAs in Plants. *Methods Enzymol*: 215-227.
14. Ding SW, Voinnet O (2007) Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130: 413-426.
15. Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, et al. (2006) A Plant miRNA Contributes to Antibacterial Resistance by Repressing Auxin Signaling. *Science* 312: 436-439.
16. Katiyar-Agarwal S, Jin H (2010) Role of Small RNAs in Host-Microbe Interactions. *Annu Rev Phytopathol*, 48, 225-246
17. Zhang Y, Jiang W-k, Gao L-z (2011) Evolution of MicroRNA Genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*: An Update of the Inverted Duplication Model. *PLoS ONE* 6: e28073.
18. Hamilton AJ, Baulcombe DC (1999) A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science* 286: 950-952.
19. Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotides RNAs. *Genes Dev* 15: 188-200.

20. Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* 409: 363-366.
21. Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404: 293-296.
22. Deleris A, Gallego-Bartolome J, Bao J, Kasschau K, Carrington J, et al. (2006) Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313: 68-71.
23. Qu F, Ye X, Morris JT (2008) Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 14732-14737.
24. Harvey JJ, Lewsey MG, Patel K, Westwood J, Heimstadt S, et al. (2011) An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS One* 6: e14639.
25. Jaubert M, Bhattacharjee S, Mello AFS, Perry KL, Moffett P (2011) ARGONAUTE2 Mediates RNA-Silencing Antiviral Defenses against Potato virus X in Arabidopsis. *Plant Physiol* 156: 1556-1564.
26. Scholthof HB, Alvarado VY, Vega-Arreguin JC, Ciomperlik J, Odokonyero D, et al. (2011) Identification of an ARGONAUTE for Antiviral RNA Silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol* 156: 1548-1555.
27. Wang XB, Jovel J, Udomborn P, Wang Y, Wu Q, et al. (2011) The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23: 1625-1638.
28. Garcia D, Garcia S, Pontier D, Marchais A, Renou Jean P, et al. (2012) Ago Hook and RNA Helicase Motifs Underpin Dual Roles for SDE3 in Antiviral Defense and Silencing of Nonconserved Intergenic Regions. *Mol Cell*. 48(1), 109-120.
29. Bucher E, Lohuis D, van Poppel PMJA, Geerts-Dimitriadou C, Goldbach R, et al. (2006) Multiple virus resistance at a high frequency using a single transgene construct. *J Gen Virol* 87: 3697-3701.
30. Voinnet O (2009) Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell* 136: 669-687.
31. Ruiz-Ferrer V, Voinnet O (2009) Roles of Plant Small RNAs in Biotic Stress Responses. *annu rev plant biol.* 60: 485-510

32. Anandalakshmi R, Pruss GJ, Ge X, Marathe R, Mallory AC, et al. (1998) A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 13079-13084.
33. Brigneti G, Voinnet O, Li W-X, Ji L-H, Ding S-W, et al. (1998) Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J* 17: 6739-6746.
34. Baulcombe DC, Molnar A (2004) Crystal structure of p19 - a universal suppressor of RNA silencing. *Trends Biochem Sci* 29: 279-281.
35. Voinnet O, Pinto YM, Baulcombe D (1999) Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci USA* 96.
36. Navarro L, Jay F, Nomura K, He SY, Voinnet O (2008) Suppression of the MicroRNA Pathway by Bacterial Effector Proteins. *Science* 321: 964-967.
37. Qiao Y, Liu L, Xiong Q, Flores C, Wong J, et al. (2013) Oomycete pathogens encode RNA silencing suppressors. *Nat Genet* 45: 330-333.
38. Baumberger N, Tsai CH, Lie M, Havecker E, Baulcombe DC (2007) The Ploverovirus silencing Suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr Biol* 17: 1609-1614.
39. Bortolamiol D, Pazhouhandeh M, Marrocco K, Genschik P, Ziegler-Graff V (2007) The Ploverovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Curr Biol* 17: 1615-1621.
40. Csorba T, Lozsa R, Hutvagner G, Burgyan J (2010) Ploverovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1. *Plant J* 62: 463-472.
41. Azevedo J, Garcia D, Pontier D, Ohnesorge S, Yu A, et al. (2010) Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev* 24: 904-915.
42. Schott G, Mari-Ordonez A, Himber C, Alioua A, Voinnet O, et al. (2012) Differential effects of viral silencing suppressors on siRNA and miRNA loading support the existence of two distinct cellular pools of ARGONAUTE1. *EMBO J* 31: 2553-2565.
43. Vargason J, Szittyá G, Burgyan J, Tanaka Hall T (2003) Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 115: 799-811.

44. Lakatos L, Csorba T, Pantaleo V, Chapman E, Carrington J, et al. (2006) Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J* 25: 2768-2780.
45. Merai Z, Kerenyi Z, Kertesz S, Magna M, Lakatos L, et al. (2006) Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol* 80: 5747-5756.
46. Csorba T, Bovi A, Dalmay T, Burgyan J (2007) The p122 subunit of Tobacco Mosaic Virus replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA- and microRNA-mediated pathways. *J Virol* 81: 11768-11780.
47. Hemmes H, Lakatos L, Goldbach R, Burgyán J, Prins M (2007) The NS3 protein of Rice hoja blanca tenuivirus suppresses RNA silencing in plant and insect hosts by efficiently binding both siRNAs and miRNAs. *RNA* 13: 1079-1089.
48. Ye K, Malinina L, Patel DJ (2003) Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* 426: 874-878.
49. Lakatos L, Szittyá G, Silhavy D, Burgyan J (2004) Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO J* 23: 876-884.
50. Omarov R, Sparks K, Smith L, Zindovic J, Scholthof HB (2006) Biological Relevance of a Stable Biochemical Interaction between the Tombusvirus-Encoded P19 and Short Interfering RNAs. *J Virol* 80: 3000-3008.
51. Scholthof HB (2006) The Tombusvirus-encoded P19: from irrelevance to elegance. *Nat Rev Micro* 4: 405-411.
52. Jay F, Wang Y, Yu A, Taconnat L, Pelletier S, et al. (2011) Misregulation of AUXIN RESPONSE FACTOR 8 underlies the developmental abnormalities caused by three distinct viral silencing suppressors in Arabidopsis. *PLoS Pathog* 7: e1002035.
53. Li H-W, Lucy AP, Guo H-S, Li W-X, Ji L-H, et al. (1999) Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defense mechanism. *EMBO J* 18: 2683-2691.
54. Scholthof H, Scholthof K, Jackson A (1995) Identification of tomato bushy stunt virus host-specific symptom determinants by expression of individual genes from a potato virus X vector. *Plant Cell* 7: 1157-1172.

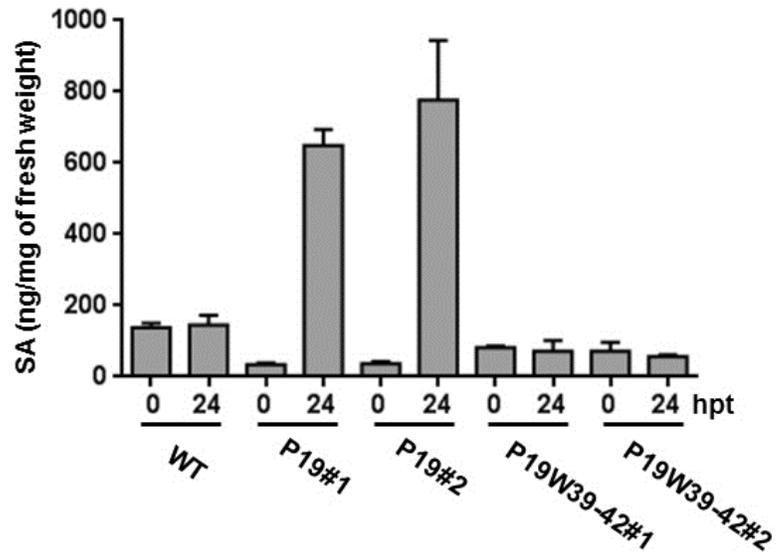
55. Chu M (2000) Genetic dissection of tomato bushy stunt virus p19-protein-mediated host-dependent symptom induction and systemic invasion. *Virology* 266: 79-87.
56. Angel CA, Schoelz JE (2013) A Survey of Resistance to Tomato bushy stunt virus in the Genus *Nicotiana* Reveals That the Hypersensitive Response Is Triggered by One of Three Different Viral Proteins. *Mol Plant Microbe Interact* 26: 240-248.
57. Angel CA, Hsieh Y-C, Schoelz JE (2011) Comparative Analysis of the Capacity of Tombusvirus P22 and P19 Proteins to Function as Avirulence Determinants in *Nicotiana* species. *Mol Plant Microbe Interact* 24: 91-99.
58. Choi CW, Qu F, Ren T, Ye X, Morris TJ (2004) RNA silencing-suppressor function of Turnip crinkle virus coat protein cannot be attributed to its interaction with the *Arabidopsis* protein TIP. *J Gen Virol* 85: 3415-3420.
59. Aoyama T, Chua N-H (1997) A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J* 11: 605-612.
60. Ji L-H, Ding S-W (2001) The Suppressor of Transgene RNA Silencing Encoded by Cucumber mosaic virus Interferes with Salicylic Acid-Mediated Virus Resistance. *Mol Plant Microbe Interact* 14: 715-724.
61. Alamillo JM, Saénz P, García JA (2006) Salicylic acid-mediated and RNA-silencing defense mechanisms cooperate in the restriction of systemic spread of plum pox virus in tobacco. *Plant J* 48: 217-227.
62. Friedrich L, Vernooij B, Gaffney T, Morse A, Ryals J (1995) Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene. *Plant Mol Biol* 29: 959-968.
63. Knoester M, van Loon LC, van den Heuvel J, Hennig J, Bol JF, et al. (1998) Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 1933-1937.
64. Cordelier S, de Ruffray P, Fritig B, Kauffmann S (2003) Biological and molecular comparison between localized and systemic acquired resistance induced in tobacco by a *Phytophthora megasperma* glycoprotein elicitor. *Plant Mol Biol* 51: 109-118-118.
65. Ménard R, Alban S, de Ruffray P, Jamois F, Franz G, et al. (2004)  $\beta$ -1,3 Glucan Sulfate, but Not  $\beta$ -1,3 Glucan, Induces the Salicylic Acid Signaling Pathway in Tobacco and *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 3020-3032.

66. Himber C, Dunoyer P, Moissiard G, Ritzenthaler C, Voinnet O (2003) Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO J* 22: 4523-4533.
67. Dunoyer P, Lecellier CH, Parizotto EA, Himber C, Voinnet O (2004) Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* 16: 1235-1250.
68. Voinnet O, Lederer C, Baulcombe DC (2000) A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103: 157-167.
69. Kim MG, Geng X, Lee SY, Mackey D (2009) The *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpm1 induces significant defenses by activating the *Arabidopsis* nucleotide-binding leucine-rich repeat protein RPS2. *Plant J* 57: 645-653.
70. Dunoyer P, Brosnan CA, Schott G, Wang Y, Jay F, et al. (2010) An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. *EMBO J* 29: 1699-1712.
71. Oh JW, Kong Q, Song C, Carpenter CD, Simon AE (1995) Open reading frames of turnip crinkle virus involved in satellite symptom expression and incompatibility with *Arabidopsis thaliana* ecotype Dijon. *Mol Plant Microbe Interact* 8: 979-987.
72. Zhao Y, DelGrosso L, Yigit E, Dempsey DA, Klessig DF, et al. (2000) The amino terminus of the coat protein of Turnip crinkle virus is the AVR factor recognized by resistant *Arabidopsis*. *Mol Plant Microbe Interact* 13: 1015-1018.
73. Wang L-Y, Lin S-S, Hung T-H, Li T-K, Lin N-C, et al. (2012) Multiple Domains of the Tobacco mosaic virus p126 Protein Can Independently Suppress Local and Systemic RNA Silencing. *Mol Plant Microbe Interact* 25: 648-657.
74. Chen H-Y, Yang J, Lin C, Yuan YA (2008) Structural basis for RNA-silencing suppression by Tomato aspermy virus protein 2b. *EMBO Rep* 9: 754-760.
75. Silhavy D, Molnar A, Lucioli A, Szittya G, Hornyik C, et al. (2002) A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J* 21: 3070-3080.
76. Papp I, Mette MF, Aufsatz W, Daxinger L, Schauer SE, et al. (2003) Evidence for Nuclear Processing of Plant Micro RNA and Short Interfering RNA Precursors. *Plant Physiol* 132: 1382-1390.

77. Zhang X, Zhao H, Gao S, Wang W-C, Katiyar-Agarwal S, et al. (2011) Arabidopsis Argonaute 2 Regulates Innate Immunity via miRNA393\*-Mediated Silencing of a Golgi-Localized SNARE Gene, MEMB12. *Mol Cell* 42: 356-366.
78. Zhai J, Jeong D-H, De Paoli E, Park S, Rosen BD, et al. (2011) MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Genes Dev* 25: 2540-2553.
79. Li F, Pignatta D, Bendix C, Brunkard JO, Cohn MM, et al. (2012) MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 109: 1790-1795.
80. Shivaprasad PV, Chen H-M, Patel K, Bond DM, Santos BACM, et al. (2012) A MicroRNA Superfamily Regulates Nucleotide Binding Site–Leucine-Rich Repeats and Other mRNAs. *Plant Cell* 24: 859-874.
81. Varallyay E, Valoczi A, Agyi A, Burgyan J, Havelda Z (2010) Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *EMBO J* 29: 3507-3519.
82. Horsh RB, Fry JE, Hoffman NL, Eichholtz D, Rogers SG, et al. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227: 1229-1231.
83. Dunoyer P, Pfeffer S, Fritsch C, Hemmer O, Voinnet O, et al. (2002) Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clump virus. *Plant J* 29: 555-567.
84. Cordelier S, de Ruffray P, Fritig B, Kauffmann S (2003) Biological and molecular comparison between localized and systemic acquired resistance induced in tobacco by a *Phytophthora megasperma* glycoprotein elicitor. *Plant Mol Biol* 51: 109-118-118.
85. Peart JR, Cook G, Feys BJ, Parker JE, Baulcombe DC (2002) An EDS1 orthologue is required for N-mediated resistance against tobacco mosaic virus. *Plant J* 29: 569-579.
86. Bouarab K, Melton R, Peart J, Baulcombe D, Osbourn A (2002) A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature* 418: 889-892.
87. El Oirdi M, Bouarab K (2007) Plant signalling components EDS1 and SGT1 enhance disease caused by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *New Phytol* 175: 131-139.
88. Hamilton A, Voinnet O, Chappell L, Baulcombe D (2002) Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J* 21: 4671-4679.

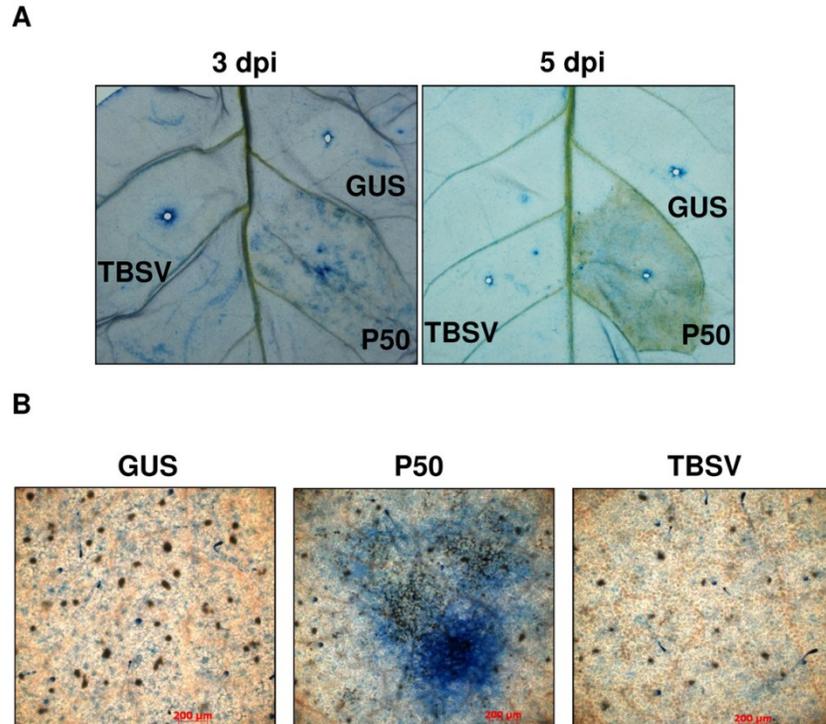


## Supporting Information



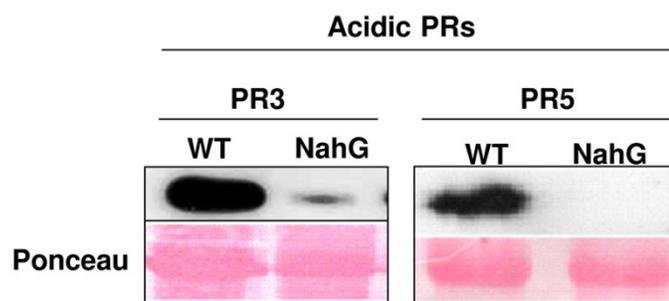
**Figure S1: P19-mediated accumulation of SA in *N. tabacum* requires its capacity to bind sRNAs**

Five-week-old WT, Dex::P19 and Dex::P19W39-42 plants were sprayed with Dex and samples were harvested at 0 and 24 hours post treatment (hpt) for SA quantification. Error bars represent the SD (n = 3). Experiments were repeated two times and gave similar results.



**Figure S2: TBSV does not induce microscopic HR in *N. tabacum***

(A-B) Five week-old *N. tabacum* cv. Xanthi plants were transiently infiltrated with a solution of *A. tumefaciens* expressing either GUS, TBSV-GFP or P50 and 3 and 5dpi leaves were stained with trypan blue to see macroscopic (A) and microscopic HR using an Zeiss Axioskop microscope (Zeiss AxioCam MRc with the Axiovision Rel. 4.8 program) under bright-field illumination (B). Experiments were repeated at least three times and gave similar results.



**Figure S3: P19-mediated, SA-dependent immune responses are compromised in NahG plants.**

Leaves of five weeks old tobacco wild type and NahG plants were transiently infiltrated with a solution of *A. tumefaciens* expressing P19 (0.25 OD in MgCl<sub>2</sub> 10 mM). The accumulation of acidic PR3 and PR5 proteins was monitored by western blot 3 days post agroinfiltration of both, wild type and *nahG* plants. Lower panel shows Ponceau Red staining of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) for confirmation of equal loading. Experiments were repeated three times and showed similar results.

## Chapitre 3

### Les dommages engendrés par des suppresseurs de l'ARNi comme signal perçu par la plante pour induire l'immunité via ses protéines de résistance.

#### 1 Matériel et méthodes

##### 1.1 Condition de croissance des plantes

Les plants de tabac et les plants transgéniques furent cultivés avec une photopériode de 16 h à 22°C et 8 h d'obscurité à 18°C avec une humidité relative de 70 %.

##### 1.2 Agroinfiltration

Les souches d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant les constructions ont été incubées 24h à 28°C dans un bouillon Luria-Bertani (LB) supplémenté avec les antibiotiques correspondant aux différentes constructions. Les combinaisons d'antibiotiques sont indiquées dans le dans le tableau en page suivante.

Les cellules bactériennes ont été récoltées par centrifugation à 4500 rotation par minutes (rpm) durant 15 minutes. Le surnageant a été jeté et les cellules ont été resuspendues dans du MgCl<sub>2</sub> 10 mM. La densité optique à 600 nm a été ajustée à 0,5 et le milieu supplémenté avec 200 µM d'acétosyringone, à moins d'avis contraire. L'agroinfiltration a été réalisée à l'aide d'une seringue.

	Rifampicine 10µg/ml	Kanamycine 50µg/ml	Gentamycine 25µg /ml	Spectinomycine 100µg/ml	Tétracycline 5µg/ml
GUS	X	X			
CP	X	X			
Rx	X	X			
P50	X	X			
P50myc	X	X	X		
N	X	X			
miR168	X	X	X		
P19myc	X		X	X	
TRV:00	X	X	X		
TRV:AGO1		X			X
TRV:RNA1	X	X	X		

**Tableau 1:Tableau des combinaisons d'antibiotiques utilisées pour l'expression de chacune des constructions**

### 1.3 VIGS

Les cultures d'*Agrobacterium* contenant TRV:RNA1, TRV:00 et TRV:AGO1 ont été incubées à 28°C durant 24h. Les cultures ont été centrifugées pendant 15 minutes à 4000 rpm. Les cellules ont ensuite été remises en suspension dans du MgCl<sub>2</sub> 10mM. Les cultures ont été ajustées à une DO600nm de 2 dans du MgCl<sub>2</sub> 10mM. Les cultures ont été supplémentées avec 200 µM d'acétosyringone et 10 µM de MES pH 5.5. Les cultures ont été ajustées à un ratio 1:1 entre TRV:RNA1 et TRV:00 ou TRV:AGO1. Les infections ont été réalisées sur des plantules de Super Benthamiana (*Nicotiana benthamiana* qui arbore N, Pto et Rx) en fonction du protocole décrit par Liu *et al.* 2002 (Pert *et al.* 2002). Toutes les feuilles ont été agroinfiltrées à l'aide d'une seringue. Les plantes furent incubées 3 semaines dans des chambres de croissance avant d'être utilisées.

## **1.4 Extraction des protéines totales**

L'extraction des protéines totales a été réalisée à partir de 200mg de disques de feuilles de 1 cm auxquelles a été ajouté 200 µl de tampon d'extraction (25 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 10% glycérol, 5 mM dithiothreitol (DTT), 1% polyvinylpolypyrrolidone et le cocktail d'inhibiteur de protéase (Sigma)). Le tampon a été ajouté aux disques foliaires directement dans un mortier froid et ils ont été broyés. L'extrait a été récupéré et centrifugé à 13000 rpm durant 15 minutes. Le surnageant a été récupéré et les protéines ont été quantifiées avec la méthode de Bradford (Bio-Rad Laboratories, Ontario). Les échantillons ont ensuite été dilués avec du tampon d'extraction sans PVPP. Le tampon de Leammi 4x (250mM Tris-HCl pH 6.8, 40% (v/v) glycérol, 5% (p/v) SDS, 0.005% bleu de bromophénol et supplément de 10% β-mercaptoéthanol) a été ajouté et les échantillons ont été bouillis pour 5 minutes.

## **1.5 Immunobuvardage de type western**

50 µg d'extrait de protéines totales ont été déposés sur gel. Un gel de séparation de SDS-Page 12 % d'acrylamide et un gel de concentration de 8% SDS-Page ont été utilisés. La migration a été effectuée durant 1h30 à 125V.

Le gel a été transféré sur une membrane de PVDF durant 2h à 175 mA par membrane. Le transfert a été réalisé dans du tampon de transfert (25 mM Tris-HCl, 192 mM glycine, pH8.3, 20% méthanol) et soumis à l'analyse de type western. La membrane a été bloquée 50 minutes dans du TTBS (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20) supplémenté avec 5% de lait.

L'anticorps anti-myc (Santacruz Biotech) a été utilisé à une concentration de 1/4000 dans du tampon TTBS avec 5% de lait toute la nuit. La membrane a été lavée à 5 reprises avec du TTBS supplémenté avec 5% lait. La membrane a ensuite été incubée avec l'anticorps secondaire anti-lapin-HRP (Sigma) à une concentration de 1/14000. Les lavages suivants ont été réalisés à

l'aide du TTBS. L'immunodétection a été réalisée à l'aide du kit Immunstar de Bio-Rad et la membrane fut exposée à un film d'autoradiographie (Amersham).

## 1.6 PCR en temps réel

Pour réaliser l'extraction d'ARN total, 1g de feuille a été déposé dans un mortier très froid et l'échantillon a été broyé en présence de 1ml de Tri Reagent (Sigma). Les échantillons ont été incubés 5 minutes à température pièce. Les échantillons ont été supplémentés avec 0.2 ml de chloroforme, agité vigoureusement et incubé à température pièce 15 minutes. Les échantillons ont été centrifugés à 13000 rpm 15 minutes à 4°C et le surnageant a été prélevé et transféré dans un nouveau tube. 0,5 ml d'isopropanol a été ajouté à la phase aqueuse et elle a ensuite été incubée à température pièce 10 minutes. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 13000 rpm durant 15 minutes à 4°C. Les culots ont été lavés deux fois avec 1 ml d'éthanol 75%. L'ARN a été solubilisé dans de l'eau distillé stérile.

Les échantillons d'ARN extrait ont été soumis à une extraction sur colonne d'affinité en utilisant le système RNeasy Plant-Mini (Qiagen Science, Maryland, USA).

Une transcription inverse fut ensuite réalisée dans 20 ul avec la transcriptase inverse Superscript II (Invitrogen) à en utilisant 2 µg d'extrait d'ARN. La réaction a été réalisée dans un bloc PCR à 42°C pour 90 minutes avec une phase finale de 10 minutes à 70°C. L'ADNc ainsi synthétisé a été dilués 1/5 avec de l'eau de grade PCR (Wisent).

Le PCR en temps réel fut réalisé sur un CFX96 de Bio-Rad en utilisant le kit SsoFast Evagreen de BioRad. Chacun des échantillons a été testé en triplicata. 3ul d'ADNc fut ajouté à 17 µl de la solution de réaction (10 ul SsoFast mix, 2.5 µl de chacune des amorces à 10 µM et complété à 17 µl avec de l'eau stérile).

Les amorces qui ont été utilisées sont : qPCRNBL23 60SF 5'-  
AAGGATGCCGTGAAGAAGATGT -3, qPCRNBL23 60SR 5'-

GCATCGTAGTCAGGAGTCACC -3, qPCRNTAgo1F 5'-  
 ACAGTATCAACGAGGTGGAGGACA -3 et qPCRNTAgo1R 5'-  
 ATGGTACAGGCTGATGTGGAGTCT -3.

## 1.7 Immunobuvardage de type Northern

Pour l'extraction d'ARN, 200 mg de feuilles ont été broyées dans un mortier refroidi à l'azote liquide. 1ml de TRI reagent (Sigma) a été ajouté à l'échantillon dans le mortier et la solution a été homogénéisée. 1ml de l'homogénat a été transféré dans un micro tube et incubé à température pièce durant 5 minutes. Un volume de chloroforme correspondant au 1/5 de l'échantillon a été ajouté. L'échantillon a été passé au vortex durant 30 secondes et incubé 5 minutes à température pièce. L'échantillon a été centrifugé à 13000 rpm à 4°C durant 15 minutes. Le surnageant a été récupéré et un volume d'isopropanol correspondant au surnageant a été ajouté. L'échantillon a ensuite été incubé 1h à température pièce et centrifugé à 13000 rpm durant 30 minutes à 4°C. Le surnageant a été jeté. Le culot a été lavé deux fois avec de l'éthanol 80% et il a été séché à l'air jusqu'à ce que l'éthanol soit évaporé. Le culot a été solubilisé dans 50-100 µl d'une solution de formamide désionisé 50%.

Un gel d'acrylamide 17,5% a été préparé (12,6g d'urée, 13,1ml solution 40% Acrylamide/Bis-Acrylamide 19 :1, 1,5ml TBE 10X, 30ml H<sub>2</sub>O, 100µl 25% APS et 11µl TEMED). 15µl de l'échantillon d'ARN a été prélevé. Il a été chauffé à 95°C durant 5 minutes et déposé immédiatement sur glace. L'échantillon a ensuite été préparé avec un tampon de chargement (50% glycérol, 50mM Tris pH7.7, 5mM EDTA et 0.03 Bleu de bromophénol). La migration a été effectuée à 80V durant 2h ou jusqu'à ce que le colorant soit au bas du gel.

Le transfert a été effectué sur une membrane Hybond-NX (Amersham) dans du TBE 0.5X durant 1 heure à 300mA dans une chambre à 4°C. La membrane a ensuite été équilibrée avec du tampon 2xSSC (Wisent) pour 10 minutes. L'ARN a ensuite été fixé à la membrane avec un Stratalinker U.V. (1200 joules x100 secondes). La membrane a ensuite été pré-hybridée avec du tampon Perfect-Hyb Plus (Sigma) à 42°C pour un minimum de 15 minutes.

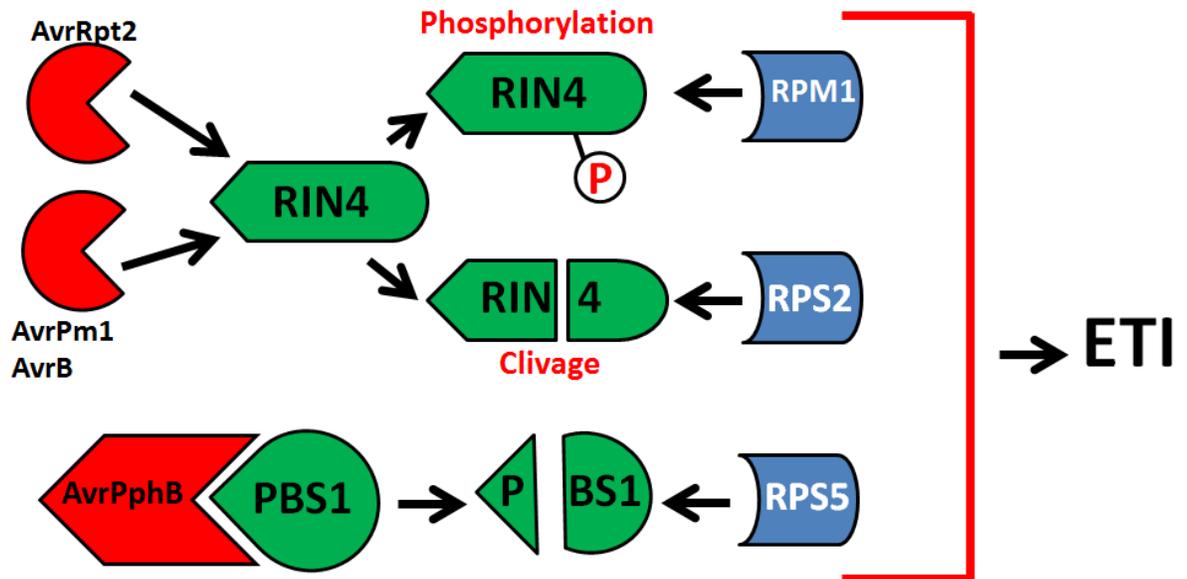
Les sondes ont été préparées soit avec le kit Prime-A-Gene (Promega) pour les grands fragments ou avec le kit PNK labelling (Fermentas) pour les micro-ARN. Dans le cas du Prime-A-Gene, la réaction a été réalisée comme décrit par le fabricant à 37°C durant 1 heure. La sonde a ensuite été dessalée avec une mini colonne de G50 Sephadex. La sonde a ensuite été chauffée à 95°C durant 5 minutes et déposée immédiatement sur glace 10 minutes avant l'utilisation. La sonde a été placée dans du tampon Perfect-Hyb Plus et incubée avec la membrane toute la nuit. Dans le cas du PNK labelling (Fermentas), la réaction a été réalisée comme décrit par le fabricant à 37°C durant 30-45 minutes. La sonde a ensuite été dessalée avec une mini colonne de G25 Sephadex. La sonde a été chauffée à 95°C durant 5 minutes et déposée immédiatement sur glace 10 minutes avant l'utilisation. La sonde a été placée dans du tampon Perfect-Hyb Plus et incubée avec la membrane toute la nuit.

Suite à l'hybridation, la membrane a été lavée 2 fois durant 20 minutes avec du 2xSSC, 2% SDS à 50°C. La membrane a ensuite été révélée sur un film d'autoradiographie (Himber *et al.*, 2003).

## **2 Résultats**

### **2.1 Mise en contexte**

On considère généralement la PTI comme étant suffisamment efficace pour contrer la plupart des pathogènes problématiques. Pourtant, certains d'entre eux parviennent à contrer la PTI et à provoquer une maladie. Dans ce cas, il est fort probable que le pathogène ait déployé un effecteur qui lui aura servi à surpasser la PTI. Il existe plusieurs exemples dans la littérature d'effecteurs qui causent des dommages à la machinerie de la PTI. Dans la figure 12, il est possible de voir des exemples de fonctionnement de la reconnaissance d'effecteurs affectant la PTI. Ainsi, ce n'est pas directement l'effecteur qui est reconnu, mais bien l'action de ce dernier. Puisque l'action est de modifier des acteurs de la voie de la PTI, la plante détecte donc le dommage causé à la machinerie de la PTI via un gène de résistance.

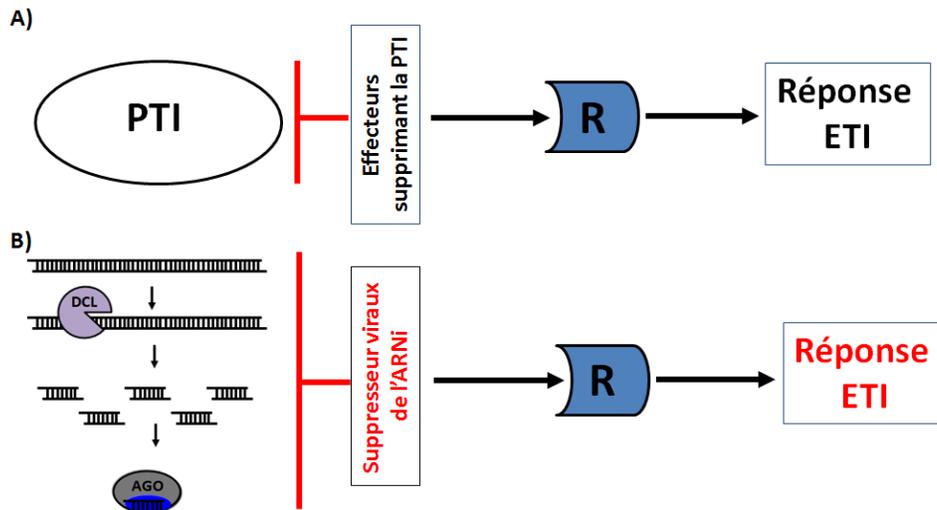


**Figure 12: Exemple de suppresseurs de la PTI qui sont perçus par la plante via leurs dommages.** AvrPm1 et AvrB induiraient la phosphorylation de RIN4. La protéine RIN4 phosphorylée est alors reconnue par la protéine de résistance RPM1 induisant du même coup l'ETI. Lorsque cette même protéine est clivée par AvrPt2, c'est RPS2 qui reconnaît le dommage et qui induit l'ETI. Un processus similaire se produit avec PBS1. Lorsqu'elle est clivée par AvrPphB, RPS5 reconnaît le dommage causé à PBS1 et induit la mise en place de l'ETI.

Les exemples présentés dans la figure 12 illustrent bien que la plante perçoit le dommage à la machinerie de la PTI. La protéine RIN4 est une protéine qui serait impliquée dans la répression de la résistance basale de la plante. En phosphorylant RIN4, le pathogène conserverait la fonction de répression de la PTI de cette protéine active, induisant du même coup une augmentation de l'accumulation bactérienne. La phosphorylation de RIN4 serait par contre reconnue par la protéine RPM1 et induirait l'ETI (Mackey *et al.*, 2002). Dans un deuxième temps, d'autres effecteurs cliveraient RIN4, ce qui empêcherait la reconnaissance faite par RPM1 de la phosphorylation de RIN4. Ultiment, ce clivage induirait la mise en place de l'ETI via RSP2 (Mackey *et al.*, 2003). Ces résultats seraient en fait un très bel exemple de la co-évolution des plantes et des pathogènes du modèle en zigzag. Une autre hypothèse est que RIN4 est une protéine appât qui mimerait la structure de certaines cibles d'effecteurs. Elle empêcherait ainsi les effecteurs d'affecter leur vraie cible (Hou *et al.*, 2011).

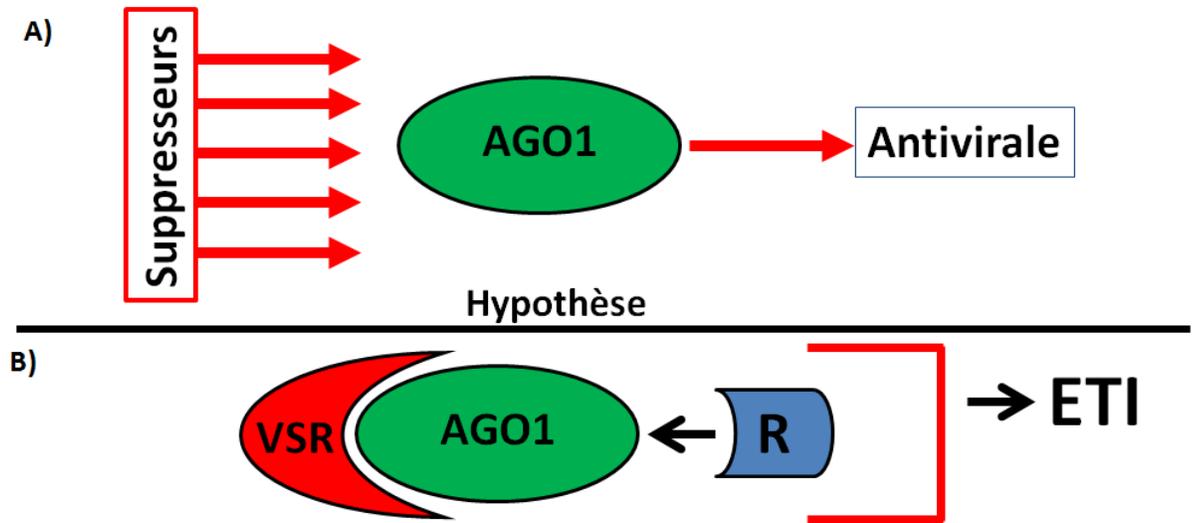
Toujours est-il que percevoir le dommage sur RIN4 revient à percevoir un dommage à la machinerie de la reconnaissance des éliciteurs. Pour ce qui est de PBS1, elle jouerait un rôle mineur dans la PTI. Sa fonction serait surtout d'être similaire à la protéine BIK1. BIK1 joue un rôle majeur dans la PTI. PBS1 serait donc en fait elle aussi un genre de protéine appât qui permettrait de soulager la protéine BIK1 de la pression exercée par les agents pathogènes sur la machinerie de la PTI. Donc, protéger PBS1 revient aussi à protéger la machinerie de la PTI (Hou *et al.*, 2011).

Ces exemples démontrent que la plante est capable de percevoir le dommage à la machinerie de la PTI. Ce dommage serait reconnu par des protéines de résistance qui induiraient une réponse de défense de type ETI. C'est ce que l'on peut voir dans la 13 A. Mais qu'en est-il chez les virus? On considère de plus en plus l'ARNi comme étant la PTI antivirale (Nakahara et Masuta, 2014). En effet, ce système polyvalent est un des premiers obstacles que le virus doit affronter. Les virus contournent ce mécanisme en produisant des VSR qui vont supprimer l'ARNi. Si l'on suit la logique de la figure 13 A, c'est la suppression de la PTI qui est perçue par la plante. Dans le cadre des virus, c'est l'ARNi qui fait office de PTI. En utilisant comme comparable ce qui se passe avec RIN4 et PBS1, il est fort possible qu'il y ait un mécanisme qui détecte les assauts des VSR sur la machinerie de l'ARNi. Notre hypothèse est donc que c'est la suppression de l'ARNi qui est perçue par la plante. Ce système de détection induirait une ETI (Figure 13 B). La plante pourrait donc être en mesure, à l'image du système de reconnaissance classique, de percevoir le dommage induit à l'équivalent antiviral de la PTI.



**Figure 13: Hypothèse où la suppression de la PTI induit l'ETI.** A) Hypothèse qui stipule que la suppression de la PTI est reconnue par les protéines de résistance afin d'induire l'ETI. B) Hypothèse qui stipule que le dommage à la machinerie de l'interférence à l'ARN viral est perçu par un gène de résistance afin d'induire l'ETI.

Outre les VSR liant les petits ARN, l'autre classe majeure de VSR cible le complexe RISC, plus particulièrement les protéines AGO. Il est donc logique de commencer notre démarche par ces protéines. De toutes les AGO, AGO1 est une cible de choix pour plusieurs VSR et, qui plus est, elle est aussi impliquée dans la machinerie d'ARNi antivirale. Il semblerait donc que ces VSR causent des dommages sur la machinerie de l'ARNi via AGO1 pour compromettre sa fonction antivirale (figure 14 A). Il semble ainsi logique de penser que la plante pourrait percevoir les dommages à la machinerie de l'ARNi via la protéine AGO1 afin d'induire une ETI. Par conséquent, notre hypothèse est qu'AGO1 serait une protéine de garde dans un ou plusieurs systèmes Avr/R où l'effecteur serait en fait un VSR (figure 14 B).



**Figure 14: Hypothèse spécifique stipulant que les dommages causés à l'ARNi pourraient être perçus via la protéine AGO1.** A) Certains suppresseurs viraux de l'interférence à l'ARN viral ont la capacité d'affecter la protéine AGO1. B) Hypothèse stipulant que le dommage causé à AGO1 par les VSR peut-être perçu par la plante afin d'induire une réponse de défense de type ETI.

Cela nous amène donc aux résultats produits présentés précédemment. Dans le chapitre 2, j'ai démontré que la capacité de lier les petits ARN était essentielle afin que la P19 induise une HR. J'ai aussi démontré que la seule capacité de lier les petits ARN n'était pas suffisante afin d'induire une HR. Nos résultats suggèrent aussi que lorsqu'on affecte le chargement du petit ARN dans la P19, on altère la mise en place de la HR. Par contre, nos résultats démontrent aussi que la P15 est incapable d'altérer le chargement des petits ARN dans le dimère P19. La P15 affecte tout de même la HR induite par la P19. Une explication logique serait que la P15 empêche une interaction entre le dimère P19/siARN et une autre protéine. L'interaction avec cette tierce protéine serait responsable de l'induction de la HR induite par P19. Selon notre hypothèse générale de la figure 13 B, cette protéine se retrouverait dans la machinerie de l'ARNi puisque P15 est un VSR. Selon notre hypothèse spécifique de la figure 14, cette tierce protéine pourrait être AGO1. Elle serait responsable de la détection du dommage à l'ARNi et de la perception des VSR en combinaison avec les bonnes protéines de résistance.

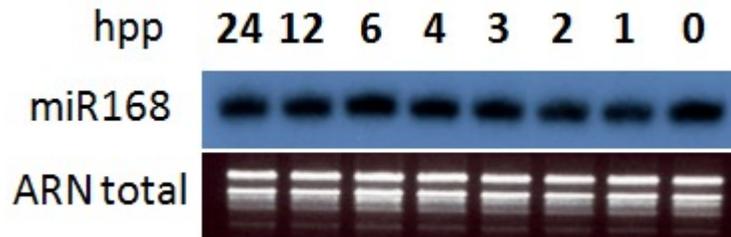
## 2.2 Implication d'AGO1 dans la mise en place de la HR induite par des VSR

L'objectif est donc de valider notre hypothèse en vérifiant l'impact de la protéine AGO1 ou de l'absence de cette dernière sur la réponse de défense induite par des VSR. Pour ce faire, j'ai utilisé 2 VSR, la P19 et la P50. Dans le cas de la P19, il existe déjà plusieurs liens avec AGO1. Outre les résultats avec P15, on savait déjà que la P19 a la capacité d'induire la production du miR168 *in vivo* et, par le fait même, de diminuer la présence d'AGO1. Néanmoins, il semblerait que cette fonction soit indépendante de l'activité VSR de la P19. Un mutant sans activité VSR est aussi capable d'induire la production de ce micro ARN (Várallyay *et al.*, 2014). Il semblerait aussi que la P19 ne se charge pas du miR168. Ensemble, l'induction du miR168 et le non chargement de ce dernier auront donc pour effet net de voir une diminution marquée de la présence de la protéine AGO1 dans le cadre d'infections virales (Várallyay *et al.*, 2010). Une autre étude a aussi démontré que la P19 est le seul suppresseur (dans le cadre des VSR testés) ayant la capacité d'empêcher le chargement de micro ARN dans la protéine AGO1 (Schott *et al.*, 2012). Finalement, un proche collaborateur nous a informés que la P19 interagissait physiquement avec la protéine AGO1 dans le cadre d'expériences de co-immunoprécipitation (Patrice Dunoyer, communication personnel). La P19 était donc un choix logique pour débiter nos expériences.

Nous avons ensuite besoin d'un autre VSR reconnu chez le tabac et non relié avec la P19. Notre choix s'est arrêté sur la P50, car elle a une activité VSR et elle provient d'une autre famille de virus. Cette protéine est reconnue par la protéine de résistance N (Erickson *et al.*, 1999). C'est donc un choix logique pour mettre en lumière un mécanisme qui serait plus général. Ensuite, j'avais besoin d'une protéine virale qui induit l'ETI et qui ne possède pas d'activité VSR démontrée. J'ai donc utilisé la protéine de la capsid de PVX qui est reconnue par la protéine de résistance Rx (Bendahmane *et al.*, 1999).

Comme le miR168 régule l'accumulation du transcrit, il a été utilisé afin de diminuer l'accumulation de la protéine (Vaucheret, 2009). On sait aussi que la protéine P19 induit la production du miR168 chez *N.benthamiana* (Várallyay *et al.*, 2014). Nous avons donc premièrement vérifié si c'était aussi le cas dans une situation où la P19 est reconnue et induit

une HR. J'ai utilisé des plantes transgéniques produisant la P19 sous promoteur inductible au dexaméthazone tel que décrit dans (Sansregret *et al.*, 2013). À la suite de la pulvérisation, j'ai fait une extraction d'ARN et mesuré l'accumulation du miR168 dans le temps par immunobuvardage de type Northern. J'ai suivi l'accumulation du miR168 durant les 24 premières heures. Le choix de 24 h correspond au moment où la P19 s'accumule bien et où les tissus ne sont pas encore détruits par la HR (figure 15).

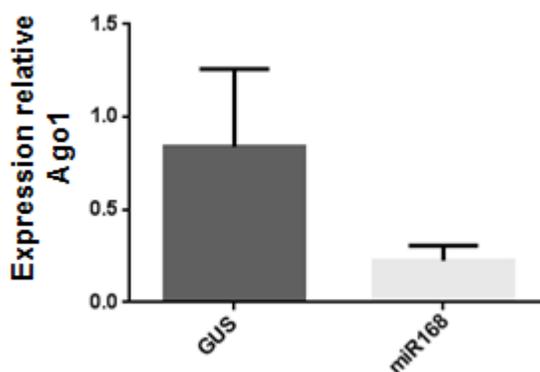


**Figure 15: Accumulation du miR168 en réponse à la P19.** Analyse par immunobuvardage de type Northern en utilisant le miR168\* comme sonde radioactive. Les échantillons ont été prélevés de plantes transgéniques exprimant la P19 sous promoteur inductible au dexaméthasone. La visualisation du miR168 a été réalisée dans des échantillons prélevés à 0h, 1h, 2h, 3h, 4h, 6h, 12h et 24h. Le gel montrant l'ARNt est utilisé comme contrôle pour comparer les quantités d'ARN déposées sur gel.

Nos résultats démontrent qu'il n'y a pas de modulation de l'accumulation du miR168 dans le temps à la suite de l'apparition de la P19 chez *N.tabacum* cv. Xanthi (Ntx). Ce qui veut donc dire que la P19 n'a pas d'impact sur le miR168 avant la mise en place de la HR. Ces résultats ne concordent pas avec ce qui a été démontré dans la littérature, mais, dans notre cas, la P19 induit l'ETI (Sansregret *et al.*, 2013; Várallyay *et al.*, 2014). Cette reconnaissance empêche peut-être l'induction du miR168 et nos temps sont peut-être trop courts. Puisque le miR168 n'est pas exprimé à la suite de l'expression de la P19 dans notre système, j'ai utilisé ce dernier afin de diminuer la présence de la protéine AGO1.

J'ai donc vérifié l'efficacité du miR168 sur l'accumulation du transcrit dans notre système, soit *N.tabacum* cv. Xanthi. J'ai mesuré par qPCR l'accumulation du transcrit d'AGO1 dans le

cas où nous avons exprimé par agroinfiltration le miR168 ou la protéine bêta-glucuronidase (GUS).

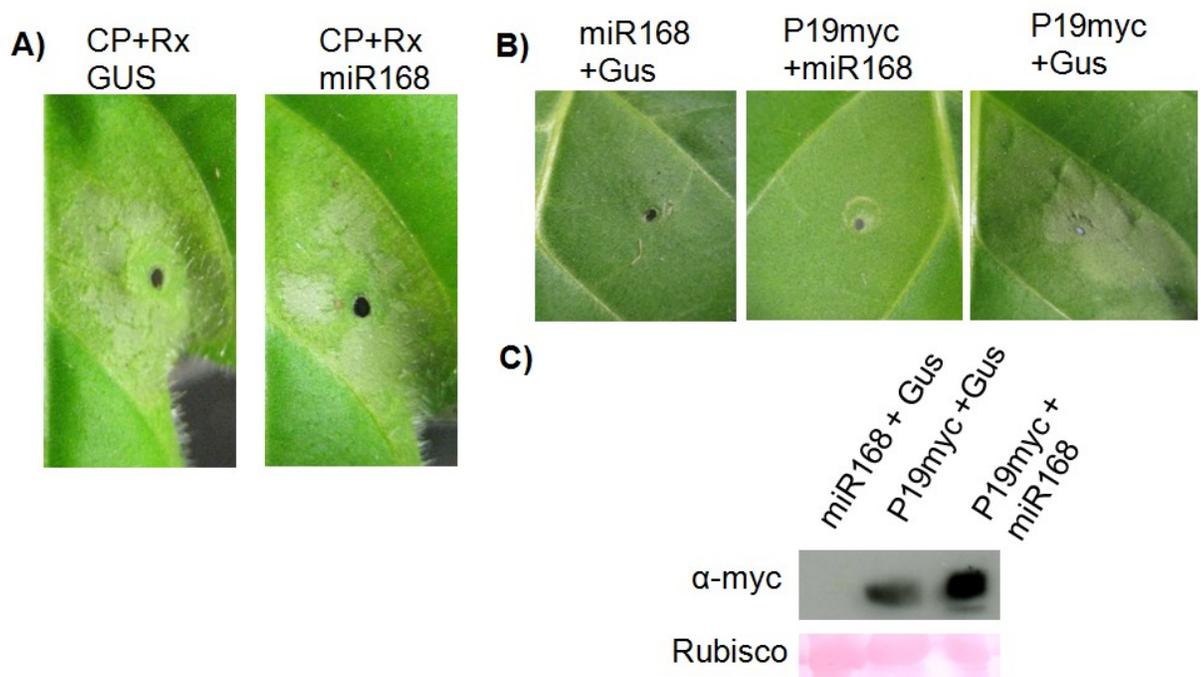


**Figure 16: Effet du miR168 sur l'accumulation de l'ARNm d'AGO1.** Détermination de l'expression relative du transcrite d'AGO1. La quantification fut réalisé par qPCR 48h suite à l'agroinfiltration du miR168 chez Ntx.

Les plantes sont infiltrées d'une part par *Agrobacterium* exprimant le miR168 et d'autre part par *Agrobacterium* exprimant GUS comme contrôle et les ARN sont extraits à 48h. Par la suite le transcrite d'AGO1 est quantifié par qPCR.

Dans notre système, l'accumulation du miR168 affecte négativement l'accumulation du transcrite d'AGO1. L'inverse aurait été surprenant. Cette méthode a donc été utilisée pour diminuer la présence du transcrite d'AGO1 dans les essais subséquents sur la mise en place de la HR (figure 16).

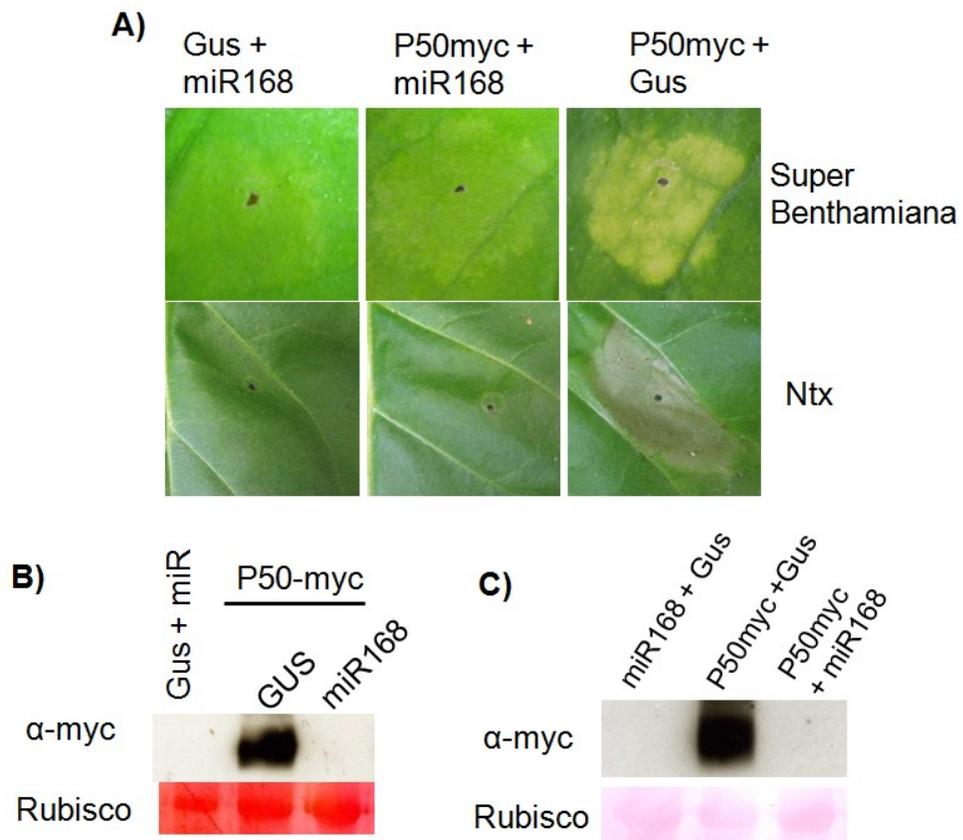
Notre hypothèse stipule donc qu'AGO1 est une protéine utilisée par la plante pour sentir le dommage induit à la machinerie de l'ARNi. Pour vérifier cette hypothèse, j'ai utilisé nos trois systèmes Avr/R. Sur ces trois systèmes, deux éliciteurs possèdent une activité VSR, P50 et P19, alors que CP n'a pas d'activité VSR démontrée. J'ai exprimé par agroinfiltration le miR168 en présence de ces trois éliciteurs et l'impact sur la HR fut mesuré 40 heures post agroinfiltration.



**Figure 17: Impact du miR168 sur la HR induite par P19 et CP/Rx.** A) Co-agroinfiltration chez Ntx de CP et Rx avec respectivement le miR168 ou Gus. B) Co-agroinfiltration de la protéine P19-myc avec respectivement Gus et le miR168. La co-agroinfiltration du miR168 et de Gus fut utilisé comme contrôle négatif de la mise en place de la HR C) Immunobuvardage de type Western mesurant l'accumulation de la protéine P19-myc en présence et en absence du miR168. Une coloration au rouge ponceau de la membrane et la visualisation de la Rubisco fut réalisé afin de vérifié l'efficacité du transfert ainsi que les niveaux des protéines chargées.

La présence du miR168 n'affecte pas la mise en place de la HR induite par CP/Rx alors qu'elle affecte la mise en place de la HR induite par P19-myc (figure 17 A et B). Pour vérifier que l'effet sur la HR induite par la P19-myc n'est pas dû à une sous-accumulation de la protéine, j'ai mesuré par immunobuvardage de type western l'accumulation de la P19-myc 40h post agroinfiltration. L'accumulation de la P19-myc en présence du miR168 était plus grande qu'en présence de notre contrôle (GUS). On peut donc conclure que l'effet sur la mise en place de la HR n'est pas dû à une sous-accumulation de la protéine, puisque l'accumulation de P19-myc est même supérieure à notre contrôle. Néanmoins, le miR168 ne semble pas affecter la mise en place de la HR induite par CP/Rx. On peut donc exclure que le miR168 ait

un effet sur la mise en place de la HR en soi. Il est plus probable que l'implication de la protéine AGO1 soit au niveau de la reconnaissance de P19-myc et qu'elle n'affecte pas celle de CP/Rx. Puisque la P19 est un VSR et que CP n'en est pas un, ces résultats supportent notre hypothèse qui stipule que la plante pourrait percevoir le dommage à la machinerie de l'ARNi via AGO1. La suite logique est donc de vérifier l'impact de la présence du miR168 (ou de la diminution d'AGO1) sur la réponse de défense induite par un autre VSR, soit la P50 de TMV.



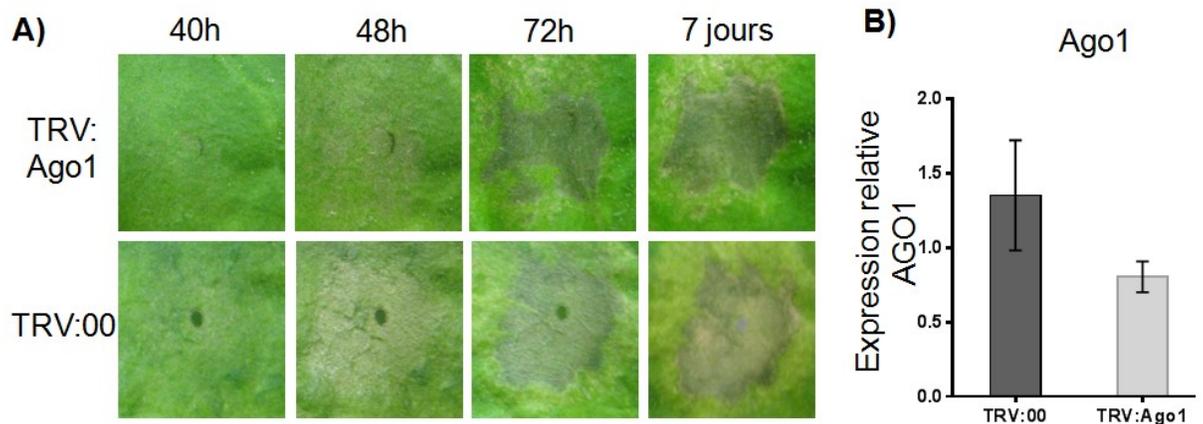
**Figure 18: Impact de l'expression du miR168 sur la réponse de défense induite par P50 chez deux espèces de tabac.** A) Co-agroinfiltration de la protéine P50-myc avec respectivement le miR168 et Gus chez Super Benthamiana ou Ntx. La co-agroinfiltration du miR168 et de Gus a été utilisée comme contrôle négatif de la HR. L'apparition de la HR a été observé respectivement 48h chez Ntx et 7 jours chez Super Benthamiana suite à agroinfiltration. B) Détection par immunobuvardage de type western de l'étiquette myc de la protéine P50-myc en présence ou en absence du miR168 chez Ntx. Les échantillons furent prélevé 48h suite à l'agroinfiltration C) Détection par immunobuvardage de type western de la

protéine P50-myc en présence ou en absence du miR168 chez Super Benthamiana. La détection a été réalisée 7 jours suite à l'agroinfiltration. Les niveaux de protéines chargées ont été mesurés avec une coloration au rouge ponceau et la visualisation de la Rubisco.

J'ai donc exprimé par agroinfiltration la P50-myc en présence du miR168 dans deux cultivars de tabac qui reconnaissent la P50 via N, soit Ntx et Super Benthamiana. L'impact de la présence du miR168 est le même dans les deux cultivars. La mise en place de la HR fut ralentie, voire inhibée (Figure 18 A). J'ai ensuite vérifié si l'effet sur la mise en place de la HR était dû à une sous-accumulation de la protéine. Dans les deux cultivars, le résultat est le même. La présence du miR168 a aboli complètement l'accumulation de P50-myc (figure 18 B et C). Il est donc probable que l'impact sur la HR soit lié à la faible accumulation de la protéine. Une explication possible est qu'AGO1 serait essentielle à la stabilisation de la protéine P50 directement ou indirectement. L'absence d'AGO1 limiterait donc la quantité de protéine présente, empêchant du même coup la reconnaissance et la mise en place de la HR. Toutefois, ces résultats n'excluent pas que la protéine AGO1 puisse avoir une implication directe dans la reconnaissance de P50. Il est aussi possible que cet effet sur la HR et sur l'accumulation de P50 soit dû au miR168 lui-même, à un effet pléiotropique et non à la diminution d'AGO1 en soi. C'est pour cela que nous avons donc décidé de contre-vérifier nos résultats en utilisant une seconde méthode expérimentale, le VIGS.

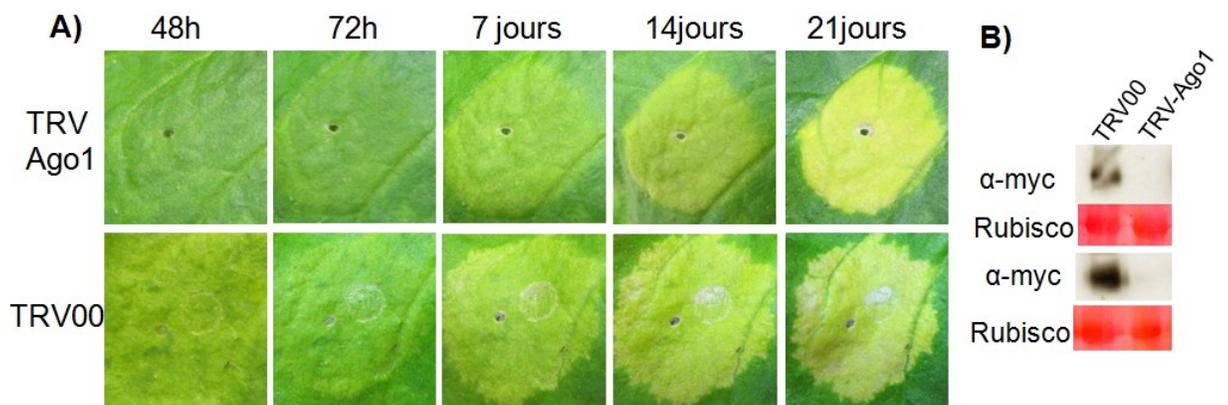
### **2.3 Impact du VIGS dirigé contre AGO1 sur la mise en place de la HR induite par un VSR**

J'ai utilisé la méthode du VIGS avec le virus du bruissement du tabac (TRV) (Liu, Schiff et al. 2002). Puisque le VIGS n'est pas très efficace chez Ntx, nous n'avons eu d'autres choix que de réaliser les expériences chez Super Benthamiana. Le VIGS avec TRV y est efficace, mais ce modèle expérimental nous permet seulement de tester CP/Rx et P50/N, la P19 n'y étant pas reconnue. J'ai réalisé l'infection avec les différentes constructions TRV dans des plantules et attendu 3 semaines avant de prendre des échantillons. J'ai ensuite exprimé par agroinfiltration les protéines CP et P50-myc afin de vérifier l'impact du VIGS sur la HR.



**Figure 19: Impact du VIGS d'AGO1 sur la réponse de défense de CP/Rx.** A) Agroinfiltration de CP chez Super Benthamiana 3 semaines après la réalisation du VIGS dirigé contre AGO1. La visualisation de la HR a été réalisée à 10h, 48h, 72h et 7 jours. B) Détermination de l'expression relative du transcrite d'AGO1 par qPCR suite au VIGS d'AGO1 chez Super Benthamiana. Les échantillons ont été prélevés 3 semaines suite à la réalisation du VIGS.

J'ai tout d'abord mesuré l'efficacité de la méthode du VIGS en quantifiant le transcrite d'AGO1 par qPCR. Les résultats de quantification ont démontré que l'accumulation du transcrite d'AGO1 était plus faible dans les plantes infectées par TRV:AGO1 que dans les plantes infectées avec le virus contrôle TRV:00 (Figure 19 B). J'ai ensuite mesuré l'effet sur la HR induite par CP et P50-myc. Ces résultats ont confirmé ce que nous avons obtenu avec le miR168, c'est-à-dire que la HR induite par CP/Rx ne semble pas affectée par la diminution de la présence d'AGO1 (Figure 19 A). Pour ce qui est des résultats obtenus avec la P50-myc, là encore, il semble que le VIGS dirigé contre AGO1 corrobore les résultats obtenus avec le miR168 et que la HR induite par la P50-myc est retardée.



**Figure 20: Impact du VIGS d'AGO1 sur la HR induite par P50/N.** A) Agroinfiltration de P50-myc chez Super Benthamiana 3 semaines après la réalisation du VIGS dirigé contre AGO1. La HR a été visualisée après 48h, 72h, 7 jours, 14 jours et 21 jours. B) Immunobuvardage de type western dirigé contre l'étiquette myc de la protéine P50-myc. Les échantillons ont été prélevés 7 jours suite à l'agroinfiltration. L'efficacité du transfert et l'uniformité du chargement a été évalué avec une coloration de la membrane au rouge ponceau.

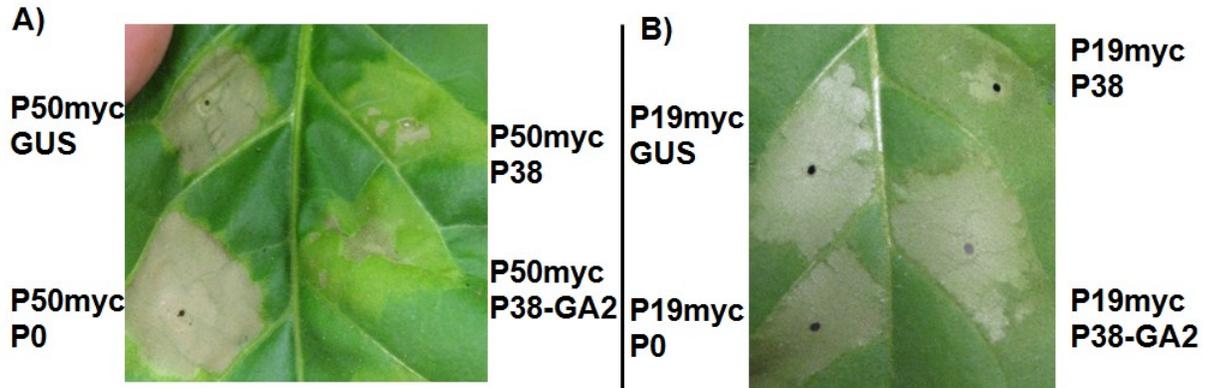
Néanmoins, ces résultats sont moins francs que ceux obtenus avec le miR168. Par contre, le VIGS semble aussi moins efficace à diminuer le transcrite d'AGO1. Il est donc possible que ce soit pour cette raison que les résultats soient moins francs.

Puisque l'accumulation de P50-myc avait été affectée par le miR168, j'ai à nouveau mesuré l'accumulation protéique de cette dernière. Encore une fois, il semble que la diminution de la protéine AGO1 ait affectée l'accumulation de la P50-myc (figure 20 B). Ce résultat est intéressant puisqu'il confirme ce que nous avons obtenu avec le miR168 et discrimine l'option que ce soit un effet pléiotropique du miR168 qui en soit responsable. Or, il semble que la présence d'AGO1 soit essentielle à la stabilisation de la protéine P50-myc. Cette stabilisation pourrait être essentielle à l'accumulation d'une quantité suffisante de la protéine nécessaire à la reconnaissance et à la mise en place de la HR. Il est aussi possible qu'AGO1 porte les deux rôles, qu'elle stabilise la protéine et qu'elle soit aussi impliquée dans la reconnaissance.

J'ai aussi remarqué durant nos essais que lorsqu'AGO1 d'*Arabidopsis* est exprimée en présence de P50 chez Super Benthamiana, il semble qu'il y a une plus grande accumulation de cette dernière. Ces résultats suggèrent donc que l'accumulation de le P50 pourrait être intimement liée à celle de la protéine AGO1. Des expériences devront être réalisées afin de démontrer ce phénomène. Si ces résultats sont confirmés, ils supporteront notre hypothèse selon laquelle AGO1 est impliquée dans la stabilisation de P50.

La protéine AGO1 semble faciliter l'accumulation de la P50 en stabilisant la protéine via un mécanisme inconnu. Cette stabilisation de P50 par AGO1 serait donc essentielle à la mise en place de la HR. Par contre, nos résultats ne nous indiquent pas si AGO1 est directement impliquée dans la reconnaissance de la P50. Les résultats obtenus avec P50, ajoutés à ceux obtenus avec la P19, démontrent qu'AGO1 semble impliquée à des niveaux différents dans la reconnaissance de ces VSR et dans la protection de la machinerie de l'ARNi.

Pour mieux caractériser ce mécanisme, j'ai utilisé deux VSR affectant AGO1 : la P0, qui dirige la protéine AGO1 vers la dégradation et empêche la formation de nouveau complexes RISC, et la protéine P38, qui lie AGO1 via des motifs GW et qui empêche son recrutement dans le complexe RISC (Azevedo *et al.*, 2010; Csorba *et al.*, 2010). J'ai aussi utilisé le mutant GA2 de la protéine P38 qui ne possède plus les motifs GW essentiels à la liaison avec AGO1. J'ai agroinfiltré des plants d'environ 5 à 6 semaines avec nos deux éliciteurs VSR et un des VSR affectant AGO1 cité ci-dessus. J'ai ensuite analysé l'impact sur la mise en place de la HR 40 h post-infiltration.



**Figure 21: Impact de deux VSR affectant AGO1 sur la HR induite par P19-myc et P50-myc chez Ntx.** A) Co-agroinfiltration de la protéine P50-myc avec respectivement Gus, P0, P38 et P38-GA2 dans Ntx. Photo prise 40h post agroinfiltration. B) Co-agroinfiltration de la protéine P19-myc avec respectivement Gus, P0, P38 et P38-GA2 dans Ntx. Photo prise 40h post agroinfiltration.

Ces résultats nous indiquent que, dans le cadre de la HR induite par P19-myc, seule la P38 est capable d'affecter sa mise en place de la HR (Figure 21 B). Ces résultats laissent penser qu'il est possible que la mise en place de la HR induite par la P19 passe par une interaction via les domaines d'AGO1 reconnaissant les motifs GW. Cette option est renforcée par le fait que le mutant P38-GA2 est incapable d'affecter la HR induite par P19-myc. La seule différence entre la P38 et le mutant GA2 est la capacité à lier AGO1 via les motifs GW.

Pour la P50-myc, les résultats sont quelque peu différents (figure 21 A). La P38 affecterait ainsi la réponse de défense, mais cet effet ne serait pas lié aux motifs GW et à leur capacité de liaison avec la protéine AGO1. Ainsi, la P38 et le mutant P38-GA2 sont tous deux capables d'altérer la HR induite par P50-myc. Puisque bien des protéines virales possèdent plusieurs activités distinctes, il est donc possible qu'une autre fonction de P38 inhibe cette réponse de défense.

La P0 qui induit la dégradation d'AGO1 n'affecte pas la mise en place de la HR, ni de la P19, ni de la P50. Ces résultats furent tout de même surprenants, puisqu'ils vont potentiellement à l'encontre de ce qui a été obtenu avec le miR168 et le VIGS. Il existe par contre plusieurs

scénarios possibles pouvant expliquer ces résultats. Il est possible que la P0 n'ait pas suffisamment de temps pour diriger une quantité suffisante d'AGO1 vers la dégradation et que, lorsque la dégradation se met réellement en branle, la signalisation induisant la HR est déjà bien entamée. Une étude suggère qu'il y a possiblement deux bassins distincts d'AGO1 chez *Arabidopsis thaliana* (Schott *et al.*, 2012). Une autre explication serait donc que les AGO1 dirigées vers la dégradation ne sont pas celles impliquées dans la mise en place de la HR induites par les VSR.

Ainsi, il semble que la protéine AGO1 soit importante pour la HR induite par des VSR dans nos deux modèles expérimentaux, soit *N. benthamiana* et *N. tabacum*. Le mécanisme utilisé pour la reconnaissance diffère entre P50 et P19. Pour la P19, les résultats laissent croire que la reconnaissance du dommage à la machinerie de l'ARNi pourrait se faire en interaction directe avec AGO1 via les motifs GW. Cette affirmation est supportée par le fait que notre collaborateur ait mis en évidence une interaction directe entre AGO1 et la P19. Le fait que la P38 affecte la HR induite par la P19 et que le mutant GA2 en soit incapable suggère ainsi qu'il pourrait y avoir un lien entre les motifs GW, des motifs d'interaction protéique, et la reconnaissance de la P19.

Pour la P50, il est aussi possible que la reconnaissance se fasse via la protéine AGO1, mais pour l'instant nos résultats suggèrent seulement qu'AGO1 stabilise la protéine P50. Cette stabilisation est probablement en partie responsable de la HR induite par la P50. Son implication est donc indéniable dans le processus, mais on ne sait pas si AGO1 est impliquée directement dans la reconnaissance ou si son implication est seulement au niveau de la stabilisation. Il nous semble important de vérifier si AGO1 interagit avec la P50 et N.

### **3 Discussion et conclusion**

On considère maintenant de plus en plus l'ARNi comme le mécanisme de défense antivirale qui fera le travail de la PTI. Dans cette mesure, à l'image du modèle en zigzag, les virus supprimeront l'ARNi afin de surpasser la PTI. Les acteurs utilisés par les virus pour supprimer

l'ARNi seront à leur tour utilisés par la plante afin de contrecarrer les assauts viraux. L'objectif de mon doctorat au départ était de démontrer que la P19 était bel et bien un éliciteur et qu'il existait un dialogue entre la reconnaissance des éliciteurs et l'ARNi. Effectivement, à l'époque, nous savions que les plantes étaient capables d'activer la voie de l'ARNi afin de mettre en place une réponse de défense efficace. Cependant, nous ignorions s'il existait un mécanisme inverse ou si l'ARNi activait la reconnaissance des éliciteurs.

Mes travaux ont démontrés que la P19 induisait une réponse de défense de type ETI et que la HR est associée avec l'accumulation de dimère de P19. Cette réponse de défense est caractérisée par l'accumulation de PR protéine et nécessite la voie de l'ET et de l'AS, ces derniers étant des marqueurs de la mise en place de la reconnaissance des éliciteurs et de l'ETI. Qui plus est, cette réponse de défense est si efficace que lors d'une infection virale au TBSV, il n'y a aucune lésion visible macroscopique ou microscopique. Ces caractéristiques sont similaires à la résistance extrême, un phénomène déjà décrit dans le cadre de la reconnaissance de CP par Rx pour le PVX (Bendahmane *et al.*, 1999; Tameling et Baulcombe, 2007). Il existe par contre une différence fondamentale entre CP et la P19 : la P19 est un VSR et CP n'a pas d'activité VSR décrite.

Quelques travaux publiés durant mon doctorat avaient déjà démontré que certains VSR étaient capables d'induire une HR. C'est le cas de la P50 de TMV. Il était déjà très bien documenté que cette protéine induisait une HR en présence du gène de résistance N, ensuite, des travaux ont démontré son activité VSR (Wang *et al.*, 2012). Il existe aussi d'autres exemples de VSR qui sont reconnus et qui induisent une HR. La P38, la protéine de la capsid de TCV, est reconnue chez *Arabidopsis* écotype Dijon-0 et la protéine 2b du TAV (tomato aspermy virus), qui est reconnue chez le tabac (Ren *et al.*, 2000). Pour la protéine TAV2b, il a aussi été démontré que des résidus impliqués dans la liaison au petit ARN étaient essentiels à la mise en place de la HR, ce qui ressemble étrangement à ce que j'ai démontré avec le mutant 39-42 de la P19 (Li *et al.*, 1999).

Ce sont ici quelques exemples de VSR qui induisent une réponse de défense. Il est donc logique de croire que ce n'est ici qu'un début. Il est possiblement que chaque VSR puisse être

reconnu en présence des bonnes protéines de résistance. Nous pouvons donc possible d'émettre l'hypothèse qu'il existe bel et bien un lien entre la voie de l'ARNi et la mise en place de l'ETI.

Durant ma thèse, j'ai investigué pour savoir s'il y avait un lien entre la voie de l'ARNi, l'activité VSR et la mise en place de la HR induite par la P19. Nous ne sommes pas les premiers auteurs à supposer que l'activité VSR est probablement essentielle à la reconnaissance d'un VSR, mais nous sommes les premiers à démontrer directement que la capacité de suppression de l'ARNi est essentielle à la reconnaissance d'un VSR. Dans notre cas, cela implique une liaison avec un petit ARN (Nakahara et Masuta, 2014). Il y a par contre une subtilité. J'ai démontré que, pour la P19, la liaison aux petits ARN est essentielle mais insuffisante à elle seule afin d'induire la HR. Cette dernière caractéristique est particulièrement intéressante. On pourrait croire avec mes travaux que le motif moléculaire produit par la P19 lié au petit ARN est reconnu. Cette situation est par contre peu probable puisque dans nos travaux nous avons démontré que la P15 est incapable de retirer les petits ARN du site actif de P19. Elle réussit néanmoins à altérer la HR induite par la P19.

Ce résultat est intéressant puisqu'il laisse penser que la P15 affecte quelque chose impliqué dans l'induction de la réponse de défense induite par P19. Puisque ce sont deux VSR, il est logique de penser que ce qui est affecté est impliqué dans la machinerie de l'ARNi. Cette hypothèse est particulièrement intéressante, puisque protéger la machinerie de l'ARNi semble logique du point de vue de la plante. Cette machinerie est essentielle à énormément de processus cellulaires et à la régulation fine. Ce mécanisme est en plus responsable de la réponse de défense basale contre les virus. Protéger les acteurs clé de l'ARNi semble donc intéressant pour la plante. Cela permettrait de se protéger contre les virus, mais aussi contre les autres types d'agents pathogènes. On sait maintenant que l'ARNi est impliqué dans la réponse de défense contre les bactéries et qu'il régule la PTI et l'ETI (Boccaro *et al.*, 2014; Navarro *et al.*, 2006). On sait aussi que certaines bactéries affectent l'ARNi via leurs effecteurs (Navarro *et al.*, 2008). C'est donc dire que protéger les assauts contre ce mécanisme semble une bonne idée pour la plante.

La suite logique est donc de tester l'impact de plusieurs protéines impliquées dans l'ARNi sur la réponse de défense induite par des VSR. Parmi tous les acteurs actuellement connus de la machinerie de l'ARNi, un qui sortait du lot, AGO1. Nos résultats ont démontré que la protéine AGO1 semble être importante dans le processus de reconnaissance des deux VSR que j'ai testés, soit la P19 et la P50. Il ne semble pas qu'elle soit impliquée dans la mise en place de la HR induite par CP puisque les expériences avec le miR168 et le VIGS dirigées contre AGO1 étaient incapables d'inhiber la HR induite par CP. L'implication d'AGO1 au niveau de la signalisation de la HR peut donc être mise de côté.

Dans le cadre de la HR induite par la P19, j'ai démontré que la protéine AGO1 semblait impliquée dans la reconnaissance de la P19. Qui plus est, les résultats avec les co-infiltrations entre la P38 et la P19 laissent croire que les domaines liant les motifs GW sont importants pour la reconnaissance de la P19, le mutant P38-GA2 étant incapable d'altérer la mise en place de la HR. La seule différence entre ce mutant et la P38 de type sauvage est que certains motifs GW ont été mutés et qu'elle est donc incapable de lier AGO1. Il est donc possible que la P19 interagisse directement avec le domaine de liaison au motif GW. Puisque les motifs GW sont des motifs d'interactions protéiques et que plusieurs protéines endogènes possèdent ces motifs, il est aussi possible que ce soit une autre protéine qui soit responsable de ce phénomène, ce qui ajouterait encore un fois de la complexité au phénomène. Il est aussi possible que le gène de résistance reconnaissant P19 garde la protéine AGO1 via les domaines de liaison au motif GW. La P38 empêcherait donc physiquement le mécanisme de garde de la protéine AGO1 par la protéine de résistance. Une autre possibilité est que la protéine P19 ait une seconde fonction pour le virus, soit d'augmenter l'expression du miR168. Il est possible que cette fonction soit aussi impliquée dans le mécanisme de reconnaissance. Dans ce cas, nous obtiendrions un étrange phénomène où la P19 serait perçue à la fois par le dommage à la machinerie de l'ARNi sous forme de la liaison aux petits ARN et par sa capacité à augmenter le miR168. Par contre, dans notre système il n'y a pas d'augmentation de l'accumulation du miR168. L'absence de cette augmentation peut être expliquée dans notre système par la liaison de la P19 avec une protéine ou simplement par la mise en place des réponses de défense. Il semblerait tout de même que la P19 ait un impact sur l'accumulation du transcrit d'AGO1. Cet impact serait indépendant de l'accumulation du miR168 (Annexe 2). Ces résultats

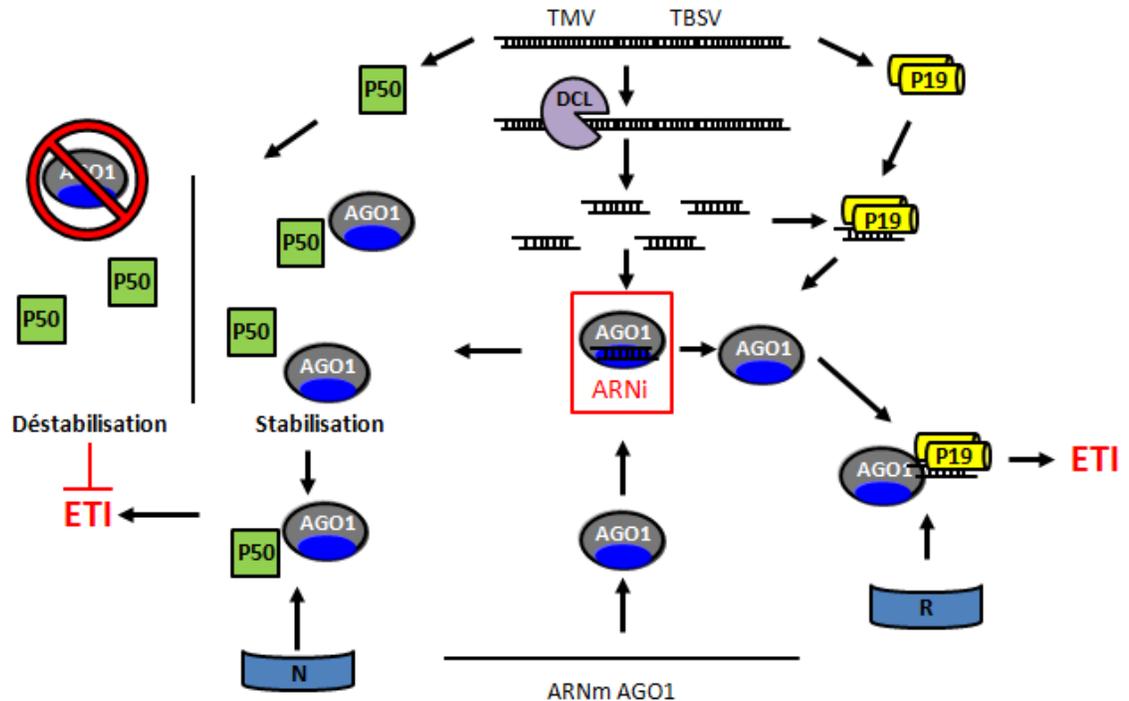
préliminaires restent tout de même à confirmer et ils ne permettent pas de discriminer entre la présence de la P19 et la mise en place de la HR.

Pour les résultats avec la P50, les choses sont différentes. À chaque fois que nous avons affecté négativement les quantités d'AGO1 via le VIGS ou le miR168, nous avons eu une abolition très forte de l'accumulation de la P50. L'absence de la protéine explique fort probablement l'absence de la mise en place de la HR. Cependant, une autre explication plausible est que la P50 nécessite AGO1 afin de se stabiliser ou, somme toute, en a besoin pour s'accumuler. Cela pourrait expliquer que P50 s'accumule plus fortement dans une situation où AGO1 est surexprimée. Ce mécanisme inconnu de stabilisation serait indispensable à l'accumulation suffisante de la protéine afin d'induire une réponse de défense. Il est aussi possible que cette stabilisation via AGO1 soit aussi impliquée directement dans le mécanisme de reconnaissance par N. Par contre, à ma connaissance, aucun résultat dans la littérature n'indique que N pourrait lier physiquement AGO1. Par ailleurs, il semble donc aussi important de vérifier s'il y a une interaction entre AGO1 et P50 ou N.

Dans le cadre de la P50, peu d'informations peuvent être tirées des expériences avec les VSR outre que la P38 altère la mise en place de la HR via une autre fonction que la liaison avec AGO1. Pour les deux VSR, les expériences avec la P0 ont donné le même résultat négatif. Il pourrait être tentant d'émettre l'hypothèse que les AGO1 impliquées dans la mise en place de la HR ne sont pas celles issues de la formation de nouveaux complexes RISC. Par contre, si c'était le cas, le miR168 n'aurait pas eu d'effet sur la mise en place de la HR. À l'image des résultats avec P50 et P38, il faut toujours être prudent avec les résultats obtenus via des VSR, puisque ceux-ci possèdent souvent plusieurs fonctions.

Cela m'amène donc à regrouper les résultats de ma thèse dans un modèle et à tenter, par le fait même, de donner une signification biologique aux expériences réalisées (figure 22). Les virus infecteront une cellule végétale et commenceront à tenter de se répliquer. Dans le processus de réplication du virus, il y aura un stade d'ARNdb. Ces ARNdb seront reconnus par les DCL, principalement DCL4. Les DCL les cliveront en petits fragments majoritairement issus du travail de DCL4, donc de 21nt. Ces derniers seront chargés dans le complexe RISC avec à son

bord une protéine argonaute, ici AGO1. Le complexe RISC dans un processus normal ira dégrader les génomes des virus. Ici, chaque virus tentera de se protéger de l'ARNi.



**Figure 22: Modèle intégrant les résultats.** Cette figure présente en résumé les résultats obtenus durant mon doctorat. Elle illustre comment la protéine AGO1 pourrait jouer un rôle important dans la reconnaissance des suppresseurs viraux de l'interférence à l'ARN anti viral.

Le TBSV produira la protéine P19 afin de se protéger de l'ARNi. Cette protéine se dimérise et ira lier avec une plus grande affinité les petits ARN produits par DCL4. Ce dimère, lié à un petit ARN, ira lier AGO1 via les domaines reconnaissant les protéines à motifs GW. C'est cette interaction qui serait reconnue dans notre système et qui induirait la HR et la mise en place de la réponse de défense.

Le TMV produirait, quant à lui, la P50 afin de se prémunir de l'action de l'ARNi. Cette P50 nécessiterait la présence de la protéine AGO1 afin de se stabiliser et de s'accumuler. Cette stabilisation par AGO1 induirait éventuellement la mise en place de la HR via le gène de

résistance N. Dans le cas où la protéine AGO1 est absente, la P50 ne peut pas s'accumuler et induire la mise en place de la HR. Ces résultats démontrent un lien indéniable entre la P50 et AGO1. Puisque le mode d'action de la protéine P50 est encore inconnu, il semble logique de penser, avec mes travaux, que cette protéine pourrait agir entre autres sur AGO1.

J'ai démontré avec mes travaux que la plante est capable de percevoir le dommage causé à la machinerie de l'ARNi en reconnaissant l'action des VSR. Puisqu'elle joue déjà un rôle prédominant dans la reconnaissance de deux VSR qui ne sont pas génétiquement reliés, la protéine AGO1 pourrait jouer un rôle central dans cette défense anti-VSR. Ce mécanisme impliquerait que des protéines de résistance soient présentes pour « sentir » les dommages causés à AGO1 et ainsi protéger le mécanisme de l'ARNi en activant la voie de l'ETI. Il n'est pas exclu que d'autres protéines de l'ARNi bénéficient de protections similaires de part de la plante. Par contre, peu de protéines de ce mécanisme sont aussi fortement ciblées par les VSR. C'est possible que ce genre de protection dont bénéficie AGO1 puisse permettre à un gène de résistance de percevoir l'action de plusieurs VSR et ainsi améliorer de manière ingénieuse l'efficacité du système immunitaire de la plante.

Les résultats concernant AGO1 ont par contre été produits avec la même méthode, soit en utilisant la machinerie de l'ARNi afin de diminuer l'expression d'un transcrit. Le problème, c'est que la protéine dont on cherche à diminuer l'expression est aussi celle que l'on utilise pour diminuer l'expression. Pour pallier ce problème, d'autres méthodologies devront être utilisées, par exemple la technologie des CRISPR (Belhaj *et al.*, 2013). Il semble aussi important de vérifier s'il y a une interaction directe entre nos VSR utilisés et la protéine AGO1. De même, il serait aussi intéressant de vérifier si la protéine N interagit avec AGO1. Des essais d'immunoprécipitation pourraient être réalisés pour répondre à cette question. Une interaction directe de l'une ou l'autre de ces protéines renforcerait fortement notre hypothèse. Puisqu'il existe plusieurs autres VSR reconnus, il serait intéressant de vérifier si AGO1 est aussi impliquée dans leur reconnaissance. Cela appuierait notre hypothèse selon laquelle AGO1 est impliquée dans la protection de la machinerie de l'ARNi et permettrait de vérifier s'il se produit le même phénomène à travers le règne des plantes. S'il s'avérait que oui, nous aurions donc un mécanisme qui serait ubiquitaire chez les plantes. Il pourrait être aussi

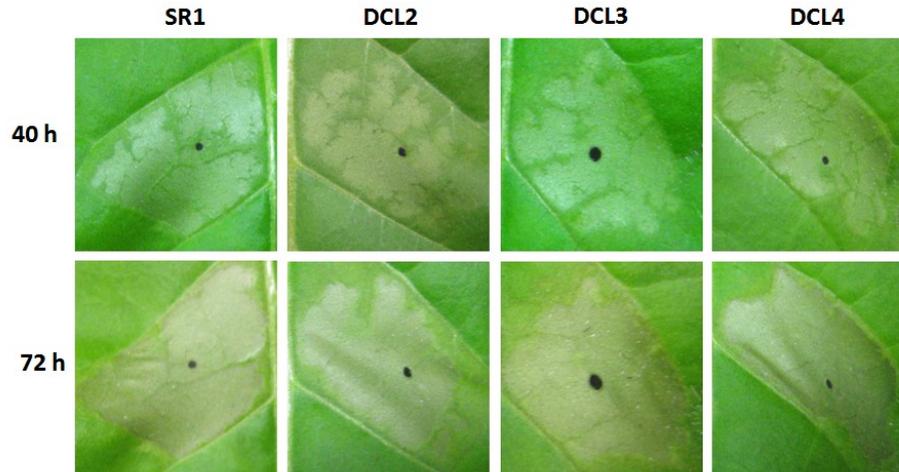
intéressant de vérifier si d'autres acteurs de l'ARNi sont aussi protégés par la plante. Outre AGO1, les autres AGO, les DCL et les DRB pourraient tous être des candidats intéressants. J'ai d'ailleurs quelques résultats préliminaires avec les protéines DCL en annexes 1. Bien sur, ces résultats devront être confirmés Ce n'est ici que quelques-unes des questions soulevées par mes travaux. Pour l'instant, bien des questions restent sans réponse.

Les résultats produits durant ma thèse ajoutent une couche de complexité supplémentaire au système de reconnaissance des agents pathogènes par la plante. Le fait qu'il existe un dialogue actif, une interrelation complexe et un chevauchement entre les voies de la PTI, de l'ETI et de l'ARNi laisse penser qu'il est trop simpliste de diviser le système immunitaire ainsi. La réalité est rarement moins complexe que ce que l'on croit. À juste titre, l'immunité de la plante devrait plutôt être perçue comme un tout dont l'interaction entre les différents membres est essentielle au bon fonctionnement normal de son système immunitaire. L'interaction et le dialogue n'est probablement pas l'exception mais plutôt la norme. À l'image d'un orchestre dont le pathogène est le maestro et les musiciens la plante, l'action du chef d'orchestre décidera de la mise en place de la musique. La qualité du morceau décidera du destin funeste soit de l'orchestre, soit du maestro. On pourra toujours diviser l'orchestre en section des cuivres, des percussions et des cordes, il restera toujours que la musicalité provient de l'ensemble. Dans le cas d'une fausse note, on se retrouvera avec une maladie et potentiellement la mort de la plante.

## Annexe 1

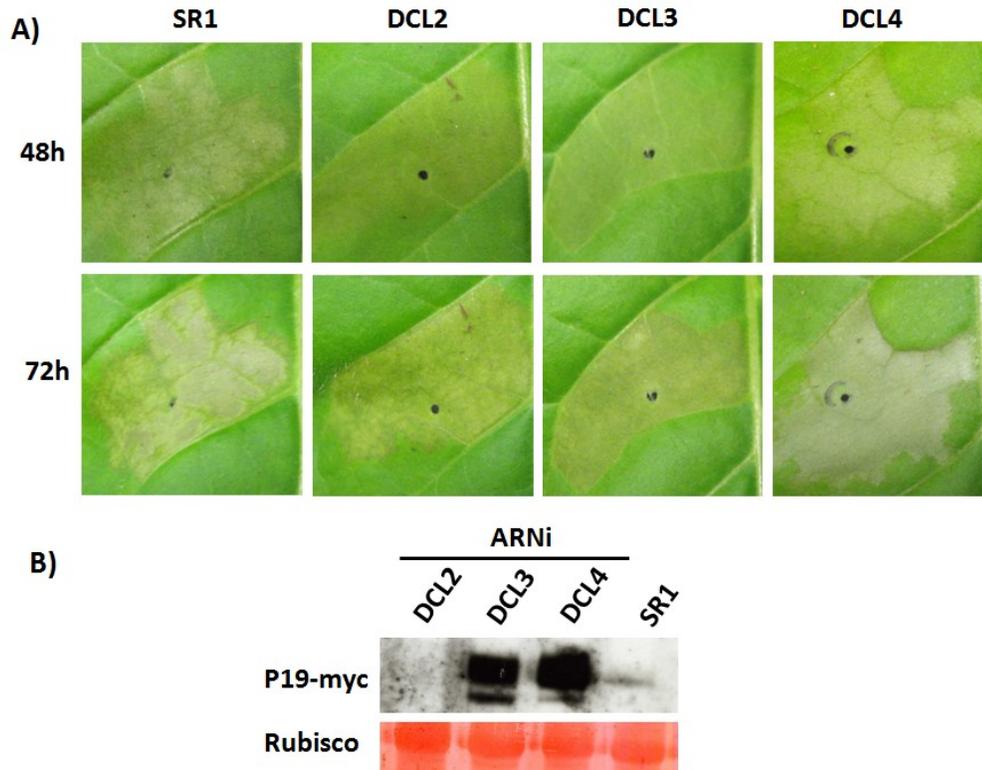
### Implication des protéines DCL dans la réponse à la suppression de l'ARNi

Puisque notre hypothèse est que la plante perçoit les dommages à l'ARNi via les protéines impliquées dans le processus et puisqu'elles sont multiples, nous n'avons pas retenue seulement AGO1 comme candidat potentiel. La plante aurait pu percevoir le dommage causé à l'ARNi via les protéines DCL. J'ai donc vérifié l'impact de l'absence de certaine DCL sur la HR. Pour ce faire, j'ai utilisé des plantes transgéniques exprimant une structure en tige boucle avec une séquence dirigée contre 3 DCL : DCL2, DCL3 et DCL4. Ces plantes transgéniques ont été générées dans le cultivar de tabac SR1. Elles contiennent des constructions répétées inversées qui ont été décrites dans la littérature en 2009 (Kuang *et al.*, 2009). J'ai agroinfiltré ces plantes avec nos 3 éliciteurs afin de vérifier si l'absence de DCL avait un impact sur la mise en place de la HR. J'ai tout d'abord vérifié s'il y avait un impact sur la HR induite par CP/Rx.



**Figure 23: Impact de l'absence de certaines DCL sur la mise en place de la HR induite par CP/Rx.** Photos de co-agroinfiltration de CP et Rx chez différents plants de tabac transgénique exprimant des constructions en tige boucle dirigées contre DCL2, DCL3 et DCL4. Ces plantes transgénique sont issues du cultivar SR1. Il est utilisé comme contrôle de la mise en place de la HR.

Comme il est possible de le constater dans la figure 23, l'absence ou la diminution de la présence de DCL2, DCL3 ou DCL4 ne semble pas avoir d'impact sur la mise en place de la HR induite par CP/Rx. On peut d'ors et déjà exclure que l'absence des DCL ait un impact sur la mise en place de la HR. J'ai ensuite testé, avec les mêmes plantes transgéniques, l'impact sur la HR induite par la protéine P19.

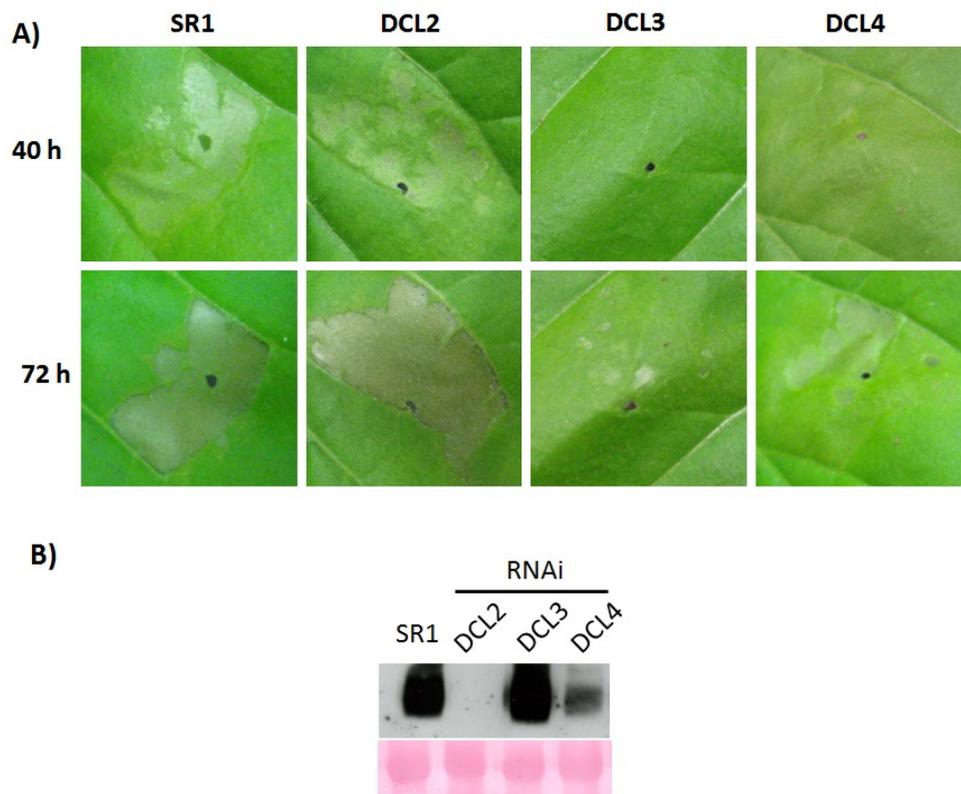


**Figure 24: Impact de l'absence des protéines DCL sur la mise en place de la HR induite par P19-myc.** A) Agroinfiltration de P19-myc chez différents plants de tabac transgénique exprimant des constructions en tige boucle dirigées contre DCL2, DCL3 et DCL4. Ces plantes transgéniques sont issues du cultivar SR1. Il est utilisé comme contrôle de la mise en place de la HR. B) Immunobuvardage de type western dirigé contre l'étiquette myc de la protéine P19-myc. La détection de la protéine a été effectuée dans les différentes plantes transgénique ainsi que le contrôle. Visualisation du chargement de protéines avec une coloration rouge ponceau.

Dans le cas de la P19-myc, il semble que l'absence de DCL2 et DCL3 ait eu un impact sur la mise en place de la réponse de défense (Figure 24 A). L'absence de ces protéines aurait ralenti la mise en place et diminué l'intensité de la HR. Afin de vérifier que cet impact n'est pas dû à

un problème d'accumulation de la protéine, j'ai fait un immunobuvardage de type western dirigé contre myc. Il est possible de constater que la protéine s'accumule plus fortement pour DCL3 et DCL4 alors que, pour DCL2, la protéine s'accumule moins que dans la plante de type sauvage (SR1). Il semble donc que le ralentissement de la mise en place de la HR constaté dans le cas de DCL2 pourrait être dû à une sous-accumulation de la protéine. Par contre, dans le cas de DCL3, il semble que cette protéine puisse être impliquée dans la mise en place de la HR induite par P19-myc (Figure 25 B). Ces résultats devront être confirmés en utilisant d'autres méthodes avant de pouvoir se prononcer sur leur portée.

J'ai ensuite vérifié si la diminution de la présence de DCL2, DCL3 et DCL4 avait le même impact sur la mise en place de la HR induite par un autre VSR, P50-myc. J'ai donc co-agroinfiltré P50-myc et N dans les différentes plantes transgéniques et dans la plante de type sauvage.



**Figure 25: Impact de l'absence de certaines DCL sur la mise en place de la HR induite par P50-myc.** A) Co-agroinfiltration de P50-myc et N chez différents plants de tabac transgénique exprimant des constructions en tige boucle dirigées contre DCL2, DCL3 et

DCL4. Ces plantes transgénique sont issues du cultivar SR1. SR1 a été utilisé comme contrôle de la mise en place de la HR. B) Immunobuvardage de type western dirigé contre l'étiquette myc de la protéine P50-myc. La détection de la protéine a été effectuée dans les différentes plantes transgéniques et le contrôle SR1. Visualisation du chargement de protéines avec une coloration de la membrane au rouge ponceau.

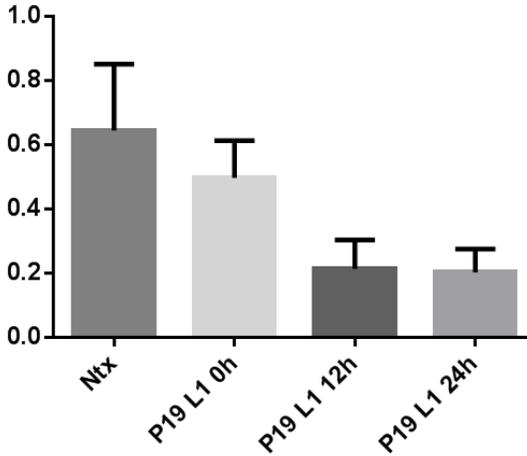
Il est possible de constater que l'absence de DCL3 et DCL4 a eu un impact négatif sur la mise en place de la HR induite par la protéine P50-myc. J'ai donc vérifié si l'impact sur la mise en place de la HR n'était pas dû à une sous-accumulation de la protéine P50. J'ai réalisé un immunobuvardage de type western afin de vérifier la présence de cette protéine. Pour DCL4, l'impact négatif constaté sur la mise en place de la HR pourrait être dû à une sous-accumulation de P50. Dans le cas de DCL3, la protéine est bel et bien accumulée; l'altération de la mise en place de la HR n'est pas due à une sous-accumulation de la P50. Dans toutes nos procédures expérimentales, jamais nous n'avons été en mesure de constater l'accumulation de la P50 dans les plantes DCL2. C'est effectivement étrange puisque la HR ne semble pas être affectée. Il est donc possible que la protéine se soit accumulée rapidement et qu'au moment où je réalise la détection, la protéine n'est plus présente. Un échantillonnage précoce permettrait d'éclaircir cette situation. De plus, dans ces expériences, la protéine de résistance a été agroinfiltrée en même temps que le VSR. Par contre, l'accumulation de cette protéine de résistance n'a pas été mesurée, puisque nous n'avons pas d'anticorps spécifique. Il est donc possible que l'impact soit au niveau de l'accumulation de la protéine de résistance. D'autres expériences seront nécessaires afin de confirmer ces résultats et mieux comprendre ce phénomène.

Il est donc possible d'exclure que les protéines DCL est un impact sur la mise en place de la HR a proprement dit. Par contre, ses résultats sont intéressants puisque les DCL qui affectent P50 et P19 sont différentes. Ces résultats confirmeraient une partie de notre hypothèse élaborée dans notre modèle (figure 22). Le mode de reconnaissance des dommages induits à la machinerie de l'ARNi, bien qu'il ait AGO1 comme acteur clé, serait différent d'un VSR à l'autre. L'implication différentielle des DCL en serait un exemple. Par contre, ces résultats

sont préliminaires. Ils doivent être reproduits et confirmés en utilisant d'autres méthodes comme les CRISPR.

## Annexe 2

### Quantification du transcrit d'AGO1 en réponse à la suppression de l'ARNi



**Figure 26: Quantification du transcrit d'AGO1 par qPCR suite à l'induction de la production de la P19.** Quantification relative du transcrit d'AGO1 dans des plantes transgéniques exprimant la protéine P19 sous promoteur inductible au dexaméthasone. Le transcrit fut quantifié par qPCR dans des échantillons prélevés à 0h, 12h et 24h suite à la pulvérisation au dexaméthasone.

Puisque nous savions que dans notre système la P19 n'avait pas d'impact sur l'accumulation du miR168, nous avons voulu vérifier si le transcrit d'AGO1 était stable dans le temps. J'ai utilisé des plantes transgéniques exprimant la protéine P19 sous promoteur inductible au dexaméthasone afin de réaliser une cinétique de l'accumulation du transcrit d'AGO1 dans le temps. Suite à la pulvérisation, des échantillons ont été prélevés à 0h, 12h et 24h. J'ai fait un qPCR afin de mesurer l'accumulation du transcrit. Il semble que la présence de la protéine P19 ai un impact négatif sur l'accumulation du transcrit AGO1. J'ai démontré que dans notre système expérimental la P19 n'a pas d'impact sur l'accumulation du miR168 (Figure 26). Il semblerait donc que la P19 diminue l'accumulation du transcrit d'AGO1 indépendamment du miR168. Il est possible que cette diminution soit due à la mise en place de la réponse de défense. D'autres expériences seront nécessaires afin de valider ces résultats.

## Bibliographie

Ahuja I., Kissen R., and Bones A.M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in Plant Science*. *17*(2), 73-90.

Alamillo J. M., Saénz P. and García J.A. (2006). Salicylic acid-mediated and RNA-silencing defense mechanisms cooperate in the restriction of systemic spread of plum pox virus in tobacco. *The Plant Journal* *48*(2), 217-227.

Anandalakshmi R., Pruss G.J., Ge X., Marathe R., Mallory A.C., Smith T.H. and Vance V.B. (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. *95*(22), 13079-13084.

Angel C. A., Hsieh Y.C. and Schoelz J.E. (2011). Comparative Analysis of the Capacity of Tombusvirus P22 and P19 Proteins to Function as Avirulence Determinants in *Nicotiana* species. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. *24*(1), 91-99.

Angel C. A. and Schoelz J.E. (2013). A Survey of Resistance to Tomato bushy stunt virus in the Genus *Nicotiana* Reveals That the Hypersensitive Response Is Triggered by One of Three Different Viral Proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *26*(2), 240-248.

Aoyama T. and Chua N.H. (1997). A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *The Plant Journal*, *11*(3), 605-612.

Axtell M. J. and Staskawicz B.J. (2003). Initiation of RPS2-specified disease resistance in *Arabidopsis* is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. *Cell* *112*, 369-377.

Azevedo J., Garcia D., Pontier D., Ohnesorge S., Yu A., Garcia S., Braun L., Bergdoll M., Hakimi M.A., Lagrange T. and Voinnet O. (2010). Argonaute quenching and global changes in Dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev.* *24*, 904-915.

Baulcombe D. C. and Molnar A. (2004). Crystal structure of p19 - a universal suppressor of RNA silencing. *Trends Biochem. Sci.* *29(6)*, 279-281.

Baumberger N., Tsai C.H., Lie M., Havecker E. and Baulcombe D.E. (2007). The Polerovirus silencing Suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr. Biol.* *17*, 1609-1614.

Bayne E. H., Rakitina D.V., Morozov S.Y. and Baulcombe D.C. (2005). Cell-to-cell movement of Potato Potexvirus X is dependent on suppression of RNA silencing. *The Plant Journal*, *44(3)*, 471-482.

Bednarek, P. (2012). Chemical warfare or modulators of defence responses – the function of secondary metabolites in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, *15(4)*, 407-414.

Belhaj K., Chaparro-Garcia A., Kamoun S. and Nekrasov V. (2013). Plant genome editing made easy: targeted mutagenesis in model and crop plants using the CRISPR/Cas system. *Plant Methods*, *9(1)*, 39.

Beliën T., Van Campenhout S., Robben J. and Volckaert G. (2006). Microbial Endoxylanases: Effective Weapons to Breach the Plant Cell-Wall Barrier or, Rather, Triggers of Plant Defense Systems?, *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *19(10)*, 1072-1081.

Bendahmane A., Kanyuka K. and Baulcombe D.C. (1999). The Rx Gene from Potato Controls Separate Virus Resistance and Cell Death Responses. *The Plant Cell*, *11(5)*, 781-792.

Bent A. F. and Mackey D. (2007). Elicitors, effectors, and R genes: The new paradigm and a lifetime supply of questions. *Annual Review of Phytopathology*, *45*, 399-436.

Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M. and Hannon G. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, *409(6818)*, 363-366.

Bivalkar-Mehla S., Vakharia J., Mehla R., Abreha M., Kanwar J.R., Tikoo A. and Chauhan A. (2011). Viral RNA silencing suppressors (RSS): Novel strategy of viruses to ablate the host RNA interference (RNAi) defense system. *Virus Research*, *155(1)*, 1-9.

Blanc S., Uzest M. and Drucker M. (2011). New research horizons in vector-transmission of plant viruses. *Current Opinion in Microbiology*, *14(4)*, 483-491.

Boller T. and Felix G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual Review in Plant Biology*, *60*, 379-406.

Bologna N.G. and Voinnet O. (2014). The Diversity, Biogenesis, and Activities of Endogenous Silencing Small RNAs in Arabidopsis. *Annual Review of Plant Biology*, *65(1)*, 473-503.

Bortolamiol D., Pazhouhandeh M., Marrocco K., Genschik P. and Ziegler-Graff V. (2007). The Polerovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Current Biology*. *17*, 1615-1621.

Bouarab K., Melton R., Peart J., Baulcombe D. and Osbourn A. (2002). A saponin-detoxifying enzyme mediates suppression of plant defences. *Nature*, *418*, 889-892.

Brigneti G., Voinnet O., Li W.X., Ji L.H., Ding S.W. and Baulcombe D. (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO Journal*, *17(22)*, 6739-6746.

Bucher E., Lohuis D., van Poppel P.M.J.A., Geerts-Dimitriadou C., Goldbach R. and Prins M. (2006). Multiple virus resistance at a high frequency using a single transgene construct. *Journal of General Virology*, *87(12)*, 3697-3701.

Buck K. W. (1999). Replication of tobacco mosaic virus RNA. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, *354(1383)*, 613-627.

Chellappan P., Vanitharani R. and Fauquet C.M. (2005). MicroRNA-binding viral protein interferes with Arabidopsis development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. *102(29)*, 10381-10386.

Chen H.Y., Yang J., Lin C. and Yuan Y.A. (2008). Structural basis for RNA-silencing suppression by Tomato aspermy virus protein 2b. *EMBO Rep*, *9(8)*, 754-760.

Cheng C.P., Jaag H.M., Jonczyk M., Serviene E. and Nagy P.D. (2007). Expression of the Arabidopsis Xrn4p 5'-3' exoribonuclease facilitates degradation of tombusvirus RNA and promotes rapid emergence of viral variants in plants. *Virology*, *368(2)*, 238-248.

Chinchilla D., Shan L., He P., de Vries S. and Kemmerling B. (2009). One for all: the receptor-associated kinase BAK1. *Trends in Plant Science*, *14(10)*, 535-541.

Chisholm S.T., Coaker G., Day B. and Staskawicz B.J. (2006). Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell*, *124*, 803-814.

Chiu M.H., Chen I.H., Baulcombe D.C. and Tsai C.H. (2010). The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Molecular Plant Pathology*, *11(5)*, 641-649.

Choi, C.W., Qu F., Ren T., Ye X. and Morris T.J. (2004). RNA silencing-suppressor function of Turnip crinkle virus coat protein cannot be attributed to its interaction with the Arabidopsis protein TIP. *Journal of General Virology*, *85(11)*, 3415-3420.

Chu M. (2000). Genetic dissection of tomato bushy stunt virus p19-protein-mediated host-dependent symptom induction and systemic invasion. *Virology*, *266*, 79-87.

Collier S.M., Hamel L.P. and Moffett P. (2011). Cell Death Mediated by the N-Terminal Domains of a Unique and Highly Conserved Class of NB-LRR Protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *24*(8), 918-931.

Collier S.M. and Moffett P. (2009). NB-LRRs work a "bait and switch" on pathogens. *Trends in Plant Science*, *14*(10), 521-529.

Cordelier S., de Ruffray P., Fritig B. and Kauffmann S. (2003). Biological and molecular comparison between localized and systemic acquired resistance induced in tobacco by a *Phytophthora megasperma* glycoprotein elicitor. *Plant Molecular Biology*, *51*(1), 109-118-118.

Covey S.N. (1997). Plants combat infection by gene silencing. *Nature*, *385*, 781-782.

Csorba T., Bovi A., Dalmay T. and Burgyan J. (2007). The p122 subunit of Tobacco Mosaic Virus replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA- and microRNA-mediated pathways. *Journal of Virology*, *81*, 11768-11780.

Csorba T., Lozsa R., Hutvagner G. and Burgyan J. (2010). Poliovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1. *The Plant Journal*, *62*, 463-472.

Dalmay T. (1993). Functional analysis of tobacco ringspot virus genome. *Virology*, *194*, 697-704.

Deleris A., Gallego-Bartolome J., Bao J., Kasschau K., Carrington J. and Voinnet O. (2006). Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* *313*, 68-71.

Derrien B., Baumberger N., Schepetilnikov M., Viotti C., De Cillia J., Ziegler-Graff V., Isono E., Schumacher K. and Genschik P. (2012). Degradation of the antiviral component ARGONAUTE1 by the autophagy pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109*(39), 15942-15946.

Ding S.W. and Voinnet O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell*, *130*, 413-426.

Dlakić M. (2006). DUF283 domain of Dicer proteins has a double-stranded RNA-binding fold. *Bioinformatics*, *22*(22), 2711-2714.

Dodds P.N. and Rathjen J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature Review Genetics*, *11*(8), 539-548.

Dreher K. and Callis J. (2007). Ubiquitin, Hormones and Biotic Stress in Plants. *Annals of Botany*, *99*(5), 787-822.

Dunoyer P., Brosnan C.A., Schott G., Wang Y., Jay F., Alioua A., Himber C. and Voinnet O. (2010). An endogenous, systemic RNAi pathway in plants. *EMBO Journal*, *29*, 1699-1712.

Dunoyer P., Lecellier C.H., Parizotto E.A., Himber C. and Voinnet O. (2004). Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *The Plant Cell*, *16*, 1235-1250.

Dunoyer P., Pfeffer S., Fritsch C., Hemmer O., Voinnet O. and Richards K.E. (2002). Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clump virus. *The Plant Journal*, *29*, 555-567.

Dunoyer P., Pfeffer S., Fritsch C., Hemmer O., Voinnet O. and Richards K.E. (2002). Identification, subcellular localization and some properties of a cysteine-rich suppressor of gene silencing encoded by peanut clump virus. *The Plant Journal*, *29*(5), 555-567.

Earley K., Smith M., Weber R., Gregory B. and Poethig R. (2010). An endogenous F-box protein regulates ARGONAUTE1 in *Arabidopsis thaliana*. *Silence*, *1*, 15.

Eggenberger A. L., Hajimorad M.R. and Hill J.H. (2008). Gain of Virulence on Rsv1-Genotype Soybean by an Avirulent Soybean mosaic virus Requires Concurrent Mutations in Both P3 and HC-Pro. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *21*(7), 931-936.

El Oirdi M. and Bouarab K. (2007). Plant signalling components EDS1 and SGT1 enhance disease caused by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *New Phytologist*, *175*(1), 131-139.

El Oirdi M., El Rahman T.A., Rigano L., El Hadrami A., Rodriguez M.C., Daayf F., Vojnov A. and Bouarab K. (2011). *Botrytis cinerea* Manipulates the Antagonistic Effects between Immune Pathways to Promote Disease Development in Tomato. *The Plant Cell*, *23*(6), 2405-2421.

Elbashir S. M., Lendeckel W. and Tuschl T. (2001). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotides RNAs. *Genes Development*, *15*, 188-200.

Ellis J.G., Lawrence G.J., Luck J.E. and Dodds P.N. (1999). Identification of Regions in Alleles of the Flax Rust Resistance Gene L That Determine Differences in Gene-for-Gene Specificity. *The Plant Cell*, *11*(3), 495-506.

Erickson F., Holzberg S., Calderon-Urrea A., Handley V., Axtell M., Corr C. and Baker B. (1999). The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defence response in tobacco. *The Plant Journal*, *18*(1), 67-75.

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), 806-811.

Friedrich L., Vernooij B., Gaffney T., Morse A. and Ryals J. (1995). Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene. *Plant Molecular Biology*, *29*(5), 959-968.

Friedrich L., Vernooij B., Gaffney T., Morse A. and Ryals J. (1995). Characterization of tobacco plants expressing a bacterial salicylate hydroxylase gene. *Plant Molecular Biology*, *29*(5), 959-968.

Fritig B., Heitz F. and Legrand M. (1998). Antimicrobial proteins in induced plant defense. *Current Opinion in Immunology*, *10*(1), 16-22.

Fu Z.Q. and Dong X. (2013). Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annual Review of Plant Biology*, *64*(1), 839-863.

Gallegos-Avila G., Ancer-Rodríguez J., Niderhauser-García A., Ortega-Martínez M. and Jaramillo-Rangel G. (2010). Multinucleation of spermatozoa and spermatids in infertile men chronically exposed to carbofuran. *Reproductive Toxicology*, *29*(4), 458-460.

Galletti R., Denoux C., Gambetta S., Dewdney J., Ausubel F.M., De Lorenzo G. and Ferrari S. (2008). The AtrbohD-Mediated Oxidative Burst Elicited by Oligogalacturonides in *Arabidopsis* Is Dispensable for the Activation of Defense Responses Effective against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiology*, *148*(3), 1695-1706.

Garcia D., Garcia S., Pontier D., Marchais A., Renou J.P., Lagrange T. and Voinnet O. (2012). Ago Hook and RNA Helicase Motifs Underpin Dual Roles for SDE3 in Antiviral Defense and Silencing of Nonconserved Intergenic Regions. *Molecular Cell*, *48*(1), 109-120.

Ghazala W. and Varrelmann M. (2007). Tobacco rattle virus 29K Movement Protein Is the Elicitor of Extreme and Hypersensitive-like Resistance in Two Cultivars of *Solanum tuberosum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *20*(11), 1396-1405.

Gilchrist D.G. (1998). Programmed Cell Death in Plant Disease: The Purpose and Promise of Cellular Suicide. *Annual Review of Phytopathology*, *36*(1), 393-414.

Glazebrook J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annual Review in Phytopathology*, *43*, 205-227.

Glazebrook J., Chen W., Estes B., Chang H.S., Nawrath C., Métraux J.P., Zhu T. and Katagiri F. (2003). Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *The Plant Journal*, *34*(2), 217-228.

Gorse I. and Balg C. (2013). Bilan des ventes de pesticides au Québec pour l'année 2010. 978-2-550-68141-0.

Govrin E.M. and Levine A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology*, *10*(13), 751-757.

Granado J., Felix G. and Boller T. (1995). Perception of Fungal Sterols in Plants Subnanomolar Concentrations of Ergosterol Elicit Extracellular Alkalinization in Tomato Cells. *Plant Physiology*, *107*(2), 485-490.

Guo M., Tian F., Wamboldt Y. and Alfano J.R. (2009). The Majority of the Type III Effector Inventory of *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 Can Suppress Plant Immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *22*(9), 1069-1080.

Halim V.A., Altmann S., Ellinger D., Eschen-Lippold D., Miersch O., Scheel D. and Rosahl S. (2009). PAMP-induced defense responses in potato require both salicylic acid and jasmonic acid. *The Plant Journal*, *57*(2), 230-242.

Hamilton A., Voinnet O., Chappell L. and Baulcombe D.C. (2002). Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO Journal*, *21*(17), 4671-4679.

Hamilton A.J. and Baulcombe D.C. (1999). A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science*, *286*(5441), 950-952.

Hammond S.M., Bernstein E., Beach E. and Hannon G.J. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, *404*(6775), 293-296.

Harvey J.J., Lewsey M.G., Patel K., Westwood J., Heimstadt S., Carr J.P and Baulcombe D.C. (2011). An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS One*, *6*, e14639.

Hemmes H., Lakatos L., Goldbach R., Burgyán J. and Prins M. (2007). The NS3 protein of Rice hoja blanca tenuivirus suppresses RNA silencing in plant and insect hosts by efficiently binding both siRNAs and miRNAs. *RNA*, *13*(7), 1079-1089.

Henderson I.R., Zhang X., Lu C., Johnson L., Meyers B.C., Green P.J. and Jacobsen S.E. (2006). Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nature Genetics*, *38*(6), 721-725.

Himber C., Dunoyer P., Moissiard G., Ritzenthaler C. and Voinnet O. (2003). Transitivity-dependent and -independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *EMBO Journal*, *22*, 4523-4533.

Horsh R.B., Fry J.E., Hoffman N.L., Eichholtz D., Rogers S.G. and Fraley R.T. (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, *227*, 1229-1231.

Hou S., Yang Y., Wu D. and Zhang C. (2011). Plant immunity: Evolutionary Insights from PBS1, Pto, and RIN4. *Plant Signaling & Behavior*, *6*(6), 794-799.

Huckelhoven R. (2007). Cell wall-associated mechanisms of disease resistance and susceptibility. *Annual Review in Phytopathology*, *(45)*, 101-127.

Infante-Rivard C. and Weichenthal S. (2007). Pesticides and Childhood Cancer: An Update of Zahm and Ward's 1998 Review. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, *10*(1), 81-99.

Jaubert M., Bhattacharjee S., Mello A.F.S., Perry K.L. and Moffett P. (2011). ARGONAUTE2 Mediates RNA-Silencing Antiviral Defenses against Potato virus X in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *156*(3), 1556-1564.

Jay F., Wang Y., Yu A., Taconnat L., Pelletier S., Colot V., Renou J.P. and Voinnet O. (2011). Misregulation of AUXIN RESPONSE FACTOR 8 underlies the developmental abnormalities caused by three distinct viral silencing suppressors in Arabidopsis. *PLoS Pathogens*, *7*, e1002035.

Ji L.H. and Ding S.W. (2001). The Suppressor of Transgene RNA Silencing Encoded by Cucumber mosaic virus Interferes with Salicylic Acid-Mediated Virus Resistance. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *14*(6), 715-724.

Jones J.D. and Dangl J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*, *444*, 323-329.

Jouannet, V., Moreno A.B., Elmayan T., Vaucheret H., Crespi M., and Maizel A. (2012). Cytoplasmic Arabidopsis AGO7 accumulates in membrane-associated siRNA bodies and is required for ta-siRNA biogenesis. *EMBO Journal*, *31*, 1704-1713.

Kang B.C., Yeam I. and Jahn M.M. (2005). Genetics of Plant Virus Resistance, *Annual Review in Phytopathology*, *43*, 581-621.

Katiyar-Agarwal S. and Jin H. (2010). Role of Small RNAs in Host-Microbe Interactions. *Annual Review Phytopathology*, *48*, 225–246.

Katiyar-Agarwal S., Morgan R., Dahlbeck D., Borsani O., Villegas A., Zhu J.K., Staskawicz B.J. and Jin H. (2006). A pathogen-inducible endogenous siRNA in plant immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(47), 18002-18007.

Katiyar-Agarwal S. and Jin H. (2007). Discovery of Pathogen-Regulated Small RNAs in Plants. *Methods in Enzymology*, *427*, 215-227.

Kim M.G., Geng X., Lee S.Y. and Mackey D. (2009). The *Pseudomonas syringae* type III effector AvrRpm1 induces significant defenses by activating the Arabidopsis nucleotide-binding leucine-rich repeat protein RPS2. *The Plant Journal*, *57(4)*, 645-653.

Knoester M., van Loon L.C., van den Heuvel J., Hennig J., Bol J.F. and Linthorst H.J.M. (1998). Ethylene-insensitive tobacco lacks nonhost resistance against soil-borne fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *95(4)*, 1933-1937.

Koornneef A., Verhage A., Leon-Reyes A., Snetselaar R., Van Loon L.C. and Pieterse C.M.J. (2008). Towards a reporter system to identify regulators of cross-talk between salicylate and jasmonate signaling pathways in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*, *3(8)*, 543-546.

Kopp E. and Medzhitov R. (2003). Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology*, *15(4)*, 396-401.

Koutros S., Beane Freeman L.E., Berndt S.I., Andreotti G., Lubin J.H., Sandler S.D., Hoppin J.A., Yu K., Li Q., Burdette L.A., Yuenger J., Yeager M. and Alavanja M.C.R. (2010). Pesticide Use Modifies the Association Between Genetic Variants on Chromosome 8q24 and Prostate Cancer. *Cancer Research*, *70(22)*, 9224-9233.

Kuang H., Padmanabhan C., Li F., Kamei A., Bhaskar P.B., Ouyang S., Jiang J., Buell C.R. and Baker B. (2009). Identification of miniature inverted-repeat transposable elements (MITEs) and biogenesis of their siRNAs in the Solanaceae: New functional implications for MITEs. *Genome Research*, *19(1)*, 42-56.

Kumagai M.H., Donson J., della-Cioppa G., Harvey D., Hanley K. and Grill K.L. (1995). Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *92(5)*, 1679-1683.

Kumar R. (2014). Role of MicroRNAs in Biotic and Abiotic Stress Responses in Crop Plants. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *174(1)*, 93-115.

Lakatos L., Csorba T., Pantaleo V., Chapman E., Carrington J., Liu Y., Dolja V., Calvino L., Lopez-Moya L. and Burgyan J. (2006). Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO Journal*, *25*, 2768-2780.

Lakatos L., Szittyá G., Silhavy D. and Burgyan J. (2004). Molecular mechanism of RNA silencing suppression mediated by p19 protein of tombusviruses. *EMBO Journal*, *23*, 876-884.

Lamb C. and Dixon R.A. (1997). The oxydative burst in plant disease resistance. Review in *Plant Physiology*, *48*, 251-275.

Leon-Reyes A., Spoel S.H., De Lange E.S., Abe H., Kobayashi M., Tsuda S., Millenaar F.F., Welschen R.A.M., Ritsema T. and Pieterse J.M.J. (2009). Ethylene Modulates the Role of NONEXPRESSOR OF PATHOGENESIS-RELATED GENES1 in Cross Talk between Salicylate and Jasmonate Signaling. *Plant Physiology*, *149(4)*, 1797-1809.

Leon-Reyes A., Van der Does D., De Lange E., Delker C., Wasternack C., Van Wees S.M., Ritsema T. and Pieterse C.J. (2010). Salicylate-mediated suppression of jasmonate-responsive gene expression in Arabidopsis is targeted downstream of the jasmonate biosynthesis pathway. *Planta*, *232(6)*, 1423-1432.

Li F., Pignatta D., Bendix C., Brunkard J.O., Cohn M.M., Tung J., Sun H., Kumar P. and Baker B. (2012). MicroRNA regulation of plant innate immune receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *109(5)*, 1790-1795.

Li H., Lucy A., Guo H., Li W., Ji L., Wong S. and Ding S. (1999). Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *EMBO Journal*, *18*, 2683-2691.

Li H.W., Lucy A.P., Guo H.S., Li W.X., Ji L.H., Wong S.M. and Ding S.W. (1999). Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defense mechanism. *EMBO Journal*, *18(10)*, 2683-2691.

Li J., Ding J., Zhang W., Zhang Y., Tang P., Chen J.Q., Tian D. and Yang S. (2010). Unique evolutionary pattern of numbers of gramineous NBS–LRR genes. *Molecular Genetics and Genomics*, *283(5)*, 427-438.

Liu Y., Schiff M. and Dinesh-Kumar S.P. (2002). Virus-induced gene silencing in tomato. *The Plant Journal*, *31(6)*, 777-786.

Liu J., Elmore J.M., Fuglsang A.T., Palmgren M.G., Staskawicz B.J. and Coaker G. (2009). RIN4 Functions with Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPases to Regulate Stomatal Apertures during Pathogen Attack. *PLoS Biology* *7(6)*: e1000139.

Mackey D., Belkhadir Y., Alonso J.M., Ecker J.R. and Dangl J.L. (2003). Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates RPS2-mediated resistance. *Cell*, *112*, 379-389.

Mackey D., Holt B.F., Wiig A. and Dangl J.L. (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated disease resistance in Arabidopsis. *Cell*, *108*, 743-754.

Malinovsky F.G., Fangel J.U. and Willats W.G.T. (2014). The role of the cell wall in plant immunity. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 178.

Mallory A., Hinze A., Tucker M., Bouche N., Gascioli V., Elmayer T., Laressergues D., Jauvion V., Vaucheret H. and Laux T. (2009). Redundant and specific roles of the ARGONAUTE proteins AGO1 and ZLL in development and small RNA-directed gene silencing. *PLoS Genetics*, *5*, e1000646.

Mallory A. and Vaucheret H. (2009). ARGONAUTE 1 homeostasis invokes the coordinate action of the microRNA and siRNA pathways. *EMBO Report*, *10*, 521-526.

Mallory A. and Vaucheret H. (2010). Form, Function, and Regulation of ARGONAUTE Proteins. *The Plant Cell*, *22(12)*, 3879-3889.

Margis R., Fusaro A.F., Smith N.A., Curtin S.J., Watson J.M, Finnegan R. and Waterhouse P.M. (2006). The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Letters*, *580(10)*, 2442-2450.

Mari-Ordonez A., Marchais A., Etcheverry M., Martin A., Colot V. and Voinnet O. (2013). Reconstructing de novo silencing of an active plant retrotransposon. *Nature Genetics*, *45(9)*, 1029-1039.

Merai Z., Kerenyi Z., Kertesz S., Magna M., Lakatos L. and Silhavy D. (2006). Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *Journal of Virology*, *80*, 5747-5756.

Metraux J.P., Serrano M., Torres M., Coluccia F. and L'Haridon F. (2014). The cuticle and plant defense to pathogens. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 274.

Meyers B. C., Kozik A., Griego A., Kuang H. and Michelmore R.W. (2003). Genome-Wide Analysis of NBS-LRR-encoding Genes in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *15(4)*, 809-834.

Monaghan, J. and Zipfel C. (2012). Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current Opinion in Plant Biology*, *15(4)*, 349-357.

Montgomery T.A., Howell M.D., Cuperus J.T., Li D., Hansen J.E., Alexander A.L., Chapman E.J., Fahlgren N., Allen E. and Carrington J.C. (2008). Specificity of ARGONAUTE7-miR390 Interaction and Dual Functionality in TAS3 Trans-Acting siRNA Formation. *Cell*, *133(1)*, 128-141.

Morozov S.Y., Miroshnichenko N.A., Solovyev A.G., Fedorkin O.N., Zelenina D.A., Lukasheva L.I., Karasev A.V., Dolja V.V. and Atabekov J.G. (1991). Expression Strategy of the Potato Virus X Triple Gene Block. *Journal of General Virology*, *72(8)*, 2039-2042.

Mur L.A.J., Kenton P., Lloyd A.J., Ougham H. and Prats E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *Journal of Experimental Botany*, *59(3)*, 501-520.

Muthamilarasan M. and Prasad M. (2013 ). Plant innate immunity: An updated insight into defense mechanism. *Journal of Bioscience*, *38(2)*, 433–449.

Ménard R., Alban S., de Ruffray P., Jamois F., Franz G., Fritig B., Yvin J.C. and Kauffmann S. (2004).  $\beta$ -1,3 Glucan Sulfate, but Not  $\beta$ -1,3 Glucan, Induces the Salicylic Acid Signaling Pathway in Tobacco and Arabidopsis. *The Plant Cell*, *16(11)*, 3020-3032.

Mérai Z., Kerényi Z., Molnar A., Barta E. , Válóczy A., Bisztray G., Havelda Z., Burgyán J. and Silhavy D. (2005). Aureusvirus P14 Is an Efficient RNA Silencing Suppressor That Binds Double-Stranded RNAs without Size Specificity. *Journal of Virology*, *79(11)*, **7217-26**.

Nagy P.D., Barajas D. and Pogany J. (2012). Host factors with regulatory roles in tombusvirus replication. *Current Opinion in Virology*, *2(6)*: 691-698.

Nakahara K.S. and Masuta C. (2014). Interaction between viral RNA silencing suppressors and host factors in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, *20(0)*, 88-95.

Navarro L., Dunoyer P., Jay F., Arnold B., Dharmasiri N., Estelle M., Voinnet O. and Jones J.D.G. (2006). A Plant miRNA Contributes to Antibacterial Resistance by Repressing Auxin Signaling. *Science*, *312(5772)*, 436-439.

- Navarro L., Jay F., Nomura K., He S.Y. and Voinnet O. (2008). Suppression of the MicroRNA Pathway by Bacterial Effector Proteins. *Science*, *321(5891)*, 964-967.
- Newman M.A., Von Roepenack E., Daniels M. and Dow M. (2000). Lipopolysaccharides and plant responses to phytopathogenic bacteria. *Molecular Plant Pathology*, *1(1)*: 25-31.
- Nielsen L.K., Cook D.J., Edwards S.G. and Ray R.V. (2014). The prevalence and impact of Fusarium head blight pathogens and mycotoxins on malting barley quality in UK. *International Journal of Food Microbiology*, *179(0)*, 38-49.
- Oh H.S., Park D.H. and Collmer A. (2010). Components of the *Pseudomonas syringae* Type III Secretion System Can Suppress and May Elicit Plant Innate Immunity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *23(6)*, 727-739.
- Oh J.W., Kong Q., Song C., Carpenter C.D. and Simon A.E. (1995). Open reading frames of turnip crinkle virus involved in satellite symptom expression and incompatibility with *Arabidopsis thaliana* ecotype Dijon. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *8(6)*, 979-987.
- Omarov R., Sparks K., Smith L., Zindovic J. and Scholthof H.B. (2006). Biological Relevance of a Stable Biochemical Interaction between the Tombusvirus-Encoded P19 and Short Interfering RNAs. *The Journal of Virology*, *80(6)*, 3000-3008.
- Osbourn A.E. (1996). Preformed Antimicrobial Compounds and Plant Defense against Fungal Attack. *The Plant Cell*, *8(10)*, 1821-1831.
- Osman T.A. and Buck K.W. (1997). The tobacco mosaic virus RNA polymerase complex contains a plant protein related to the RNA-binding subunit of yeast eIF-3. *Journal of Virology* *71(8)*, 6075-6082.

Papp I., Mette M.F., Aufsatz W., Daxinger L., Schauer S.E., Ray A., van der Winden J., Matzke M. and Matzke A.J.M. (2003). Evidence for Nuclear Processing of Plant Micro RNA and Short Interfering RNA Precursors. *Plant Physiology*, *132*(3), 1382-1390.

Peart J.R., Cook G., Feys J.B., Parker J.E. and Baulcombe D.C. (2002). An EDS1 orthologue is required for N-mediated resistance against tobacco mosaic virus. *The Plant Journal*, *29*(5), 569-579.

Pontes O., Li C.F., Nunes P.C., Haag J., Ream T., Vitins A., Jacobsen S.E. and Pikaard C.S. (2006). The Arabidopsis Chromatin-Modifying Nuclear siRNA Pathway Involves a Nucleolar RNA Processing Center. *Cell*, *126*(1), 79-92.

Qiao Y., Liu L., Xiong Q., Flores C., Wong J., Shi J., Wang X., Liu X., Xiang Q., Jiang S., Zhang F., Wang Y., Judelson H.S., Chen X. and Ma W. (2013). Oomycete pathogens encode RNA silencing suppressors. *Nature Genetics*, *45*(3), 330-333.

Qiu W.P. (2002). Tombusvirus P19-mediated suppression of virus induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *15*, 269-280.

Qu F., Ye X. and Morris J.T. (2008). Arabidopsis DRB4, AGO1, AGO7, and RDR6 participate in a DCL4-initiated antiviral RNA silencing pathway negatively regulated by DCL1. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, *105*, 14732-14737.

Qureshi M.I., Qadir S. and Zolla L. (2007). Proteomics-based dissection of stress-responsive pathways in plants. *Journal of Plant Physiology*, *164*(10), 1239-1260.

Rairdan G.J., Collier S.M., Sacco M.A., Baldwin T.T., Boettrich T. and Moffett P. (2008). The Coiled-Coil and Nucleotide Binding Domains of the Potato Rx Disease Resistance Protein Function in Pathogen Recognition and Signaling. *The Plant Cell*, *20*(3), 739-751.

- Rairdan G.J. and Moffett P. (2006). Distinct Domains in the ARC Region of the Potato Resistance Protein Rx Mediate LRR Binding and Inhibition of Activation. *The Plant Cell*, *18*(8), 2082-2093.
- Ratcliff F., Harrison B.D. and Baulcombe D.C. (1997). A Similarity Between Viral Defense and Gene Silencing in Plants. *Science*, *276*(5318), 1558-1560.
- Reed J.C., Kasschau K.D., Prokhnovsky A.I., Gopinath K., Pogue J.P., Carrington J.C. and Dolja V.V. (2003). Suppressor of RNA silencing encoded by Beet yellows virus. *Virology*, *306*(2), 203-209.
- Ren T., Qu F. and Morris T.J. (2000). HRT Gene Function Requires Interaction between a NAC Protein and Viral Capsid Protein to Confer Resistance to Turnip Crinkle Virus. *The Plant Cell*, *12*(10), 1917-1925.
- Richard Y. and Giroux I. (2004). Impacte de l'agriculture sur les communautés benthiques et piscicoles du ruisseau St-Georges, ENV/2004/0226.
- Rivas S. and Thomas C.M. (2005). Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Annual Review of Phytopathology*, *43*, 395-436.
- Robert-Seilaniantz A., Grant M. and Jones J.G.D. (2011). Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just JASMONATE-SALICYLATE Antagonism. *Annual Review of Phytopathology*, *49*(1), 317-343.
- Rogers E.E., Glazebrook J. and Ausubel F.M. (1996). Phytoalexin-Deficient Mutants of *Arabidopsis* Reveal That Pad4 Encodes a Regulatory Factor and That Four Pad Genes Contribute to Downy Mildew Resistance, *Genetics*, *9*(8), 748-757.
- Roossinck M.J. (2012). Plant Virus Metagenomics: Biodiversity and Ecology. *Annual Review of Genetics*, *46*(1), 359-369.

Roossinck M.J. (2013). Plant Virus Ecology. *PLoS Pathogens*, *9*(5), e1003304.

Roossinck M.J. and Stobbe A. (2014). Plant Virus Metagenomics: What We Know and Why We Need to Know More. *Frontiers in Plant Science*, *5*, 150.

Ruiz-Ferrer V. and Voinnet O. (2009). Roles of Plant Small RNAs in Biotic Stress Responses. *Annual Review of Plant Biology*, *60*, 485-510.

Sansregret R., Dufour V., Langlois M., Daayf F., Dunoyer P., Voinnet O. and Bouarab K. (2013). Extreme Resistance as a Host Counter-counter Defense against Viral Suppression of RNA Silencing. *PLoS Pathogens*, *9*(6), e1003435.

Santibanez M., Vioque J., Alguacil J., de la Hera M., Moreno-Osset E., Carrato A., Porta M. and Kauppinen T. (2010). Occupational exposures and risk of pancreatic cancer. *European Journal of Epidemiology*, *25*(10), 721-730.

Scholthof H.B., Scholthof K.B. and Jackson A. (1995). Identification of tomato bushy stunt virus host-specific symptom determinants by expression of individual genes from a potato virus X vector. *The Plant Cell*, *7*, 1157-1172.

Scholthof H.B. (1995). Tomato bushy stunt virus spread is regulated by two nested genes that function in cell-to-cell movement and host-dependent systemic invasion. *Virology*, *213*, 425-438.

Scholthof H.B. (2006). The Tombusvirus-encoded P19: from irrelevance to elegance. *Nature Reviews Microbiology*, *4*(5), 405-411.

Scholthof H.B., Alvarado V.Y., Vega-Arreguin J.C., Ciomperlik J., Odokonyero D., Brosseau C., Jaubert M., Zamora A. and Moffett P. (2011). Identification of an ARGONAUTE for Antiviral RNA Silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiology*, *156*(3), 1548-1555.

Schott G., Mari-Ordonez A., Himber C., Alioua A., Voinnet O. and Dunoyer P. (2012). Differential effects of viral silencing suppressors on siRNA and miRNA loading support the existence of two distinct cellular pools of ARGONAUTE1. *EMBO Journal*, *31(11)*, 2553-2565.

Schuck J., Gursinsky T., Pantaleo V., Burgyán J. and Behrens S.E. (2013). AGO/RISC-mediated antiviral RNA silencing in a plant in vitro system. *Nucleic Acids Research*, *41(9)*, 5090-5103.

Shivaprasad P.V., Chen H.M., Patel K., Bond D.M., Santos B.A.C.M. and Baulcombe D.C. (2012). A MicroRNA Superfamily Regulates Nucleotide Binding Site–Leucine-Rich Repeats and Other mRNAs. *The Plant Cell Online*, *24(3)*, 859-874.

Silhavy D. (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO Journal*, *21*, 3070-3080.

Silhavy D., Molnar A., Lucioli A., Szittya G., Hornyik C., Tavazza M. and Burgyan J. (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO Journal*, *21*, 3070-3080.

So Young Y., Ken S., Jae Sun M., Lee S.G. and Kwon S.Y. (2014). The activated SA and JA Signaling pathways have an influence in flg22-triggered oxidative burst and callose deposition. *PloS ONE*, *9(2)*, e88951.

Tameling W.I.L. and Baulcombe D.C. (2007). Physical Association of the NB-LRR Resistance Protein Rx with a Ran GTPase–Activating Protein Is Required for Extreme Resistance to Potato virus X. *The Plant Cell*, *19(5)*, 1682-1694.

Tellier S. (2006). Les pesticides en milieu agricole : état de la situation environnementale et initiatives prometteuses. ISBN –13:978-2-550-48224-6: p90.

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*(1), 33-41.

Torres M.A., Jones J.D.G. and Dangl J.L. (2006). Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *Plant Physiology*, *141*(2), 373-378.

Truman W., Bennett M.H., Kubigsteltig I., Turnbull C. and Grant M. (2007). Arabidopsis systemic immunity uses conserved defense signaling pathways and is mediated by jasmonates. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *104*(3), 1075-1080.

Tsuda K. and Katagiri F. (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, *13*(4), 459-465.

Van der Does D., Leon-Reyes A., Koornneef A., Van Verk M.C., Rodenburg N., Pauwels L., Goossens A., Körbes A.S., Memelink J., Ritsema T., Van Wees S.C.M. and Pieterse C.M.J. (2013). Salicylic Acid Suppresses Jasmonic Acid Signaling Downstream of SCFCO11-JAZ by Targeting GCC Promoter Motifs via Transcription Factor ORA59. *The Plant Cell*, *25*(2), 744-761.

van Doorn W.G., Beers E.P., Dangl J.L., Franklin-Tong V.E., Gallois P., Hara-Nishimura I., Jones A.M., Kawai-Yamada M., Lam E., Mundy J., Mur L.A.J., Petersen M., Smertenko A., Taliansky M., Van Breusegem F., Wolpert T., Woltering E., Zhivotovsky B. and Bozhkov P.V. (2011). Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation*, *18*(8), 1241-1246.

van Esse H.P., Bolton M.D., Stergiopoulos I., de Wit P.J.M. and Thomma B.P.H.J. (2007). The Chitin-Binding *Cladosporium fulvum* Effector Protein Avr4 Is a Virulence Factor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *20*(9), 1092-1101.

Van Loon L.C., Rep M. and Pieterse C.M.J. (2006). Significance of inducible defense related protein in infected plants. *Annual Review of Phytopathology*, *44*(1), 135-162.

Varallyay E., Valoczi A., Agyi A., Burgyan J. and Havelda Z. (2010). Plant virus-mediated induction of miR168 is associated with repression of ARGONAUTE1 accumulation. *EMBO Journal*, *29(20)*, 3507-3519.

Vargason J., Szittyá G., Burgyan J. and Tanaka Hall T. (2003). Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell*, *115*, 799-811.

Vaucheret H. (2009). AGO1 homeostasis involves differential production of 21-nt and 22-nt miR168 species by MIR168a and MIR168b. *PLoS One*, *4*, e6442.

Vaucheret H., Mallory A. and Bartel D. (2006). AGO1 homeostasis entails coexpression of MIR168 and AGO1 and preferential stabilization of miR168 by AGO1. *Molecular Cell*, *22*, 129-136.

Verchot J., Angell S.M. and Baulcombe D.C. (1998). In Vivo Translation of the Triple Gene Block of Potato Virus X Requires Two Subgenomic mRNAs. *Journal of Virology*, *72(10)*, 8316-8320.

Voinnet, O. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proceeding of the National Academy of Science USA*, *96*, 14147-14152.

Voinnet, O. (2009). Origin, biogenesis, and activity of plant microRNAs. *Cell*, *136*, 669-687.

Voinnet O., Lederer C. and Baulcombe D.C. (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell*, *103*, 157-167.

Voinnet O., Pinto Y.M. and Baulcombe D.C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses. *Proceeding of the National Academy of Science USA*, *96*, 14146-14152.

Voinnet O., Rivas S., Mestre P. and Baulcombe D.C. (2003). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *The Plant Journal*, *33*(5), 949-956.

Várallyay É., Oláh E. and Havelda Z. (2014). Independent parallel functions of p19 plant viral suppressor of RNA silencing required for effective suppressor activity. *Nucleic Acids Research*, *42*(1), 599-608.

Wang L.Y., Lin S.S., Hung T.H., Li T.K., Lin N.C. and Shen T.L. (2012). Multiple Domains of the Tobacco mosaic virus p126 Protein Can Independently Suppress Local and Systemic RNA Silencing. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *25*(5), 648-657.

Wang X.B., Jovel J., Udornporn P., Wang Y., Wu Q., Li W.X., Gascioli V., Vaucheret H. and Ding S.V. (2011). The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, *23*, 1625-1638.

Wassenegger M. and Krczal G. (2006). Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends in Plant Science*, *11*(3), 142-151.

Waterhouse P.M., Wang M.B. and Lough T. (2001). Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature*, *411*(6839), 834-842.

Wen R.H., Khatabi B., Ashfield T., Maroof M.A.S. and Hajimorad M.R. (2013). The HC-Pro and P3 Cistrons of an Avirulent Soybean mosaic virus Are Recognized by Different Resistance Genes at the Complex Rsv1 Locus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *26*(2), 203-215.

Yang S., Feng Z., Zhang X., Jiang K., Jin X., Hang J., Chen J.Q. and Tian D. (2006). Genome-wide investigation on the genetic variations of rice disease resistance genes. *Plant Molecular Biology*, *62*(1-2), 181-193.

Ye K., Malinina L. and Patel D.J. (2003). Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature*, *426*(6968), 874-878.

Zhai J., Jeong D.H., De Paoli E., Park S., Rosen B.D., Li Y., González A.J., Yan Z., Kitto S.L., Grusak M.A., Jackson S.A., Stacey G., Cook D.R., Green P.J., Sherrier D.J. and Meyers B.C. (2011). MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Genes & Development*, *25*(23), 2540-2553.

Zhang C., Czymbek K.J. and Shapiro A.D. (2003). Nitric oxide Does Not Trigger Early Programmed Cell Death Events but May Contribute to Cell-to-Cell Signaling Governing Progression of the Arabidopsis Hypersensitive Response. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *16*(11), 962-972.

Zhang X., Zhao H., Gao S., Wang W.C., Katiyar-Agarwal S., Huang H.D., Raikhel N. and Jin H. (2011). Arabidopsis Argonaute 2 Regulates Innate Immunity via miRNA393\*-Mediated Silencing of a Golgi-Localized SNARE Gene, MEMB12. *Molecular Cell*, *42*(3), 356-366.

Zhang Y., Jiang W.K. and Gao L.Z. (2011). Evolution of MicroRNA Genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana*: An Update of the Inverted Duplication Model. *PLoS ONE*, *6*(12), e28073.

Zhao Y., DelGrosso L., Yigit E., Dempsey D.A., Klessig D.F. and Wobbe K.K. (2000). The amino terminus of the coat protein of Turnip crinkle virus is the AVR factor recognized by resistant arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *13*(9), 1015-1018.

Zhou J., Wu S., Chen X., Liu C., Sheen J., Shan L. and He P. (2014). The *Pseudomonas syringae* effector HopF2 suppresses *Arabidopsis* immunity by targeting BAK1. *The Plant Journal*, *77*(2), 235-245.

Zhu F., Xi D.H., Deng X.G., Peng X.J., Tang H., Chen Y.J., Jian W., Feng H. and Lin H.H. (2014). Chilli Veinal Mottle Virus Regulates Expression of the Tobacco Mosaic Virus Resistance Gene N and Jasmonic Acid/Ethylene Signaling Is Essential for Systemic Resistance Against Chilli Veinal Mottle Virus in Tobacco. *Plant Molecular Biology Reporter*, *32*(2), 382-394.

Zipfel C. (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, *12*(4), 414-420.

Zvereva A.S. and Pooggin M.M. (2012). Silencing and Innate Immunity in Plant Defense Against Viral and Non-Viral Pathogens. *Viruses*, *4*(11), 2578-2597.

