



**IDENTIFICATION D'ÉCOTYPES SENSIBLES D'*ARABIDOPSIS THALIANA* AUX  
VIROÏDES ET CARACTÉRISATION GÉNIQUE**

par

**Matthieu Glanowski**

Mémoire présenté au Département de biologie en vue  
de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, décembre 2020

Le 24 décembre 2020

Le jury a accepté le mémoire de Monsieur Matthieu Glanowski  
dans sa version finale

Membres du jury

Professeur Peter Moffett  
Directeur de recherche  
Département de biologie  
Université de Sherbrooke

Professeure Pascale Beauregard  
Présidente-rapporteur  
Département de biologie  
Université de Sherbrooke

Professeur Daniel Lafontaine  
Évaluateur interne  
Département de biologie  
Université de Sherbrooke

## REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier le professeur Peter Moffett qui m'a offert la possibilité de m'épanouir dans la recherche, l'université de Sherbrooke, le centre Sève et autres organismes de financement. C'est avec le concours de tous ces acteurs que j'ai pu accomplir ma maîtrise.

Merci aux membres de mon comité d'évaluateurs et de conseillers, les professeurs Peter Moffett, Daniel Lafontaine et Pascale Beauregard, qui m'ont aidé lors des moments d'incertitudes qu'apporte la recherche.

J'aimerais remercier tous les membres du laboratoire qui sont devenus des amis avec tout ce temps passé au laboratoire. C'est pour leur aide au quotidien, leurs conseils ainsi que leur soutien plus que crucial si loin de son pays que je souhaite remercier mes amis : Ayooluwa Adurogbangba, Chantal Brosseau, Guilherme Silva Martins, Charles Roussin-Léveillée, Geneviève Clément, Romain Durand, et Teura Barff. Enfin peut-être le plus important de tous, je veux remercier mon frère Simon Glanowski qui est toujours là pour moi, au laboratoire comme dans la vie.

Pour terminer, j'aimerais exprimer ma profonde gratitude à mes parents, Marie-Pierre Glanowski et Frédéric Glanowski, qui m'ont encouragé à traverser le globe pour venir étudier dans cette belle province du Québec. Enfin que dire du soutien au quotidien de Miriam Dussault avec qui j'ai partagé les moments les plus difficiles de la maîtrise comme les plus joyeux.

## SOMMAIRE

Les viroïdes sont des pathogènes très méconnus et découverts récemment en comparaison aux bactéries, champignons ou virus. Ce sont des molécules d'ARN simple brin circulaire, possédant une structure secondaire très complexe et ne codant pour aucune protéine. Ils peuvent se répliquer soit dans le noyau soit dans les chloroplastes des cellules dépendant de leur famille en suivant un mécanisme de réplication en cercle roulant. Les viroïdes sont responsables de maladies ayant des impacts économiques importants sur plusieurs cultures vivrières telles que la tomate, la pomme de terre ou chez des cultures d'arbres fruitiers.

Cependant, la recherche du ou des mécanismes moléculaires rentrant en jeu lors d'une infection avec un viroïde se heurte à un manque de plante modèle. Cet hôte doit avoir un génome connu, facile à étudier en laboratoire et ayant une variabilité génétique vis-à-vis de la susceptibilité face à un pathogène. En effet, le meilleur candidat serait *Arabidopsis thaliana* bien que n'ayant jamais été décrite comme pouvant permettre la réplication systémique de viroïdes lors d'une infection. Cependant, plusieurs études ont démontré que des écotypes différents d'*A. thaliana* ne se comportaient pas tous de la même façon lors d'une infection virale.

Nous avons donc émis l'hypothèse que de même que les virus, une variation naturelle de la sensibilité aux viroïdes peut exister chez *A. thaliana*. À cette fin, nous avons infecté de nombreux écotypes avec trois viroïdes (PSTVd, HSVd et CLVd), puis cherché des symptômes d'infection ou détecté la présence de viroïdes par plusieurs techniques. Ceci a permis d'identifier plusieurs écotypes d'intérêt dans la recherche d'un modèle d'étude des viroïdes. D'autres

expériences chez des lignées transgéniques de *Nicotiana benthamiana* et *Solanum lycopersicum* ont mis en évidence l'importance du gène codant pour la protéine AGO2 et peut-être le rôle de la protéine RDR1. Cette étude montre donc la mise en place d'un modèle d'étude des viroïdes chez *A. thaliana* ainsi que les premières pistes pour un ou des gènes conférant une résistance ou sensibilité aux viroïdes dépendamment de l'allèle ou de l'espèce d'origine de ce gène.

**Mots-clés : Viroïde, Résistance végétale, Lignées transgéniques, Modèle d'étude, Protéines Argonautes.**

# TABLE DES MATIÈRES

<b>CHAPITRE 1 INTRODUCTION .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Les viroïdes : .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Présentation générale sur les viroïdes : .....	1
1.1.2. Présentation des familles de viroïdes et leurs particularités : .....	2
1.1.2.1. Les Avsunviroidae : .....	2
1.1.2.2. Les Pospiviroidae : .....	4
1.1.3. Symptômes et transmission : .....	7
<b>1.2. Introduction à l'ARN interférent (RNA silencing) : .....</b>	<b>9</b>
1.2.1. Introduction aux mécanismes de défense des plantes : .....	9
1.2.2. ARN interférent (RNA silencing) et ses acteurs : .....	10
1.2.2.1. Introduction de l'ARN interférent : .....	10
1.2.2.2. Les protéines Dicer (DCL) : .....	10
1.2.2.3. Les protéines Argonautes (AGO) : .....	13
1.2.2.4. Les protéines RNA-dependent RNA polymérase (RdR) : .....	15
1.2.2.5. Les autres composants du RNA silencing : .....	16

<b>1.3.Introduction aux petits ARN (sRNA) dans le RNA silencing :</b>	<b>17</b>
1.3.1. La voie des micro-ARN (miRNA) et fonction :	17
1.3.2. Les petits ARN interfèrent chez les plantes (siRNA) :	18
1.3.3. La méthylation de l'ADN ARN dépendant (RdDM) :	20
1.3.4. Le mouvement des sRNA :	21
<b>1.4.ARN interférent et virus :</b>	<b>22</b>
1.4.1. L'ARNi dirigé contre les virus :	22
1.4.2. Viral Supressor of RNA silencing :	23
<b>1.5.L'ARN interférent et son interaction avec les viroïdes :</b>	<b>24</b>
1.5.1. Les viroïdes capables de déclencher l'ARNi :	24
1.5.2. Viroïdes et protéines Dicer :	25
1.5.3. Ciblage des viroïdes par le PTGS (cis-PTGS) :	27
1.5.4. Viroïdes et trans-PTGS :	27
1.5.5. Viroïdes et RdDM (RNA-directed DNA methylation) :	28
<b>1.6.Objectifs</b>	<b>30</b>
<b>CHAPITRE 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES</b>	<b>33</b>
<b>2.1. Matériel végétal et condition de croissance</b>	<b>33</b>
<b>2.2. Inoculation des viroïdes et souches utilisées</b>	<b>34</b>



<b>2.3. Détection des viroïdes</b> .....	37
2.3.1. Extraction de l'ARN et RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR) :.....	37
2.3.2. PCR (Polymerase Chain Reaction) :.....	38
2.3.3. PCR en temps réel (RT-qPCR) :.....	39
2.3.4. Northern Blot : .....	40
<b>2.4. Détection des protéines AGO2 (SIAGO2, NbAGO2 et AtAGO2)</b> .....	41
2.4.1. Western Blot :.....	41
2.4.2. Extraction d'ARN, RT-PCR et RT-qPCR :.....	41
2.4.3. Expression transitoire chez <i>Nicotiana benthamiana</i> : .....	42
<b>CHAPITRE 3 RÉSULTATS</b> .....	<b>43</b>
<b>3.1. Criblage des écotypes d'<i>Arabidopsis thaliana</i></b> .....	43
<b>3.2. La détection des viroïdes dans ces écotypes</b> .....	54
<b>3.3. Caractérisation des lignées transgéniques de tomates vis-à-vis de PSTVd</b> ...	56
<b>3.4. Détection des viroïdes dans les différentes lignées</b> .....	61
<b>CHAPITRE 4 DISCUSSION ET CONCLUSION</b> .....	<b>65</b>
<b>CHAPITRE 5 BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>72</b>

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b>	Liste des écotypes présentés dans les différentes figures .....	<b>34</b>
<b>Tableau 2</b>	Amorces PCR et qPCR utilisées .....	<b>38</b>
<b>Tableau 3</b>	Synthèse de l'expérience de criblage des écotypes d' <i>A. thaliana</i> .....	<b>48</b>

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b>	Cycle de réplication des Avsunviroidae en cercle roulant symétrique.....	4
<b>Figure 2</b>	Cycle de réplication des Pospiviroidae via cercle roulant asymétrique.....	5
<b>Figure 3</b>	Hypothèses pour l'origine des symptômes causés par les viroïdes.....	31
<b>Figure 4</b>	Obtention de viroïdes mature à partir de dimères.....	35
<b>Figure 5</b>	Méthode d'infection des plantes pour les viroïdes et virus.....	36
<b>Figure 6</b>	Phénotypes observés lors du premier criblage.....	44
<b>Figure 7</b>	Photo de l'infection de Leb-3 avec PSTVd.....	45
<b>Figure 8</b>	Photo de l'éco-type N°10 (collection de 96 lignées).....	46
<b>Figure 9</b>	Présence de points de nécroses chez l'éco-type N°70.....	47
<b>Figure 10</b>	Phénotype infectieux de l'éco-type N°81.....	48
<b>Figure 11</b>	Résultats de northern Blot pour St-2 infecté avec PSTVd.....	55
<b>Figure 12</b>	Résultats de RT-PCR pour St-2.....	55
<b>Figure 13</b>	Mise en évidence de l'accumulation de PSTVd chez Leb-3.....	56
<b>Figure 14</b>	Représentation de la construction génétique portée par les lignées transgéniques.....	57
<b>Figure 15</b>	Western blot de détection de la protéine AGO2.....	58

<b>Figure 16</b>	Phénotypes d'infections des lignées transgéniques de tomates et de la lignée sauvage (MoneyMaker).....	59
<b>Figure 17</b>	Impact de PSTVd sur des tomates (fruit) WT ou transgéniques.....	60
<b>Figure 18</b>	Résultats PCR des lignées transgéniques pour PSTVd.....	61
<b>Figure 19</b>	Résultats du northern blot pour confirmer la présence de PSTVd mature dans les plants de tomates.....	62
<b>Figure 20</b>	qPCR montrant la résistance des lignées transgéniques à PSTVd.....	63
<b>Figure 21</b>	Résultats qPCR de l'expérience chez <i>N. benthamiana</i> (lignées transgéniques et WT).....	64

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AGO	Protéine Argonaute
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	Système d'ARN interférent
ARNm	Acide ribonucléique messenger
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
CLVd	Columnnea Latent viroid
DCL	Dicer-like protein
DPI	Jour post-inoculation (day post-inoculation)
ETI	Immunité médiée par un effecteur (Effector-Triggered Immunity)
HSVd	Hop Stunt viroid
KO	Knock-Out
L	Litre
miRNA	micro ARN
MgCl <sub>2</sub>	Chlorure de magnésium
mL	Millilitre
mM	Millimolaire
NB	Immunobuvardage de type Northern (northern blot)
<i>Nb</i>	<i>Nicotiana benthamiana</i>
PAMP	Motifs moléculaires associés aux agents pathogènes (Pathogen Associated Molecular Pattern)
pb	Paire de bases
PCR	Réaction de polymérisation en chaîne (Polymerase Chain Reaction)
PSTVd	Potato Spindle Tuber viroid
PTGS	Post-transcriptional gene silencing
PTI	Immunité médiée par les PAMPs (MAMP-Triggered Immunity)
PVX	virus X de la pomme de terre
RdDM	Méthylation de l'ADN dirigé par l'ARN (RNA-directed DNA methylation)
RdR	Protéine RNA-dépendant RNA polymérase
RISC	Complexe d'ARN interférent
RT-PCR	Transcription inverse sur l'ARN suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne
RT-qPCR	Transcription inverse sur l'ARN suivie d'une réaction de polymérisation en chaîne quantitative

RT	Réaction de transcription inverse (Reverse Transcription)
<i>Sl</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
siRNA	Petit ARN interférent (short interfering RNA)
tasiRNA	trans-acting siRNA
T-DNA	Acide désoxyribonucléique transféré
µg	Microgramme
µL	Microlitre
µM	Micromolaire
vd-siRNA	siRNA dérivé d'un viroïde
vsiRNA	siRNA viral (viral small-interfering RNA)
WB	immunobuvardage de type western (Western Blot)
WT	Type sauvage (Wild Type)

# CHAPITRE 1

## INTRODUCTION

### 1.1. Les viroïdes

#### 1.1.1. Présentation générale sur les viroïdes

L'étude des viroïdes est rendue importante par leur fort impact sur plusieurs cultures telles que les pommes de terre où l'on observe de 17% à 64% de pertes lors d'une infection à PSTVd (Pfannenstiel, 1980; Singh et al., 1971). La pomme de terre n'est pas la seule culture étant affectée par les viroïdes, il en va de même pour la tomate, le houblon ainsi que les concombres dans des proportions différentes. Plusieurs arbres fruitiers sont également touchés par les viroïdes comme les pommiers, par exemple, culture importante au Canada, plus particulièrement au Québec. La vigne également est souvent porteuse d'un ou plusieurs viroïdes, certains causant des maladies à la vigne elle-même ou pouvant être transmis à des cultures très sensibles à tel ou tel viroïde (exemple : le houblon et *hop stunt viroid*). Enfin, les viroïdes sont également capables de causer des pertes économiques pour des plantes dites ornementales telles que chez le chrysanthème avec le CSVd (*chrysanthemum stunt viroid*).

Au travers de ces différents exemples, on retrouve l'importance d'étudier les viroïdes. Avant d'entrer plus en détail dans les caractéristiques de ces derniers, faisons une brève description des viroïdes. Pour commencer, il est bon de rappeler que les viroïdes, plus particulièrement PSTVd, sont les premières petites molécules d'ARN circulaires hautement structurées découvertes comme étant capables de se répliquer indépendamment, sans coder pour la moindre protéine (Diener, 1971; Ding, 2009; Flores, 2005). Ils sont également très résistants dans le milieu extérieur, ce qui facilite leur transmission comme expliquée plus tard. Pour déterminer si un ARN structuré est bel et bien un viroïde, il doit répondre à plusieurs critères : démontrer sa capacité d'infection à une ou plusieurs plantes hôtes, la possibilité de ce dernier à induire des

symptômes ou non et son aptitude à se répliquer chez la ou les plantes hôtes (F Di Serio et al., 2014a).

### **1.1.2. Présentation des familles de viroïdes et leurs particularités**

Une plante qui est susceptible aux viroïdes est un organisme dans lequel ce dernier est capable de se répliquer, de s'accumuler et d'infecter la plante de façon systémique (Diener, 1987; F Di Serio et al., 2014b). En mettant de côté les constructions artificielles de laboratoire, les viroïdes sont connus à ce jour pour infecter seulement les angiospermes (Hadidi et al., 2003; F Di Serio et al., 2014a). On distingue une différence dans les hôtes des deux familles de viroïdes que sont les *Avsunviroidae* et les *Pospiviroidae* (Delan-Forino et al., 2011; R. Flores et al., 2015), les premiers ne pouvant infecter que les dicotylédones alors que les seconds peuvent infecter aussi bien des dicotylédones que des monocotylédones (Hadidi et al., 2003). Bien que pour les monocotylédones, très peu de viroïdes sont capables de les infecter (Hadidi et al., 2003).

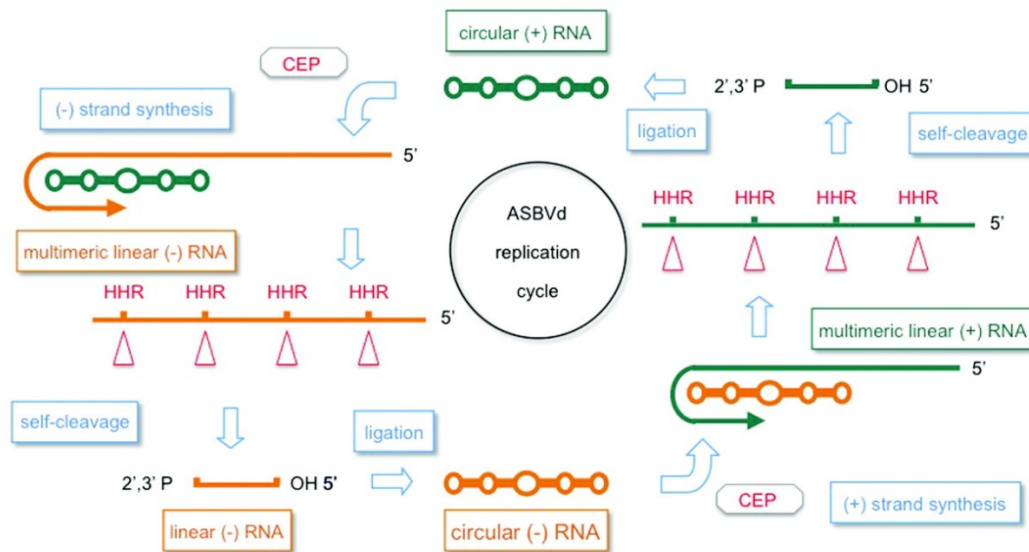
#### **1.1.2.1. Les *Avsunviroidae***

Ce mémoire ne traitant que peu des viroïdes de la famille des *Avsunviroidae*, leur structure ne sera abordée que rapidement. Cette famille tire son nom du premier viroïde attribué à cette famille: l'*avocado sunblotch viroid* (Flores, 2005). Les *Avsunviroidae* se définissent par l'absence de ce que l'on appelle le CCR (Central Conserved Region) qui caractérise entre autres la seconde famille. Le second point remarquable des *Avsunviroidae* est la présence d'un ribozyme en tête de marteau (hammerhead ribozyme) autant dans la forme négative que positive du génome ayant un rôle dans la réplication en cercle roulant symétrique qui sera abordé dans une partie dédiée. On note également que leur réplication se déroule dans les chloroplastes de la plante infectée (Bonfiglioli et al., 1994; Flores et al., 2009).



Comme dit précédemment, la réplication des membres de la famille des *Avsunviroidae* se déroule dans les chloroplastes de la plante infectée. L'enzyme impliquée dans leur réplication est une ARN polymérase chloroplastique (Flores et al., 2009; Flores, 2005; F Di Serio et al., 2014a). Pour ce qui est du cycle de réplication en lui-même, il est dit en cercle roulant symétrique. Ce cycle se déroule en plusieurs étapes (cf : figure 1). Tout d'abord, le viroïde (ARN circulaire positive) va être transcrit en ARN négatif multimérique par la CEP (Chloroplast Encoded Polymerase). Ce brin négatif et multimérique va, de manière autonome, se cliver en monomère négatif par l'action des HHR (Hammerhead Ribozyme) présents dans les deux polarités du viroïde (Hammann & Steger, 2012). Ces monomères vont être circularisés par l'intervention d'une ligase de la plante. Puis à partir de ce « viroïde négatif », on recommence le même processus jusqu'à l'obtention d'un nouveau viroïde circulaire positif.

Le viroïde peach latent mosaic viroid (PLMVd) est utilisé comme modèle pour étudier la structure secondaire des *Avsunviroidae* (Bussière et al., 2000; Dubé et al., 2011). Chez PLMVd plusieurs motifs importants ont été révélés. Les positions A<sub>50</sub> et particulièrement C<sub>51</sub> ont été identifiées comme site d'initiation chez le brin (+) pour la réplication. Pour brin (-) c'est la position U<sub>284</sub> (Delgado et al., 2005). La structure secondaire de ces viroïdes dépend de la polarité du brin. Par exemple, PLMVd (-) possède 8 branches contre 14 pour PLMVd (+). Il en va de même pour les autres membres des *Avsunviroidae* (Giguère et al., 2014).

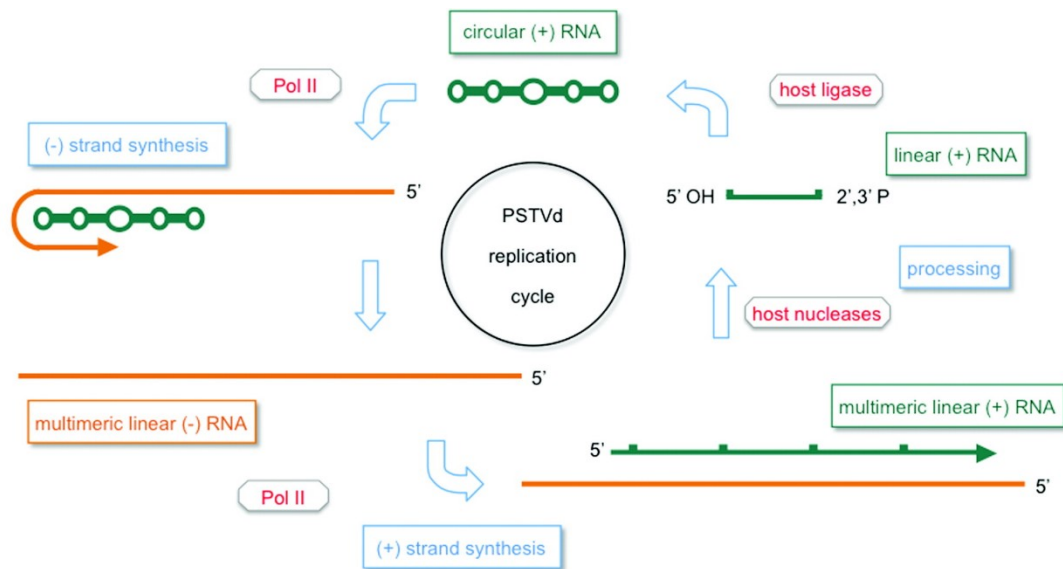


**Figure 1 : Cycle de répllication des *Avsunviroidae* en cercle roulant symétrique :** CEP (Chloroplast Encoded Polymerase), HHR (Hammerhead Ribozyme). (Figure issue de : (Hammann & Steger, 2012)).

### 1.1.2.2. Les *Pospiviroidae*

La seconde famille de viroïde tire son nom du potato spindle tuber viroid (PSTVd). Les viroïdes appartenant à cette famille se répliquent au sein du noyau des cellules. Ils possèdent une structure secondaire en forme de tige (Flores et al., 2009; Flores, 2005). Leur génome peut être décrit en 5 régions distinctes : la région terminale de gauche, le domaine de pathogénicité, la région centrale conservée (CCR), la région variable et la région terminale de droite. La région CCR est très importante pour définir les pospiviroides ; elle possède deux segments conservés de nucléotides dans le brin supérieur et inférieur. Les nucléotides situés dans la partie supérieure de la CCR jouent un rôle important dans la répllication en cercle roulant asymétrique des pospiviroides (Gas et al., 2007; Gozmanova et al., 2003).

Contrairement aux *Avsunviroidae*, la réplication des *Pospiviroidae* suit un cercle roulant asymétrique. Ce cycle se déroule dans le noyau des cellules infectées. L'ARN circulaire positif du viroïde va servir de base à l'ARN polymérase II ADN dépendante pour transcrire un brin multimérique d'ARN négatif qui lui-même va servir pour transcrire un ARN positif multimérique (cf : 2). Ce brin va être clivé par une nucléase puis circularisé par une ligase de l'hôte. Ce cycle est dit en cercle roulant asymétrique, car contrairement au cycle des *Avsunviroidae*, il n'y a pas de passage par l'état de viroïde circulaire négatif pour retourner au viroïde circulaire positif.



**Figure 2 : Cycle de réplication des *Pospiviroidae* via cercle roulant asymétrique Pol II (ARN polymérase II ADN dépendant) (Hammann et Steger 2012).**

Le modèle pour étudier la structure secondaire des *Pospiviroidae* est PSTVd. Les viroïdes de cette famille sont souvent décrits comme ayant une forme en bâton. On peut diviser cette structure en 5 domaines distincts.

La partie terminale de gauche (TL) contient une séquence répétée imparfaite qui entraîne une forme de Y ou une forme de bâton. Cependant, la forme en bâton du domaine TL est thermodynamiquement préférée (Dingley et al., 2003). PSTVd est transcrit par une ARN polymère II ADN-dépendante de l'hôte qui est redirigée pour accepter une base d'ARN. Un point de départ dans le brin négatif a été identifié dans la boucle du domaine TL. Ce point de départ est soit U359, soit C1 lors d'une transcription *in vitro* (Kolonko et al., 2006).

Le domaine de pathogénicité (P) contient une zone riche en purines dans le brin supérieur qui correspond à une zone riche en pyrimidine dans le brin inférieur. La région qui en résulte est relativement instable d'un point de vue thermodynamique (Gross et al., 1981). C'est après séquençage de ce domaine que l'on a appris qu'un léger changement de séquence dans cette zone entraînait une différence dans la pathogénicité de la souche de PSTVd (Gross et al., 1981).

Le domaine central (C) des membres de la famille des *Pospiviroidae* est une région hautement conservée. En plus des structures en bâtons entre les bases des brins supérieurs et inférieurs, il y a possibilité de formation de boucle en épingle à cheveux dans cette zone.

Le domaine variable (V) est comme son nom l'indique très variable. C'est le domaine qui montre le moins de similarité d'une espèce de viroïde à l'autre. Les limites du domaine V sont définies par une faible similarité avec le domaine C et le domaine terminal droit (TR) (Keese & Symons, 1985).

Enfin le domaine TR semble essentiel au mouvement de cellule en cellule via les plasmodesmes chez PSTVd (Ding et al., 1997). Il existe certainement des motifs structurels qui interagissent spécifiquement avec des facteurs cellulaires pour obtenir un déplacement systémique chez la

plante (R. Takeda et al., 2011). La structure et/ou la stabilité de la boucle présente dans le domaine TR sont essentielles pour le mouvement sur de longues distances (Hammond, 1994).

### 1.1.3. Symptômes et transmission

Depuis la découverte des viroïdes, la question récurrente est : comment les viroïdes induisent-ils des symptômes chez les plantes ? En effet, à bien des égards, les symptômes causés par des viroïdes sont identiques à ceux causés par des virus bien que contrairement à ces derniers, les viroïdes ne codent pour aucune protéine. Plusieurs études sur HSVd et *Citrus exocortis viroid* (CEVd) ont montré qu'ils peuvent induire des modifications du métabolisme aux niveaux hormonaux, changements responsables de l'apparition de la maladie (Duran-Vila & Semancik, 1982; Yaguchi & Takahashi, 1985). Le rôle de l'ARNi est très important lors d'une infection aux viroïdes, il est le responsable d'une diminution du titre de viroïdes dans la plante (Francesco Di Serio et al., 2009; Itaya et al., 2001; Martínez de Alba et al., 2002). En effet, les viroïdes peuvent être reconnus par la plante comme étant de l'ARNdb par les protéines DICER (DCL) et seront dégradés en vd-sRNA (Viroid-derived sRNA) qui, en association avec les protéines Argonautes (AGO), vont former le RISC et cibler les viroïdes entraînant ainsi leur dégradation (Axtell, 2013; Chiumenti et al., 2014; Hammann & Steger, 2012b; Mallory & Vaucheret, 2010). D'un autre côté, il semble aussi que les vd-sRNA puissent cibler des transcrits de la plante, voire des gènes, et empêcher respectivement leur traduction et leur transcription, ceci entraînant de fait l'apparition de symptômes par effet de cascade (Minoia et al., 2014b; Schuck et al., 2013). La relation entre viroïdes et ARNi sera abordée plus en détail par la suite.

PSTVd est le premier viroïde à avoir été découvert en 1971, soit 50 ans après la première description de la maladie qu'il engendre dans les années 1920 (Diener, 1971). Afin de limiter les pertes importantes dans la production de pommes de terre, on doit commencer rapidement à mettre en place des tests afin de détecter la présence de ce viroïde. PSTVd est connu pour infecter sévèrement plusieurs espèces végétales, dont *S. lycopersicum* (Puchta et al., 1990) et *Solanum tuberosum* (pomme de terre). Sur la pomme de terre, son effet est de déformer le

tubercule ; il peut également réduire sa taille ou son nombre. Les plantes infectées seront plus petites avec de plus petites feuilles parfois déformées (Schultz & Folsom, 1923). PSTVd est capable d'infecter naturellement de nombreux membres de la famille des solanacées, mais aussi certaines espèces ligneuses comme l'avocat (*Persea americana*). De façon expérimentale, PSTVd peut infecter un plus large spectre de plante que dans la nature (Singh, 1973). PSTVd possède un génome allant de 356 à 364 nucléotides avec une conformation en bâtonnet et une région centrale conservée (Owens et al., 2012).

Il existe deux types de transmission pour les viroïdes : la transmission horizontale où le pathogène est transmis d'une plante à une autre dans la même génération ainsi que la transmission verticale où l'agent infectieux est transmis de la plante mère aux plantes filles. Dans les cas des viroïdes, c'est la transmission horizontale qui prédomine. Elle survient lors de l'utilisation de matériels agricoles contaminés (Flores et al., 2011), ces derniers pouvant rester longtemps contagieux à cause de la résistance importante des viroïdes en milieu extérieur. Il peut également y avoir transmission via les mains, les gants ou les vêtements. Des études ont présenté le cas peu fréquent d'une transmission par les racines (Hadidi et al., 2003). Il a été montré qu'en culture hydroponique de tomate, PSTVd pouvait se propager d'un plant à l'autre via les racines (Mehle et al., 2014; Vachev et al., 2010). De même que la transmission par les racines, la diffusion des viroïdes par les insectes n'est que très peu documentée, mais existe cependant (Diener, 1987).

On note également la possibilité de transmission verticale pour les viroïdes. Ce phénomène est bien étudié pour la transmission par les graines et/ou le pollen pour les viroïdes des deux familles (Flores et al., 2011; Hadidi et al., 2003). Peu importe le système viroïde/plante étudié, il en résulte que la transmission aux graines varie en fonction du variant pour le viroïde et du cultivar pour la plante (Francesco Di Serio et al., 2010).

## **1.2. Introduction à l'ARN interférent (RNA silencing)**

### **1.2.1. Introduction aux mécanismes de défense des plantes**

Animaux, plantes, bactéries : tous ces organismes doivent faire face à des attaques de pathogènes aussi divers que variés. Chaque forme de vie a développé un ou plusieurs mécanismes de défense. Ici, on abordera ceux adoptés par les plantes afin de se défendre contre : des virus, des bactéries, des champignons, des nématodes ou encore des viroïdes (J. D. G. Jones & Dangl, 2006)

Au cours de l'évolution, les plantes ont adopté un système de défense comprenant plusieurs niveaux de réponses : l'immunité déclenchée par reconnaissance d'un motif moléculaire associé au pathogène (Pathogen-Associated Molecular Pattern (PAMP)-Triggered Immunity (PTI)) ainsi que l'immunité déclenchée par des effecteurs (Effectors Triggered Immunity (ETI)) (Stael et al., 2015).

Tel qu'énoncé précédemment, les plantes ont deux mécanismes de défense principaux afin de faire face aux menaces extérieures. Chaque cellule de la plante possède à sa surface des protéines qui appartiennent à la classe des récepteurs de reconnaissance de motifs (Pattern Recognition Receptors (PRRs)) (J. D. G. Jones & Dangl, 2006; Pieterse et al., 2009). Lorsqu'un pathogène veut pénétrer une cellule de la plante, les PRRs vont reconnaître des molécules exprimées à la surface ou dans le pathogène ; ces molécules sont les PAMPs. La reconnaissance du PAMPs par les PRRs va déclencher une cascade de réaction qui va mettre en action le système immunitaire. Si les plantes ont évolué pour reconnaître les pathogènes afin de déclencher leur système immunitaire, il va de soi que de leur côté, les pathogènes ont également évolué pour contrer ce système. En effet, ces derniers vont produire ce que l'on nomme des effecteurs qui ont pour but d'inhiber la PTI. Les plantes en réponse à ces effecteurs ont acquis, au cours de l'évolution, des gènes de résistance (gènes R) (Anandalakshmi et al., 1998; Cook et al., 2015; Garner et al., 2016). Ces gènes vont produire des protéines de résistance (R) en présence

d'effecteurs et ainsi déclencher la réponse ETI. L'impact le plus important de l'ETI est une réponse d'hypersensibilité autour de la zone d'entrée du pathogène. Cette réaction va entraîner la mort rapide des cellules pour empêcher la diffusion de l'infection au reste de la plante (Durrant & Dong, 2004).

## **1.2.2. ARN interférent (RNA silencing) et ses acteurs**

### **1.2.2.1. Introduction de l'ARN interférent**

Il est maintenant temps d'aborder un mécanisme permettant aux plantes de se défendre contre des acides nucléiques étrangers tels que les virus et les viroïdes, mais aussi de réguler l'expression transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle de gènes : l'ARN interférent (ARNi) ou RNA silencing (RNAi) (Fang & Qi, 2016). Ce mécanisme est médié par de petits ARN (small RNA sRNA). Ces derniers résultent de la dégradation d'ARN double brin (double-stranded RNA dsRNA) par des DICER ou DICER-like proteins (M.-B. Wang et al., 2012). Ce clivage des dsRNA par les DICER forme des duplex de sRNA de 21 à 24 nucléotides de long (Ruiz-Ferrer & Voinnet, 2009). Ces sRNA vont ensuite être pris en charge par des protéines Argonautes (AGO). La combinaison sRNA/AGO va former un complexe nommé RISC (RNA-Induced Silencing Complex) (Bologna & Voinnet, 2014). Le sRNA chargé dans le RISC va servir de guide pour cibler spécifiquement des séquences complémentaires pour entraîner la dégradation de l'ARN cible, la répression de sa traduction ou encore entraîner la méthylation de l'ADN de cible homologue régulant ainsi plusieurs aspects physiologiques des plantes (Borges & Martienssen, 2015).

### **1.2.2.2. Les protéines Dicer (DCL)**

Comme brièvement énoncées précédemment, les protéines DCL sont responsables du clivage de l'ARNdb d'origine endogène ou exogène présent dans les cellules de la plante. Les protéines DICER des champignons et des animaux, tout comme les protéines DICE-like des plantes,



possèdent 6 domaines qui peuvent ne pas être tous présents en fonctions des protéines, soit : DExD, Hélicase-C, DUF283, PAZ (Piwi/Argonaut/Zwille), RNase III, et double-stranded RNA-binding (dsRB). L'hélicase-C et DexD sont retrouvés respectivement dans la partie C-terminale et N-terminale de la protéine (Margis et al., 2006). DUF283 ou Domaine de Fonction Inconnu 283 est lui situé dans la partie N-terminale du premier domaine RNase III (Du et al., 2008). En effet, il existe 2 domaines RNase III (RNase IIIa et RNase IIIb) chez les protéines DICER. Chez de nombreux vertébrés (humain, souris) ainsi que chez les nématodes, les voies des microARN (miRNA) et des siRNA (small interfering RNA) sont régulées par une seule protéine DICER qui va moduler leur développement (Song & Rossi, 2017). La capacité de cette unique protéine DICER a été expliquée dans des études chez l'Homme, étude démontrant la capacité de la protéine à effectuer un réarrangement structural (Taylor et al., 2013). Brièvement, les domaines PAZ et dsRDB pourront être réarrangés en fonction du précurseur d'ARNdb rencontré. Enfin, la distance entre le domaine PAZ et le domaine RNase III va déterminer la longueur du petit ARN produit (sRNA).

Lorsque l'on se penche sur les plantes, on remarque que les DCL des plantes partagent une grande homologie avec celle du règne animal, ceci laissant suggérer une similarité dans leurs propriétés biologiques (Fukudome & Fukuhara, 2017; Zhao et al., 2015). En plus de cette ressemblance, il est bon de noter que contrairement aux animaux et nématodes, les plantes ont développé plusieurs DCL, le nombre variant d'une espèce à l'autre. Chez *A. thaliana*, la plante modèle en biologie moléculaire végétale, il existe 4 DCL (*AtDCL* 1, 2, 3 et 4); *Vitis vinifera* en possède également 4 (*VvDCL* 1, 2, 3 et 4); la tomate (*S. lycopersicum*) quant à elle en a 7 (*SlDCL* 1, 2a, 2b, 2c, 2d, 3 and 4) (Bellaoui et al., 2003; Bologna & Voinnet, 2014; T. Wang et al., 2016; Zhao et al., 2015). Bien que très similaire, les différentes DCL ont des rôles allant du développement de la plante, à la défense contre des virus/viroïdes en passant par la production des différents sRNA de la plante ; donc plus largement en réponse aux stress (Q. Liu et al., 2009). De plus, l'expression des DCL varie d'un tissu à l'autre chez *A. thaliana* (Q. Liu et al., 2009).

Tout comme leur cousine du règne animal, les DCL des plantes possèdent plusieurs domaines. Chez la protéine DCL1 d'*A. thaliana*, on note la présence des domaines suivants : DExD, RNA hélicase, DUF283, PAZ, deux domaines RNase III (RNase IIIa et RNase IIIb) et deux domaines dsRBD (Margis et al., 2006). De récentes études semblent montrer que le domaine DUF283 de DCL1 est un domaine de liaison à l'ARN nouvellement annoté (Qin et al., 2010). Le traitement des précurseurs des miRNA se fait via le domaine hélicase de DCL1, cette action est ATP dépendant (C. Liu et al., 2012). Le domaine dsRBD des protéines DCL semble varier d'une protéine à l'autre. Le cas du second dsRBD C-terminal de DCL1, également retrouvé chez DCL3 et DCL4, mais pas chez DCL2, est responsable de la reconnaissance de l'ARN double brin ainsi que de la localisation de DCL1 dans le noyau de la cellule (Burdisso et al., 2012).

De façon similaire au DICER humain qui génère des siRNA de longueurs qui diffèrent en fonction de l'hélice- $\alpha$  qui se connecte au domaine PAZ et au domaine catalytique. C'est la longueur de cette hélice qui détermine la longueur des siRNA. Les protéines DCL2, DCL3 et DCL4 d'*A. thaliana* vont cliver les molécules d'ARN double brin en siRNA respectivement de longueur 22, 24 et 21 nucléotides (Bologna & Voinnet, 2014; Henderson et al., 2006). La fonction de DCL4 est très liée au PTGS (Post Transcriptional Gene Silencing) via 2 populations de siRNA, les phasiRNA et les tasiRNA, qui seront expliquées ultérieurement, ce dernier provenant de la dégradation d'ARNdb issue de la RDR6 (RNA-Dependent RNA Polymerase 6) (Haag et al., 2012; Matzke & Mosher, 2014). Quant à elle, DCL3 influe aussi le PTGS et est associée avec le RDR2. Plusieurs études démontrent des redondances fonctionnelles de DCL2, 3 et 4 pour la production de siRNA ainsi que la mise en place de la méthylation de l'ADN et son maintien (Henderson et al., 2006). Ces trois DCL peuvent toutes accéder à l'ARNdb; cependant, leur localisation cellulaire ainsi que les voies de biosynthèses peuvent être à l'origine de différences d'affinité (Bologna & Voinnet, 2014).

Ce qui vient d'être montré concerne de l'ARNdb d'origine endogène ; cependant, l'ARNdb peut également provenir de l'extérieur. Les DCL des plantes ont la capacité de cliver l'ARNdb d'origine virale/viroïdale (Minoia *et al.*, 2014; Katsarou *et al.*, 2016), ceci étant crucial dans le

RNA-silencing antiviral. Lors d'une infection par un virus à ARN, il y a production de vsiRNA (viral small-interfering RNA) de 21 nucléotides par DCL4 et 22nt par DCL2. Ces derniers seront ensuite pris en charge par des protéines Argonautes (AGO) qui peuvent ensuite cibler l'ARN viral (Carbonell & Carrington, 2015; Pumplin & Voinnet, 2013). Plusieurs études ont démontré qu'en cas d'une mutation des DCL2 et 4, la sensibilité aux virus était accrue (Garcia-Ruiz et al., 2010). Pour une défense efficace en cas d'attaque virale, il est nécessaire que soient présents DCL 2 et 4 ainsi que les RDR1 et 6, dont le rôle va être détaillé par la suite (Garcia-Ruiz et al., 2010; Moissiard et al., 2007).

### **1.2.2.3. Les protéines Argonautes (AGO)**

Les protéines de la famille des Argonautes sont des protéines ayant la capacité de se lier à de petits ARN (sRNA) de toutes sortes. Lorsque l'une d'entre elles s'attache avec un sRNA, elle forme le complexe RISC (RNA-Induced Silencing Complex) (Carbonell & Carrington, 2015; Vaucheret, 2008); c'est ce complexe ainsi assemblé qui va inhiber la transcription et/ou la traduction des gènes chez la plante ou encore entraîner une modification de la chromatine (Carbonell & Carrington, 2015; Schuck et al., 2013). Les AGO sont présentes chez les bactéries, les Archées et les eucaryotes ; ceci suggère une origine ancienne de ces gènes. Le nombre de gènes codant pour des protéines AGO varie d'un organisme à l'autre allant d'un seul chez la levure *Schizosaccharomyces pombe* à 27 chez le nématode *Caenorhabditis elegans* (Höck & Meister, 2008). Chez l'organisme modèle en biologie végétale *A. thaliana*, on compte dix protéines Argonautes nommées de 1 à 10 (AGO-1 à AGO-10) (Vaucheret, 2008); la tomate quant à elle possède 15 versions de protéines AGO (Xian et al., 2013).

Toutes les protéines AGO possèdent les 4 domaines suivants : le domaine N-terminal, le domaine PAZ (PIWI-ARGONAUTE-ZWILLE), le domaine MID (Middle) et le domaine PIWI (Meister, 2013). De tous ces domaines, le domaine N-terminal est le plus incompris chez les plantes (Fang & Qi, 2016). Le domaine PAZ, de son côté, de manière similaire aux protéines DCL, est responsable de la liaison avec les sRNA simples brins grâce à la présence d'une région

de liaison de repliement à oligonucléotide/oligosaccharide. Le domaine MID, pour sa part, a une boucle de nucléotide spécifique qui reconnaît le nucléotide 5' du sRNA (Frank et al., 2012). Cette spécificité va changer en fonction des AGO. En effet, chez *Arabidopsis* AGO1 interagit de préférence avec des ARNm avec un 5'U; AGO5 avec des sRNA avec un 5'C; alors qu'AGO2 se lie avec des siRNA avec un 5'A (Mi et al., 2008; Montgomery et al., 2008; A. Takeda et al., 2008). De son côté, le domaine PIWI a une fonction proche de celle d'une RNase H, ce qui permet aux protéines AGO de cliver leur ARN cible en fonction de la complémentarité de leur sRNA guide. Cette capacité est conférée par le site catalytique suivant : Asp-Asp-Asp/His (soit DDD ou DDH) (Fang & Qi, 2016).

Pour le bon fonctionnement du mécanisme de ARNi (RNAi ou RNA silencing), les sRNA doivent être triés et chargés dans des protéines AGO spécifiques. Comme expliqué précédemment, la nature même du nucléotide situé en 5' des sRNA est importante pour être incorporée dans le complexe qui, avec la protéine AGO, va former le RISC. Cependant, dans certains cas, ce nucléotide n'est pas le seul facteur permettant de différencier les AGO. AGO1 et AGO2 se lient avec des sRNA avec le même nucléotide en 5'. La différence va se faire sur une préférence de mésappariement dans la région centrale du sRNA (15<sup>e</sup> nucléotide). AGO1 va préférer ou accepter un mésappariement alors qu'AGO2 ne va, quant à lui, tolérer qu'un seul alignement parfait.

Les protéines AGO vont agir de façons différentes; elles peuvent faire de la régulation post-transcriptionnelle en clivant les ARNm ou en les séquestrant, entraînant ainsi une répression de la traduction de ces derniers (Montgomery et al., 2008). Les AGO peuvent également agir au niveau de la transcription en réalisant de la RdDM. De nombreuses protéines AGO ont la capacité de cliver les ARNm comme précisés plus tôt; certains plus que d'autres, comme AGO1 (N Baumberger & Baulcombe, 2005), AGO4 (Y. Qi et al., 2006), AGO7 (Montgomery et al., 2008), AGO2 (Carbonell et al., 2012) et AGO10 (Ji et al., 2011). Des études montrent que la compartimentalisation intracellulaire du complexe AGO1/miRNA peut jouer un rôle entre le clivage de l'ARNm cible ou sa séquestration. En plus de la méthylation de l'ADN, il a été révélé

récemment d'autres fonctions jouées par les AGO des plantes. Un exemple est celui de la réparation de l'ADN par AGO2 (Wei et al., 2012). Les protéines AGO jouent un rôle clef dans la protection contre les virus via l'ARNi.

#### 1.2.2.4. Les protéines RNA-dependent RNA polymérase (RdR)

Un autre acteur important des différentes voies de l'ARNi : les protéines RdR sont capables de synthétiser un ARN double brin à partir d'ARN simple brin. On trouve des RdR dans de multiples organismes, tels que les virus, les plantes, les insectes, les mammifères, les champignons, *etc.* (Zong et al., 2009). Il existe, chez les eucaryotes, trois clades majeurs de RdR : RDR $\alpha$ , RDR $\beta$  et RDR $\gamma$ . Cependant, tous ne possèdent pas les trois groupes ; les plantes et les champignons possèdent des RDR $\gamma$ , les RDR $\beta$  sont présentes uniquement chez les champignons et les animaux. Enfin, les RDR $\alpha$  sont retrouvées chez les trois différents groupes (plantes, animaux et champignons) (Wassenegger & Krczal, 2006; Zong et al., 2009). Lorsque l'on regarde du côté d'*A. thaliana*, 3 protéines RDR sont bien caractérisées : RDR1, RDR2 et RDR6, toutes faisant partie du clade RDR $\alpha$ . RDR2 participe à la production d'ARN double brin qui va être clivé par la protéine DCL3, ceci donnant comme résultat des petits ARN nommés hc-siRNA (heterochromatic small interfering RNA). Ces derniers vont être pris en charge par AGO4 afin de réaliser de la méthylation de l'ADN ARN dépendant (RdDM) (Haag et al., 2012; Matzke & Mosher, 2014).

Les RDR vont avoir un rôle important lors d'une infection virale ou par un viroïde ; en effet, elles vont être à l'origine de la production d'ARN double brin *de novo* à partir d'ARN viral ou viroïdale clivé (vRNA ou vdRNA). Cet ARNdb va passer par les protéines DCL4 et DCL2; il en résulte des vsiRNA (secondary viral small interfering RNA) et donc une amplification du RNA-silencing dirigé contre le virus/viroïde (Adkar-Purushothama et al., 2019; Garcia-Ruiz et al., 2010; Gómez et al., 2008a). Les RDR 1, 2 et 6 ont déjà été décrites dans la défense contre une infection virale. De plus, RDR1 et 6 sont essentiels pour une défense totale (Garcia-Ruiz et al., 2010; X. Qi et al., 2009a). Chez *Arabidopsis*, trois protéines RDR définissent le clade RDR $\gamma$  :

RDR 3, RDR4 et RDR5. Aucune fonction ne leur a été attribuée pour le moment. Cependant, ces trois protéines montrent une expression variable dans plusieurs phases du développement ou de stress de la plante. Ceci laissant penser qu'elles ont des rôles dans différentes voies (Zong et al., 2009).

#### **1.2.2.5. Les autres composants du RNA silencing**

Les plantes codent pour cinq protéines se liant à l'ARN double brin (dsRNA binding protein) : DRB1/HYL1, DRB2, DRB3, DRB4 et DRB5 (Hiraguri et al., 2005). Elles contiennent chacune 2 domaines de liaison à l'ARNdb N-terminal (dsRBD double stranded RNA Binding Domain). Les protéines DRB interagissent avec les protéines DCL chez les plantes et sont essentielles pour le passage d'ARN double brin au sRNA. DRB1/HYL1 via son second dsRBD interagit avec DCL1 pour traiter les précurseurs de miRNA ainsi que sélectionner le sRNA guide qui va être chargé dans le complexe RISC (Kurihara, 2005). Les DRB 2, 3 et 5 ont été montrés capables de traiter des miRNA non conventionnels spécifiques (Eamens et al., 2012). DRB4 va être requise pour une production correcte des trans-acting siRNA (tasiRNA), vraisemblablement en interagissant avec DCL4 (Adenot et al., 2006) ; de plus, DRB4 est antagoniste de DRB2 dans le traitement des hc-siRNA dans le RdRM. Ceci suggérant un rôle pour ces 2 protéines dans cette voie métabolique (Pelissier et al., 2011). Enfin, DRB3 interagit avec DCL3 et AGO4 dans la défense antivirale via la méthylation contre les Gémivirus (Raja et al., 2014).

Après le clivage des ARNdb pour les protéines DCL, les sRNA ont besoin d'être modifiés pour empêcher leur dégradation. Cette modification va être réalisée par une protéine méthyltransférase Hua Enhancer (HEN1) qui va ajouter un groupement méthyle à l'extrémité 3' de chaque brin du miRNA et du duplex siRNA spécifiquement dans le 2'-OH (Li et al., 2005; B. Yu, 2005). La protéine HEN1 possède 5 domaines : un domaine méthyltransférase, 2 domaines dsRBD, un LCD (La-motif-containing domain) et un PLD (PPIase-like domain) (Huang et al., 2009). Les deux dsRBD interagissent avec le sRNA et vont former un lien fort sur la région du duplex. Le LCD va spécifiquement reconnaître les groupements 3'-OH

permettant ainsi au domaine méthyltransférase d'ajouter le groupement 2'-O-méthyl. Il a été montré, avec l'aide d'expériences *in vitro*, que la reconnaissance de la partie 3' et l'ajout du groupement méthyle sont font séparément dans le duplex sRNA (Huang et al., 2009; Li et al., 2005; B. Yu, 2005). La protéine HEN1 est importante dans le RNA silencing contre les virus étant donné que la méthylation 2'-OH est nécessaire pour protéger les vsiRNA de la dégradation. En effet, des mutants HEN1 montrent une hypersensibilité aux virus (Vogler et al., 2007).

Enfin, le dernier acteur du RNA silencing que l'on doit présenter est le SGS (Supressor of Gene Silencing). SGS2 et SGS3 sont les protéines les mieux caractérisées dans ce groupe (Mourrain et al., 2000; Peragine et al., 2004). Les protéines SGS contiennent un domaine en doigt de Zinc (Zinc Finger ZF) ayant une fonction inconnue, un domaine XS nécessaire pour la liaison de l'ARN (D. Zhang & Trudeau, 2008) et un domaine CC (Coiled-coil domain) impliqué dans l'homodimérisation de SGS3 (Elmayan et al., 2009). Les protéines SGS interagissent avec RDR6 surtout SGS3, mais également SGS2; elles aident dans la synthèse secondaire d'ARNdb (Borges & Martienssen, 2015; Peragine et al., 2004). De plus, les SGS protègent l'ARN simple brin de la dégradation avant la production d'ARN double brin (Elmayan et al., 2009).

### **1.3. Introduction aux petits ARN (sRNA) dans le RNA silencing**

#### **1.3.1. La voie des micro-ARN (miRNA) et fonction**

La voie des miRNA débute avec la transcription des gènes miRNA par la polymérase II; il en résulte la formation d'un pri-miRNA avec 5' coiffé et une queue de poly-A. Contrairement aux animaux, les pri-miRNA des plantes sont traités dans le noyau par une unique RNase III de la famille DICER-like : DCL1 (Kurihara & Watanabe, 2004). DCL1 n'est pas le seul acteur entrant en jeu dans le traitement des pré-miRNA, la protéine de liaison à l'ARNdb HYL1 (Hyponastic Leaves 1) et la protéine doigt de Zinc Serrate assistent DCL1 dans ce processus (Han et al., 2004; Lobbes et al., 2006). Durant tout ce processus, le pri-miRNA passe par une étape de pre-miRNA et finalement au duplex mature miR:miR. Ce dernier est modifié par la

méthyltransférase HEN1 qui protège le miRNA des autres modifications ou de l'activité d'exonucléase (Yang et al., 2006). Par la suite, le miRNA mature est exporté du noyau vers le cytoplasme de la cellule où il va entrer en interaction avec AGO1 ou d'autres protéines AGO et agir dans le clivage, dans la répression de la traduction ou la méthylation de l'ADN en fonction de la cible (Addo-Quaye et al., 2008; Iwakawa & Tomari, 2015). Peu de miRNA/cibles sont conservées chez les différentes familles de plantes. De plus, la majorité des interactions semble très spécifiques, ceci laissant suggérer qu'un grand nombre de gènes MIRNA connus sont relativement récents dans l'évolution des plantes. Certains sont conservés, tels que chez les bryophytes. (Cuperus et al., 2011).

Les miRNA jouent des rôles clefs dans presque tous les processus biologiques et métaboliques des plantes. On peut noter leur implication dans la transition entre plante juvénile et plante adulte, dans la floraison avec l'action des miR156 et miR172 (Ji et al., 2011; Wu et al., 2009). De plus, les miRNA ont d'importantes fonctions de réponses au stress chez les plantes. Lors d'interaction plante-pathogène, plusieurs miRNA peuvent voir leur quantité augmentée. Par exemple, chez *A. thaliana*, lors d'une infection par la bactérie *Pseudomonas syringae* (Pst) DC300 avec une souche virulente et l'autre non virulente, on note une différence d'expression de plusieurs miRNA (W. Zhang et al., 2011).

### **1.3.2. Les petits ARN interfèrent chez les plantes (siRNA)**

Tout comme les miRNA, les siRNA est une classe de sRNA qui ont un rôle crucial chez les plantes dans le développement et les réponses face au stress. Il existe plusieurs classes de siRNA qui se différencient par leur biogenèse (Fei et al., 2013). Les hc-siRNA sont des sRNA de 24 nucléotides de long issus de l'action de DCL3 à partir de régions intergéniques ou répétées du génome. Par l'action de l'ARN polymérase Pol IV, les hc-siRNA aident au maintien de l'intégrité du génome via la méthylation de l'ADN ARN dépendant (Axtell, 2013).



Les trans-acting siRNA (tasiRNA) sont une classe de siRNA secondaires qui sont générés à partir des gènes TAS qui produisent de l'ARN non codant (Manavella et al., 2012). Il existe 4 familles de TAS décrites à ce jour chez *A. thaliana* Columbia-0. miR173 est capable de cibler les familles TAS1a/b/c et TAS2 (Yoshikawa et al., 2005); miR390 cible la famille TAS3a/b/c (Axtell, 2013); alors que miR828 est capable de déclencher la biogenèse de tasiRNA TAS4 (Rajagopalan et al., 2006). Après la transcription de l'ARN non codant des TAS par l'ARN polymérase II, puis son clivage par le miRNA chargé dans AGO1, la RDR6, en collaboration avec SGS3, va déclencher la synthèse d'ARN double brin à partir des fragments d'ARN TAS clivé par les miRNA (Yoshikawa, 2013). Cet ARNdb va être traité par la combinaison de DCL4 et DRB4 (Double-stranded RNA Binding protein), formant ainsi des duplex tasiRNA de 21 nucléotides de long (Fukudome & Fukuhara, 2017). La famille des TAS3 est l'une des mieux caractérisées parmi les tasiRNA; en effet, plusieurs études montrent leur implication lors des réponses en présence d'auxine telles que le développement des racines et la transition juvénile/adulte (Marin et al., 2010). Une étude de séquençage a démontré que les niveaux d'expression de TAS4 tasiRNA augmentent lors d'une déficience en phosphate laissant suggérer un rôle pour ce tasiRNA dans les réponses au stress (Hsieh et al., 2009).

Il existe un dernier type de siRNA dépendant d'une ARN polymérase ARN dépendante (RDR) ; ce sont les phasiRNA (phased small-interfering RNA). Les phasiRNA ont une biogenèse similaire à celle des tasiRNA. Cependant, ils sont générés à partir de *loci* codant pour des protéines comprenant les PPR (Pentatricopeptide Repeat), NB-LRR et la famille de facteurs de transcription MYB qui, dans différentes espèces de plantes, participent dans la régulation post-transcriptionnelle de ces gènes (Howell et al., 2007; Xia et al., 2012). Les plantes possèdent un nombre important de protéines NB-LRR, ces dernières déclenchant l'ETI (Effectors-Triggered Immunity). Les phasiRNA jouent un rôle important dans la régulation des NB-LRR. Chez *S. lycopersicum*, deux miRNA, miR482 et miR2118 se lient à l'ARNm de protéines NB-LRR; il en résulte la production de phasiRNA (Shivaprasad et al., 2012). Le rôle des phasiRNA devient très important, car un défaut d'inhibition des transcrits des protéines NB-LRR peut conduire à

une accumulation trop importante de ces dernières qui peuvent déclencher une auto-immunité en absence de pathogène et nuire à la croissance de la plante (Fei et al., 2013).

### **1.3.3. La méthylation de l'ADN ARN dépendant (RdDM)**

La RdDM est un processus épigénétique qui est déclenché par les hc-siRNA et les ARN non codants de longue taille (Axtell, 2013; Wierzbicki et al., 2008). La biogenèse des hc-siRNA est lié au bon fonctionnement de la machine transcriptionnelle. Après la formation d'ARN simple brin par la Pol IV au *locus* cible, une molécule d'ARN double brin est synthétisée par la RDR2 qui est physiquement associée avec la Pol IV (Haag et al., 2012). La protéine DCL3 clivera l'ARN double brin en duplex de hc-siRNA de 24 nucléotides, lesquels sont protégés de la dégradation via méthylation par HEN1 (Ji & Chen, 2012). Les siRNA obtenus peuvent être chargés dans différentes protéines AGO toutes appartenant au clade d'AGO4, tel qu'AGO6, AGO9 (Eun et al., 2011; Olmedo-Monfil et al., 2010).

La seconde étape de la RdDM passe par la génération d'une longue molécule d'ARN non codant par l'ARN PolV lié à l'ARN polymérase II à partir des transposons, des séquences répétées ou répétition dans les promoteurs des gènes, les introns ou les régions codantes. L'ARNdb produit va rapidement entrer en interactions avec les hc-siRNA de 24nt chargés dans les protéines AGO4 ou apparentés (Matzke & Mosher, 2014). La transcription de cet ARN non codant de grande taille et l'association de la Pol V avec la chromatine sont facilitées par le complexe DDR (Zhong et al., 2012). Le complexe DDR est formé de trois acteurs principaux, le remodeleur de chromatine DRD1 ( Defective in RNA-directed DNA methylation), DMS3 (Defective in Meristem Silencing 3) et RDM1 (RNA-directed DNA Methylation 1) (Law et al., 2010). La Pol V recrute AGO4 via l'interaction avec NRPE1 (Nuclear RNA Polymerase E1), une grosse sous unité de la Pol V, avec KTF1/SPT5 (Kow Domain-Containing Transcription Factor 1) qui contient un motif permettant l'accroche de protéines AGO (Bies-Etheve et al., 2009). Le complexe formé d'AGO4/siRNA se lie spécifiquement à la séquence de l'ARN non codant et

recrute DRM2 (Domains Rearranged Methyltransferase 2) qui va catalyser la méthylation de l'ADN (Chan et al., 2005).

En plus des rôles dans la reproduction, le contrôle des transposons et d'autres voies métaboliques dans le cycle de vie des plantes, la RdDM joue également un rôle dans la défense lors d'une infection par un pathogène. De nombreuses études ont montré que la méthylation de la chromatine virale conduisant au TGS (Transcriptional Gene Silencing) est un système de défense potentiel contre les virus à ADN tel que les Géminivirus (Raja et al., 2008, 2014). En effet, des preuves tendent à montrer que la RdDM agit contre les infections par des virus à ADN. Cependant, les géminivirus sont capables de produire des suppresseurs qui inactivent l'ADK (Adenosine Kinase) requise et nécessaire en tant que cofacteur de méthyltransférase et donc inhibent les mécanismes de RdDM (Buchmann et al., 2009).

#### **1.3.4. Le mouvement des sRNA**

Très tôt dans l'étude sur les sRNA, des expériences sur les greffes ont démontré la capacité du signal de l'ARN interférent à se propager via le phloème aux différentes parties de la plante (Palauqui et al., 1997; Voinnet et al., 1998). Ceci laisse penser que les mouvements de cellules en cellules, ainsi que les mouvements systémiques peuvent avoir des rôles dans le développement et la physiologie des plantes (Voinnet et al., 2000), mais également aussi dans la défense antivirale (Carlsbecker et al., 2010). Des expériences des greffes chez *A. thaliana* exprimant un transgène GFP ainsi que des racines exprimant une hairpin ARN dérivé de la GFP pour cibler la GFP produite dans les parties hautes de la plante ont montré une diminution de fluorescence dans les parties supérieures de la plante. Cette perte est due au mouvement des sRNA produit dans les racines exprimant la GFP-hairpin (Molnar et al., 2010). Les siRNA de 24 nucléotides de longs peuvent se transmettre au travers des deux parties d'une greffe et sont capables de réaliser de la RdDM et du TGS de promoteur de transgène dans les cellules méristématiques (Melnik et al., 2011). Ces données appuient l'hypothèse selon laquelle la plante est capable de propager les sRNA comme des signaux pour l'ARNi. La capacité des

sRNA à se mouvoir est cruciale pour obtenir une amplification de la répression contre les virus. Cette amplification permet aux tissus non infectés de se préparer et de limiter la propagation des virus dans l'organisme. L'importance de cette mobilité dans la défense antivirale est appuyée par l'existence de VSRs (Viral Suppressors of RNA silencing) qui préviennent la diffusion du signal de plusieurs manières. De plus cela empêche l'initiation de la réponse antivirale, en séquestrant les sRNA, en empêchant la formation, l'assemblage fonctionnel ou l'inactivation du complexe RISC (Csorba et al., 2015).

## **1.4. ARN interférent et virus**

### **1.4.1. L'ARNi dirigé contre les virus**

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires et vont profiter de la machinerie de l'hôte pour se multiplier et se propager. Leur génome peut être constitué d'ADN ou d'ARN simples ou doubles brins, génome qui va être protégé de l'environnement par une structure de protéines, la capsid. Les virus encodent pour un petit nombre de gènes nécessaires à leur réplication et leur mouvement. En agriculture, les pertes de productivité due aux maladies de virus de plantes sont très importantes (Anderson et al., 2004; Boualem et al., 2016; Dangl et al., 2013). L'ARNi est ce que les plantes possèdent de plus immédiat pour se défendre contre les infections virales (Baulcombe, 2004). De façon similaire aux mécanismes endogènes, la défense est déclenchée par la présence d'ARN double brin d'origine viral, que ce soit des intermédiaires de réplication, des régions locales de complémentarité dans le génome viral ou encore par l'action de RDR sur ARN viral (Donaire et al., 2009; X. Qi et al., 2009b; Szittyta et al., 2010). L'ARN viral double brins est clivé par les protéines DCL pour donner des vsi-RNA (viral siRNA) qui vont être méthylés en 2'-O via l'intervention de HEN1 pour les protéger de la dégradation. L'un des brins du vsi-RNA va être chargé dans une protéine AGO pour assembler le RISC. Ce dernier va être guidé par le vsi-RNA pour interférer avec le génome viral via la complémentarité entre le guide et le génome (Pumplin & Voinnet, 2013; Ruiz-Ferrer & Voinnet, 2009). Dans le cas des virus à ADN qui ne se répliquent pas via des intermédiaires d'ARNdb,

il est supposé que les vsi-RNA sont formés à partir de transcription antisens, par l'activité des RDR ou de structure secondaire de l'ARN viral (Aregger et al., 2012; Blevins et al., 2006). La RdDM de la chromatine virale pourrait être une défense contre les virus à ADN (Raja et al., 2008; Rajamäki et al., 2014).

#### **1.4.2. Viral Suppressor of RNA silencing**

Une preuve que l'ARNi est un acteur majeur de la défense contre les infections virales est la capacité des virus de contrecarrer la réponse de l'ARNi par l'action de VSR (Viral suppressors of RNA-silencing). Les VSR présentent une grande diversité dans leur séquence, leur structure et leur activité parmi les différentes familles de virus; ceci laisse penser à des origines indépendantes (Incarbone & Dunoyer, 2013). Du fait de leur diversité, les VSR peuvent agir de différentes façons pour prévenir l'ARNi. La stratégie de nombreux VSR est de séquestrer les duplex de sRNA (vsiRNA et miRNA) et ainsi prévenir les étapes suivantes de l'ARNi (Lakatos et al., 2006; Silhavy et al., 2002). D'autres VSR vont inhiber la réponse de l'ARNi en se liant avec les sRNA, prévenant ainsi l'intervention des protéines de l'hôte impliqué dans l'ARNi (Hemmes et al., 2007; Kubota et al., 2003). Il existe une troisième stratégie que les virus possèdent pour contrecarrer l'ARNi; ils peuvent déstabiliser les protéines AGO et donc prévenir la formation du RISC ou son inactivation (Nicolas Baumberger et al., 2007; Bortolamiol et al., 2007). Les VSR sont très importants pour les virus ; pour preuve, tous les virus en possèdent même si leur nature ou leur fonction diffère. Malgré la présence de VSR, les virus sont tout de même ciblés de façon plus ou moins efficace par l'ARNi.

## 1.5. L'ARN interférent et son interaction avec les viroïdes

### 1.5.1. Les viroïdes capables de déclencher l'ARNi

De façon similaire aux virus, les viroïdes se répliquant provoquent le déclenchement de la machinerie de l'ARNi des plantes (Itaya et al., 2001; Papaefthimiou et al., 2001; M.-B. Wang et al., 2004). Pour se protéger des pathogènes, les plantes ont développé des stratégies de défenses pour combattre les infections aux viroïdes. Il semble que les 4 protéines DCL sont capables de cliver l'ARN des viroïdes (Dadami et al., 2013; Navarro et al., 2009). L'ARN des viroïdes matures est directement ciblé par les DCL, ce qui va entraîner leur dégradation endonucléaire en vd-siRNA (viroid derived siRNA) (Itaya et al., 2007). Des études appuient cette affirmation en démontrant que des transcrits de PSTVd et PLMVd (Peach Latent Mosaic viroid) sont clivés en vd-siRNA après incubation *in vitro* avec des extractions contenant les DCL (Itaya et al., 2007; Landry & Perreault, 2005). Comme vu dans la partie sur la réplication des viroïdes, il existe des étapes intermédiaires à ARNdb entre 2 formes matures d'un viroïde. Ces formes intermédiaires peuvent être ciblées par les DCL en plus de la forme mature ayant des zones partiellement ARNdb. Chez les plantes, les transcrits aberrants comme les ARN n'ayant pas de coiffe et/ou de queue de polyA sont copiés en ARNdb par la RDR6 dans le cytoplasme et certainement dans le noyau aussi (Gazzani et al., 2004; Luo & Chen, 2007). Il est raisonnable d'émettre l'hypothèse selon laquelle les viroïdes matures ou leurs intermédiaires de réplication vont être reconnus comme les ARN aberrants décrits précédemment. Il a été montré indirectement que RDR6 est capable de transcrire l'ARN de PSTVd lors d'une étude sur une infection chez un mutant RDR6 de *N. benthamiana* (Francesco Di Serio et al., 2010). Il fut observé que RDR6 est associé avec un retard dans l'accumulation de PSTVd et de son exclusion du méristème. En association avec la RDR6, RDR2 semble être capable de copier les transcrits négatifs oligomériques des viroïdes de la famille des *Pospiviroidae* s'accumulant dans le noyau des cellules (Tabler & Tsagris, 2004). Pour la famille des *Avsunviroidae*, ce n'est pas certain qu'il soit traité par les RDR (Schiebel et al., 1998). Il est intéressant de noter que RDR1 a été montré comme étant plus exprimé dans des plants de tomates infectés avec PSTVd (Schiebel et

al., 1998). Indifféremment de leur origine, les vd-siRNA sont chargés dans les protéines AGO (Minoia et al., 2014a) pour cibler les viroïdes matures et/ou leurs intermédiaires de réplication (cis-PTGS). En plus du cis-PTGS, les vd-siRNA semblent également être capables de cibler les gènes de l'hôte (trans-PTGS) ainsi que se faire de la RdDM. Les trois cas de figure seront développés ultérieurement.

### 1.5.2. Viroïdes et protéines Dicer

Comme abordé dans les parties précédentes, les protéines DCL ont des fonctions redondantes et sont localisées dans la périphérie du noyau (Pontes et al., 2013). De plus, on a également vu que les viroïdes des 2 familles sont ciblés par les DCL (Martínez de Alba et al., 2002; Papaefthimiou et al., 2001). Les *Pospiviroidae*, qui se répliquent dans le noyau, sont certainement ciblés par les DCL lors de cette réplication. De leur côté, pour les membres de la famille des *Avsunviroidae*, l'hypothèse est qu'ils sont ciblés par les DCL lors de leur passage dans le cytoplasme (Gómez & Pallas, 2012). De plus, il est possible que les viroïdes soient ciblés par les DCL dans le cytoplasme pendant leur mouvement de cellule en cellule et leur mouvement longue distance. Il a été montré que l'ensemble des vd-siRNA produits lors d'une infection ne couvre pas l'intégralité du génome du viroïde; ceci renforce l'idée que les viroïdes dans leur forme simple brin plutôt que leur forme double brin sont ciblés par les DCL (Itaya et al., 2007). Cependant, il est bon de noter que même lorsque l'ARNdb clivé par les DCL est parfaitement double brin, il n'en résulte pas une population homogène de sRNA le long de l'ARNdb, mais présente des points chauds (Hotspot) (Sasaki et al., 2014). Chez des tomates transgéniques exprimant un transgène hairpin-PSTVd, les siRNA dérivés de cette hairpin montrent des hotspots d'accumulation similaires à ceux observés lors d'infections naturelles (Schwind et al., 2009). Les hotspots, quant à eux, reflètent des disparités dues aux différences de traitement par les DCL, une différence de chargement/stabilité dans les AGO ou une difficulté de clonage/séquençage des sRNA n'est pas claire. Il est important de noter que les régions parfaitement alignées dans les viroïdes matures ne sont pas plus longues que 14 paires de bases (pb) (M.-B. Wang et al., 2004). Un fragment de 14 pb d'ARNdb est sous le minimum pour être ciblés par les DCL qui

ont besoin au moins de 19 pb d'ARNdb parfait (J.-Y. Yu et al., 2002). Cependant, des vd-siRNA des 2 polarités ont été détectées par séquençage et Northern Blot (Itaya et al., 2007; Machida et al., 2007; Y. Wang et al., 2011), ce qui laisse suggérer que le clivage n'est pas forcément réalisé sur l'ARNdb. Pour résumer, les données actuelles ne permettent pas d'affirmer si les DCL clivent uniquement les viroïdes dans leur forme ARNdb ou ARNsb, mais plutôt un mélange des deux. Les vd-siRNA des viroïdes suivants appartenant soit aux *Pospiviroidae* ou aux *Avsunviroidae* ont été détectés par northern blot et/ou par séquençage des sRNA : PSTVd (Dadami et al., 2013; Francesco Di Serio et al., 2010; Diermann et al., 2010; Itaya et al., 2001; Machida et al., 2007), ASVd (avocat sunblotch viroid) (Markarian et al., 2004), hop stunt viroid (HSVd) (Gómez et al., 2008b; Navarro et al., 2009), grapevine yellow speckle viroid 1 (GYSVd1) (Navarro et al., 2009). Les vd-siRNA ont été montrés comme étant phosphorylés à leur début en 5' et méthylés à leur fin en 3' par HEN1 (Martín et al., 2007). Les vd-siRNA(+) sont répartis en hotspots sur le génome du viroïde, alors que pour les vd-siRNA(-), la répartition se fait tout du long du génome (Itaya et al., 2007; Y. Wang et al., 2011). Il est bon de noter que cette découverte n'est peut-être pas révélatrice du point de vue biologique, mais peut-être due à un biais du séquençage ou une différence de stabilité des différents vd-siRNA. Il n'est également pas certain que les vd-siRNA soient des duplex d'ARNdb parfaits ou possèdent des boucles asymétriques en leur sein. Ce dernier point peut être d'une importance biologique majeure et pourrait être impliqué dans l'ARNi en initiant un changement de conformation d'AGO1 (Chen et al., 2010; Cuperus et al., 2010; McHale et al., 2013).

Une co-immunoprécipitation des protéines AGO d'*A. thaliana*, exprimée de façon transitoire chez *N. benthamiana* infecté par PSTVd, révèle que AGO1, AGO2 et AGO3 se lient préférentiellement avec les vd-siRNA de 21 et 22 nucléotides; alors que AGO4, AGO5 et AGO9 se lient plutôt avec des vd-siRNA de 24 nt (Minoia et al., 2014b). Cependant, il n'est pas certain si le complexe vd-siRNA/AGO est présent dans le cytoplasme et le noyau. Chez la tomate, les vd-siRNA dérivés de PSTVd sont présents uniquement dans le cytoplasme (Denti et al., 2004).



### 1.5.3. Ciblage des viroïdes par le PTGS (cis-PTGS)

La structure secondaire si particulière des viroïdes laisse suggérer que ces derniers peuvent échapper ou sont résistants au PTGS (Itaya et al., 2007; M.-B. Wang et al., 2004). Il est certain que lors d'une infection naturelle, les vd-siRNA produits sont incapables d'éliminer le viroïde correspondant. Cependant, il existe plusieurs exemples qui démontrent que le PTGS est capable de cibler les viroïdes. Chez des plants de tomates transgéniques exprimant en grande quantité une hairpin-PSTVd, l'infection de ces mêmes plants avec PSTVd était inefficace (SCHWIND et al., 2009). De même chez des transgéniques de *N. benthamiana* exprimant un transgène hairpin-PSTVd dans un stock de racines, la partie supérieure de la greffe présente des symptômes atténués d'infection (Kasai et al., 2013). Une expression transitoire des protéines AGO1, AGO2, AGO4 et AGO5 par agroinfiltration chez des tissus infectés avec PSTVd de *N. benthamiana* entraîne une diminution des niveaux d'ARN de viroïdes. Ceci laisse suggérer que les viroïdes ou leurs précurseurs sont ciblés par les siRNA (Minoia et al., 2014b).

Enfin, une étude de co-infection de citronnier par le CDVd (citrus dwarfing viroid) et le CTV (citrus tristeza virus) montre que la quantité de viroïdes augmente grâce à l'action d'un acteur du virus inhibant l'ARNi. Ceci laissant penser que les viroïdes n'échappent pas complètement au cis-PTGS (Serra et al., 2014). Apparemment, les vd-siRNA sont incapables de déclencher le PTGS au niveau du noyau (Athanasios Dalakouras et al., 2015). Il est donc possible d'assumer que les viroïdes sont capables d'être ciblés uniquement dans le cytoplasme quand ils se déplacent du noyau (*Pospiviroidae*) et des chloroplastes (*Avsunviroidae*) aux cellules voisines.

### 1.5.4. Viroïdes et trans-PTGS

Les vd-siRNA sont possiblement capables de cibler des transcrits de l'hôte, réalisant de fait du trans-PTGS. Ainsi, les symptômes issus d'une infection aux viroïdes seraient basés sur l'inhibition de l'expression de gènes de l'hôte (Hammann & Steger, 2012b; Papaefthimiou et al., 2001; M.-B. Wang et al., 2004). Cette affirmation est soutenue par de multiples observations.

Chez des tomates exprimant un hairpin d'ARN constitué de la quasi-totalité de la séquence de PSTVd, on note l'apparition d'un phénotype similaire à une infection naturelle de PSTVd (M.-B. Wang et al., 2004). Encore chez des tomates infectées avec PSTVd, l'accumulation de plusieurs miRNA endogènes est supprimée, donc les vd-siRNA induisent une diminution du miRNA correspondant (Diermann et al., 2010). Deux gènes de la tomate, impliqués dans la biosynthèse de la gibbérelline et de l'acide jasmonique, possèdent des sites de liaisons pour des vd-siRNA dans leur ORF et sont réprimés dans les premiers temps d'une infection à PSTVd (Y. Wang et al., 2011). Lors d'une infection de tomates par TPMVd (tomato planta macho viroid), un ARNm de l'hôte a été prédit puis validé comme étant clivé par un vd-siRNA (Avina-Padilla et al., 2015).

Comme évoqué précédemment, les vd-siRNA ne sont pas nécessairement des duplex parfaits, mais peuvent contenir des boucles asymétriques. De tels siRNA sont suggérés comme étant capables de changer AGO1 en une structure permettant l'initiation de l'ARNi transitif en recrutant RDR6 (Manavella et al., 2012). Ce recrutement de la RDR6 va entraîner la production de siRNA secondaires qui peuvent avoir le potentiel de cibler des gènes de l'hôte n'ayant aucune homologie avec le génome du viroïde ; on a donc un effet hors cible. Il est intéressant de savoir que chez *N. benthamiana*, les symptômes induits par HSV sont dépendants de l'activité de la RDR6 (Gómez et al., 2008a). À l'inverse, toujours chez *N. benthamiana*, les symptômes issus d'une infection à PSTVd sont indépendants de la RDR6 (Francesco Di Serio et al., 2010). Il est bon de noter que l'activation de l'ARNi contre les virus chez *Arabidopsis* est accompagnée par la production de vasiRNAs (virus-activated siRNA) de 21 nt par la RDR1. Ces vasiRNA sont transcrits à partir des gènes de l'hôte et déclenchent l'inhibition de nombreux endogènes (Cao et al., 2014). Pour le moment, un tel mécanisme n'est pas connu pour les viroïdes.

#### **1.5.5. Viroïdes et RdDM (RNA-directed DNA methylation)**

En plus de l'activation du PTGS, les membres de la famille des *Pospiviroidae* ont la capacité de déclencher la RdDM de séquences homologues (Wassenegger, 2000; Wassenegger et al., 1994).

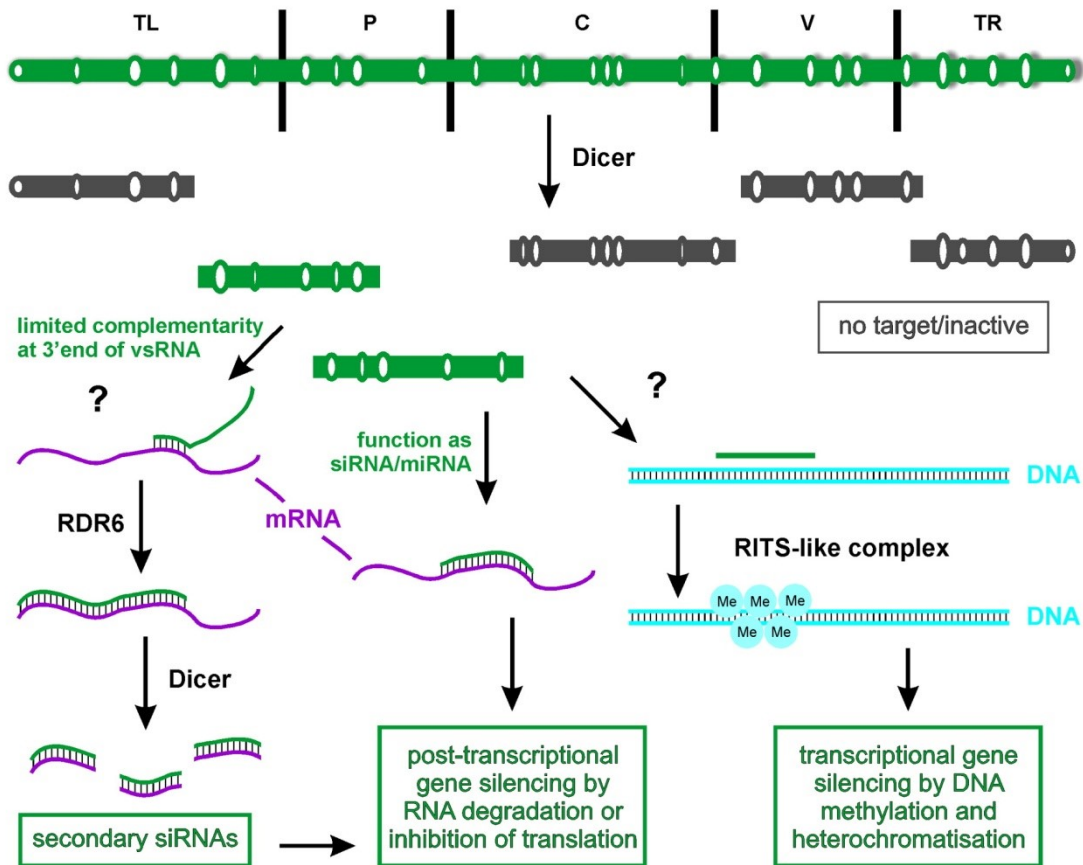
L'ADN des chloroplastes n'est pas méthylé, mais à ce jour, il n'a pas été déterminé si oui ou non les membres de la famille des *Avsunviroidae* peuvent déclencher la RdDM sur des séquences d'ADN nucléaires apparentées. La RdDM induite par les viroïdes a été découverte chez des plants de tabacs infectés avec PSTVd contenant des copies multimériques de PSTVd intégrées dans leur génome (Wassenegger et al., 1994). La RdDM induite par les viroïdes est hautement dépendante de l'homologie entre la séquence du viroïde et la séquence cible; elle requiert une cible d'une taille minimale de 30pb (Thierry Péliissier & Wassenegger, 2000), mais peut être inhibée par certaines séquences d'ADN (Athanasios Dalakouras et al., 2010). Il en résulte une dense méthylation des cytosines dans les contextes suivants : CG, CHG CHH (T Péliissier et al., 1999). Seule la méthylation CG est maintenue dans une descendance non infectée issue de parents infectés avec un viroïde (Athanasios Dalakouras et al., 2012).

L'importance biologique de la RdDM lors d'une infection par un viroïde reste incertaine. Chez le concombre, une infection par HSVd induit un changement dans la dynamique de la méthylation de l'ADN des gènes d'ARN ribosomal (Martinez et al., 2014), ceci indiquant que l'épigénétique peut avoir un impact sur l'initiation des symptômes de viroïdes. La façon dont les viroïdes induisent la RdDM n'est pas claire; le modèle actuel de RdDM suggère que des siRNA de 24nt guident la machinerie de la RdDM à leur cible (Matzke & Mosher, 2014). Cependant, il semble probable que les siRNA ne soient pas les guides directs de la RdDM, mais qu'ils soient plutôt impliqués dans une étape intermédiaire (A Dalakouras et al., 2013). De nouvelles études sont nécessaires pour découvrir si une infection de viroïde est en effet associée avec la méthylation de novo d'endogènes qui sont impliqués dans l'apparition des symptômes.

## 1.6. Objectifs

Les viroïdes ont une capacité à infecter un nombre restreint de plantes. Y a-t-il des gènes conférant la résistance aux viroïdes ou une sensibilité qui existe ? En biologie végétale, le modèle de plante est *A. thaliana*. Or, à ce jour, cette dernière n'est pas connue pour être infectée par aucun viroïde.

Des études précédentes dans le laboratoire ont mis à jour que les différents écotypes d'une même espèce vont présenter des sensibilités différentes pour un même virus. Il en ressort que les allèles AGO2 des écotypes Col-0 et C24 vont être respectivement plus résistants et plus sensibles à PVX. En sachant ceci, le premier objectif que nous nous sommes fixés est d'identifier au moins un écotpe sensible d'*A. thaliana* aux viroïdes. Les 2 collections d'écotypes à disposition vont être criblées une première fois avec un mélange de trois viroïdes (PSTVd, HSVd et CLVd). Par la suite, des infections individuelles vont permettre d'identifier lequel ou lesquels de ces viroïdes à la capacité d'infecter l'écotype.



**Figure 3 : Hypothèses pour l'origine des symptômes causés par les viroïdes**

Par la suite se trouvent des croisements successifs avec l'écotype possédant le plus de mutants disponibles, Col-0 (Columbia), et ce afin de diminuer la part du génome de l'écotype sensible au fur et à mesure des générations tout en gardant la sensibilité aux viroïdes. Une fois le pourcentage d'écotype sensible suffisamment faible, le but est d'identifier le ou les gènes apportant la sensibilité aux viroïdes; ceci rendant disponible un modèle d'études des viroïdes dans la plante modèle en biologie moléculaire végétale.

Une fois le modèle en place, il devient possible d'étudier plus facilement plusieurs zones d'ombres chez les viroïdes. Parmi ces dernières, les acteurs de réplication des viroïdes ne sont pas tous connus, tout comme les moyens utilisés pour leur déplacement de cellule en cellule et leur mouvement via le phloème. Comment interagissent-ils avec l'ARNi est également

méconnu; comment, dans certains cas, l'ARNi va être capable de cibler et éliminer les viroïdes, et dans d'autres, les viroïdes vont emballer le système de l'ARNi et induire des symptômes via ce dernier. Avec un modèle en place, il devient aussi possible d'observer le fonctionnement d'une infection avec un viroïde. En effet, il existe plusieurs hypothèses (**Figure 3**) concernant l'induction de symptômes par un viroïde, hypothèses qui peuvent être étudiées avec un modèle approprié. *A. thaliana* est le modèle parfait en biologie végétale par sa facilité de croissance ainsi que par les connaissances sur son génome très nombreuse. À cela s'ajoutent une gamme de mutants et des ressources importantes à disposition.

Le second objectif de cette maîtrise est de caractériser l'efficacité de la protéine AGO2 d'*A. thaliana* à cibler les viroïdes et de la comparer avec celles de *N. benthamiana* et de la tomate. En effet, des lignées transgéniques de tomate présentes au laboratoire vont permettre de regarder la capacité de ces trois protéines AGO2 de combattre une infection à PSTVd, puisque ce viroïde est ravageur chez les tomates. La sensibilité aux viroïdes établie pour ces lignées transgéniques, il est important de tester également l'impact de ces transgènes sur la plante, c'est-à-dire de tester la capacité de la plante à faire des fruits, combien et leur taille.

## CHAPITRE 2

### MATÉRIELS ET MÉTHODES

#### 2.1. Matériel végétal et condition de croissance

Pour ce projet, plusieurs plantes sont utilisées : *A. thaliana*, *N. benthamiana* et *S. lycopersicum* avec plusieurs écotypes, mutants ou lignées transgéniques pour chaque espèce. Les graines d'*Arabidopsis* de tous les écotypes passent 3 jours à 4°C pour simuler l'hiver, c'est la vernalisation. Les graines poussent toutes dans le mélange Agromix de Fafard avec un cycle Jour/Nuit de 12h à 23°C. Pour *Nicotiana* et les tomates, le mélange BM6 de Berger sans vernalisation est préconisé ; le cycle Jour/Nuit est de 16h de jour pour 8h de nuit le tout à 21°C. Pour une obtention plus rapide des graines de tomates, un cycle avec un temps réduit, voire nul, de nuit peut être utilisé.

La liste des différents écotypes d'*A. thaliana* utilisés peut être retrouvée sur le site TAIR (<https://www.arabidopsis.org/index.jsp>). Ils font partie deux collections différentes, la collection provenant du laboratoire de D. Weigel, MPI (Max Planck Institute) et la seconde du laboratoire Joy Bergelson, Martin Kreitman, Magnus Nordborg. La liste des écotypes montré dans les différentes figures est visible au tableau 1.

Pour ce qui est des lignées transgéniques de tomates et de *N. benthamiana*, les graines étaient déjà présentes au laboratoire. Les graines de *N. benthamiana* CRISPR-AGO2 proviennent de Márta Ludman, József Burgyán et Károly Fátyol (Ludman et al., 2017). Les plantes de type sauvage (WT) de *N. benthamiana* étaient elles aussi déjà au laboratoire. Pour finir, les graines du cultivar de tomates Moneymaker ont été achetées chez West Coast Seeds. Toutes les expériences ont été répétées 3 fois avec 3 plantes ou plus par répétition.

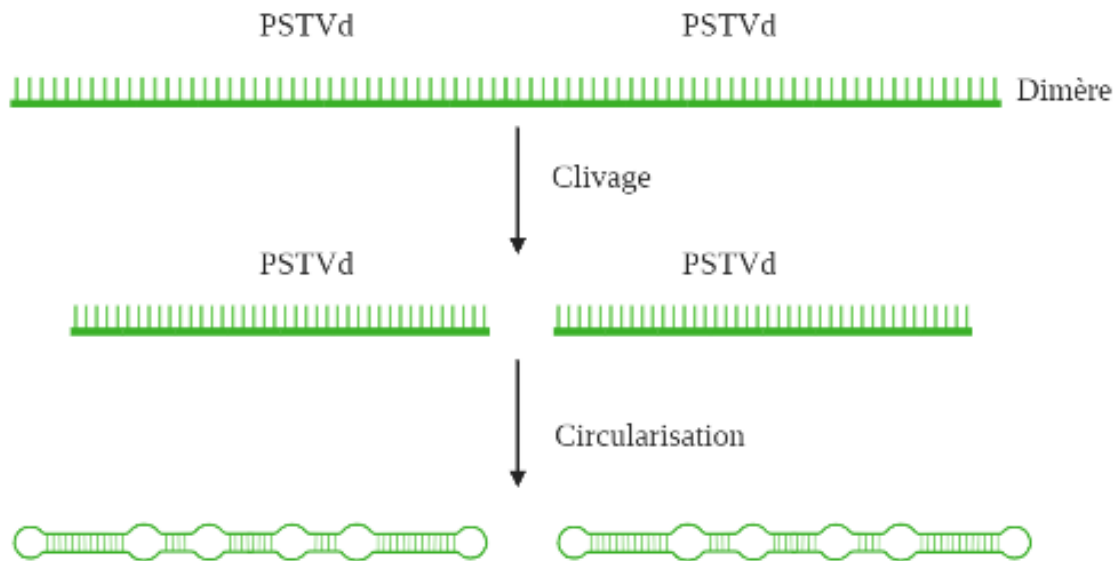
**Tableau 1 : Liste des écotypes présentés dans les différentes figures :**

<b>Tube</b>	<b>Stock Number</b>	<b>Name</b>	<b>Abréviation</b>	<b>Other Name</b>	<b>Country</b>	<b>Collection</b>
<b>10</b>	CS22573	Eden-2	<b>Eden-2</b>	N22573	Sweden	Joy Bergelson, Martin Kreitman, Magnus Nordbourg
<b>70</b>	CS22633	Bayreuth	<b>Bay-0</b>	N22633	Germany	
<b>81</b>	CS22644	Warschau	<b>Wa-1</b>	N22644	Poland	
<b>29</b>	CS76422	Krasnaja Zorka	<b>Krazo-2</b>	ice 75	Russia	D. Weigel lab, MPI
<b>43</b>	CS76370	Petrovac	<b>Petro-1</b>	ice 21	Serbia	
<b>46</b>	CS76426	Lebjashje	<b>Leb-3</b>	ice 138	Russia	
<b>9</b>	CS76377	Stepnoje	<b>Stepn-2 (St-2)</b>	ice 60	Russia	

## **2.2. Inoculation des viroïdes et souches utilisées**

Le projet utilise 3 viroïdes différents : PSTVd (potato spindle tuber Viroid), HSVd (hop stunt viroid) et CLVd (columnnea latent Viroid). Les souches ont pour numéro d'accèsion respective AY937179.1 potato spindle tuber viroid strain PSTVd\_intermediate, AB055634.1, hop stunt viroid variant AD2 genomic RNA, et AY367350.1 columnnea latent viroid isolate 89001013. Les viroïdes nous ont été fournis par le laboratoire du professeur Jean-Pierre Perreault de l'université de Sherbrooke, sous la forme de transcrits *in vitro*.

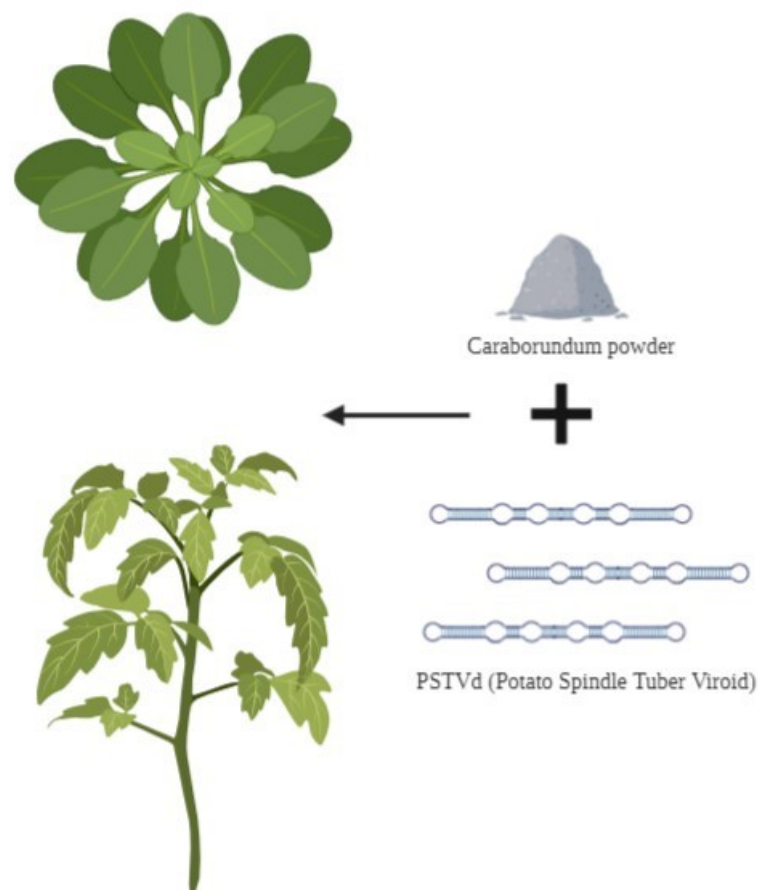




**Figure 4 : Obtention de viroïdes mature à partir de dimères :** Les viroïdes fournis sont issus d'une transcription *in vitro* donnant pour résultat un dimère pour le viroïde transcrit. Lors de l'inoculation de ce dimère dans une plante, un clivage de ce dernier va être effectué. À la suite du clivage, le viroïde va se circulariser obtenant alors sa forme mature.

Pour l'inoculation, 3 voies peuvent être empruntées. La première, et la plus employée, est l'inoculation par frottement (Figure 5). Les viroïdes sont intégrés sous forme de dimères dans des plasmides de transcription *in vitro* (Marquez-Molins et al., 2019). Cette construction binaire sous le contrôle d'un promoteur T7 permet d'obtenir une solution contenant de l'ARN infectieux dimérique. Ces dimères de viroïdes après inoculation vont être clivés puis se circulariser, donnant ainsi un viroïde mature (Figure 4). Après l'application d'un composé abrasif (Carbon powder) sur les feuilles à infecter, au nombre de trois par plantes, on dépose 1000 ng d'ARN infectieux. La solution d'ARN infectieux est composée des dimères obtenus de façon *in vitro* dilués avec de l'eau distillée stérile et un tampon phosphate 0,5 M pH 7,0 (concentration finale 0,05 M). La seconde méthode d'inoculation passe encore par un plasmide (pbin61) dans lequel est insérée la construction dimérique du viroïde voulu afin de faire de l'agro-infiltration par *Agrobacterium tumefaciens* (Gómez et al., 2008a). Enfin, la troisième manière d'infecter les

différentes plantes utilisées est de récolter les viroïdes déjà matures d'une infection précédente. Ceci pouvant augmenter la variabilité génétique due aux erreurs de réplifications qui augmentent la diversité génétique des viroïdes au cours d'une infection. Pour limiter cet effet, un gros stock de viroïdes mature est réalisé par extraction de la sève d'un plant de tomate infecté par PSTVd. Une fois ce stock réalisé, la méthode d'infection est la même que pour l'ARN infectieux.



**Figure 5 : Méthode d'infection des plantes pour les viroïdes et virus :** L'inoculation par frottement est réalisée avec une poudre de carbone qui par frottement sur la feuille va endommager les tissus de surface. Ceci va permettre aux viroïdes au préalable déposés de pénétrer dans la feuille.

### **2.3. Détection des viroïdes**

Une fois l'infection en place, il faut vérifier la présence ou non de viroïdes dans la plante. En plus du contrôle de l'aspect phénotypique de l'infection, il faut déterminer la présence de viroïdes matures dans l'organisme.

#### **2.3.1. Extraction de l'ARN et RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR)**

Pour l'extraction d'ARN, deux options sont possibles. Dans le cas d'une extraction en vue d'une RT-PCR, une bonne qualité et pureté de l'ARN est nécessaire. Pour ce faire, 100mg de tissu sont broyés dans de l'azote liquide, puis l'ARN est extrait en utilisant le kit « RNA extraction kit » de Qiagen puis suivi d'un traitement pour éliminer les RNases « RNase-Free DNase » de Qiagen. Pour les deux kits, les recommandations des protocoles sont suivies sans modification. La qualité et la pureté de l'ARN sont vérifiées par l'utilisation d'un spectrophotomètre ; le degré de pureté ciblé est compris entre 1,7 et 2,2. L'intégrité de l'ARN est vérifiée par une électrophorèse dans un gel d'agarose à 1,5%. Une fois ces vérifications effectuées, l'ADNc est synthétisé à partir de l'ARN obtenu précédemment avec l'utilisation du kit « All-in-one RT MasterMix » d'abm® en suivant le protocole et en appliquant 1000ng d'ARN par échantillon. Ce kit s'est montré le plus efficace pour réaliser des RT-PCR sur des viroïdes matures. Les différentes amorces utilisées sont disponibles dans le tableau 2.

**Tableau 2 : Amorces PCR et qPCR utilisées.**

<b>Amorces</b>	<b>Séquences 5' -&gt; 3'</b>
qPCR PSTVd F2	TCGTGGTTCCTGTGGTTCAC
qPCR PSTVd R2	GGTGAAAACCTGTTTCGGC
qPCR PSTVd F3	CCCTTCCTTTCTTCGGGTGT
qPCR PSTVd R3	GTTTCCACCGGGTAGTAGCC
qPCR PSTVd F4	AACTCGTGGTTCCTGTGGTT
qPCR PSTVd R4	GGTGAAAACCTGTTTCGGC
qPCR PSTVd F5	CTCGTGGTTCCTGTGGTTCA
qPCR PSTVd R5	CGGGAATTACTCCTGTTCGGC
qPCR SL Ubi3 F1	GAAACCCTAGAAGCCGCAGT
qPCR SL Ubi3 R1	CTGCTTTCCGGCGAAAATCA
PSTV-231F	GCC CCC TTT GCG CTG T
PSTV-296R	AAG CGG TTC TCG GGA GCT T
PSTVd-For-BssSal	CTCGTGGTTCCTGTGGTTCACAC
PSTVd-Rev-StyI	CCAAGGGCTAAACACCCTCGC
AtAGO2-HA-F1	GCCACCATGTACCCATACGA
AtAGO2-HA-R1	CACGACCACGACCTTGTTCT
AtAGO2-HA-R2	CCACGACCTTGACCACGATT
NbAGO2-HA-F1	GCCACCATGTACCCATACGA
NbAGO2-HA-R1	GCTATCACCTCCACCACCAC
NbAGO2-HA-R2	GGCCTTGCTCCTGTTCGTAT
SlAGO2-F1	GGGAATCGGCCTGTGAAGAA
SlAGO2-R1	CTTCCCCGTCAGACCAGTTC
SlAGO2-F2	TGTCAAGTCAATTGCGCTGC
SlAGO2-R2	CTTCACAGGCCGATTCCCAT
qPCR TomUbi3 F	CACTCTCCATCTCGTGCTCC
qPCR TomUbi3 R	GCAACACAGCGAGCTTAACC

### 2.3.2. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Pour la détection des viroïdes par PCR, l'ADNc correspondant va être utilisé. Chaque réaction de PCR contient du tampon ThermoPol 10X, de la TaqDNA Polymérase (New England Biolabs), 0,2 mM du mix de dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,6 µM de chaque amorce spécifique pour le viroïde voulu. Les réactions PCR sont réalisées en thermocycleur avec des paramètres

correspondant aux spécificités de la paire d'amorces pour permettre une amplification spécifique. Pour toutes les PCR portant sur les viroïdes, la température d'hybridation est de 58°C. Le cycle complet est le suivant : dénaturation initiale 5min à 95°C, puis 35 cycles avec 10s de dénaturation à 95°C, 20s d'hybridation à 58°C et 30s d'élongation à 72°C, enfin une élongation finale de 3 min à 72°C. Le résultat de la PCR est observé par électrophorèse d'un gel d'agarose 2%.

### 2.3.3. PCR en temps réel (RT-qPCR)

Les différentes expériences de RT-qPCR sont réalisées dans la machine CFX96 de BioRad®, permettant analyse de l'expression relative. Chaque réaction contient un Mastermix SYBR Green de WISENT, 400 µM des deux amorces ainsi qu'une dilution au 1/5 de 2 µg d'ADNc. Les cycles d'amplification sont les suivants après optimisation : 2 min 95°C puis 40 cycles avec 5 sec à 95°C et 30 sec à 60°C. Ces cycles sont suivis par l'étape des courbes de fusion afin de vérifier la spécificité des amorces utilisées. Toutes les réactions de RT-qPCR sont réalisées en triplicatas biologiques et techniques. Pour normaliser les résultats, un gène de référence doit être déterminé. Pour les viroïdes, c'est l'ubiquitine UBI3 qui est retenue pour la tomate et la tubuline (TUA6) pour *N. benthamina*. Pour obtenir l'expression relative des analyses la formule mise en place par (Pfaffl, 2001) est utilisée. Les cycles seuils (Ct : Cycle threshold) de chaque échantillon et chaque réaction sont tout d'abord convertis en expression relative (ER). Pour ce faire, on normalise les Ct pour chaque échantillon ce que l'on nomme Ct 1, on fait de même pour les Ct de la condition contrôle (Ct Ø). La différence de ces deux Ct nous donne :  $\Delta Ct1 = Ct1 - Ct \emptyset$ . Par la suite, une deuxième normalisation est effectuée pour les gènes de références (Ct ref) ainsi que la condition contrôle (Ct Øref). De même que précédemment la différence des deux donne :  $\Delta Ctref = Ct \text{ ref} - Ct \emptyset \text{ref}$ . Pour déterminer l'expression relative, il faut également prendre en compte l'efficacité des amorces (EA). Ceci donne la formule suivante pour l'expression relative :  $ER = EA1(\Delta Ct1) / EAref(\Delta Ctref)$ . Une fois l'expression relative obtenue, il reste l'analyse statistique à réaliser. Cette dernière se fait par ANOVA à comparaison multiple ou par un test T selon l'expérience réalisée.

#### 2.3.4. Northern Blot

Dans le cas des northern blot, l'extraction d'ARN a été effectuée en suivant le protocole fourni avec le Qiazol (Qiagen®). La détection des viroïdes par northern blot permet d'observer les deux formes des viroïdes : la forme circulaire qui est celle des viroïdes matures et la forme linéaire qui peut être originaire des intermédiaires répliqués ou issue de viroïde mature linéarisé au cours des manipulations. Pour la détection des viroïdes, des sondes correspondantes à chaque viroïde sont créées ; ces sondes ont la particularité d'intégrer des nucléotides modifiés portant une Digoxigénine (DIG), permettant ainsi la détection avec un anticorps spécifique. Les Northern blot sont réalisés soit sur gel d'agarose 2%, soit sur gel de polyacrylamide 5%. Pour le gel d'agarose, on dissout 1.2 g d'agarose dans 110 mL de MOPS 1X une fois la solution chauffée on complète le tout avec 10 mL formaldéhyde à 37%. On dépose 15 µg d'ARN avec du tampon de charge pour l'ARN. On chauffe l'ensemble à 65°C pendant 10 min puis on laisse reposer 5 min sur glace. Le gel est migré pendant 2h à 70 V dans du tampon 1X MOPS. À la suite de la migration, le gel est rincé 2 fois dans du 20X SSC (Salin Sodium Citrate) pendant 15 min puis 1 fois dans de l'eau distillée stérile pendant 10 min. Le transfert du gel vers la membrane se fait par capillarité avec pour solution du 20X SSC pendant toute la nuit. Le lendemain la membrane est fixée sous UV pendant 105 secondes et 15 000 J. Pour vérifier que le transfert a bien fonctionné, on peut colorer la membrane avec une solution de bleu de méthylène (0.02% w/v). La membrane est ensuite décolorée avec une solution 0,2X SSC et 1% SDS. La membrane est ensuite préhybridée dans 10 mL du tampon DIG Easy Hyb de Roche pendant 6h à 50°C. Peu de temps avant la fin des 6h, les sondes sont dénaturées 5 min à 95°C puis on ajoute 5 à 10 µL au tampon. L'hybridation continue ainsi toute la nuit à 50°C. La suite du protocole est décrite en détail dans le protocole fourni par Roche (DIG Easy Hyb).

## **2.4. Détection des protéines AGO2 (SIAGO2, NbAGO2 et AtAGO2)**

### **2.4.1. Western Blot**

La première étape pour détecter les AGO2 par western Blot est d'extraire les protéines. Pour ce faire, on utilise un tampon d'extraction de protéines (4% SDS, 20% glycérol, 10% 2-mercaptoéthanol, 0.004% bleu de bromophénol, 0,125 M Tris HCl). Après avoir broyé dans de l'azote liquide les tissus, on ajoute à raison de 100mg de tissus pour 100-200 µL de tampon. Après récupération du surnageant et l'ajout de tampon de charge, le tout est chauffé à 95°C pendant 5 min puis centrifugés 5 minutes à 13000 g. Ces étapes sont nécessaires pour dénaturer les protéines et leur donner une charge négative. Le surnageant obtenu est chargé sur un gel SDS-PAGE pendant 1h, d'abord à 90 V puis 110V au bout de 5 à 10 min. À l'issue de la migration, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (Bio-RAD, ON, Mississauga). Les protéines *NbAGO2* et *AtAGO2* des lignées transgéniques possèdent une étiquette HA (HA-Tag) permettant d'utiliser un anticorps anti-HA (dilution 1 : 3000) comme anticorps primaire et un anticorps secondaire d'âne anti-IgG polyclonal de lapin HRP (dilution 1 : 10 000). Pour vérifier un chargement égal en protéines des différents gels, on vérifie avec une coloration au rouge de Ponceau.

### **2.4.2. Extraction d'ARN, RT-PCR et RT-qPCR**

Il est également possible de vérifier la présence des transgènes par PCR ou même de quantifier leur présence lors des infections et en dehors des infections via la RT-qPCR. Dans les deux cas, l'extraction de l'ARN va être la même que pour les viroïdes, donc avec le kit Qiagen. Par la suite, le même protocole pour obtenir l'ADNc est utilisé. Seules les amorces pour PCR et pour qPCR vont être spécifiques au transgène visé. L'ubiquitine est utilisée comme gène de référence dans ce cas-là aussi.

### **2.4.3. Expression transitoire chez *Nicotiana benthamiana***

*N. benthamiana* est utilisée afin d'exprimer de façon transitoire les protéines *SlAGO2*, *AtAGO2* et *NbAGO2*, toutes trois Flag-Tag. Cette expression transitoire chez *N. benthamiana* CRISPR-AGO2 permet d'étudier la stabilité et l'efficacité des différentes AGO2 vis-à-vis des viroïdes (PSTVd). Les vecteurs binaires transformés dans la souche C58C1 d'*A. tumefaciens*, souche contenant un plasmide « helper » pSoup, le tout via électroporation (H. D. Jones et al., 2005). Pour donner suite à la transformation, une sélection des bactéries contenant le plasmide est réalisée sur milieu contenant un ou des antibiotiques. Ensuite, une culture en bouillon est réalisée, après centrifugation et resuspension dans du MgCl<sub>2</sub> 10 mM. Le tout est dilué à une densité optique de 0,2 et une longueur d'onde de 600 nm. Cette solution est finalement infiltrée à l'aide d'une seringue dans plusieurs feuilles des *N. benthamiana*.



## CHAPITRE 3

### RÉSULTATS

#### 3.1. Criblage des écotypes d'*Arabidopsis thaliana*

Il est important de mettre en place un modèle pour étudier les viroïdes afin de mieux comprendre comment et quels acteurs permettent la réplication des viroïdes. À ce jour, très peu d'articles ne traitent d'*Arabidopsis* et des viroïdes. Il en existe un seul montrant qu'*Arabidopsis* n'est pas capable d'être infecté par les viroïdes, mais possède la machinerie enzymatique pour leur réplication *in vitro* (Daròs & Flores, 2004). Dans cet article, seule la sensibilité de l'écotype Columbia (Col-0) a été testée. Or, dans le laboratoire de Peter Moffett, il a été montré par Chantal Brosseau que des écotypes d'*A. thaliana* montrent une variabilité de sensibilité vis-à-vis de PVX (potato virus X) (Brosseau et al., 2020). En partant de cette observation, nous avons émis l'hypothèse qu'il pourrait en être de même avec les viroïdes et les écotypes d'*A. thaliana*.

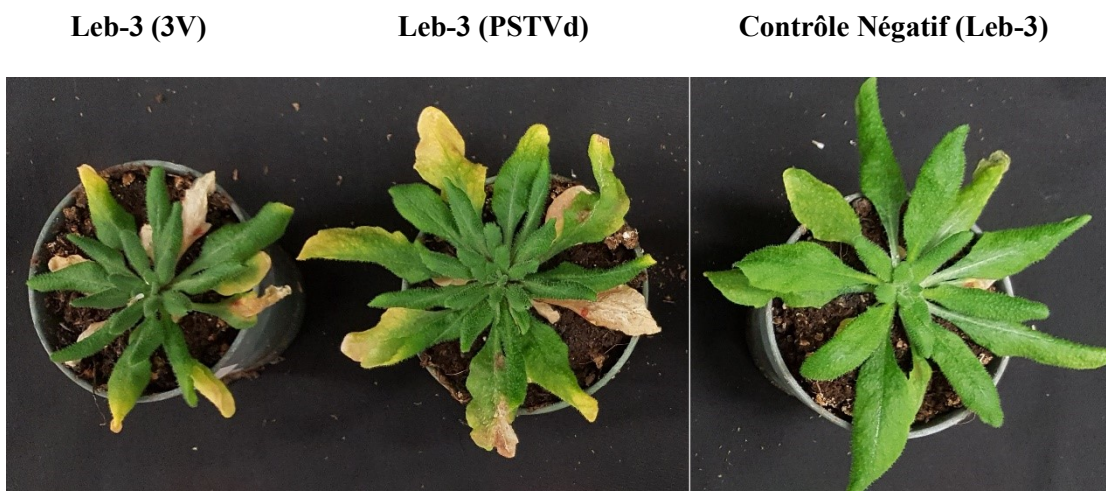
Pour ce faire, nous avons à notre disposition deux collections d'écotypes : une de 80 écotypes (D. Weigel lab, MPI) et l'autre de 96 écotypes (Joy Bergelson, Martin Kreitman, Magnus Nordborg). Pour ce qui est de la sélection des viroïdes, notre choix s'est arrêté sur les trois présentés en détails dans l'introduction, à savoir : PSTVd, HSVd et CLVd. Ces viroïdes sont obtenus par transcription *in vitro* sous forme dimères pour une raison : c'est la meilleure méthode pour une infection répétable. En effet, du fait de leur nature (ARN simple brin), au cours des réplifications, des erreurs vont survenir, erreurs qui ne sont pas réparés. Au fil du temps et des erreurs de réplifications certaines séquences vont former des groupes de population qui sont considérés comme des quasi-espèces. Ces dernières peuvent donc se comporter différemment que le matériel génétique de base. Donc en repartant à chaque infection du matériel de base, on augmente la répétabilité.

Après avoir défini quels viroïdes nous voulions tester, nous avons décidé que puisque nous cherchions un écotype sensible, peu importe le viroïde l'infectant, nous allions dans un premier temps faire un criblage d'écotypes en infectant chacun d'entre eux avec un mélange des trois viroïdes. Lors de ce premier criblage, l'observation du phénotype des plantes infectées contre le phénotype des plantes contrôles est important, mais pas suffisant. Tous les écotypes infectés, en plus de l'aspect phénotypique, sont soumis à un northern blot ou un dot blot afin de détecter la présence de viroïdes.



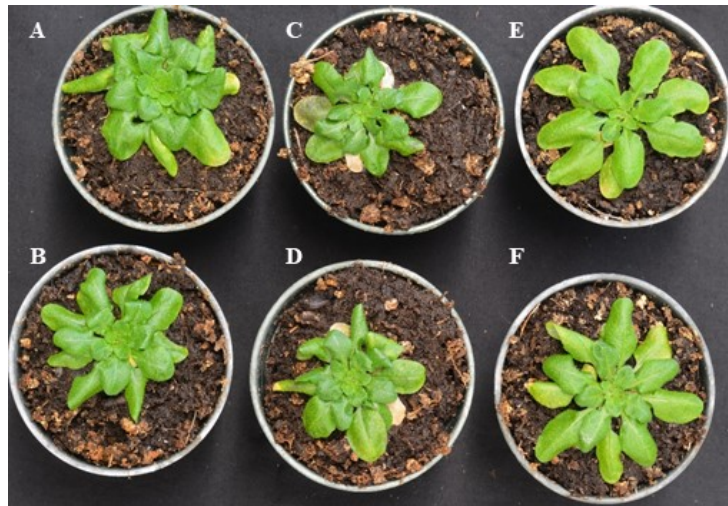
**Figure 6 : Phénotypes observés lors du premier criblage :** Écotypes N°43 A- Plante témoin et B- Plante infectée. Écotypes N°46 (Leb-3) C- Plante témoin D- Plante infectée. Écotype N°29 E- Plante témoin F- Plante infectée.

Lors des premiers criblages sur la collection de 80 écotypes, certains phénotypes ont pu être remarqués. En effet, comme montré à la figure 6, les phénotypes infectieux des viroïdes, lorsque symptôme il y a, peuvent être très différents d'un écotype à l'autre. Par exemple nous pouvons observer un retard de croissance des plants contre une croissance normale pour les témoins (N°46 = Leb-3, figure 6 et 7) ; une infection conduisant à la mort des plantes infectées (N°29, figure 6) ; des plantes plus petites avec des feuilles malformées (N°10, Figure 8); l'apparition de nécrose sur les feuilles des plantes infectées (N°70, Figure 9) ; une fleuraison plus précoce (N°81, Figure 10) ; ou encore une meilleure croissance du plant infecté par rapport au témoin (N°43, figure 6).



**Figure 7 : Photo de l'infection de Leb-3 avec PSTVd :** Plantes infectées avec le mix des trois viroïdes (PSTVd, HSVd, CLVd) ou avec PSTVd seulement et plante contrôle.

Il est possible de noter que pour l'écotype N°46 ou Leb-3, lors d'une infection avec PSTVd, on note d'autres symptômes. Les feuilles les plus anciennes de la plante ont tendance à mourir plus tôt que chez les plantes témoins. Le retard de croissance diminue jusqu'à disparaître au fur et à mesure de l'infection.



**Figure 8 : Photo de l'écotype N°10 (collection de 96 lignées) : A, B, C et D : Plantes infectées avec PSTVd, HSVd et CLVd. E et F : Plantes témoins.**

Les symptômes décrits précédemment ont tous été observés plusieurs fois pour chaque écotype. En plus des écotypes présentés dans les figures de cette section, il est possible d'observer dans le Tableau 3 l'intégralité des écotypes testés. En tout 146 écotypes différents ont été testés en triplicatas. Chaque réplica technique comportant au minimum 3 plantes pour chaque écotype. Parmi toutes les expériences d'infection réalisées, 7 écotypes ont montré des phénotypes lors de chaque réplica. Et la détection constante lors des réplicas n'a été possible que chez deux écotypes.

Il existe plusieurs hypothèses possibles pour expliquer l'incapacité de détecter les viroïdes dans certains cas. La première est que la quantité de viroïdes présents dans les feuilles systémiques est trop faible pour être détectée; auquel cas un tel écotype ne nous intéresserait pas. En effet, un écotype où il n'est pas possible de suivre le développement du viroïde dans toute la plante n'est pas un bon candidat pour étudier le développement d'une infection ou encore d'observer l'impact d'une telle infection sur plusieurs protéines d'intérêt. Donc un écotype comme celui-ci ne fait pas un bon modèle d'études pour les viroïdes. La seconde est que le viroïde ou les viroïdes

arrivent à se répliquer dans les feuilles inoculées et que les symptômes observés sont issus des vsRNA qui se propageraient dans la plante alors que les viroïdes matures ne le peuvent pas.



**Figure 9 : Présence de points de nécroses chez l'écotype N°70 :** A- Feuille d'une plante témoin. B- Feuille d'une plante infectée avec PSTVd, HSVd et CLVd. Observation de nécrose sur les feuilles des plantes infectées.

La présence de nombreux phénotypes infectieux différents suggère plusieurs choses : tout d'abord, la possibilité qu'un symptôme soit attribué à un viroïde ou que la combinaison de deux ou trois viroïdes donne un autre symptôme. Bien que l'on observe plusieurs phénotypes infectieux, et qu'*A. thaliana* possède tout ce qu'il faut pour répliquer les viroïdes localement en faible quantité, ces derniers sont incapables de se déplacer dans la plante (Daròs & Flores, 2004). Ceci laisse donc suggérer que le bon candidat pour un écotpe sensible serait un écotpe chez qui le viroïde est capable de se multiplier en grande quantité ainsi que de se déplacer dans la plante.



**Figure 10 : Phénotype infectieux de l'écotype N°81 : A : Contrôle négatif. B : Plante infectée par les 3 viroïdes (PSTVd, HSVd et CLVd).**

Enfin, en plus des écotypes montrant des phénotypes infectieux, il est bon de mentionner un écotype dont il sera question plus tard dans ce document. En effet, l'écotype Stepn-2 qui ne montre aucun signe extérieur d'infection est cependant sensible aux viroïdes, leurs détections étant positives par northern Blot.

**Tableau 3 : Synthèse de l'expérience de criblage des écotypes d'*A. thaliana* :**

Numéro d'accession	Nom	Abréviation	Réplicas	Symptômes visibles	Détection des viroïdes
CS76347	Ait Barka	Aitba-2	3	Non	Non
CS76348	Toufliht	Toufl-1	3	Non	Non

Tableau 3 : suite

Numéro d'accession	Nom	Abréviation	Répliquas	Symptômes visibles	Détection des viroïdes
CS76350	Vezzano	Vezzano-2	3	Non	Non
CS76352	Voeran	Voeran-1	3	Non	Non
CS76353	Altenburg	Altenb-2	3	Non	Non
CS76354	Mitterberg	Miterberg-1-181	3	Non	Non
CS76355	Castel Feder	Castelfed-4-212	3	Non	Non
CS76356	Castel Feder	Castelfed-4-213	3	Non	Non
CS76357	Bozen-Guntschnaberg	Bozen-1	3	Non	Non
CS76360	Cisterna de Latina	Ciste-1	3	Non	Non
CS76361	Montesano Scalo	Monte-1	3	Non	Non
CS76362	Sant Angelo	Angel-1	3	Non	Non
CS76363	Morane	Moran-1	3	Non	Non
CS76364	Mammola	Mammo-2	3	Non	Non
CS76365	Mammola	Mammo-1	3	Non	Non
CS76366	Ponte Angitola	Angit-1	3	Non	Non
CS76367	Rocigliano-Lago	Lago-1	3	Non	Non
CS76368	Sant Pietro Apostolo	Apost-1	3	Non	Non
CS76369	Dobranovic	Dobra-1	3	Non	Non
<b>CS76370</b>	<b>Petrovac</b>	<b>Petro-1</b>	<b>3+</b>	<b>Oui</b>	<b>Non</b>
CS76371	Lechovo	Lecho-1	3	Non	Non
CS76372	Jablokovec	Jablo-1	3	Non	Non
CS76373	Bolintin Vale	Bolin-1	3	Non	Non
CS76375	Shiguljovsk	Shigu-2	3	Non	Non
CS76376	Kidrjasovo	Kidr-1	3	Non	Non
<b>CS76377</b>	<b>Stepnoje</b>	<b>Stepn-2</b>	<b>3+</b>	<b>Oui</b>	<b>Oui</b>

**Tableau 3 : suite**

Numéro d'accession	Nom	Abréviation	Répliquas	Symptômes visibles	Détection des viroïdes
CS76378	Stepnoje	Stepn-1	3	Non	Non
CS76379	Sjiak	Sij-1	3	Non	Non
CS76380	Sijak	Sij-2	3	Non	Non
CS76381	Sijak	Sij-4	3	Non	Non
CS76382	Shakdara	Sha	3	Non	Non
CS76383	Koyvanskoe ozero bei Sawwuch	Koz-2	3	Non	Non
CS76384	Kolyvan	Kly-4	3	Non	Non
CS76385	Kolyvan	Kly-1	3	Non	Non
CS76386	Dogruyol	Dog-4	3	Non	Non
CS76387	Xanbulan	Xan-1	3	Non	Non
CS76388	Lerik	Lerik-1-3	3	Non	Non
CS76389	Istisu	Istisu-1	3	Non	Non
CS76390	Lagodechi	Lag2-2	3	Non	Non
CS76391	Vashlovani	Vash-1	3	Non	Non
CS76392	Bakuriani	Bak-2	3	Non	Non
CS76393	Bakuriani	Bak-7	3	Non	Non
CS76394	Yeghegis	Yeg-1	3	Non	Non
CS76395	Kastel Mountain	Kastel-1	3	Non	Non
CS76396	Kocherov	Koch-1	3	Non	Non
CS76397	Deliblato	Del-10	3	Non	Non
CS76398	Nemrut Mountain	Nemrut-1	3	Non	Non
CS76399	Eyach	Ey1.5-2	3	Non	Non
CS76400	Starzach	Star-8	3	Non	Non
CS76401	Tubingen- Schaal	Tu-Scha- 9	3	Non	Non
CS76402	Niederreutin	Niel-2	3	Non	Non
CS76403	Tubingen- Schonblick30	Tu-SB30- 3	3	Non	Non
CS76404	Heiligkreuzta 12	HKT2-4	3	Non	Non
CS76405	Tubingen- Wanne	Tu-Wal-2	3	Non	Non



Tableau 3 : suite

Numéro d'accession	Nom	Abréviation	Répliquas	Symptômes visibles	Détection des viroïdes
CS76406	Rubgarten-3	Ru3.1-31	3	Non	Non
CS76407	Tubingen-Volksbank	Tu-V-13	3	Non	Non
CS76408	Walddorf-Haslach	Wal-HasB-4	3	Non	Non
CS76409	Aguaron	Agu-1	3	Non	Non
CS76410	Caldas de Miravete	Cdm-0	3	Non	Non
CS76411	Donana	Don-0	3	Non	Non
CS76412	St. Maria d. Feiria	Fei-0	3	Non	Non
CS76413	San Leonardo de Yague	Leo-1	3	Non	Non
CS76414	Merida	Mer-6	3	Non	Non
CS76415	Pedriza	Ped-0	3	Non	Non
CS76416	Pradena del Rincon	Pra-6	3	Non	Non
CS76417	Quintela	Qui-0	3	Non	Non
CS76418	Viella	Vie-0	3	Non	Non
CS76419	Slavianka	Slavi-1	3	Non	Non
CS76420	Copac	Copac-1	3	Non	Non
CS76421	Borskoje	Borsk-2	3	Non	Non
<b>CS76422</b>	<b>Krasnaja Zorka</b>	<b>Krazo-2</b>	<b>3+</b>	<b>Oui</b>	<b>Non</b>
CS76423	Galdo	Galdo-1	3	Non	Non
CS76424	Timpo Ulivi	Timpo-1	3	Non	Non
CS76425	Valsinnica	Valsi-1	3	Non	Non
<b>CS76426</b>	<b>Lebjashje</b>	<b>Leb-3</b>	<b>3+</b>	<b>Oui</b>	<b>Oui</b>
CS22564	RRS-7	RRS-7	3	Non	Non
CS22565	RRS-10	RRS-10	3	Non	Non
CS22566	Knox-10	Knox-10	3	Non	Non
CS22567	Knox-18	KNO-18	3	Non	Non
CS22568	Rmx	RMX-A02	3	Non	Non
CS22569	Rmx-A180	RMX-A180	3	Non	Non

Tableau 3 : suite

Numéro d'accession	Nom	Abréviation	Répliquas	Symptômes visibles	Détection des viroïdes
CS22570	Pna-17	Pna-17	3	Non	Non
CS22571	Pna-10	Pna-10	3	Non	Non
CS22572	Eden-1	Eden-1	3	Non	Non
<b>CS22573</b>	<b>Eden-2</b>	<b>Eden-2</b>	<b>3+</b>	<b>Oui</b>	<b>Non</b>
CS22574	Lovvik 1	Lov-1	3	Non	Non
CS22575	Lovvik 5	Lov-5	3	Non	Non
CS22576	Faberget 2	Fab-2	3	Non	Non
CS22577	Faberget 4	Fab-4	3	Non	Non
CS22578	Billaberget 5	Bil-5	3	Non	Non
CS22579	Billaberget 7	Bil-7	3	Non	Non
CS22580	Varhallarna 2-1	Var2-1	3	Non	Non
CS22581	Varhallarna 2-6	Var2-6	3	Non	Non
CS22582	Spratteboda 1-2	Spr1-2	3	Non	Non
CS22583	Spratteboda 1-6	Spr1-6	3	Non	Non
CS22584	Ostra Mocklo 2-1	Omo2-1	3	Non	Non
CS22585	Ostra Mocklo 2-3	Omo2-3	3	Non	Non
CS22586	Ullstorp 2-5	Ull2-5	3	Non	Non
CS22587	Ullstorp 2-3	Ull2-3	3	Non	Non
CS22614	Cape Verde Islands	Cvi-0	3	Non	Non
CS22615	Lezoux	Lz-0	3	Non	Non
CS22616	Eifel	Ei-2	3	Non	Non
CS22617	Gückingén	Gu-0	3	Non	Non
CS22618	Landsberg	Ler-1	3	Non	Non
CS22619	Niederzenz	Nd-1	3	Non	Non
CS22620	C24	C24	3	Non	Non
CS22621	N13	N13	3	Non	Non
CS22622	Weiningen	Wei-0	3	Non	Non

Tableau 3 : suite

Numéro d'accession	Nom	Abréviation	Répliquas	Symptômes visibles	Détection des viroïdes
CS22623	Wassilewskij a	Ws-0	3	Non	Non
CS22624	Yosemite	Yo-0	3	Non	Non
CS22625	Columbia	Col-0	3	Non	Non
CS22626	Antwerpen	An-1	3	Non	Non
CS22627	Vancouver	Van-0	3	Non	Non
CS22628	Br	Br-0	3	Non	Non
CS22629	Estland	Est-1	3	Non	Non
CS22630	Argentat	Ag-0	3	Non	Non
CS22631	Gy	Gy-0	3	Non	Non
CS22632	Randan	Ra-0	3	Non	Non
<b>CS22633</b>	<b>Bayreuth</b>	<b>Bay-0</b>	<b>3+</b>	<b>Oui</b>	<b>Non</b>
CS22634	Gabelstein	Ga-0	3	Non	Non
CS22635	Märkt	Mrk-0	3	Non	Non
CS22636	Merzhausen	Mz-0	3	Non	Non
CS22637	Wietze	Wt-5	3	Non	Non
CS22638	Kashmir	Kas-2	3	Non	Non
CS22639	Catania	Ct-1	3	Non	Non
CS22640	Monte	Mr-0	3	Non	Non
CS22641	Tsu	Tsu-1	3	Non	Non
CS22642	Martuba	Mt-0	3	Non	Non
CS22643	Noordwijk	Nok-3	3	Non	Non
<b>CS22644</b>	<b>Warschau</b>	<b>Wa-1</b>	<b>3+</b>	<b>Oui</b>	<b>Non</b>
CS22645	St. Maria d. Feiria	Fei-0	3	Non	Non
CS22646	San Eleno	Se-0	3	Non	Non
CS22647	Tossa de Mar 1	Ts-1	3	Non	Non
CS22648	Tossa de Mar 5	Ts-5	3	Non	Non
CS22649	Proaza, Asturios	Pro-0	3	Non	Non
CS22650	Llagostera	Ll-0	3	Non	Non
CS22651	Kondara	Kondara	3	Non	Non
CS22652	Shakdara	Shahdara	3	Non	Non

**Tableau 3 : suite**

<b>Numéro d'accession</b>	<b>Nom</b>	<b>Abréviation</b>	<b>Répliquas</b>	<b>Symptômes visibles</b>	<b>Détection des viroïdes</b>
CS22653	Sorbo	Sorbo	3	Non	Non
CS22654	Kindalville	Kin-0	3	Non	Non
CS22655	Moscow	Ms-0	3	Non	Non
CS22656	Burren	Bur-0	3	Non	Non
CS22657	Edinburgh	Edi-0	3	Non	Non
CS22658	Oystese	Oy-0	3	Non	Non
CS22659	Wassilewskij a 2	Ws-2	3	Non	Non

### **3.2. La détection des viroïdes dans ces écotypes**

La détection des viroïdes n'est pas toujours très simple ; comme décrite dans la section matériel et méthodes, elle peut être faite par PCR, RT-qPCR ou northern Blot. Dans le cas des différents écotypes présentés ci-dessus, les premiers northern blots en gel d'agarose, bien que peu présentables, ont permis de confirmer la présence de viroïdes.

Parmi les différents écotypes testés, deux ont fini par sortir positifs pour une détection par northern Blot ou PCR pour PSTVd. En plus de la détection, une cinétique d'infection a été réalisée pour les écotypes St-2 (N°9) et Leb-3 (N°46). Dans le cas de l'écotype St-2, on note une accumulation maximum 21 jours après l'inoculation de PSTVd (Figure 11). Il est possible de commencer à détecter PSTVd dès 15 DPI par northern Blot. À noter que pour les northern Blot chez *A. thaliana*, l'exposition de la membrane doit s'effectuer de façon importante pour être en mesure de détecter correctement PSTVd qui s'accumule moins que chez d'autres espèces végétales.



**Figure 11 : Résultats de northern Blot pour St-2 infecté avec PSTVd : Poids moléculaire des bandes observées = 359 nt.**

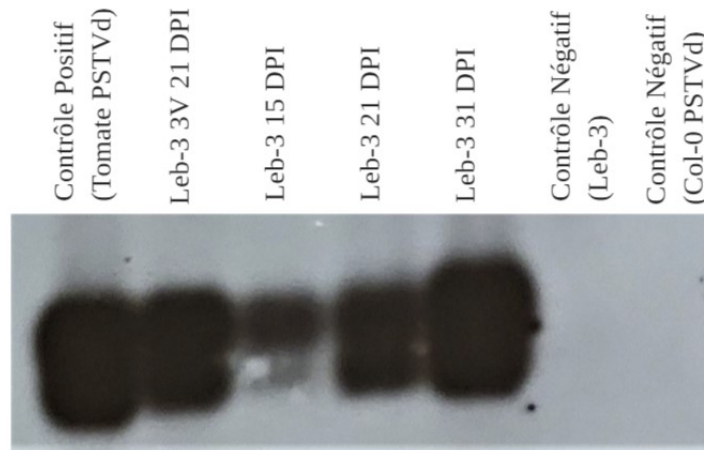
Lors d'une détection par PCR (Figure 12) pour l'écotype St-2, l'accumulation de PSTVd semble moins importante, car elle est comparée avec un échantillon issu d'une tomate infectée. Or, chez la tomate, PSTVd est extrêmement infectieux, donc il s'accumule dans des quantités bien supérieures. Cependant, la présence de PSTVd dans les échantillons de St-2 par PCR reste observable.



**Figure 12 : Résultats de RT-PCR pour St-2.**

Comme énoncé précédemment, le second écotpe identifié comme accumulant PSTVd est Leb-3 (N°46). Dans son cas avec les mêmes paramètres d'exposition des membranes de northern Blot, PSTVd est présent en plus grandes quantités (Figure 13). De plus, la réalisation de la cinétique de l'infection de cet écotpe permet d'observer un maximum d'accumulation de

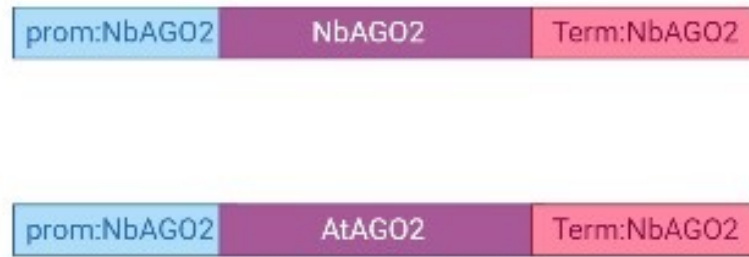
viroïde à 31 DPI. La quantité de PSTVd présent dans la plante décroît après 31 DPI. De même que pour St-2, il est possible de détecter de faible quantité de viroïdes après 15 DPI.



**Figure 13 : Mise en évidence de l'accumulation de PSTVd chez Leb-3 :** Northern blot présentant comme contrôle positif un échantillon issu d'un plant de tomate infecté avec PSTVd. Deux contrôles négatifs sont présents : un plant de Leb-3 non infecté et un plant de Col-0 infecté. Plusieurs plants de Leb-3 infectés soit par le mix des trois viroïdes (3V) ou par PSTVd à plusieurs moments de l'infection dans le temps.

### 3.3. Caractérisation des lignées transgéniques de tomates vis-à-vis de PSTVd

Les lignées transgéniques de tomates appartiennent toutes au cultivar MoneyMaker; il est très utilisé dans les serres et donc est d'une importance toute particulière en agriculture. PSTVd est capable d'infecter ce cultivar et de détruire en grande partie voire en totalité la production d'un plant infecté. La transmission mécanique des viroïdes est particulièrement importante dans le cas d'une culture sous serre et donc augmente la rapidité à laquelle le viroïde se propage.



**Figure 14 : Représentation de la construction génétique portée par les lignées transgéniques :** Les gènes *At-AGO2* et *Nb-AGO2* sont flanqués tous deux du promoteur natif de *NbAGO2* et du terminateur natif *NbAGO2*. Ces deux constructions sont utilisées pour transformer les *N. benthamiana* WT et les *S. lycopersicum* Moneymaker WT.

Deux lignées différentes ont été assemblées ; la première comporte, en plus de *Sl-AGO2*, une copie de *Nb-AGO2* alors que la seconde a une copie d'*At-AGO2*. Dans les deux cas, les protéines AGO2 ajoutées sont sous le contrôle du promoteur natif de *Nb-AGO2*, une étiquette HA (HA-Tag) et le terminateur *Nb-AGO2* (Figure 14). Les deux lignées sont, pour le moment, hétérozygotes pour le transgène à 50% et 25% homozygotes. Donc avant d'infecter les plants de tomates, il faut déterminer lesquels sont porteurs du transgène et vérifier également dans quelle proportion le gène est exprimé. Ceci est réalisé par Western Blot pour l'expression.

*Sl-At-AGO2* *Sl-At-AGO2* WT (Monsieur Maché) *Nb-AGO2* *Nb-AGO2* *Sl-Nb-AGO2* *Sl-Nb-AGO2* *Sl-Nb-AGO2* 4



**Figure 15 : Western blot de détection de la protéine AGO2 :** Immunobuvardage de type western réalisé sur des plants de tomates avant leur infection par PSTVd. Anticorps primaire anti-HA. Détection de bande spécifique à AGO2 autour de 113 KDa.

La figure 15 résulte d'un western blot. Elle met en évidence l'expression ou non de la protéine AGO2 chez les plants de tomates pour les lignées portant *Nb-AGO2* ou *At-AGO2*. Le western blot réalisé ne cible pas l'AGO2 endogène, en effet les transgènes portent tous les deux une étiquette HA que l'on cible avec un anticorps spécifique. Ce criblage est réalisé systématiquement avant toute infection et sur toutes les plantes. Les plantes exprimant le transgène ont été infectées, les autres ne sont pas utilisées. Sur cette figure on observe que l'expression du transgène n'est pas systématique. Ceci s'explique par le fait que les lignées utilisées sont encore hétérozygotes pour le transgène est donc 75% des plantes vont exprimer le transgène.

Pour les infections, 5 plants porteurs du transgène sont infectés ainsi que 5 plants WT et 2 à 3 plants témoins pour chaque. L'apparition des symptômes est mesurée au cours du temps ainsi que des prélèvements pour l'extraction d'ARN et de protéines. Comme montrés dans la figure ci-dessous (Figure 16), les symptômes de PSTVd (feuilles déformées, zones de nécroses et



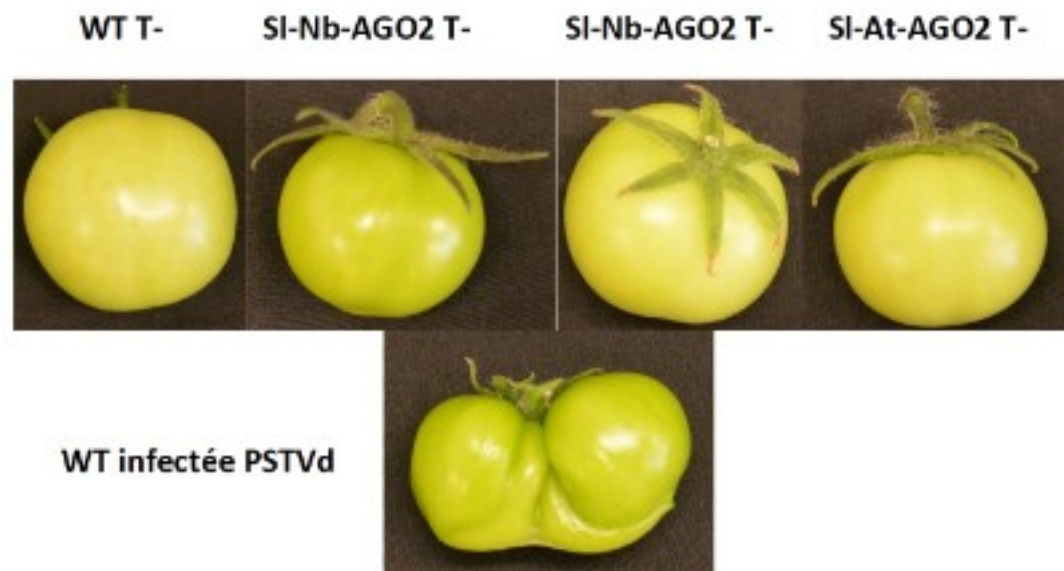
retards de croissances) apparaissent au bout de 15 à 18 jours chez les plants de tomates WT. Du côté des lignées transgéniques, aucun symptôme visible ni à 18 jours après l'inoculation (18 DPI), ni à 21 DPI, ni à 31 DPI.



**Figure 16 : Phénotypes d'infections des lignées transgéniques de tomates et de la lignée sauvage (MoneyMaker).**

Comme abordé précédemment et dans les objectifs, il est important de savoir si l'insertion du transgène va affecter la capacité des tomates à avoir des fruits de bonnes tailles. L'observation des symptômes dans cette expérience et lors des 3 réplicas s'est poursuivie jusqu'à l'obtention des fruits. On observe donc que chez les lignées transgéniques les fruits ne semblent être affectés en taille ni en aspect par le transgène (Figure 17). Alors que pour les fruits de plantes WT, il existe deux possibilités : soit le fruit est déformé (Figure 17), soit les fruits avortent très tôt dans leur développement. Des résultats préliminaires montrent que les fruits d'une plante WT infectée vont avoir tendance à être déformés ou plus petits que des fruits de tomate WT saine. De plus, on note que les fruits des lignées transgéniques, aussi bien *Nb-AGO2* qu'*At-AGO2*, semblent ne pas être affectés par le transgène. Cependant, il est important de préciser que les

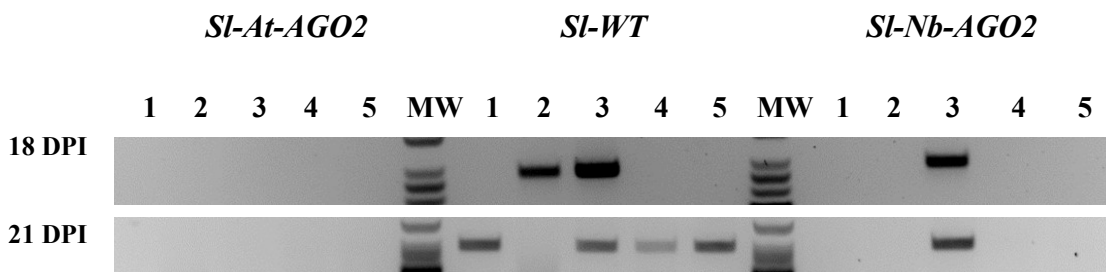
pots utilisés pour faire pousser les tomates ne permettent pas un développement maximal des plantes, il faut donc réaliser des expériences de même nature avec de plus grands pots pour avoir une meilleure idée de l'impact du transgène sur la taille des fruits, la taille de la plante, la biomasse, la taille des racines, *etc...*



**Figure 17 : Impact de PSTVd sur des tomates (fruit) WT ou transgéniques :** Comparaison de l'aspect de fruits issus de différentes plantes, soit des plantes transgéniques non infectées, soit des plantes WT infectées ou non avec PSTVd. Ceci pour déterminer si le transgène pour affecter l'aspect des fruits.

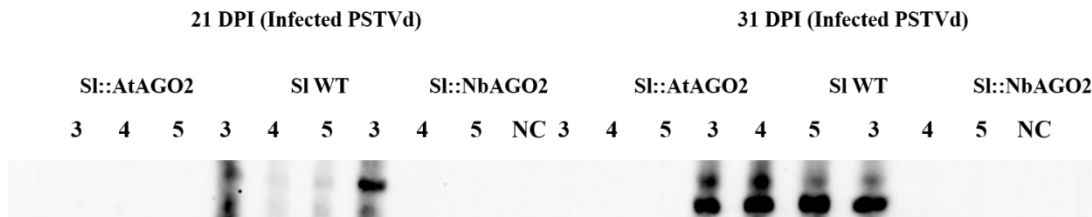
### 3.4. Détection des viroïdes dans les différentes lignées

La détection des viroïdes sur les différentes lignées a été réalisée de trois façons : la première présentée ci-dessous est une détection par PCR avec une paire d'amorces spécifiques pour PSTVd. On note qu'après 18 DPI, 2 plants de tomates WT sur 5 sont positifs pour PSTVd ainsi que 1 pour les plants *Nb*-AGO2 et aucun pour les plants *At*-AGO2. Ceci montre la rapidité à laquelle le viroïde infecte les plantes WT. À 21 DPI, presque toutes les plantes WT montrent une accumulation pour PSTVd alors qu'aucun changement n'est notable pour les 2 lignées transgéniques.



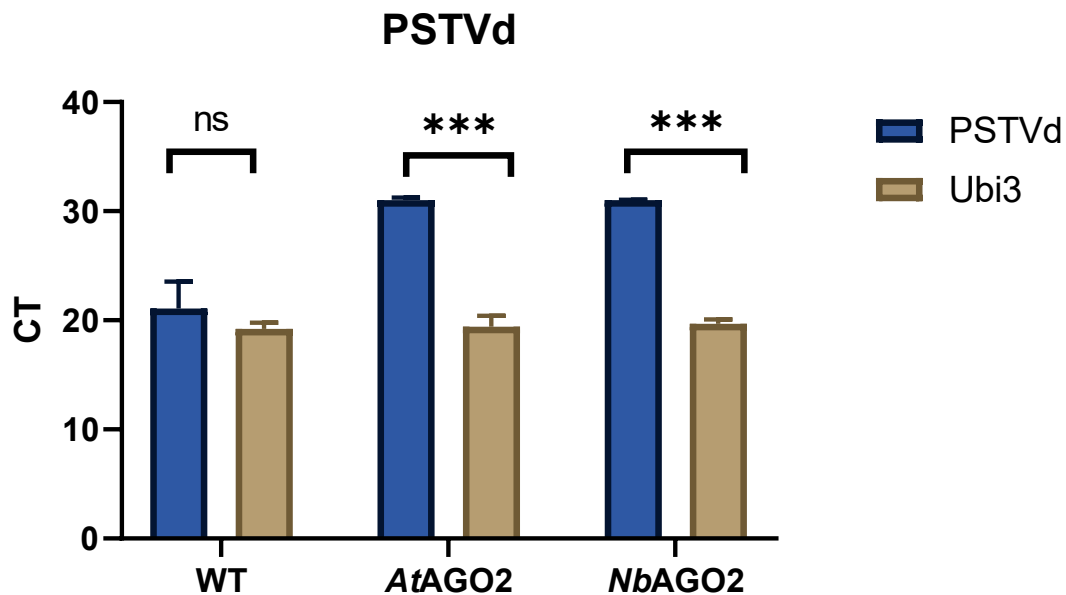
**Figure 18 : Résultats PCR des lignées transgéniques pour PSTVd :** Amplification montrant une bande autour de 350 pb ce qui correspond à la taille de PSTVd. Résultats de PCR montrant l'évolution de l'infection à PSTVd au cours du temps chez les lignées transgéniques de tomates et chez la lignée WT.

La confirmation PCR (figure 18) seule n'étant pas suffisante pour montrer la présence de viroïdes matures dans les plants de tomates, des northern blots sont réalisés. Les northern blots nous apprennent la même chose que les résultats PCR ceci confortant encore les résultats (Figure 19).



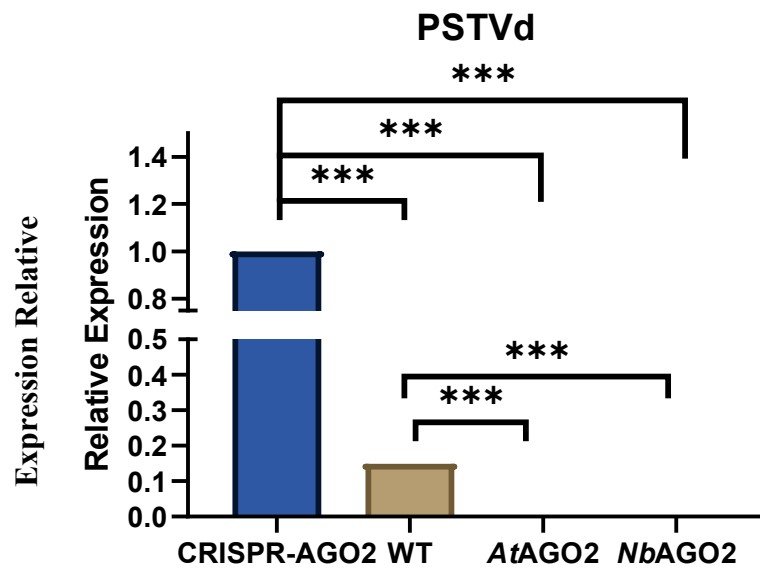
**Figure 19 : Résultats du northern blot pour confirmer la présence de PSTVd mature dans les plants de tomates.**

La confirmation de l'efficacité des lignées transgéniques pour résister à PSTVd a également été testée par qPCR (Figure 20). Contrairement aux résultats classiques d'une qPCR, ici le choix a été de représenter ces derniers par leur CT et non par l'expression relative qui est normalement utilisée. Ce choix s'explique par l'absence totale d'amplification pour PSTVd chez les lignées transgéniques, ou par une amplification dans les derniers cycles de la qPCR. On remarque que dans la lignée WT, le viroïde est présent dans des quantités similaires à l'ubiquitine. En revanche, pour les lignées transgéniques, PSTVd donne des CT supérieurs à 30 qui sont considérés comme du bruit de fond.



**Figure 20 : qPCR montrant la résistance des lignées transgéniques à PSTVd :** Pour chaque condition 3 réplicas technique sont réalisés ainsi que 3 réplicas biologiques pour une expérience. L'expérience a été répétée 3 fois. Le test statistique réalisé est un T-test.

Une expérience similaire chez *N. benthamiana*, avec en plus des plantes *Nb*-CRISPR-AGO2 inactivant la protéine AGO2 endogène (Ludman et al., 2017), montre des résultats similaires, avec une accumulation accrue de PSTVd chez la plante. Plusieurs répétitions de cette expérience sont nécessaires pour une conclusion correcte. En revanche, les résultats préliminaires par qPCR semblent donner les mêmes conclusions que ceux pour les lignées transgéniques de tomates. C'est-à-dire que les *N. benthamiana* portant un autre *Nb*-AGO2 ou un *At*-AGO2 et donc 2 versions du gène AGO2 n'accumulent pas de PSTVd alors que les *N. benthamiana* WT en accumulent. De plus, des plantes n'ayant aucun AGO2 fonctionnel (CRISPR-AGO2) présentent une quantité bien supérieure de PSTVd (Figure 21). Ceci soulève plusieurs questions vis-à-vis d'AGO2 et de son rôle contre PSTVd. Voilà des questions qui seront discutées plus loin.



**Figure 21 : Résultats qPCR de l'expérience chez *N. benthamiana* (lignées transgéniques et WT) :** Pour chaque condition 3 réplicas technique sont réalisés ainsi que 3 réplicas biologie pour une expérience. L'expérience a été répétée 3 fois.

## CHAPITRE 4

### DISCUSSION ET CONCLUSION

Les mécanismes moléculaires d'une infection aux viroïdes sont peu connus à ce jour. Ce déficit de connaissances quant aux détails provient du manque d'études des viroïdes en biologie végétale chez l'organisme modèle *A. thaliana*. Actuellement, la capacité des viroïdes à induire une infection chez *Arabidopsis* n'a pas été démontrée. Seule la capacité d'utiliser la machinerie enzymatique *in vitro* de l'écotype Col-0 du viroïde PSTVd a été mise en évidence.

L'hypothèse de départ était qu'*A. thaliana* présente une variabilité génétique entre les écotypes qui permettrait une infection avec un viroïde pour certains d'entre eux. Cette variabilité d'*Arabidopsis* est connue pour les virus comme PVX, mais n'a pas été mise en évidence pour les viroïdes. Le but de ce projet est de mettre en évidence la capacité d'un ou plusieurs viroïdes à infecter *A. thaliana* dans un premier temps. Puis dans un second temps, de caractériser l'infection afin de déterminer quels mécanismes moléculaires entrent en jeu. Les deux collections d'écotypes mentionnées précédemment sont donc testées pour leur sensibilité vis-à-vis des viroïdes sélectionnés : PSTVd, HSVd et CLVd.

Parmi tous les écotypes testés, certains sortent du lot par l'intensité de l'infection observée ou par la facilité de détection du viroïde. Cependant, la démarche expérimentale étant inédite chez *Arabidopsis* avec des viroïdes, plusieurs problèmes ont été rencontrés. Il en ressort que plusieurs écotypes affichent des symptômes lors d'une infection par des viroïdes. L'infection semble pouvoir prendre de multiples formes, allant d'une nécrose des feuilles à un retard de croissance de la plante, en passant par une floraison précoce ; ou encore une absence totale de symptômes, soit une infection latente. Ces symptômes n'ayant jamais été observés chez *Arabidopsis*, il est difficile de faire une comparaison ; cependant, chez la tomate qui est beaucoup utilisée pour étudier les viroïdes, on peut observer des symptômes similaires. Chez certains des écotypes, seul

l'aspect macroscopique de l'infection est observable. En effet, dans ces cas précis, la détection par northern blot, RT-PCR ou RT-qPCR n'a jamais donné de résultat positif malgré l'infection avec pour exception les écotypes St-2 et Leb-3.

Il existe plusieurs hypothèses pour expliquer ceci, mais elles n'ont pas pu être testées afin de se concentrer sur d'autres aspects du projet. La première hypothèse est que les viroïdes ont la capacité de se répliquer localement et que ce sont les vd-sRNA qui sont pris en charge par la plante et ainsi déplacés dans toute la plante. Ceci induit donc les symptômes sans que le viroïde mature soit présent dans toute la plante. Une autre hypothèse est que le viroïde peut se répliquer dans la plante et se déplacer, mais dans des quantités trop faibles pour être détectables. Cependant, cette dernière hypothèse ne peut être retenue ; en effet, pour la détection de viroïdes, trois techniques sont utilisées comme mentionnées ci-dessus, ce qui réduit la possibilité de ne pas avoir détecté des viroïdes présents.

Lors du criblage des écotypes, deux se sont démarqués par la facilité de détection et la quantité de viroïdes présents lors de l'infection. Les écotypes en question sont Leb-3 et Stpn-2. Tous deux sont intéressants pour l'identification d'un ou plusieurs gènes responsables de la sensibilité aux viroïdes. L'écotype Stpn-2 est sensible à PSTVd, mais ne présente aucun symptôme visible de l'infection. Ceci laisse penser que le viroïde est capable de se répliquer chez Stpn-2 sans que les vd-sRNA ne ciblent de gènes ou de transcrits de la plante, n'induisant ainsi aucun symptôme. L'importance de cet écotype est que les croisements nécessaires pour identifier un gène de susceptibilité sont déjà avancés jusqu'à la troisième génération (F3). Le travail de croisement restant sera effectué par la personne prenant la suite de ce projet.

Le second écotype identifié comme sensible à PSTVd est Leb-3. Lors de l'infection, ce dernier présente au début un retard de croissance ainsi qu'une nécrose de certaines feuilles sans toutefois entraîner la mort de la plante. Les différentes infections réalisées chez cet écotype ont permis d'établir le temps au bout duquel on obtient un maximum de viroïdes chez *A. thaliana*, soit 21 DPI, bien que le viroïde commence à être détectable après 10 jours d'infection avec une



accumulation augmentant jusqu'à 21DPI au maximum. Ces deux écotypes laissent suggérer que différents allèles d'AGO2 peuvent entraîner une sensibilité différente vis-à-vis de PSTVd. En effet, il existe deux grands types d'allèles pour AGO2. L'allèle présent chez Col-0 confère une résistance aux virus, et l'allèle AGO2 de C24 lui confère une sensibilité à plusieurs virus. Or, l'écotype Stpn-2 possède un allèle d'AGO2 similaire à C24, et Leb-3, lequel possède un allèle rare proche de C24. Ceci laisse supposer une importance nécessaire, mais non capitale d'AGO2 pour que PSTVd soit capable d'infecter *A. thaliana*.

Pour étudier plus avant l'importance d'AGO2 lors d'une infection aux viroïdes, un changement de plante modèle a été effectué. Au laboratoire, le rôle d'AGO2 vis-à-vis de la résistance à PVX a été utilisé pour rendre résistants des plants de tomate et de *N. benthamiana*. PSTVd étant capable d'infecter ces deux plantes, il a été décidé de faire des tests sur les deux. De plus, la tomate, et plus particulièrement le cultivar « MoneyMaker », est très sensible à une infection avec PSTVd.

Les différentes lignées transgéniques de *N. benthamiana* ont été testées par infection avec PSTVd. Comme le montre la Figure 21, la protéine AGO2 semble avoir un impact différent sur la capacité de PSTVd à infecter la plante en fonction de l'origine du transgène. Naturellement, PSTVd est capable d'infecter *N. benthamiana* WT. Cette infection ne présente pas de symptômes dans les conditions normales de croissance, mais permet au viroïde de se répliquer et d'être détecté sans souci. Cette expérience donne plusieurs informations. Tout d'abord, lorsque la protéine AGO2 n'est pas exprimée (CRISPR-AGO2), la quantité de PSTVd retrouvée dans la plante est bien supérieure à celle d'une plante Nb-WT. On apprend également par cette expérience que dans les cas des lignées transgéniques de *N. benthamiana* Nb-AGO2 et At-AGO2, le viroïde PSTVd n'est pas capable de se répliquer. Dans ce cas, pourquoi en est-il incapable ? En effet, chez *N. benthamiana* WT, il se réplique en quantité largement suffisante pour être détectée sans problème. Or, chez la souche WT, il y a présence d'un exemplaire du gène codant pour la protéine AGO2. Et pourquoi lorsque chez la lignée transgénique *Nb:Nb-AGO2* portant 2 versions du gène AGO2, l'infection par PSTVd n'est-elle pas possible ?

L'hypothèse est que la quantité des protéines AGO2 va influencer sur la capacité de PSTVd à se répliquer. Pour répondre à cette hypothèse, la lignée CRIPSR-AGO2 va être très utile. Cette dernière, comme vue à la Figure 21, accumule bien davantage PSTVd plutôt que *N. benthamiana* WT; ce qui, en croisant avec les données obtenues pour les autres lignées, confirme l'importance de la protéine AGO2 dans la résistance aux viroïdes. Mais pour savoir si la quantité d'AGO2 a un impact sur la capacité de PSTVd à se répliquer, la lignée CRISPR-AGO2 devra être agroinfiltrée avec les différentes versions des AGO2 (*N. benthamiana*, *A. thaliana*, *S. lycopersicum*). Cette expérience sera l'occasion de tester la capacité des trois types d'AGO2 quant à leur efficacité pour défendre la plante contre PSTVd. La lignée CRISPR-AGO2 est la candidate idéale pour une telle expérience, car celle-ci n'exprime aucune protéine AGO2.

Une expérience similaire avec des lignées de tomates transgéniques a été réalisée comme décrite précédemment. Il en ressort que de même que chez *N. benthamiana*, les lignées transgéniques de tomates portant Nb-AGO2 ou At-AGO2 sont résistantes à PSTVd. Ceci d'un point de vue phénotypique ainsi que du côté de l'accumulation de viroïde qui est nulle. Or, *S. lycopersicum* est particulièrement sensible à PSTVd, à tel point que le viroïde est capable de faire mourir une plante infectée. Cela met en évidence l'inefficacité de *Sl*-AGO2 pour contrer PSTVd. Or, lorsqu'on ajoute une version du gène codant pour AGO2 provenant soit de *N. benthamiana*, soit de *A. thaliana*, la plante est totalement immunisée contre PSTVd.

La question qui se pose alors est pourquoi, chez la tomate, *Nb*-AGO2 est efficace quand il est présent en un exemplaire. Alors que chez *N. benthamiana*, WT l'infection par PSTVd est possible ? En effet, chez la tomate un seul exemplaire de Nb-AGO2 est nécessaire pour rendre les tomates résistantes à PSTVd. Alors que chez *N. benthamiana* Wt qui a donc également une version du gène *ago2*, la plante est sensible à PSTVd. Il doit donc exister une différence entre *N. benthamiana* et *S. lycopersicum*. Cette différence est due chez la tomate à la présence d'une protéine RDR1 fonctionnelle qui ne l'est pas chez la lignée *N. benthamiana* WT possédée au laboratoire. Or, la protéine RDR1 est connue pour avoir entre autres une fonction antivirale en

plus de fonctions inconnues (Willmann et al., 2011). L'hypothèse est que cette protéine joue un rôle avec AGO2 dans la résistance contre PSTVd.

Pour enquêter sur le rôle de RDR1 quant à sa place dans la résistance à PSTVd, il sera nécessaire d'obtenir une lignée transgénique de *N. benthamiana* portant une version fonctionnelle du gène codant pour la RDR1. Avec une telle lignée, portant donc une version de *Nb*-AGO2 et une de RDR1, on pourra tester l'hypothèse et apprendre si RDR1 est nécessaire pour un effet maximum de *Nb*-AGO2 afin de combattre PSTVd. Une lignée de *N. benthamiana* portant le gène RDR1 provenant de *Nicotiana tabacum* est arrivée dernièrement au laboratoire pour cette fonction. Cela laisserait entendre que la sensibilité ou la résistance à PSTVd est liée à 2 gènes au moins chez la tomate et *N. benthamiana*.

Enfin, les expériences sur les lignées de tomates transgéniques nous apprennent que l'aspect des fruits de ces lignées semble ne pas être impacté par le transgène. Seule une diminution du nombre de fruits par plante a été observée. Cependant, ces résultats ne permettent pas d'apporter une conclusion sur ce point ; en effet, les expériences sont réalisées en chambre de croissance, et dans ce cas, les tomates n'atteignent pas leur taille maximale, tant la plante que le fruit. Une suite pour cette expérience pourra être réalisée par la personne prenant la suite du projet une fois la serre de l'université mise en fonction.

## CONCLUSION

Les viroïdes restent à ce jour des pathogènes très peu étudiés ou inconnus. En effet, peu d'espèces de viroïdes sont répertoriées et peu de chercheurs se positionnent actuellement pour en découvrir de nouvelles. La recherche portant sur les viroïdes est rendue difficile par manque d'organismes modèles tels qu'*A. thaliana*, permettant les expériences sur la génétique et sur la compréhension des mécanismes moléculaires en jeu lors d'une infection.

C'est au travers de toutes les expériences de criblages d'écotypes conduites dans ce projet que plusieurs bons candidats ont été découverts. En effet, les écotypes Leb-3 et St-2 ont démontré tous les deux leur sensibilité au viroïde PSTVd. Cependant, plusieurs candidats potentiels restent ouverts à davantage d'expériences afin de détecter les viroïdes et non pas seulement un phénotype infectieux. De plus, il est possible que certains des écotypes testés ne l'aient pas été avec le viroïde qui puisse les infecter. En effet, lors de ce projet, seuls des viroïdes de la famille des *Pospiviroidae* ont été testés. Ceci laisse la seconde famille de viroïdes, les *Avsunviroidae*, encore à la recherche d'un écotpe d'*A. thaliana* sensible pour les étudier.

L'investigation du rôle de la protéine AGO2 vis-à-vis de la sensibilité aux viroïdes chez des lignées transgéniques de *S. lycopersicum* et *N. benthamiana* ont démontré qu'en effet, AGO2 semble être un acteur majeur de la résistance à PSTVd. La question de la spécificité ou de la quantité des différentes protéines AGO2 vis-à-vis de leur efficacité contre PSTVd reste à approfondir. Il en va de même pour la protéine RDR1 qui a peut-être un rôle à jouer au côté d'AGO2 dans la résistance aux viroïdes.

Chez *A. thaliana*, plusieurs allèles existent pour *AGO2*. Or, les écotypes Leb-3 et St-2 portent tous deux des allèles connus pour appartenir au groupe d'allèles, augmentant ainsi la sensibilité aux virus. Ces allèles peuvent-ils expliquer à eux seuls la sensibilité de ces écotypes à PSTVd ?

Ceci reste à déterminer dans le futur. Ces deux écotypes posent les bases d'un modèle chez *A. thaliana* pour répondre à ces questions.

## CHAPITRE 6

### BIBLIOGRAPHIE

- Addo-Quaye, C., Eshoo, T. W., Bartel, D. P., & Axtell, M. J. (2008). Endogenous siRNA and miRNA Targets Identified by Sequencing of the Arabidopsis Degradome. *Current Biology*, *18*(10), 758–762. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2008.04.042>
- Adenot, X., Elmayan, T., Laressergues, D., Boutet, S., Bouché, N., Gascioli, V., & Vaucheret, H. (2006). DRB4-Dependent TAS3 trans-Acting siRNAs Control Leaf Morphology through AGO7. *Current Biology*, *16*(9), 927–932. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.03.035>
- Adkar-Purushothama, C. R., Perreault, J.-P., Adkar-Purushothama, C. R., & Perreault, J.-P. (2019). Suppression of RNA-Dependent RNA Polymerase 6 Favors the Accumulation of Potato Spindle Tuber Viroid in *Nicotiana Benthamiana*. *Viruses*, *11*(4), 345. <https://doi.org/10.3390/v11040345>
- Anandalakshmi, R., Pruss, G. J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A. C., Smith, T. H., Vance, V. B., Masuta, C., Vance, V. B., Watson, J. M., Rezaian, A., Dennis, E. S., & Waterhouse, P. M. (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(22), 13079–13084. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.22.13079>
- Anderson, P. K., Cunningham, A. A., Patel, N. G., Morales, F. J., Epstein, P. R., & Daszak, P. (2004). Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, *19*(10), 535–544. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.07.021>
- Aregger, M., Borah, B. K., Seguin, J., Rajeswaran, R., Gubaeva, E. G., Zvereva, A. S., Windels,

- D., Vazquez, F., Blevins, T., Farinelli, L., & Pooggin, M. M. (2012). Primary and secondary siRNAs in geminivirus-induced gene silencing. *PLoS Pathogens*, 8(9), e1002941. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002941>
- Avina-Padilla, K., Martinez de la Vega, O., Rivera-Bustamante, R., Martinez-Soriano, J. P., Owens, R. A., Hammond, R. W., & Vielle-Calzada, J. P. (2015). In silico prediction and validation of potential gene targets for pospiviroid-derived small RNAs during tomato infection. *Gene*, 564(2). <https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.03.076>
- Axtell, M. J. (2013). Classification and Comparison of Small RNAs from Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 64(1), 137–159. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120043>
- Baulcombe, D. (2004). RNA Silencing in plants. *Nature*, 431(7006), 356–363. <https://doi.org/10.1038/nature02874>
- Baumberger, N., & Baulcombe, D. C. (2005). Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(33), 11928–11933. <https://doi.org/10.1073/pnas.0505461102>
- Baumberger, Nicolas, Tsai, C.-H., Lie, M., Havecker, E., & Baulcombe, D. C. (2007). The Plovervirus Silencing Suppressor P0 Targets ARGONAUTE Proteins for Degradation. *Current Biology*, 17(18), 1609–1614. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.08.039>
- Bellaoui, M., Keddie, J. S., & Gruissem, W. (2003). DCL is a plant-specific protein required for plastid ribosomal RNA processing and embryo development. *Plant Molecular Biology*, 53, 531–543. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1023%2FB%3APLAN.0000019061.79773.06.pdf>
- Bies-Etheve, N., Pontier, D., Lahmy, S., Picart, C., Vega, D., Cooke, R., & Lagrange, T. (2009). RNA-directed DNA methylation requires an AGO4-interacting member of the SPT5 elongation factor family. *EMBO Reports*, 10(6), 649–654. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.31>

- Blevins, T., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P. V., Beknazariants, D., Si-Ammour, A., Park, H.-S., Vazquez, F., Robertson, D., Meins, F., Hohn, T., & Pooggin, M. M. (2006). Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Research*, *34*(21), 6233–6246. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl886>
- Bologna, N. G., & Voinnet, O. (2014). The Diversity, Biogenesis, and Activities of Endogenous Silencing Small RNAs in Arabidopsis. *Annu. Rev. Plant Biol*, *65*, 473–503. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-035728>
- Bonfiglioli, R. G., McFadden, G. I., & Symons, R. H. (1994). In situ hybridization localizes avocado sunblotch viroid on chloroplast thylakoid membranes and coconut cadang cadang viroid in the nucleus. *The Plant Journal*, *6*(1), 99–103. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1994.6010099.x>
- Borges, F., & Martienssen, R. A. (2015). The expanding world of small RNAs in plants. *Nature Publishing Group*, *16*. <https://doi.org/10.1038/nrm4085>
- Bortolamiol, D., Pazhouhandeh, M., Marrocco, K., Genschik, P., & Ziegler-Graff, V. (2007). The Ploverovirus F Box Protein P0 Targets ARGONAUTE1 to Suppress RNA Silencing. *Current Biology*, *17*(18), 1615–1621. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.07.061>
- Boualem, A., Dogimont, C., & Bendahmane, A. (2016). The battle for survival between viruses and their host plants. *Current Opinion in Virology*, *17*, 32–38. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.12.001>
- Brosseau, C., Bolaji, A., Roussin-Léveillé, C., Zhao, Z., Biga, S., & Moffett, P. (2020). Natural variation in the Arabidopsis AGO2 gene is associated with susceptibility to potato virus X. *New Phytologist*, *226*(3), 866–878. <https://doi.org/10.1111/nph.16397>
- Buchmann, R. C., Asad, S., Wolf, J. N., Mohannath, G., & Bisaro, D. M. (2009). Geminivirus AL2 and L2 Proteins Suppress Transcriptional Gene Silencing and Cause Genome-Wide Reductions in Cytosine Methylation. *Journal of Virology*, *83*(10), 5005–5013. <https://doi.org/10.1128/JVI.01771-08>



- Burdisso, P., Suarez, I. P., Bologna, N. G., Palatnik, J. F., Bersch, B., & Rasia, R. M. (2012). Second Double-Stranded RNA Binding Domain of Dicer-like Ribonuclease 1: Structural and Biochemical Characterization. *Biochemistry*, *51*(51), 10159–10166. <https://doi.org/10.1021/bi301247r>
- Bussière, F., Ouellet, J., Côté, F., Lévesque, D., & Perreault, J. P. (2000). Mapping in Solution Shows the Peach Latent Mosaic Viroid To Possess a New Pseudoknot in a Complex, Branched Secondary Structure. *Journal of Virology*, *74*(6), 2647–2654. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.6.2647-2654.2000>
- Cao, M., Du, P., Wang, X., Yu, Y.-Q., Qiu, Y.-H., Li, W., Gal-On, A., Zhou, C., Li, Y., & Ding, S.-W. (2014). Virus infection triggers widespread silencing of host genes by a distinct class of endogenous siRNAs in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *111*(40), 14613–14618. <https://doi.org/10.1073/pnas.1407131111>
- Carbonell, A., & Carrington, J. C. (2015). Antiviral roles of plant ARGONAUTES. *Current Opinion in Plant Biology*, *27*, 111–117. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2015.06.013>
- Carbonell, A., Fahlgren, N., Garcia-Ruiz, H., Gilbert, K. B., Montgomery, T. A., Nguyen, T., Cuperus, J. T., & Carrington, J. C. (2012). Functional Analysis of Three *Arabidopsis* ARGONAUTES Using Slicer-Defective Mutants. *The Plant Cell*, *24*(9), 3613–3629. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.099945>
- Carlsbecker, A., Lee, J.-Y., Roberts, C. J., Dettmer, J., Lehesranta, S., Zhou, J., Lindgren, O., Moreno-Risueno, M. A., Vatén, A., Thitamadee, S., Campilho, A., Sebastian, J., Bowman, J. L., Helariutta, Y., & Benfey, P. N. (2010). Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature*, *465*(7296), 316–321. <https://doi.org/10.1038/nature08977>
- Chan, S. W.-L., Henderson, I. R., & Jacobsen, S. E. (2005). Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews Genetics*, *6*(5), 351–360. <https://doi.org/10.1038/nrg1601>
- Chen, H.-M., Chen, L.-T., Patel, K., Li, Y.-H., Baulcombe, D. C., & Wu, S.-H. (2010). 22-

- nucleotide RNAs trigger secondary siRNA biogenesis in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(34), 15269–15274. <https://doi.org/10.1073/pnas.1001738107>
- Chiumenti, M., Torchetti, E. M., Di Serio, F., & Minafra, A. (2014). Identification and characterization of a viroid resembling apple dimple fruit viroid in fig (*Ficus carica* L.) by next generation sequencing of small RNAs. *Virus Research*, 188. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.03.026>
- Cook, D. E., Mesarich, C. H., & Thomma, B. P. H. J. (2015). Understanding Plant Immunity as a Surveillance System to Detect Invasion. *Annu. Rev. Phytopathol*, 53, 541–563. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120114>
- Csorba, T., Kontra, L., & Burgyán, J. (2015). viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology*, 479–480, 85–103. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.028>
- Cuperus, J. T., Carbonell, A., Fahlgren, N., Garcia-Ruiz, H., Burke, R. T., Takeda, A., Sullivan, C. M., Gilbert, S. D., Montgomery, T. A., & Carrington, J. C. (2010). Unique functionality of 22-nt miRNAs in triggering RDR6-dependent siRNA biogenesis from target transcripts in *Arabidopsis*. *Nature Structural & Molecular Biology*, 17(8), 997–1003. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1866>
- Cuperus, J. T., Fahlgren, N., & Carrington, J. C. (2011). Evolution and Functional Diversification of *MIRNA* Genes. *The Plant Cell*, 23(2), 431–442. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.082784>
- Dadami, E., Boutla, A., Vrettos, N., Tzortzakaki, S., Karakasilioti, I., & Kalantidis, K. (2013). DICER-LIKE 4 But Not DICER-LIKE 2 May Have a Positive Effect on Potato Spindle Tuber Viroid Accumulation in *Nicotiana benthamiana*. *Molecular Plant*, 6(1), 232–234. <https://doi.org/10.1093/MP/SSS118>
- Dalakouras, A., Dadami, E., & Wassenegger, M. (2013). Viroid-induced DNA methylation in plants. *Biomolecular Concepts*, 4(6), 557–565. <https://doi.org/10.1515/bmc-2013-0030>

- Dalakouras, Athanasios, Dadami, E., Bassler, A., Zwiebel, M., Krczal, G., & Wassenegeger, M. (2015). Replicating Potato spindle tuber viroid mediates de novo methylation of an intronic viroid sequence but no cleavage of the corresponding pre-mRNA. *RNA Biology*, *12*(3), 268–275. <https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1017216>
- Dalakouras, Athanasios, Dadami, E., Zwiebel, M., Krczal, G., & Wassenegeger, M. (2012). Transgenerational maintenance of transgene body CG but not CHG and CHH methylation. *Epigenetics*, *7*(9), 1071–1078. <https://doi.org/10.4161/epi.21644>
- Dalakouras, Athanasios, Moser, M., Krczal, G., & Wassenegeger, M. (2010). A chimeric satellite transgene sequence is inefficiently targeted by viroid-induced DNA methylation in tobacco. *Plant Molecular Biology*, *73*(4–5), 439–447. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9631-6>
- Dangl, J. L., Horvath, D. M., & Staskawicz, B. J. (2013). Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Deployment. *Science*, *341*(6147), 746–751. <https://doi.org/10.1126/science.1236011>
- Daròs, J.-A., & Flores, R. (2004). Arabidopsis thaliana has the enzymatic machinery for replicating representative viroid species of the family Pospiviroidae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(17), 6792–6797. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401090101>
- Delan-Forino, C., Maurel, M.-C., & Torchet, C. (2011). Replication of avocado sunblotch viroid in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Virology*, *85*(7), 3229–3238. <https://doi.org/10.1128/JVI.01320-10>
- Delgado, S., Martínez de Alba, Á. E., Hernández, C., & Flores, R. (2005). A Short Double-Stranded RNA Motif of Peach Latent Mosaic Viroid Contains the Initiation and the Self-Cleavage Sites of Both Polarity Strands. *Journal of Virology*, *79*(20), 12934–12943. <https://doi.org/10.1128/jvi.79.20.12934-12943.2005>
- Denti, M. A., Boutla, A., Tsagris, M., & Tabler, M. (2004). Short interfering RNAs specific for potato spindle tuber viroid are found in the cytoplasm but not in the nucleus. *The Plant*

*Journal of Cell and Molecular Biology*, 37(5), 762–769. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313x.2004.02001.x>

Di Serio, Francesco, Gisel, A., Navarro, B., Delgado, S., Martínez de Alba, Á.-E., Donvito, G., & Flores, R. (2009). Deep Sequencing of the Small RNAs Derived from Two Symptomatic Variants of a Chloroplastic Viroid: Implications for Their Genesis and for Pathogenesis. *PLoS ONE*, 4(10), e7539. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007539>

Di Serio, Francesco, Martínez de Alba, A.-E., Navarro, B., Gisel, A., & Flores, R. (2010). RNA-dependent RNA polymerase 6 delays accumulation and precludes meristem invasion of a viroid that replicates in the nucleus. *Journal of Virology*, 84(5), 2477–2489. <https://doi.org/10.1128/JVI.02336-09>

Diener, T. O. (1971). Potato spindle tuber “virus”: IV. A replicating, low molecular weight RNA. *Virology*, 45(2), 411–428. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(71\)90342-4](https://doi.org/10.1016/0042-6822(71)90342-4)

Diener, T. O. (1987). Biological Properties. In *The Viroids* (pp. 9–35). Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1855-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1855-2_2)

Diermann, N., Matoušek, J., Junge, M., Riesner, D., & Steger, G. (2010). Characterization of plant miRNAs and small RNAs derived from potato spindle tuber viroid (PSTVd) in infected tomato. *Biol. Chem*, 391, 1379–1390. <https://doi.org/10.1515/BC.2010.148>

Ding, B. (2009). *The Biology of Viroid-Host Interactions*. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080508-081927>

Ding, B., Kwon, M. O., Hammond, R., & Owens, R. (1997). Cell-to-cell movement of potato spindle tuber viroid. *Plant Journal*, 12(4), 931–936. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1997.12040931.x>

Dingley, A. J., Steger, G., Esters, B., Riesner, D., & Grzesiek, S. (2003). Structural characterization of the 69 nucleotide potato spindle tuber viroid left-terminal domain by NMR and thermodynamic analysis. *Journal of Molecular Biology*, 334(4), 751–767. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2003.10.015>

- Donaire, L., Wang, Y., Gonzalez-Ibeas, D., Mayer, K. F., Aranda, M. A., & Llave, C. (2009). Deep-sequencing of plant viral small RNAs reveals effective and widespread targeting of viral genomes. *Virology*, *392*(2), 203–214. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.07.005>
- Du, Z., Lee, J. K., Tjhen, R., Stroud, R. M., & James, T. L. (2008). Structural and biochemical insights into the dicing mechanism of mouse Dicer: A conserved lysine is critical for dsRNA cleavage. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(7), 2391–2396. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711506105>
- Dubé, A., Bolduc, F., Bisailon, M., & Perreault, J. P. (2011). Mapping studies of the Peach latent mosaic viroid reveal novel structural features. *Molecular Plant Pathology*, *12*(7), 688–701. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2010.00703.x>
- Duran-Vila, N., & Semancik, J. S. (1982). Effects of exogenous auxins on tomato tissue infected with the citrus exocortis viroid. *Phytopathology*, *72*(7), 777–781. <https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84975044060&partnerID=40&md5=7f4041e04b511e2d4356d2f665fb8e11>
- Durrant, W. E., & Dong, X. (2004). SYSTEMIC ACQUIRED RESISTANCE. *Annu. Rev. Phytopathol*, *42*, 185–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.42.040803.140421>
- Eamens, A. L., Wook Kim, K., & Waterhouse, P. M. (2012). DRB2, DRB3 and DRB5 function in a non-canonical microRNA pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*, *7*(10), 1224–1229. <https://doi.org/10.4161/psb.21518>
- Elmayan, T., Adenot, X., Gissot, L., Laressergues, D., Gy, I., & Vaucheret, H. (2009). A neomorphic sgs3 allele stabilizing miRNA cleavage products reveals that SGS3 acts as a homodimer. *FEBS Journal*, *276*(3), 835–844. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06828.x>
- Eun, C., Lorkovic, Z. J., Naumann, U., Long, Q., Havecker, E. R., Simon, S. A., Meyers, B. C., Matzke, A. J. M., & Matzke, M. (2011). AGO6 Functions in RNA-Mediated Transcriptional Gene Silencing in Shoot and Root Meristems in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*, *6*(10), e25730. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025730>

- Fang, X., & Qi, Y. (2016). RNAi in Plants: An Argonaute-Centered View. *The Plant Cell*, 28(2), 272–285. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00920>
- Fei, Q., Xia, R., & Meyers, B. C. (2013). Phased, Secondary, Small Interfering RNAs in Posttranscriptional Regulatory Networks. *The Plant Cell*, 25(7), 2400–2415. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.114652>
- Flores, R., Minoia, S., Carbonell, A., Gisel, A., Delgado, S., López-Carrasco, A., Navarro, B., & Di Serio, F. (2015). Viroids, the simplest RNA replicons: How they manipulate their hosts for being propagated and how their hosts react for containing the infection. *Virus Research*, 209. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.02.027>
- Flores, Ricardo, Di Serio, F., Navarro, B., Duran-Vila, N., & Owens, R. A. (2011). Viroids and viroid diseases of plants. *Studies in Viral Ecology: Microbial and Botanical Host Systems*, 1, 311–346.
- Flores, Ricardo, Gas, M.-E., Molina-Serrano, D., Nohales, M.-Á., Carbonell, A., Gago, S., De la Peña, M., & Daròs, J.-A. (2009). Viroid Replication: Rolling-Circles, Enzymes and Ribozymes. *Viruses*, 1(2), 317–334. <https://doi.org/10.3390/v1020317>
- Frank, F., Hauver, J., Sonenberg, N., & Nagar, B. (2012). *Arabidopsis* Argonaute MID domains use their nucleotide specificity loop to sort small RNAs. *The EMBO Journal*, 31(17), 3588–3595. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.204>
- Fukudome, A., & Fukuhara, T. (2017). Plant dicer-like proteins: double-stranded RNA-cleaving enzymes for small RNA biogenesis. *Journal of Plant Research*, 130(1), 33–44. <https://doi.org/10.1007/s10265-016-0877-1>
- Garcia-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E. J., Sullivan, C. M., Fahlgren, N., Bremel, K. J., & Carrington, J. C. (2010). *Arabidopsis* RNA-Dependent RNA Polymerases and Dicer-Like Proteins in Antiviral Defense and Small Interfering RNA Biogenesis during *Turnip Mosaic Virus* Infection. *The Plant Cell*, 22(2), 481–496. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.073056>
- Garner, C. M., Kim, S. H., Spears, B. J., & Gassmann, W. (2016). Express yourself:

- Transcriptional regulation of plant innate immunity. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 56, 150–162. <https://doi.org/10.1016/J.SEMCDB.2016.05.002>
- Gas, M.-E., Hernández, C., Flores, R., & Daròs, J.-A. (2007). Processing of Nuclear Viroids In Vivo: An Interplay between RNA Conformations. *PLoS Pathogens*, 3(11), e182. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030182>
- Gazzani, S., Lawrenson, T., Woodward, C., Headon, D., & Sablowski, R. (2004). A Link Between mRNA Turnover and RNA Interference in Arabidopsis. *Science*, 306(5698), 1046–1048. <https://doi.org/10.1126/science.1101092>
- Giguère, T., Adkar-Purushothama, C. R., Bolduc, F., & Perreault, J. P. (2014). Elucidation of the structures of all members of the Avsunviroidae family. *Molecular Plant Pathology*, 15(8), 767–779. <https://doi.org/10.1111/mpp.12130>
- Gómez, G., Martínez, G., & Pallás, V. (2008a). Viroid-Induced Symptoms in *Nicotiana benthamiana* Plants Are Dependent on RDR6 Activity. *Plant Physiology*, 148(1), 414–423. <https://doi.org/10.1104/pp.108.120808>
- Gómez, G., Martínez, G., & Pallás, V. (2008b). Viroid-Induced Symptoms in *Nicotiana benthamiana* Plants Are Dependent on RDR6 Activity. *Plant Physiology*, 148(1), 414–423. <https://doi.org/10.1104/pp.108.120808>
- Gómez, G., & Pallas, V. (2012). Studies on subcellular compartmentalization of plant pathogenic noncoding RNAs give new insights into the intracellular RNA-traffic mechanisms. *Plant Physiology*, 159(2), 558–564. <https://doi.org/10.1104/pp.112.195214>
- Gozmanova, M., Denti, M. A., Minkov, I. N., Tsagris, M., & Tabler, M. (2003). Characterization of the RNA motif responsible for the specific interaction of potato spindle tuber viroid RNA (PSTVd) and the tomato protein Virp1. *Nucleic Acids Research*, 31(19), 5534–5543. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg777>
- Gross, H. J., Liebl, U., Alberty, H., Krupp, G., Domdey, H., Ramm, K., & Sanger, H. L. (1981). A severe and a mild potato spindle tuber viroid isolate differ in three nucleotide exchanges

- only. *Bioscience Reports*, 1(3), 235–241. <https://doi.org/10.1007/BF01114910>
- Haag, J. R., Ream, T. S., Marasco, M., Nicora, C. D., Norbeck, A. D., Pasa-Tolic, L., & Pikaard, C. S. (2012). In Vitro Transcription Activities of Pol IV, Pol V, and RDR2 Reveal Coupling of Pol IV and RDR2 for dsRNA Synthesis in Plant RNA Silencing. *Molecular Cell*, 48(5), 811–818. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.027>
- Hadidi, A., Flores, R., & Randles, J. (2003). *Viroids*. Science Publishers. [https://play.google.com/store/books/details?id=ktYAYhLKOoC&rdid=book-ktYAYhLKOoC&rdot=1&source=gbs\\_vpt\\_read&pcampaignid=books\\_booksearch\\_viewport](https://play.google.com/store/books/details?id=ktYAYhLKOoC&rdid=book-ktYAYhLKOoC&rdot=1&source=gbs_vpt_read&pcampaignid=books_booksearch_viewport)
- Hammann, C., & Steger, G. (2012a). Viroid-specific small RNA in plant disease. *RNA Biology*, 9(6), 809–819. <https://doi.org/10.4161/rna.19810>
- Hammann, C., & Steger, G. (2012b). Viroid-specific small RNA in plant disease. *RNA Biology*, 9(6), 809–819. <https://doi.org/10.4161/rna.19810>
- Hammond, R. W. (1994). Agrobacterium-mediated inoculation of PSTVd cDNAs onto tomato reveals the biological effect of apparently lethal mutations. *Virology*, 201(1), 36–45. <https://doi.org/10.1006/viro.1994.1263>
- Han, M.-H., Goud, S., Song, L., & Fedoroff, N. (2004). The Arabidopsis double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(4), 1093–1098. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307969100>
- Hemmes, H., Lakatos, L., Goldbach, R., Burgyan, 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(7), 1079–1089. <https://doi.org/10.1261/rna.444007>
- Henderson, I. R., Zhang, X., Lu, C., Johnson, L., Meyers, B. C., Green, P. J., & 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. <https://doi.org/10.1038/ng1804>
- Hiraguri, A., Itoh, R., Kondo, N., Nomura, Y., Aizawa, D., Murai, Y., Koiwa, H., Seki, M., Shinozaki, K., & Fukuhara, T. (2005). Specific interactions between Dicer-like proteins and HYL1/DRB- family dsRNA-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 57(2), 173–188. <https://doi.org/10.1007/s11103-004-6853-5>
- Höck, J., & Meister, G. (2008). The Argonaute protein family. *Genome Biology*, 9(2), 210. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-2-210>
- Howell, M. D., Fahlgren, N., Chapman, E. J., Cumbie, J. S., Sullivan, C. M., Givan, S. A., Kasschau, K. D., & Carrington, J. C. (2007). Genome-Wide Analysis of the RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE6/DICER-LIKE4 Pathway in *Arabidopsis* Reveals Dependency on miRNA- and tasiRNA-Directed Targeting. *The Plant Cell*, 19(3), 926–942. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.050062>
- Hsieh, L.-C., Lin, S.-I., Shih, A. C.-C., Chen, J.-W., Lin, W.-Y., Tseng, C.-Y., Li, W.-H., & Chiou, T.-J. (2009). Uncovering Small RNA-Mediated Responses to Phosphate Deficiency in *Arabidopsis* by Deep Sequencing. *Plant Physiology*, 151(4), 2120–2132. <https://doi.org/10.1104/pp.109.147280>
- Huang, Y., Ji, L., Huang, Q., Vassilyev, D. G., Chen, X., & Ma, J.-B. (2009). Structural insights into mechanisms of the small RNA methyltransferase HEN1. *Nature*, 461(7265), 823–827. <https://doi.org/10.1038/nature08433>
- Incarbone, M., & Dunoyer, P. (2013). RNA silencing and its suppression: novel insights from in planta analyses. *Trends in Plant Science*, 18(7), 382–392. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.04.001>
- Itaya, A., Folimonov, A., Matsuda, Y., Nelson, R. S., & Ding, B. (2001). *Potato spindle tuber viroid* as Inducer of RNA Silencing in Infected Tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 14(11), 1332–1334. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.11.1332>

- Itaya, A., Zhong, X., Bundschuh, R., Qi, Y., Wang, Y., Takeda, R., Harris, A. R., Molina, C., Nelson, R. S., & Ding, B. (2007). A structured viroid RNA serves as a substrate for dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RNA-induced silencing complex-mediated degradation. *Journal of Virology*, *81*(6), 2980–2994. <https://doi.org/10.1128/JVI.02339-06>
- Iwakawa, H., & Tomari, Y. (2015). The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends in Cell Biology*, *25*(11), 651–665. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2015.07.011>
- Ji, L., & Chen, X. (2012). Regulation of small RNA stability: methylation and beyond. *Cell Research*, *22*(4), 624–636. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.36>
- Ji, L., Liu, X., Yan, J., Wang, W., Yumul, R. E., Kim, Y. J., Dinh, T. T., Liu, J., Cui, X., Zheng, B., Agarwal, M., Liu, C., Cao, X., Tang, G., & Chen, X. (2011). ARGONAUTE10 and ARGONAUTE1 Regulate the Termination of Floral Stem Cells through Two MicroRNAs in Arabidopsis. *PLoS Genetics*, *7*(3), e1001358. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001358>
- Jones, H. D., Doherty, A., & Wu, H. (2005). Review of methodologies and a protocol for the Agrobacterium-mediated transformation of wheat. In *Plant Methods* (Vol. 1, Issue 1, pp. 1–9). BioMed Central. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-1-5>
- Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, *444*(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Kasai, A., Sano, T., & Harada, T. (2013). Scion on a Stock Producing siRNAs of Potato Spindle Tuber Viroid (PSTVd) Attenuates Accumulation of the Viroid. *PLoS ONE*, *8*(2), e57736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057736>
- Katsarou, K., Mavrothalassiti, E., Dermauw, W., Van Leeuwen, T., & Kalantidis, K. (2016). Combined Activity of DCL2 and DCL3 Is Crucial in the Defense against Potato Spindle Tuber Viroid. *PLoS Pathogens*, *12*(10). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005936>

- Keese, P., & Symons, R. H. (1985). Domains in viroids: Evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 82(14), 4582–4586. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.14.4582>
- Kolonko, N., Bannach, O., Aschermann, K., Hu, K. H., Moors, M., Schmitz, M., Steger, G., & Riesner, D. (2006). Transcription of potato spindle tuber viroid by RNA polymerase II starts in the left terminal loop. *Virology*, 347(2), 392–404. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.11.039>
- Kubota, K., Tsuda, S., Tamai, A., & Meshi, T. (2003). Tomato Mosaic Virus Replication Protein Suppresses Virus-Targeted Posttranscriptional Gene Silencing. *Journal of Virology*, 77(20), 11016–11026. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.20.11016-11026.2003>
- KURIHARA, Y. (2005). The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA*, 12(2), 206–212. <https://doi.org/10.1261/rna.2146906>
- Kurihara, Y., & Watanabe, Y. (2004). Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(34), 12753–12758. <https://doi.org/10.1073/pnas.0403115101>
- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E. J., Carrington, J. C., Liu, Y.-P., Dolja, V. V., Calvino, L. F., López-Moya, J. J., & Burgyán, J. (2006). Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *The EMBO Journal*, 25(12), 2768–2780. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601164>
- Landry, P., & Perreault, J.-P. (2005). Identification of a peach latent mosaic viroid hairpin able to act as a Dicer-like substrate. *Journal of Virology*, 79(10), 6540–6543. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.10.6540-6543.2005>
- Law, J. A., Ausin, I., Johnson, L. M., Vashisht, A. A., Zhu, J.-K., Wohlschlegel, J. A., & Jacobsen, S. E. (2010). A Protein Complex Required for Polymerase V Transcripts and RNA-Directed DNA Methylation in Arabidopsis. *Current Biology*, 20(10), 951–956.

<https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.03.062>

- Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J., & Chen, X. (2005). Methylation Protects miRNAs and siRNAs from a 3'-End Uridylation Activity in Arabidopsis. *Current Biology*, 15(16), 1501–1507. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2005.07.029>
- Liu, C., Axtell, M. J., & Fedoroff, N. V. (2012). The helicase and RNaseIIIa domains of Arabidopsis Dicer-Like1 modulate catalytic parameters during microRNA biogenesis. *Plant Physiology*, 159(2), 748–758. <https://doi.org/10.1104/pp.112.193508>
- Liu, Q., Feng, Y., & Zhu, Z. (2009). Dicer-like (DCL) proteins in plants. *Functional & Integrative Genomics*, 9(3), 277–286. <https://doi.org/10.1007/s10142-009-0111-5>
- Llobes, D., Rallapalli, G., Schmidt, D. D., Martin, C., & Clarke, J. (2006). SERRATE: a new player on the plant microRNA scene. *EMBO Reports*, 7(10), 1052–1058. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400806>
- Ludman, M., Burgyán, J., & Fátýol, K. (2017). Crispr/Cas9 Mediated Inactivation of Argonaute 2 Reveals its Differential Involvement in Antiviral Responses /631/337/384/2053 /631/449/2169/597 /42/89 /42/44 /38/22 article. *Scientific Reports*, 7(1), 1010. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01050-6>
- Luo, Z., & Chen, Z. (2007). Improperly Terminated, Unpolyadenylated mRNA of Sense Transgenes Is Targeted by RDR6-Mediated RNA Silencing in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(3), 943–958. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.045724>
- Machida, S., Yamahata, N., Watanuki, H., Owens, R. A., & Sano, T. (2007). Successive accumulation of two size classes of viroid-specific small RNA in potato spindle tuber viroid-infected tomato plants. *Journal of General Virology*, 88(12), 3452–3457. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83228-0>
- Mallory, A., & Vaucheret, H. (2010). Form, function, and regulation of ARGONAUTE proteins. *The Plant Cell*, 22(12), 3879–3889. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.080671>
- Manavella, P. A., Koenig, D., & Weigel, D. (2012). Plant secondary siRNA production

- determined by microRNA-duplex structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(7), 2461–2466. <https://doi.org/10.1073/pnas.1200169109>
- Margis, R., Fusaro, A. F., Smith, N. A., Curtin, S. J., Watson, J. M., Finnegan, E. J., & Waterhouse, P. M. (2006). The evolution and diversification of Dicers in plants. *FEBS Letters*, 580(10), 2442–2450. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.03.072>
- Marin, E., Jouannet, V., Herz, A., Lokerse, A. S., Weijers, D., Vaucheret, H., Nussaume, L., Crespi, M. D., & Maizel, A. (2010). miR390, *Arabidopsis TAS3* tasiRNAs, and Their *AUXIN RESPONSE FACTOR* Targets Define an Autoregulatory Network Quantitatively Regulating Lateral Root Growth. *The Plant Cell*, 22(4), 1104–1117. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.072553>
- Markarian, N., Li, H. W., Ding, S. W., & Semancik, J. S. (2004). RNA silencing as related to viroid induced symptom expression. *Archives of Virology*, 149(2), 397–406. <https://doi.org/10.1007/s00705-003-0215-5>
- Marquez-Molins, J., Navarro, J. A., Pallas, V., & Gomez, G. (2019). Highly efficient construction of infectious viroid-derived clones. *Plant Methods*, 15(1), 87. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0470-4>
- Martín, R., Arenas, C., Daròs, J.-A., Covarrubias, A., Reyes, J. L., & Chua, N.-H. (2007). Characterization of small RNAs derived from *Citrus exocortis* viroid (CEVd) in infected tomato plants. *Virology*, 367(1), 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2007.05.011>
- Martínez de Alba, A. E., Flores, R., & Hernández, C. (2002). Two chloroplastic viroids induce the accumulation of small RNAs associated with posttranscriptional gene silencing. *Journal of Virology*, 76(24), 13094–13096. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.24.13094-13096.2002>
- Martinez, G., Castellano, M., Tortosa, M., Pallas, V., & Gomez, G. (2014). A pathogenic non-coding RNA induces changes in dynamic DNA methylation of ribosomal RNA genes in host plants. *Nucleic Acids Research*, 42(3). <https://doi.org/10.1093/nar/gkt968>

- Matzke, M. A., & Mosher, R. A. (2014). RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Reviews Genetics*, *15*(6), 394–408. <https://doi.org/10.1038/nrg3683>
- McHale, M., Eamens, A. L., Finnegan, E. J., & Waterhouse, P. M. (2013). A 22-nt artificial microRNA mediates widespread RNA silencing in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, *76*(3), 519–529. <https://doi.org/10.1111/tpj.12306>
- Mehle, N., Gutiérrez-Aguirre, I., Prezelj, N., Delic, D., Vidic, U., & Ravnikar, M. (2014). Survival and transmission of potato virus Y, pepino mosaic virus, and potato spindle tuber viroid in water. *Applied and Environmental Microbiology*, *80*(4), 1455–1462. <https://doi.org/10.1128/AEM.03349-13>
- Meister, G. (2013). Argonaute proteins: functional insights and emerging roles. *Nature Reviews Genetics*, *14*(7), 447–459. <https://doi.org/10.1038/nrg3462>
- Melnyk, C. W., Molnar, A., Bassett, A., & Baulcombe, D. C. (2011). Mobile 24 nt small RNAs direct transcriptional gene silencing in the root meristems of *Arabidopsis thaliana*. *Current Biology: CB*, *21*(19), 1678–1683. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.08.065>
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., Chen, S., Hannon, G. J., & Qi, Y. (2008). Sorting of Small RNAs into *Arabidopsis* Argonaute Complexes Is Directed by the 5' Terminal Nucleotide. *Cell*, *133*(1), 116–127. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.034>
- Minoia, S., Carbonell, A., Di Serio, F., Gisel, A., Carrington, J. C., Navarro, B., & Flores, R. (2014a). Specific Argonautes Selectively Bind Small RNAs Derived from Potato Spindle Tuber Viroid and Attenuate Viroid Accumulation In Vivo. *Journal of Virology*, *88*(20), 11933–11945. <https://doi.org/10.1128/JVI.01404-14>
- Minoia, S., Carbonell, A., Di Serio, F., Gisel, A., Carrington, J. C., Navarro, B., & Flores, R. (2014b). Specific argonautes selectively bind small RNAs derived from potato spindle tuber viroid and attenuate viroid accumulation in vivo. *Journal of Virology*, *88*(20), 11933–11945. <https://doi.org/10.1128/JVI.01404-14>

- Minoia, S., Carbonell, A., Di Serio, F., Gisel, A., Carrington, J. C., Navarro, B., & Flores, R. (2014c). Specific argonautes selectively bind small RNAs derived from potato spindle tuber viroid and attenuate viroid accumulation in vivo. *Journal of Virology*, *88*(20), 11933–11945. <https://doi.org/10.1128/JVI.01404-14>
- Moissiard, G., Parizotto, E. A., Humber, C., & Voinnet, O. (2007). Transitivity in Arabidopsis can be primed, requires the redundant action of the antiviral Dicer-like 4 and Dicer-like 2, and is compromised by viral-encoded suppressor proteins. *RNA (New York, N.Y.)*, *13*(8), 1268–1278. <https://doi.org/10.1261/rna.541307>
- Molnar, A., Melnyk, C. W., Bassett, A., Hardcastle, T. J., Dunn, R., & Baulcombe, D. C. (2010). Small Silencing RNAs in Plants Are Mobile and Direct Epigenetic Modification in Recipient Cells. *Science*, *328*(5980), 872–875. <https://doi.org/10.1126/science.1187959>
- Montgomery, T. A., Howell, M. D., Cuperus, J. T., Li, D., Hansen, J. E., Alexander, A. L., Chapman, E. J., Fahlgren, N., Allen, E., & Carrington, J. C. (2008). Specificity of ARGONAUTE7-miR390 Interaction and Dual Functionality in TAS3 Trans-Acting siRNA Formation. *Cell*, *133*(1), 128–141. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.033>
- Mourrain, P., Béclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., Jouette, D., Lacombe, A. M., Nikic, S., Picault, N., Rémoué, K., Sanial, M., Vo, T. A., & Vaucheret, H. (2000). Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell*, *101*(5), 533–542. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80863-6](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80863-6)
- Navarro, B., Pantaleo, V., Gisel, A., Moxon, S., Dalmay, T., Bisztray, G., Di Serio, F., & Burguán, J. (2009). Deep Sequencing of Viroid-Derived Small RNAs from Grapevine Provides New Insights on the Role of RNA Silencing in Plant-Viroid Interaction. *PLoS ONE*, *4*(11), e7686. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007686>
- Olmedo-Monfil, V., Durán-Figueroa, N., Arteaga-Vázquez, M., Demesa-Arévalo, E., Autran, D., Grimanelli, D., Slotkin, R. K., Martienssen, R. A., & Vielle-Calzada, J.-P. (2010). Control of female gamete formation by a small RNA pathway in Arabidopsis. *Nature*,

464(7288), 628–632. <https://doi.org/10.1038/nature08828>

- Owens, R. A., Flores, R., Di Serio, F., Li, S.-F., Pallás, V., Randles, J. W., Sano, T., & Vidalakis, G. (2012). Viroids. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 1221–1234.
- Palauqui, J. C., Elmayan, T., Pollien, J. M., & Vaucheret, H. (1997). Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *The EMBO Journal*, 16(15), 4738–4745. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.15.4738>
- Papaefthimiou, I., Hamilton, A., Denti, M., Baulcombe, D., Tsagris, M., & Tabler, M. (2001). Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of post-transcriptional gene silencing. *Nucleic Acids Research*, 29(11), 2395–2400. <https://doi.org/10.1093/nar/29.11.2395>
- Pelissier, T., Clavel, M., Chaparro, C., Pouch-Pelissier, M.-N., Vaucheret, H., & Deragon, J.-M. (2011). Double-stranded RNA binding proteins DRB2 and DRB4 have an antagonistic impact on polymerase IV-dependent siRNA levels in Arabidopsis. *RNA*, 17(8), 1502–1510. <https://doi.org/10.1261/rna.2680711>
- Pélissier, T, Thalmeir, S., Kempe, D., Sängler, H. L., & Wassenegger, M. (1999). Heavy de novo methylation at symmetrical and non-symmetrical sites is a hallmark of RNA-directed DNA methylation. *Nucleic Acids Research*, 27(7), 1625–1634. <https://doi.org/10.1093/nar/27.7.1625>
- Pélissier, Thierry, & Wassenegger, M. (2000). A DNA target of 30 bp is sufficient for RNA-directed DNA methylation. *RNA*, 6(1), 55–65. <https://www.cambridge.org/core/journals/rna/article/dna-target-of-30-bp-is-sufficient-for-rnadirected-dna-methylation/D9D047ABA483F590A26BAE5E96F46EE7#>
- Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H., & Poethig, R. (2004). SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes & Development*, 18(19), 2368–2379.



<https://doi.org/10.1101/gad.1231804>

- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), 45e – 45. <https://doi.org/10.1093/nar/29.9.e45>
- Pfannenstiel, M. A. (1980). Response of Potato Cultivars to Infection by the Potato Spindle Tuber Viroid. *Phytopathology*, 70(9), 922. <https://doi.org/10.1094/Phyto-70-922>
- Pieterse, C. M. J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., & Van Wees, S. C. M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nature Chemical Biology*, 5(5), 308–316. <https://doi.org/10.1038/nchembio.164>
- Pontes, O., Vitins, A., Ream, T. S., Hong, E., Pikaard, C. S., & Costa-Nunes, P. (2013). Intersection of Small RNA Pathways in Arabidopsis thaliana Sub-Nuclear Domains. *PLoS ONE*, 8(6), e65652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065652>
- Puchta, H., Herold, T., Verhoeven, K., Roenhorst, A., Ramm, K., Schmidt-Puchta, W., & Sönger, H. L. (1990). A new strain of potato spindle tuber viroid (PSTVd-N) exhibits major sequence differences as compared to all other PSTVd strains sequenced so far. *Plant Molecular Biology*, 15(3), 509–511. <https://doi.org/10.1007/BF00019169>
- Pumplin, N., & Voinnet, O. (2013). RNA silencing suppression by plant pathogens: defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature Reviews Microbiology*, 11(11), 745–760. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3120>
- Qi, X., Bao, F. S., & Xie, Z. (2009a). Small RNA Deep Sequencing Reveals Role for Arabidopsis thaliana RNA-Dependent RNA Polymerases in Viral siRNA Biogenesis. *PLoS ONE*, 4(3), e4971. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004971>
- Qi, X., Bao, F. S., & Xie, Z. (2009b). Small RNA Deep Sequencing Reveals Role for Arabidopsis thaliana RNA-Dependent RNA Polymerases in Viral siRNA Biogenesis. *PLoS ONE*, 4(3), e4971. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004971>
- Qi, Y., He, X., Wang, X.-J., Kohany, O., Jurka, J., & Hannon, G. J. (2006). Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature*,

443(7114), 1008–1012. <https://doi.org/10.1038/nature05198>

- Qin, H., Chen, F., Huan, X., Machida, S., Song, J., & Yuan, Y. A. (2010). Structure of the *Arabidopsis thaliana* DCL4 DUF283 domain reveals a noncanonical double-stranded RNA-binding fold for protein-protein interaction. *RNA (New York, N.Y.)*, *16*(3), 474–481. <https://doi.org/10.1261/rna.1965310>
- Raja, P., Jackel, J. N., Li, S., Heard, I. M., & Bisaro, D. M. (2014). *Arabidopsis* Double-Stranded RNA Binding Protein DRB3 Participates in Methylation-Mediated Defense against Geminiviruses. *Journal of Virology*, *88*(5), 2611–2622. <https://doi.org/10.1128/JVI.02305-13>
- Raja, P., Sanville, B. C., Buchmann, R. C., & Bisaro, D. M. (2008). Viral Genome Methylation as an Epigenetic Defense against Geminiviruses. *Journal of Virology*, *82*(18), 8997–9007. <https://doi.org/10.1128/JVI.00719-08>
- Rajagopalan, R., Vaucheret, H., Trejo, J., & Bartel, D. P. (2006). A diverse and evolutionarily fluid set of microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Genes & Development*, *20*(24), 3407–3425. <https://doi.org/10.1101/gad.1476406>
- Rajamäki, M.-L., Streng, J., & Valkonen, J. P. T. (2014). Silencing Suppressor Protein VPg of a Potyvirus Interacts With the Plant Silencing-Related Protein SGS3. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *27*(11), 1199–1210. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-14-0109-R>
- Ricardo, F. (2005). Viroids and Viroid-Host Interactions. *Annual Review of Phytopathology*, *43*(1), 117–139. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.43.040204.140243>
- Ruiz-Ferrer, V., & Voinnet, O. (2009). Roles of Plant Small RNAs in Biotic Stress Responses. *Annual Review of Plant Biology*, *60*(1), 485–510. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.043008.092111>
- Sasaki, T., Lee, T., Liao, W.-W., Naumann, U., Liao, J.-L., Eun, C., Huang, Y.-Y., Fu, J. L., Chen, P.-Y., Meyers, B. C., Matzke, A. J. M., & Matzke, M. (2014). Distinct and concurrent pathways of Pol II- and Pol IV-dependent siRNA biogenesis at a repetitive

- trans* -silencer locus in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 79(1), 127–138.  
<https://doi.org/10.1111/tpj.12545>
- Schiebel, W., Pélissier, T., Riedel, L., Thalmeir, S., Schiebel, R., Kempe, D., Lottspeich, F., Sanger, H. L., & Wassenegger, M. (1998). Isolation of an RNA-Directed RNA Polymerase-Specific cDNA Clone from Tomato. *The Plant Cell*, 10(12), 2087–2101.  
<https://doi.org/10.1105/tpc.10.12.2087>
- Schuck, J., Gursinsky, T., Pantaleo, V., Burgyan, J., & Behrens, S.-E. (2013). AGO/RISC-mediated antiviral RNA silencing in a plant in vitro system. *Nucleic Acids Research*, 41(9), 5090–5103. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt193>
- Schultz, E. S., & Folsom, D. (1923). Transmission, variation, and control of certain degeneration diseases of Irish potatoes. *J. Agric. Res.*, 25, 43–118.
- SCHWIND, N., ZWIEBEL, M., ITAYA, A., DING, B., WANG, M.-B., KRCZAL, G., & WASSENEGGER, M. (2009). RNAi-mediated resistance to *Potato spindle tuber viroid* in transgenic tomato expressing a viroid hairpin RNA construct. *Molecular Plant Pathology*, 10(4), 459–469. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2009.00546.x>
- Serio, F Di, Flores, R., Verhoeven, J. T. J., Li, S.-F., Pallas, V., Randles, J. W., Sano, T., Vidalakis, G., & Owens, R. A. (2014a). Current status of viroid taxonomy. *Archives of Virology*, 159(12), 3467–3478. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2200-6>
- Serio, F Di, Flores, R., Verhoeven, J. T. J., Li, S.-F., Pallas, V., Randles, J. W., Sano, T., Vidalakis, G., & Owens, R. A. (2014b). Current status of viroid taxonomy. *Archives of Virology*, 159(12), 3467–3478. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2200-6>
- Serra, P., Bani Hashemian, S. M., Fagoaga, C., Romero, J., Ruiz-Ruiz, S., Gorris, M. T., Bertolini, E., & Duran-Vila, N. (2014). Virus-Viroid Interactions: Citrus Tristeza Virus Enhances the Accumulation of Citrus Dwarfing Viroid in Mexican Lime via Virus-Encoded Silencing Suppressors. *Journal of Virology*, 88(2), 1394–1397.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.02619-13>

- Shivaprasad, P. V., Chen, H.-M., Patel, K., Bond, D. M., Santos, B. A. C. M., & Baulcombe, D. C. (2012). A MicroRNA Superfamily Regulates Nucleotide Binding Site–Leucine-Rich Repeats and Other mRNAs. *The Plant Cell*, *24*(3), 859–874. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.095380>
- Silhavy, D., Molnár, A., Lucioli, A., Szittyá, G., Hornyik, C., Tavazza, M., & Burgyán, J. (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *The EMBO Journal*, *21*(12), 3070–3080. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf312>
- Singh, R. P. (1973). Experimental host range of the potato spindle tuber ‘virus.’ *American Potato Journal*, *50*(4), 111–123. <https://doi.org/10.1007/BF02857207>
- Singh, R. P., Finnie, R. E., & Bagnall, R. H. (1971). Losses due to the potato spindle tuber virus. *American Potato Journal*, *48*(7), 262–267. <https://doi.org/10.1007/BF02861592>
- Song, M.-S., & Rossi, J. J. (2017). Molecular mechanisms of Dicer: endonuclease and enzymatic activity. *The Biochemical Journal*, *474*(10), 1603–1618. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160759>
- Stael, S., Kmieciak, P., Willems, P., Van Der Kelen, K., Coll, N. S., Teige, M., & Van Breusegem, F. (2015). Plant innate immunity – sunny side up? *Trends in Plant Science*, *20*(1), 3–11. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2014.10.002>
- Szittyá, G., Moxon, S., Pantaleo, V., Toth, G., Rusholme Pilcher, R. L., Moulton, V., Burgyán, J., & Dalmay, T. (2010). Structural and Functional Analysis of Viral siRNAs. *PLoS Pathogens*, *6*(4), e1000838. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000838>
- Tabler, M., & Tsagris, M. (2004). Viroids: petite RNA pathogens with distinguished talents. *Trends in Plant Science*, *9*(7), 339–348. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2004.05.007>
- Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M., & Watanabe, Y. (2008). The Mechanism Selecting the Guide Strand from Small RNA Duplexes is Different Among Argonaute Proteins. *Plant and Cell Physiology*, *49*(4), 493–500. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn043>

- Takeda, R., Petrov, A. I., Leontis, N. B., & Ding, B. (2011). A three-dimensional RNA motif in Potato spindle tuber viroid mediates trafficking from palisade mesophyll to spongy mesophyll in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell*, 23(1), 258–272. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.081414>
- Taylor, D. W., Ma, E., Shigematsu, H., Cianfrocco, M. A., Noland, C. L., Nagayama, K., Nogales, E., Doudna, J. A., & Wang, H.-W. (2013). Substrate-specific structural rearrangements of human Dicer. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(6), 662–670. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2564>
- Vachev, T., Ivanova, D., Minkov, I., Tsagris, M., & Gozmanova, M. (2010). Trafficking of the Potato spindle tuber viroid between tomato and *Orobanche ramosa*. *Virology*, 399(2), 187–193. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2009.12.022>
- Vaucheret, H. (2008). Plant ARGONAUTES. *Trends in Plant Science*, 13(7), 350–358. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2008.04.007>
- Vogler, H., Akbergenov, R., Shivaprasad, P. V., Dang, V., Fasler, M., Kwon, M.-O., Zhanybekova, S., Hohn, T., & Heinlein, M. (2007). Modification of Small RNAs Associated with Suppression of RNA Silencing by Tobamovirus Replicase Protein. *Journal of Virology*, 81(19), 10379–10388. <https://doi.org/10.1128/JVI.00727-07>
- Voinnet, O., Lederer, C., & Baulcombe, D. C. (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell*, 103(1), 157–167. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)00095-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)00095-7)
- Voinnet, O., Vain, P., Angell, S., & Baulcombe, D. C. (1998). Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell*, 95(2), 177–187. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81749-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81749-3)
- Wang, M.-B., Bian, X.-Y., Wu, L.-M., Liu, L.-X., Smith, N. A., Isenegger, D., Wu, R.-M., Masuta, C., Vance, V. B., Watson, J. M., Rezaian, A., Dennis, E. S., & Waterhouse, P. M. (2004). On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and

- viral satellites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *101*(9), 3275–3280. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400104101>
- Wang, M.-B., Masuta, C., Smith, N. A., & Shimura, H. (2012). RNA Silencing and Plant Viral Diseases. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *25*(10), 1275–1285. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-12-0093-CR>
- Wang, T., You, L., Li, R., Fu, D.-Q., Zhu, B.-Z., Luo, Y.-B., & Zhu, H.-L. (2016). Cloning, identification, and expression analysis of a Dicer-Like gene family from *Solanum lycopersicum*. *Biologia Plantarum*, *60*(3), 410–418. <https://doi.org/10.1007/s10535-016-0620-8>
- Wang, Y., Shibuya, M., Taneda, A., Kurauchi, T., Senda, M., Owens, R. A., & Sano, T. (2011). Accumulation of Potato spindle tuber viroid-specific small RNAs is accompanied by specific changes in gene expression in two tomato cultivars. *Virology*, *413*(1), 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.01.021>
- Wassenegger, M. (2000). RNA-directed DNA methylation. *Plant Molecular Biology*, *43*(2/3), 203–220. <https://doi.org/10.1023/A:1006479327881>
- Wassenegger, M., Heimes, S., Riedel, L., & Sanger, H. L. (1994). RNA-directed de novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell*, *76*(3), 567–576. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90119-8](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90119-8)
- Wassenegger, M., & Krczal, G. (2006). Nomenclature and functions of RNA-directed RNA polymerases. *Trends in Plant Science*, *11*(3), 142–151. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2006.01.003>
- Wei, W., Ba, Z., Gao, M., Wu, Y., Ma, Y., Amiard, S., White, C. I., Rendtlew Danielsen, J. M., Yang, Y.-G., & Qi, Y. (2012). A Role for Small RNAs in DNA Double-Strand Break Repair. *Cell*, *149*(1), 101–112. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.03.002>
- Wierzbicki, A. T., Haag, J. R., & Pikaard, C. S. (2008). Noncoding Transcription by RNA Polymerase Pol IVb/Pol V Mediates Transcriptional Silencing of Overlapping and

- Adjacent Genes. *Cell*, 135(4), 635–648. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.09.035>
- Willmann, M. R., Endres, M. W., Cook, R. T., & Gregory, B. D. (2011). The Functions of RNA-Dependent RNA Polymerases in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book*, 9(9), e0146. <https://doi.org/10.1199/tab.0146>
- Wu, G., Park, M. Y., Conway, S. R., Wang, J.-W., Weigel, D., & Poethig, R. S. (2009). The Sequential Action of miR156 and miR172 Regulates Developmental Timing in Arabidopsis. *Cell*, 138(4), 750–759. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.06.031>
- Xia, R., Zhu, H., An, Y., Beers, E. P., & Liu, Z. (2012). Apple miRNAs and tasiRNAs with novel regulatory networks. *Genome Biology*, 13(6), R47. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-6-r47>
- Xian, Z., Yang, Y., Huang, W., Tang, N., Wang, X., & Li, Z. (2013). Molecular cloning and characterisation of SLAGO family in tomato. *BMC Plant Biology*, 13, 126. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-126>
- Yaguchi, S., & Takahashi, T. (1985). Syndrome characteristics and endogenous indoleacetic acid levels in cucumber plants incited by hop stunt viroid / Syndrom-Eigenschaften und endogene Indoleessigsäuregehalte in Gurkenpflanzen nach Induktion durch das Hopfenstaucheviroid. In *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz / Journal of Plant Diseases and Protection* (Vol. 92, pp. 263–269). Verlag Eugen Ulmer KG. <https://doi.org/10.2307/43383579>
- Yang, Z., Ebright, Y. W., Yu, B., & Chen, X. (2006). HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Research*, 34(2), 667–675. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj474>
- Yoshikawa, M. (2013). Biogenesis of &lt;i>trans&lt;/i>-acting siRNAs, endogenous secondary siRNAs in plants. *Genes & Genetic Systems*, 88(2), 77–84. <https://doi.org/10.1266/ggs.88.77>
- Yoshikawa, M., Peragine, A., Park, M. Y., & Poethig, R. S. (2005). A pathway for the biogenesis

- of trans-acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes & Development*, *19*(18), 2164–2175. <https://doi.org/10.1101/gad.1352605>
- Yu, B. (2005). Methylation as a Crucial Step in Plant microRNA Biogenesis. *Science*, *307*(5711), 932–935. <https://doi.org/10.1126/science.1107130>
- Yu, J.-Y., DeRuiter, S. L., & Turner, D. L. (2002). RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *99*(9), 6047–6052. <https://doi.org/10.1073/pnas.092143499>
- Zhang, D., & Trudeau, V. L. (2008). The XS domain of a plant specific SGS3 protein adopts a unique RNA recognition motif (RRM) fold. *Cell Cycle*, *7*(14), 2268–2270. <https://doi.org/10.4161/cc.7.14.6306>
- Zhang, W., Gao, S., Zhou, X., Chellappan, P., Chen, Z., Zhou, X., Zhang, X., Fromuth, N., Coutino, G., Coffey, M., & Jin, H. (2011). Bacteria-responsive microRNAs regulate plant innate immunity by modulating plant hormone networks. *Plant Molecular Biology*, *75*(1–2), 93–105. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9710-8>
- Zhao, H., Zhao, K., Wang, J., Chen, X., Chen, Z., Cai, R., & Xiang, Y. (2015). Comprehensive Analysis of Dicer-Like, Argonaute, and RNA-dependent RNA Polymerase Gene Families in Grapevine (*Vitis Vinifera*). *Journal of Plant Growth Regulation*, *34*(1), 108–121. <https://doi.org/10.1007/s00344-014-9448-7>
- Zhong, X., Hale, C. J., Law, J. A., Johnson, L. M., Feng, S., Tu, A., & Jacobsen, S. E. (2012). DDR complex facilitates global association of RNA polymerase V to promoters and evolutionarily young transposons. *Nature Structural & Molecular Biology*, *19*(9), 870–875. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2354>
- Zong, J., Yao, X., Yin, J., Zhang, D., & Ma, H. (2009). Evolution of the RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) genes: Duplications and possible losses before and after the divergence of major eukaryotic groups. *Gene*, *447*(1), 29–39. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2009.07.004>





