



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2006/01/05
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2006/07/13
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2007/07/05
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: FR 2006/000017
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2006/072742
(30) Priorité/Priority: 2005/01/05 (FR0500090)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C12N 15/82* (2006.01)
(71) Demandeur/Applicant:
INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE
DEVELOPPEMENT (IRD), FR
(72) Inventeurs/Inventors:
BRUGIDOU, CHRISTOPHE, FR;
SIRE, CHRISTELLE, FR
(74) Agent: BERESKIN & PARR

(54) Titre : VECTEURS VIRAUX POUR LA SUREXPRESSION OU POUR L'EXTINCTION DE GENES CHEZ LES
PLANTES ET LEURS APPLICATIONS
(54) Title: FUNCTIONAL VIRAL VECTORS FOR THE OVEREXPRESSION OR EXTINCTION OF PARTICULAR GENES
IN PLANTS, AND APPLICATIONS THEREOF

(57) **Abrégé/Abstract:**

L'invention a pour objet l'utilisation de gènes codant chez les plantes pour des protéines présentant une diversité fonctionnelle vis-à-vis du silencing, comprenant le choix du gène ayant le niveau d'efficacité pour construire un vecteur viral de plantes ayant la fonction de surexpression ou de silencing de gènes d'intérêt recherchée.



(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international(43) Date de la publication internationale
13 juillet 2006 (13.07.2006)

PCT

(10) Numéro de publication internationale
WO 2006/072742 A3(51) Classification internationale des brevets :
C12N 15/82 (2006.01)(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/FR2006/000017

(22) Date de dépôt international : 5 janvier 2006 (05.01.2006)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(30) Données relatives à la priorité :
0500090 5 janvier 2005 (05.01.2005) FR(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : IN-
STITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPE-
MENT (IRD) [FR/FR]; 213, Rue La Fayette, F-75480
Paris Cedex 10 (FR).

(72) Inventeurs; et

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : BRUGI-
DOU, Christophe [FR/FR]; 3, Avenue Sainte-Cécile,
F-34570 Pignan (FR). SIRE, Christelle [FR/FR]; 57,
Rue Louise Michel, Résidence Le Cadran Solaire-villa 7,
F-34000 Montpellier (FR).(74) Mandataires : PEAUCELLE, Chantal etc.; Cabinet Ar-
mengaud Aine, 3, Avenue Bugeaud, F-75116 Paris (FR).(81) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de
protection nationale disponible*) : AE, AG, AL, AM, AT,AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY,
MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO,
NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK,
SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre
de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publiée :

— avec rapport de recherche internationale

(88) Date de publication du rapport de recherche
internationale: 15 février 2007(15) Renseignements relatifs à la correction:
Correction précédente:
voir la Gazette du PCT n° 45/2006 du 9 novembre 2006*En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abrégia-
tions, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et
abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de
la Gazette du PCT.*(54) Title: FUNCTIONAL VIRAL VECTORS FOR THE OVEREXPRESSION OR EXTINCTION OF PARTICULAR GENES
IN PLANTS, AND APPLICATIONS THEREOF(54) Titre : VECTEURS VIRAUX POUR LA SUREXPRESSION OU POUR L'EXTINCTION DE GENES CHEZ LES PLANTES
ET LEURS APPLICATIONS(57) Abstract: The invention relates to the use of genes which, in plants, encode proteins with a functional diversity in terms of
silencing, comprising the selection of the gene with the level of effectiveness in order to construct a plant viral vector having the
function of overexpressing or silencing particular genes.(57) Abrégé : L'invention a pour objet l'utilisation de gènes codant chez les plantes pour des protéines présentant une diversité
fonctionnelle vis-à-vis du silencing, comprenant le choix du gène ayant le niveau d'efficacité pour construire un vecteur viral de
plantes ayant la fonction de surexpression ou de silencing de gènes d'intérêt recherchée.

WO 2006/072742 A3

**« Vecteurs viraux pour la surexpression ou pour l'extinction
de gènes chez les plantes et leurs applications »**

L'invention a pour objet des vecteurs viraux fonctionnels pour la surexpression, ou pour l'extinction post-transcriptionnelle (désignée ci-après par « silencing ») de gènes d'intérêt chez les plantes. Elle vise plus
5 particulièrement des vecteurs générés à partir de virus de plantes et comprenant des séquences codant pour des protéines présentant une diversité fonctionnelle vis-à-vis de la surexpression ou du silencing de gènes chez les céréales, en particulier chez le riz.

10 L'un des principaux mécanismes de défense antivirale chez les plantes, et également chez les animaux, repose sur le phénomène de PTGS (*post-transcriptional gene silencing* ou extinction post-transcriptionnelle des gènes) qui conduit à la dégradation spécifique des ARN étrangers ou sur-exprimés.

15 Dans le cas des virus, le génome viral est le déclencheur et la cible du phénomène.

De manière concomitante, les virus ont développé des fonctions leur permettant de contourner ce type de mécanisme de défense, en spécialisant certaines de leurs protéines dans
20 des fonctions de suppression du silencing ciblant des étapes clés du PTGS.

De nombreuses protéines, dites « supprimeurs de silencing » ont été décrites chez les virus phytopathogènes grâce à des interactions non-hôtes pour certaines chez
25 *Nicotiana benthamiana*. En effet, des vecteurs PVX-protéine suppresseur potentielle ont été générés et inoculés (par agro-infiltration) sur des *N. benthamiana* présentant du PTGS afin d'évaluer le pouvoir suppresseur des protéines étudiées. La protéine P1 du virus de la panachure jaune du riz (désigné ci-
30 après par « RYMV » pour *Rice yellow mottle sobemovirus*), virus

exclusivement restreint à l'infection du riz et de quelques graminées sauvages, a ainsi été décrite comme suppresseur de silencing.

La protéine P1 du RYMV est une protéine de 158 acides aminés codée par la première des 4 ORF virales. Cette protéine est traduite pendant la totalité du cycle infectieux et détectée sous forme d'un doublet de 18 et 19 kDa. Elle exerce une action indirecte sur la réplication virale et apparaît nécessaire au mouvement du RYMV de cellule à cellule et au mouvement longue distance. Des études de complémentation ont montré qu'elle agit en *trans* au cours de l'infection virale. Cette protéine a été décrite comme suppresseur de silencing agissant en mode cellule « non autonome » et donc sur la propagation du signal du PTGS.

Les inventeurs ont évalué l'efficacité de la protéine P1 et du RYMV pour la suppression du PTGS dans un contexte d'interaction naturelle entre le RYMV et son hôte, le riz.

Les travaux réalisés sur une collection d'isolats de RYMV, caractérisée en termes de pathogénie et de phylogénie, a permis de mettre en évidence une diversité de P1 et des différences fonctionnelles d'activité liées à cette diversité. Ces travaux ont également permis d'explorer les effets quantitatifs et qualitatifs de ces P1 et de RYMV sur la suppression du PTGS.

L'invention a donc pour but la mise à profit de la diversité fonctionnelle de suppresseurs de silencing pour fournir de nouveaux vecteurs viraux d'expression ou de silencing et des outils de génomique fonctionnelle basés sur la diversité fonctionnelle d'une protéine suppresseur d'un virus de plante.

Elle vise également à fournir des vecteurs viraux d'expression et de VIGS (Extinction des gènes induite par les virus pour « Virus Induced Gene Silencing ») et leur construction à partir de virus de plantes, et plus

particulièrement à partir du RYMV dans le but de disposer d'outils efficaces pour la génomique fonctionnelle du riz, plante modèle pour les monocotylédones.

Selon un premier aspect, l'invention porte donc sur
5 l'utilisation de gènes codant chez les plantes pour des protéines présentant une diversité fonctionnelle vis-à-vis du silencing, et le choix du gène ayant le niveau d'efficacité pour construire un vecteur viral de plantes ayant la fonction de surexpression ou de silencing de gènes d'intérêt
10 recherchée.

L'invention porte également sur l'utilisation de gènes codant chez les plantes pour des protéines P1 du RYMV, avec des effets suppresseurs faibles à forts selon les protéines, pour construire des vecteurs viraux de plantes fonctionnels
15 pour la surexpression ou pour le silencing de gènes d'intérêt.

L'invention vise plus particulièrement l'utilisation de protéines sélectionnées pour un niveau d'activité donné en mettant en œuvre une technique comprenant

- le clonage de protéines suppresseurs de silencing
20 présentant une diversité fonctionnelle en aval d'un promoteur approprié, tel que le promoteur 35S de RYMV,
- l'inoculation des différentes protéines par biolistique sur de feuilles de riz,
- l'inoculation mécanique de virus sur des lignées,
25 telles que les lignées L2,4 et L10,
- le dosage de la charge virale par DAS-ELISA en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre un isolat donné, par exemple un isolat de Madagascar,
- la visualisation de la restauration de l'expression du
30 gène rapporteur par test histochimique GUS
- la quantification de la restauration de l'expression du gène rapporteur par dosage de l'activité enzymatique,
- la détection des siARN (preuves du PTGS) par Northern blot, et

- la sélection de la protéine présentant le niveau d'activité requis pour soit la surexpression, soit le silencing d'un gène d'intérêt.

Pour la sélection de protéines P1, on applique la technique ci-dessus en clonant les différentes P1, plus particulièrement Tz3, Tz8, Mg1, BF1, Ci63 en aval du promoteur 35S.

De manière préférée, les protéines sP1-Ci63 et Tz3 sont utilisées pour une grande efficacité dans la suppression du PTGS. Des protéines P1 comme sP1-Tz8 présentent une efficacité intermédiaire, alors que s-P1Mg1 et -BF1 sont peu efficaces dans la suppression du PTGS.

Les résultats obtenus, illustrés par les exemples, montrent que la variabilité de la suppression du PTGS par les différentes protéines P1 s'exprime à la fois à l'échelle quantitative, les protéines montrant une activité plus ou moins importante, mais également à l'échelle qualitative, les résultats montrant une vitesse de suppression du PTGS différentielle.

L'activité des protéines P1 sur la suppression du PTGS a été évaluée par l'analyse de leur effet sur l'accumulation des miARN et des siARN. Il s'est avéré que l'efficacité variable de suppression du PTGS entraîne une diminution variable de siARN spécifiques des transgènes testés. Les analyses réalisées ont également révélé que les protéines P1 entraînent une diminution de l'accumulation des miARN.

L'invention concerne également l'utilisation du génome d'un isolat de RYMV, à effet supprimeur du PTGS variable, de fort à faible.

Selon un autre aspect, l'invention concerne des vecteurs viraux d'expression ou de silencing de gènes d'intérêt, caractérisés en ce qu'ils sont générés à partir du génome de RYMV et comprennent un gène codant pour un suppresseur de silencing choisi de manière à présenter le niveau d'efficacité

permettant de définir la fonctionnalité de surexpression ou de silencing recherchée.

La construction de tels vecteurs suppose de prendre en compte toutes les contraintes imposées par la structure du virus et dépend étroitement des capacités du virus à conserver son potentiel infectieux (par rapport au mouvement et à l'encapsidation).

L'invention vise des vecteurs viraux d'expression ou de silencing de gènes d'intérêt, caractérisés en ce qu'ils sont générés à partir du génome de RYMV et comprennent un gène codant pour des protéines P1 exprimant une diversité fonctionnelle comme suppresseurs de silencing. Ce gène remplace celui du génome de RYMV codant pour une protéine P1 quelconque.

Ces vecteurs présentent avantageusement une intensité de répllication équivalente à celle de clone infectieux connus et induisent les mêmes symptômes.

Dans un mode de réalisation, les vecteurs de l'invention sont caractérisés en ce qu'il s'agit de vecteurs viraux d'expression contenant un insert d'un gène d'intérêt à surexprimer ou à éteindre, de taille inférieure à 700 pb.

Pour des tailles d'insert supérieures à 700 pb, on utilise l'ORF répllicative (i.e. ORF_{2a, 2b}) ou "amplicon", du RYMV ce qui permet de disposer de suffisamment d'espace pour l'insertion de grandes séquences.

Les ORF absentes pourront être complémentées en *trans* (i.e. plantes transgéniques) ou en *cis* (i.e. co-inoculation).

Ces vecteurs viraux d'expression sont de bons candidats comme outils pour l'expression transitoire de gènes.

Avantageusement, ils possèdent une séquence avec des sites de restriction d'intérêt pour le clonage de séquences exogènes.

Ces vecteurs sont encore caractérisés en ce qu'ils comprennent en outre un gène codant pour le suppresseur de

PTGS p19, afin de rendre le clone plus fonctionnel dans des cellules non hôtes, comme les protoplastes BY2.

Dans un autre mode de réalisation, les vecteurs de l'invention sont caractérisés en ce qu'il s'agit de vecteurs VIGS contenant des inserts d'une taille inférieure à 50pb
5 quelle que soit leur orientation d'insertion dans le génome viral et dont la cible est l'ARNm du transgène.

Les vecteurs définis ci-dessus sont avantageusement obtenus selon un protocole comprenant les étapes de :

- 10
- amplification PCR ;
 - digestion ;
 - ligation ;
 - transformation de bactéries compétentes.

Les vecteurs d'expression sont validés plus
15 particulièrement selon un protocole comprenant les étapes de

- transcription *in vitro* ;
- préparation et électroporation de protoplastes avec les transcrits ;
- visualisation des inserts 3 à 7 jours après
20 l'électroporation ;
- extraction d'ARN selon la même cinétique ;
- validation de la répllication et stabilité des gènes insérés par RT-PCR.

Les vecteurs VIGS sont plus spécialement validés selon un
25 protocole comprenant les étapes de

- transcription *in vitro* ;
- inoculation mécanique de différentes variétés de riz présentant des degrés de résistance variable au RYMV et des lignées transgéniques avec les transcrits ;
- 30 - caractérisation phénotypique avec la visualisation des phénotypes de silencing ;
- caractérisation moléculaire avec l'extraction d'ARN totaux, Northern blot en gel de polyacrylamide des ARN

de bas poids moléculaire et détection des siARN spécifiques des gènes ciblés par le VIGS.

L'invention fournit ainsi des outils de grand intérêt pour l'insertion de gènes exogènes dans le génome de RYMV en vue de leur surexpression ou de leur silencing.

L'étude de la suppression du PTGS par le RYMV a permis de mettre en évidence l'importance de la quantité de virus inoculée.

La construction et la validation des vecteurs viraux d'expression et de VIGS permettent de développer un ensemble d'outils adaptés à l'étude de l'expression de gènes et à la production de molécules d'intérêt, de manière transitoire chez le riz (production de protéines dans des protoplastes de riz par électroporation, dans des suspensions cellulaires de riz par co-culture avec des agrobactéries comme *A. tumefaciens*, expression transitoire sur feuilles par bombardement). A l'échelle tissulaire, l'inoculation par biolistique de feuille de riz permet d'effectuer des études de complémentation fonctionnelle.

Les résultats obtenus conformément à l'invention sur la suppression du PTGS par les protéines P1 et par le RYMV dans son ensemble permettent un meilleur ciblage de l'utilisation des vecteurs.

Une protéine P1, ou une combinaison de supresseurs, possédant une faible activité de suppression du PTGS constituera un outil idéal pour la création de vecteurs VIGS. Au contraire, une forte activité de suppression du PTGS sera exploitée pour l'optimisation de vecteurs d'expression.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention sont donnés dans les exemples qui suivent et les figures 1 à 12, qui représentent, respectivement,

Figure 1 : Cinétique de restauration de l'activité Gus pendant l'infection virale de 1 à 30 jours après l'inoculation (jai),

dans une lignée transgénique avec extinction de *gus*. **a-** les résultats de coloration histochimique Gus dans les feuilles de riz de différentes lignées transgéniques et avec différentes conditions d'inoculation. Les témoins correspondent à L4NI :
5 lignée transgénique L4 exprimant constitutivement le transgène *uidA*, et L10 NI/BI : lignée transgénique L10 avec *uidA* éteint de manière constitutive non inoculée et inoculée avec un tampon. La coloration histochimique de l'activité Gus sur des feuilles inoculées par des virus à partir de L10 est contrôlée
10 dans les feuilles inoculées à 1 et 2 jours après inoculation et dans des feuilles infectées de manière systémique à 7, 14 et 30 jai. L'inoculation virale est effectuée avec un inoculum standard (condition H^cI). **b-** les résultats de la coloration histochimique de l'activité Gus dans des feuilles infectées
15 par L10 à 30 jai. Pour chaque condition d'inoculation indépendante (H^cI ou L^cI) les plantes avec une intensité de symptôme contrastée appartenant aux classes I à V sont rassemblées.

Figure 2 : Effet de la teneur en virus sur la suppression du silencing par RYMV, révélée dans des feuilles infectées de
20 manière systémique à partir de L10 récoltées à 30 jai. La mesure de l'activité Gus par fluorimétrie (exprimée en pmol MU/min/ μ g protéine et représentée avec des histogrammes grisés) selon la teneur en virus évaluée par DAS-ELISA, les
25 données correspondant à l'absorbance (A_{405nm}) étant représentées par des points noirs.

Les témoins correspondent à 4 NI, la lignée transgénique L4 exprimant constitutivement le transgène *uidA* et L10 NI/BI, la lignée transgénique L10 avec *uidA*, éteint de manière
30 constitutive respectivement non-inoculée et inoculée par un taampon. L'activité enzymatique a été également mesurée dans les feuilles à partir de plantes inoculées par le virus (i.e. lignée L10 avec extinction de *gus*) classée selon l'intensité de symptômes apparents (de la classe I à V) à 30 jai.

a- Résultats suivant l'inoculation virale dans des conditions d'inoculation standard (H^cI); b- Résultats suivant l'inoculation virale dans des conditions d'inoculation faibles (L^cI).

5 **Figure 3** : Effet quantitatif de différentes P1 sur des siRNA gus-spécifiques : les expériences Northern blots pour la détection des siRNA gus-spécifiques 2 jours par biolistique de différentes s-P1 d'isolats de RYMV représentatifs de la phylogénie du virus (sP1-Mg1, -Tz3, -Tz8, -Ci63). La détection
10 des siRNA est effectuée sur l'ARN total extrait de feuilles de cultivar de riz Taipei, de lignée de riz transgénique L4 avec expression constitutive du transgène gus, la lignée *N. benthamiana* 16c (16c) et la lignée de riz transgénique L10 avec extinction constitutive du transgène gus. Les feuilles re
15 riz sont analysées après différents traitements : feuille intacte (ND pour non délivré), feuille blessée (BD pour délivrance de tampon par biolistique) et feuille inoculée avec sP1-Mg1, -Tz8, -Tz3, -Ci63, -BF1 (Mg1, Tz8, Tz3, Ci63, BF1) par biolistique. Les feuilles de 16c sont infiltrées (I) avec
20 une souche de *A. tumefaciens* portant un plasmide binaire avec un intron Gus pour l'induction transitoire de PTGS sur le gène uidA, et sont analysées 5 jours après infiltration. La coloration au bromure d'éthidium de ARNr sert de témoin.

Figure 4: Arbre de relation des différents isolats de RYMV.
25 L'arbre phylogénétique est construit selon la méthode de Neighbor-Joining à partir de l'alignement des séquences nucléiques de l'ORF₃ codant la protéine de capsid (CP) des différents isolats. Les isolats utilisés pour les différentes analyses sont surlignés en gris. L'appartenance à différents
30 sérogroupes est indiquée sur la droite de l'arbre.

Figure 5 : Etude quantitative de la levée du PTGS en fonction des différents isolats. Résultats de dosages enzymatiques de l'activité Gus (Act. Gus) réalisés sur des protéines de feuilles systémiquement infectées, par les isolats dont les

noms sont reportés en abscisse des diagrammes, et récoltées à 35 jai. Le niveau de restauration de l'activité enzymatique est exprimé en pourcentage de l'activité enzymatique de la lignée L4 de référence comme niveau d'activité attendu. Les

5 contrôles sont constitués par le dosage de l'activité Gus sur les protéines extraites de feuilles de la lignée L4 non inoculées (NI) et de la lignée non inoculées et inoculées avec du tampon (BI). Restauration de l'activité enzymatique, tous isolats confondus.

10 **Figure 6 :** Etude quantitative et qualitative de la levée du PTGS en fonction des différents isolats du séro groupe 2 en réponse à une inoculation contrôlée. Comparaison des résultats de dosages enzymatiques de l'activité Gus à 20 et 40 jai après inoculation. Le diagramme inférieur représente la variation

15 relative de restauration d'activité enzymatique entre 20 et 40 jours.

Figure 7 : Evaluation quantitative de l'effet propre de la P1 des différents isolats représentatifs de la phylogénie du virus sur le PTGS. **a-** Résultats du dosage enzymatique de

20 l'activité Gus réalisés sur des protéines de feuilles de *N. benthamiana* co-infiltrées avec des souches d'*A. tumefaciens* contenant pCambia1305.1 (Gus) et différentes constructions pBin-p19, pBin-P1-HA et bin-P1 dont les noms sont reportés en abscisse des diagrammes, et récoltées à 3 et 4 jai. Le niveau

25 de restauration de l'activité enzymatique est exprimé en pourcentage de l'activité enzymatique des feuilles infiltrées par pCambia1305.1 seul comme activité de référence. Pour chaque protéine P1, trois échantillons indépendants ont été analysés et l'écart-type des lectures est représenté sur le

30 diagramme par des barres. **b-** Comparaison des résultats de dosages enzymatiques de l'activité Gus à 3 et 4 jai, et représentation de la variation relative du renforcement de l'activité enzymatique par rapport à un niveau de référence entre 3 et 4 jai.

Figure 8 : Les différents clones infectieux utilisés et vecteurs viraux générés correspond au promoteur de l'ARN sub-génomique, correspond à 14 nucléotides additionnels (ACG TAC TAG TGGGC). La position et le nom des différents sites de restriction utilisés pour les clonages sont représentés sur le génome viral par des flèches descendantes. La position et le nom des amorces utilisées pour la validation des vecteurs par RT-PCR sont indiqués par des flèches.

Figure 9 : Etude du clone C-gfp, **a-** dans les protoplastes BY2 et **b-** dans les protoplastes O₂₄₂₈. Résultats de RT-PCR réalisées sur des ARN des protoplastes électroporés et récoltés à 2, 3, 4, 5, 6 et 7 jae. Différentes conditions d'électroporations ont été analysées et les protoplastes ont été non électroporés (NE), électroporés avec des transcrits *in vitro* du clone C-gfp (Cg), électroporés avec des transcrits *in vitro* du clone C-gfp et le plasmide p19 (Cg + p19), électroporés avec les transcrits *in vitro* du clone infectieux FL5 (FL) et électroporés avec le plasmide contrôle 35S-gfp (gfp). Trois amplifications PCR ont été réalisées sur les produits de RT, synthétisés à partir de l'amorce R20, avec les couples d'amorces R15-R16, R19-GFP2 et GFP1-GFP2.

Les pistes M, FL-ADN, Cg-ADN et gfp-ADN correspondent respectivement au marqueur de taille et aux amplifications PCR réalisées sur de l'ADN plasmidique des clones FL5 et C-gfp et du 35S-gfp.

Figure 10 : Etude du clone C-Gus, **a-** dans les protoplastes BY2, **b-** dans les protoplastes O₂₄₂₈.

Résultats de RT-PCR réalisées sur des ARN des protoplastes électroporés et récoltés à 2, 3, 4, 5, 6 et 7 jae. Différentes conditions d'électroporations ont été analysées et les protoplastes ont été non électroporés (NE), électroporés avec des transcrits *in vitro* du clone C-Gus (CG), électroporés avec des transcrits *in vitro* du clone C-Gus et le plasmide p19 (CG + p19) électroporés avec les transcrits *in vitro* du clone

infectieux FL5 (FL) et électroporés avec le plasmide contrôle 35S-Gus (Gus). Trois amplifications PCR ont été réalisées sur les produits de RT, synthétisés à partir de l'amorce R20 , avec les couples d'amorces R15-R16, R19-GUS2 et GUS1-GUS2.

5 Les pistes M, FL-ADN, CG-ADN et Gus-ADN correspondent respectivement au marqueur de taille et aux amplifications PCR réalisées sur de l'ADN plasmidique des clones FL5 et C-Gus et du contrôle 35S-Gus.

Figure 11 : Etude du clone Sit-gfp, **a-** dans les protoplastes
10 BY2, **b-** dans les protoplastes O₂₄₂₈. Résultats de RT-PCR réalisées sur des ARN des protoplastes électroporés et récoltés à 2, 3, 4, 5, 6 et 7 jae. Différentes conditions d'électroporations ont été analysées et les protoplastes ont
15 été non électroporés (NE), électroporés avec des transcrits *in vitro* du clone Sit-gfp (Sg), électroporés avec des transcrits *in vitro* du clone Sit-gfp et le plasmide p19 (Sg + p19) électroporés avec les transcrits *in vitro* du clone infectieux FL5 (FL) et électroporés avec le plasmide contrôle 35S-gfp (gfp). Trois amplifications PCR ont été réalisées sur les
20 produits de RT, synthétisés à partir de l'amorce R20, avec les couples d'amorces R15-R16, R19-GFP2 et GFP1-GFP2. Les amplifications de taille inférieure à la taille attendue avec les amorces R19-GFP2 correspondent à une amplification avec les amorces R19 et R20 (amorce résiduelle de la RT).

25 Les pistes M, FL-ADN, Sg-ADN et gfp-ADN correspondent respectivement au marqueur de taille et aux amplifications PCR réalisées sur de l'ADN plasmidique des clones FL5 et Sit-gfp et du contrôle 35S-gfp.

Figure 12 : Etude de l'expression des gènes rapporteurs dans
30 des protoplastes de *N. tabaccum* (BY2) et des protoplastes d'*O. s.* (O₂₄₂₈) quatre jours après électroporation avec les transcrits *in vitro* générés à partir des différents recombinants. Pour les recombinants exprimant la Gfp (C-gfp et Sit-gfp), la visualisation de la protéine a été effectuée sous

illumination UV (uv) après une observation des protoplastes sous lumière visible (vis). L'auto-fluorescence des protoplastes non électroporés (NE) ainsi que la fluorescence générée par l'expression du plasmide contrôle 35S-gfp ont été évaluées et comparée à celle émise dans les protoplastes électroporés avec les vecteurs d'expression.

L'expression du Gus détectée par test histochimique chez les protoplastes O₂₄₂₈ électroporés avec le plasmide contrôle 35S-Gus ou le recombinant C-Gus, a été évaluée sous lumière visible.

MATERIEL ET METHODES

La présente demande de brevet utilise les propriétés de matériel biologique issu de différents pays d'Afrique. L'application de l'invention se fera dans le respect des accords de la convention de Rio sur la biodiversité (<http://www.biodiv.org>).

La protéine P1 de plusieurs isolats de RYMV originaires de différents pays d'Afrique est utilisée pour obtenir la surexpression ou l'extinction de gènes. L'utilisation des protéines P1 des isolats référencés dans le tableau ci-dessous est expressément visée dans la description et les revendications.

Nom, origine, année de prélèvement et connaissances acquises sur les isolats du virus de la panachure jaune du riz (RYMV) utilisés dans le brevet 'Vecteurs viraux pour la surexpression ou pour l'extinction de gènes d'intérêt chez les plantes et leurs applications'; nom et institut de recherche d'appartenance des chercheurs impliqués.

Isolats	Origine	Année de prélèvement	Connaissances acquises	Chercheur	Institut de recherche
BF1	Burkina Faso	1990	séquence partielle	Jean-Loup Notteghem	CIRAD
CI63	Côte d'Ivoire	1997	séquence entière	Placide N'Guessan	CNRA
Mg1	Madagascar	1989	séquence entière	Jean-Loup Notteghem	CIRAD
Tz3	Tanzanie	1997	séquence entière	Zakia Abubakar	ZARC
Tz8	Tanzanie	1997	séquence entière	Zakia Abubakar	ZARC

. Clones infectieux

5 On rapporte les résultats obtenus avec les clones infectieux suivants qui sont illustrés sur la figure 1:

- FL5 (Brugidou *et al*, 1995, qui correspond au cDNA complet du génome viral cloné en aval du promoteur du bactériophage T7;
- 10 - FL5ΔCP, dont une partie de l'ORF₃ codant pour la protéine capside a été déléetée(à savoir 3634 à 4167 nt et qui possède 14 nucléotides additionnels dans la partie en 3'aval de la délétion (ACG TAC TAG TGG GC), correspondant à des sites uniques de restriction
- 15 intéressants pour l'insertion de séquences surnuméraires;
- nouveau clone CP*, construit par insertion d'un fragment de 720pb correspondant à l'ORF de la CP amplifiée par 5'r PCR à partir de FL5(à savoir avec les
- 20 amorces sens 5' ACA AAG **ATG GCC AGG** AAG GGC AAG 3' et reverse 5' GAA TTC TAC GTA TCA CGT ATT GAG TGT TGG ATC 3', Tm 60°C) et digéré par MscI (en gras) et SnaBI (souligné), dans FL5ΔCP digéré par MscI (position 3450 nt) et SnaBI (position 3637 nt).

25 .Vecteurs d'expression

Les vecteurs viraux d'expression ont été générés à partir du recombinant CP*.

Fusions :

Dans un premier temps, des fusions transcriptionnelles par
30 insertion de séquences exogènes au site SpeI (positions 3996 à 4172 nt) ont été réalisées, entraînant une délétion partielle dans l'ORF de la CP correspondant à 54 acides aminés dans la protéine. Les séquences complètes du gène *gfp+* (accès dans

GenBank n°U84737) et du gène *uidA* (accès dans GenBank n°AJ414112) ont été amplifiées avec les oligonucléotides :

- Amorces *gpf+* : sens 5' GAA TTC ACT AGT GTG AGC AAG GGC GAG GA 3', antisens 5' GAA TTC ACT AGT TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT 3' (Tm 62°C) ;

- Amorces *uidA* : sens 5' GAA TTC ACT AGT TTA CGT CCT GTA GAA ACC 3', antisens 5' GAA TTC ACT AGT TCA TTG TTT GCC TCC CTG 3' (Tm 60°C) (les séquences complémentaires aux séquences des gènes rapporteurs sont soulignées). Les produits PCR (à savoir 720 pb pour *gpf+* et 1816 pb pour *uidA*) ont été clonés au site *SpeI* de CP* et les constructions ainsi réalisées sont respectivement dénommées C-gfp et C-Gus.

Duplication du promoteur de l'ARN sub-génomique (SIT) (Hacker & Sivakumaraan, 1997) :

Le promoteur est inséré dans la partie 3' de l'ORF de la CP par amplification PCR à partir de FL5 avec les amorces sens 5' ACA AAG ATG GCC AGG AAG GGC AAG 3' et antisens 5' GAA TTC TAC GTA GCA TGC CAT CTT TGT GGG AGA CTC GCC CTA TCC CAC TCA CGT ATT GAG TGT TGG ATC 3' (Tm 60°C).

Les sites *SphI* et *SnaBI* ont également été introduits par PCR en 5' du SIT (souligné). Le fragment de 774 pb ainsi amplifié a été introduit par ligation dans FL5ΔCP aux sites *MscI* et *SnaBI*, le clone généré a été appelé C-Sit.

Clonage de *gfp+* en aval du SIT :

Un fragment PCR de 720 pb correspondant à la séquence complète du gène *gfp+* amplifié avec les amorces sens 5' GAA TTC GCA TGC GTG AGC AAG GGC GAG GAG 3' et antisens 5' GAA TTC GCA TGC TTA CTT GTA CAG CTC GTC CAT 3' a été cloné au site *SphI* de C-Sit. Ce recombinant est désigné Sit-gfp.

.Vecteurs VIGS

Les vecteurs VGS ont été générés par l'insertion de fragments PCR de tailles différentes, de 44 à 121 pb, des gènes *sgfp* (accès dans GenBank n° U43284, AAC53659) (Pang et

al, 1996 ; Sallaud et al, 2003) et *pds* (accès dans Genbank n°AF049356) de *O.sativa* L.spp.indica cv. IR36 au site SnaBI (position 4170 nt) de CP*. Les résultats sont donnés dans le tableau 1 ci-dessous.

5 Les inserts n'ont pas tous été intégrés dans la même orientation, « s » correspond à l'orientation sens et « as » à l'orientation antisens. Les inserts *gf**, *gf***, *f* fp** et *fp*** ont été amplifiés à l'aide des amorces précisées dans le tableau à partir de l'ADN du plasmide pCambia5305. L'insert *pds** a été amplifié par PCR en présence des amorces appropriées à partir d'un produit d'une réaction de rétro-transcription réalisée sur 750 ng d'ARN extrait de feuilles de riz cv. IR64 en présence d'amorces oligonucléotidiques de type d'oligodT.

15

Tableau I

Gène - Nom du vecteur	Position de l'insert sur le gène (taille de l'insert en pb)	Oligonucléotide sens 5'-3'	Oligonucléotide antisens 5'-3'	*Tm
Gfp - <i>gf*as</i>	242-286 (44)	GAATTCTACGTAGCAGACTTCTT	GAATTCTACGTACCTGGACGTAGC	55 °C
Gfp - <i>gf**s</i>	242-334 (92)	GAATTCTACGTAGCAGACTTCTT	GAATTCTACGTACGGCGCGGGACT	55 °C
Gfp - <i>f*as</i>	479-532 (53)	GAATTCTACGTACGGCATCAA	GAATTCTACGTAGCAGCTGCCGT	57 °C
Gfp - <i>fp*s</i>	677-716 (39)	GAATTCTACGTACGCCCGGGAT	GAATTCTACGTATTGTACAGCTCG	55 °C
<i>Pds</i> - <i>pds*s</i>	996-1071 (51)	GAATTCTACGTAATAGAACTTAATCCT	GAATTCTACGTATCCATCGGTAAG	52 °C

*Tm : température d'hybridation moyenne des deux amorces, utilisée pour les amplifications PCR)

.Validation

Transcription *in vitro* des recombinants

20

- Vecteurs d'expression

. électroporation

25

Environ un million de protoplastes de tabac (*Nicotiana tabaccum* var BY2) ou de riz (*O. sativa* var O₂₄₂₈, sensible au RYMV) ont été électroporés avec 30 µg de transcrits *in vitro* correspondant aux vecteurs d'expression.

Sept électroporations indépendantes ont été réalisées pour chaque vecteur recombinant et ont été mélangées en fin d'expérimentation.

- Vecteurs VIGS

5 . inoculation mécanique de différentes variétés de riz présentant des degrés de résistance variable au RYMV.

Les transcrits *in vitro* générés à partir des vecteurs VIGS, ciblant le gène *pds*, ont été inoculés mécaniquement sur des variétés de riz présentant différents degrés de résistance
10 au RYMV : cv.IR64 spp.indica (sensible), cv.Azucena spp.japonica (partiellement résistant), cv.Nipponbare spp.japonica, cv. Taipei309 spp.japonica) et des lignées transgéniques (cv. Taipei309) (Pang et al et Sallaud et al ci-dessus).

15 Pour chaque variété ou lignée, quatre à cinq jeunes plantes (i.e. 15 jours après semis, stade deux feuilles), ont été inoculées mécaniquement à l'aide de carborundum. L'inoculum correspond à 20 µg de transcrits *in vitro* dilués deux fois dans 20 mM de tampon sodium phosphate pH 7.

20 Caractérisation phénotypique : visualisation des phénotypes de silencing (*gfp* = disparition de la *gfp* sous illumination UV, *pds* = blanchissement des feuilles).

Caractérisation moléculaire : extraction d'ARN totaux (Trizol), Northern blot en gel de polyacrylamide des ARN de
25 bas poids moléculaire et détection des siARN spécifiques des gènes ciblés par les VIGS.

Protocoles de biologie moléculaire et de culture cellulaire

A) Analyse de la suppression du PTGS

30 1a. Evaluation de la charge virale par DAS-ELISA

Le contenu en virus dans les feuilles systématiquement infectées est estimé par dosage immuno-enzymatique selon la

technique DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).

Un millilitre PBS-T (1.36 M NaCl, 14 mM KH_2PO_4 , 80 mM Na_2HPO_4 , 26 mM KCl, pH 6.8, 0.5 % v/v Tween 20) a été ajouté à
5 100 mg de poudre issue des feuilles systématiquement infectées
broyées, constituant ainsi la solution d'antigènes. Des
anticorps polyclonaux (dilués au 1/1000^{ème}), issus d'un sérum
dirigé contre un isolat de Madagascar, ont préalablement été
fixés sur des plaques de microtitration (Nunc) selon le mode
10 opératoire précédemment décrit (N'Guessan et al., 2000). Des
étapes d'incubation et de lavages successives conduisent à la
détection d'une réaction positive entre les antigènes déposés
et l'anticorps polyclonal couplé à la phosphatase alcaline. La
réaction entre la phosphatase alcaline et son substrat, le
15 pNPP (p-nitrophényl phosphatase substrate) (SIGMA®) dilué
dans une solution de diéthanolamine (SIGMA®) génère une
réaction colorée dont l'intensité est mesurée par lecture de
la densité optique à 405 nm avec un fluorimètre (Multiskan
fluorimeter, Labsystem).

20 2a.Extraction de protéines

Les protéines totales hydrosolubles sont extraites à
partir de 100 mg de feuilles broyées, dans un tampon phosphate
(50 mM NaH_2PO_4 , 10 mM Na_2EDTA , 1 mg.ml⁻¹ N-Laurylsarcosine, 0.1 %
v/v triton), le surnageant est récupéré à l'issue de deux
25 centrifugations successives de 30 min à 20 000 g à 4°C. Les
protéines sont dosées selon la méthode de Bradford (Coomassie
protein assay kit, Pierce) (Bradford, 1976). Une gamme étalon
est réalisée par mesure de la densité optique à 595 nm obtenue
avec des concentrations connues de BSA.

30 3a.Evaluation de l'activité GUS par test histochimique et dosage fluorimétrique

On rapporte ci-après deux types d'expérimentations menés
pour détecter l'activité enzymatique de la β -glucuronidase
(GUS). Le test histochimique sur feuilles a été réalisé comme

décrit dans la littérature (Jefferson et al., 1987) après infiltration sous vide (15 min, 0.33 MPa) en présence de 1mg.ml⁻¹ X-GlucA (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D glucuronide) (Duchefa) dilué dans un tampon approprié (50 mM sodium phosphate, 0.25 mM K₃Fe(CN)₆, 0.25 mM K₄Fe(CN)₆, 0.5 % v/v Triton). Les échantillons sont alors incubés pendant 12 h à l'obscurité à 37 °C. Les feuilles sont ensuite décolorées par un traitement avec une solution qui déstabilise la chlorophylle (10 % v/v de formaldéhyde, 5 % v/v d'acide acétique glacial, 42.5 % v/v d'éthanol) pendant 24 h à température ambiante. Enfin, les feuilles sont rincées plusieurs fois et sont conservées dans de l'éthanol 70 % (v/v).

Un dosage fluorimétrique de l'activité Gus a été réalisé sur les protéines hydrosolubles extraites des feuilles systémiquement infectées. Cinq microlitres de protéines ont alors été soumises au dosage enzymatique de l'activité Gus en présence de 1 mM de substrat (MUG (4-méthylumbelliféryl- β -D-glucuronide), Sigma®) dans un volume réactionnel de 200 μ l. La cinétique d'apparition du produit fluorescent de la réaction enzymatique (i.e. MU, excitation à 365 nm, émission à 455 nm) est réalisée pendant 2 h, avec des lectures à intervalle de 30 min, à l'aide d'un fluorimètre (Fluoroskan fluorimeter, Labsystem). Une gamme étalon de référence est réalisée par la mesure de fluorescence de différentes concentrations de MU. L'activité enzymatique du Gus est exprimée en quantité de produit synthétisée par unité de temps et rapportée à une même quantité de protéines : pmol MU/min/ μ g protéine.

4a.Analyse des ARN par Northern-blot

Les ARN des différents échantillons ont été extraits à partir de 100 mg de poudre à l'aide de Trizol® (Invitrogen™) selon les recommandations du fournisseur et sont repris dans 30 à 50 μ l de formamide déionisé 50 %. La quantité et la qualité des ARN ont respectivement été évaluées par mesure de

la densité optique à 260 nm, et 2 µg d'ARN ont été déposés sur un gel d'agarose 1 % et migrés à 50 V/cm dans du TBE 0.5 X.

Quinze microgrammes d'ARN totaux, complétés après dénaturation avec $\frac{1}{4}$ de tampon de charge (50 % v/v glycérol, 50 mM Tris pH 7.7, 5 mM EDTA, 0.03 % v/v Bleu de bromophénol) sont séparés par électrophorèse en conditions dénaturantes sur un gel de polyacrylamide de 17.5 % (7 M urée, 17.5 % v/v acrylamide-bisacrylamide 19:1, 0.5 X TBE, 0.04 % v/v Temed, 0.08 % v/v Persulfate d'ammonium) comme décrit précédemment (Hamilton & Baulcombe, 1999) pendant 2 h à 100 V/cm dans du TBE 0.5 X. Les ARN de bas poids moléculaire ainsi séparés sont électro-transférés sur une membrane de nylon non chargée (Hybond NX, Amersham) pendant 1 h à 100V à 4°C dans du TBE 0.5X.

Pour la détection des siARN, la sonde est marquée par ancrage aléatoire d'amorces, à l'aide du kit Megaprime™ DNA labelling system (Amersham) en présence de 20 U de Klenow et de 5 µCi de α -³²P-dCTP dans un volume réactionnel de 50 µl, selon les recommandations du fournisseur. Le marquage est effectué pendant 1 h à 37 °C et la sonde marquée est ensuite purifiée sur une colonne Sephadex-G50 (Amersham) avant d'être dénaturée et incorporée au tampon d'hybridation (PerfectHyb™ Plus hybridization buffer, Sigma®).

Les sondes utilisées pour la détection de miARN sont synthétisées par phosphorylation d'amorces oligonucléotidiques (20 pmol) complémentaires des miARN choisis, par 10 unités de T4 polynucléotide kinase (Qbiogene) en présence de 2 µl de tampon de réaction et de 5 µCi de γ -³²P-dCTP, dans un volume réactionnel de 20 µl. Le marquage est effectué pendant 1 h à 37°C, et la sonde marquée est purifiée sur une colonne Sephadex-G25 (Amersham) avant d'être dénaturée et incorporée au tampon d'hybridation.

Les membranes sont ensuite hybridées toute la nuit à la température adéquate (i.e. 42°C pour la détection de siARN,

Tm-20°C pour la détection des miARN). Deux étapes successives de lavage de 20 min à 50 °C sont ensuite réalisées avec une solution de SSC 2 X et de SDS 2 %. Enfin les membranes, enveloppées dans du Saran Wrap sont exposées contre un film d'autoradiographie (LifeRay™ XDA Plus, Ferrania imaging technologies) à -80°C pour une durée variable selon l'intensité du signal souhaitée. Le film d'autoradiographie est révélé manuellement.

Une fois les membranes hybridées, elles peuvent être déshybridées par deux traitements successifs de 20 min avec une solution de SDS 0.1 % portée à ébullition, pour des expérimentations successives d'hybridation.

B) Préparation des constructions et clonage

1b. Préparation des vecteurs et inserts

Les vecteurs sont préparés par digestion de l'ADN plasmidique avec l'enzyme appropriée dans un volume réactionnel de 100 µl. Les produits de digestion sont ensuite purifiés à l'aide du kit GFX™ PCR, DNA and Gel Band Purification kit (Amersham) selon les recommandations du fournisseur et sont repris dans 30 µl de tampon d'élution. Les vecteurs digérés par des enzymes générant des bouts francs sont traités à la phosphatase alcaline. Ainsi la totalité du produit de digestion purifié est déphosphorylé par 1 U de CIP¹ (New England Biolabs) avec du tampon NEB3 1 X (New England Biolabs) dans un volume réactionnel de 40 µl, pendant 1 h à 37 °C. Les vecteurs déphosphorylés sont ensuite purifiés sur une colonne GFX™ (GFX™ PCR, DNA and Gel Band Purification kit, Amersham).

Les inserts sont des produits d'amplification PCR réalisées avec une polymérase haute fidélité (Pfu, Promega) dans un volume réactionnel de 50 µl. Les amplifications PCR sont réalisées selon les recommandations du fournisseur en présence de son tampon (1X), de 200 µM de dNTP, de 0.5 µM de

chaque amorce et de 1.25 U de Taq. A l'issue d'une dénaturation de 3 min à 95 °C, les cycles PCR ont été effectués selon des conditions particulières : l'ancrage des amorces à la matrice est effectué au Tm moyen des amorces pendant 30 sec et l'élongation du fragment est réalisée à 72 °C durant 1 min par kpb à amplifier, 30 cycles d'amplification ont été réalisés. Les produits PCR de la taille attendue sont ensuite purifiés à partir d'un gel d'agarose sur une colonne GFX™ (GFX™ PCR, DNA and Gel Band Purification kit, Amersham) et repris dans 30 µl de tampon d'élution. Les inserts sont alors digérés avec les enzymes appropriées dans un volume réactionnel de 40 µl. Les produits de digestion sont purifiés sur une colonne GFX™ (GFX™ PCR, DNA and Gel Band Purification kit, Amersham).

La qualité et la quantité des vecteurs et inserts sont évaluées respectivement par électrophorèse en conditions non dénaturantes dans du TAE 1X et par mesure de la densité optique à 260 nm.

2b.Ligation

Cent ng de vecteur ont été utilisés pour chaque réaction de ligation, auxquels ont été rajoutés la quantité voulue d'insert selon la formule : $\text{ng insert} = \text{ratio (insert/vecteur)} \times (\text{ng vecteur} \times \text{taille insert}) / \text{taille vecteur}$. Plusieurs types de ratios moléculaires de vecteur et d'insert ont été utilisés : 1:1, 1:3, 1:5. Une unité et demi de T4 DNA ligase (Invitrogen) avec 2 µl de tampon ligase 5X (Invitrogen) ont été utilisés pour les différentes réactions de ligation, effectuées dans un volume réactionnel de 10 µl pendant 20 h à 16 °C.

3b.Transformation de *Escherichia coli* compétentes (JM110, Promega)

Cinq microlitres de produit de ligation sont ajoutés à 50 µl de cellules compétentes. Après incubation de 10 min dans la glace, les bactéries sont transformées par choc thermique de

50 sec à 42 °C et sont remplacées immédiatement dans la glace pendant 2 min. Sept cents microlitres de milieu SOC froid sont alors ajoutés aux cellules qui sont incubées pendant 1 h à 37 °C sous agitation (225 rpm). Les bactéries sont ensuite
5 étalées par aliquots (i.e. de 50 à 300 µl) sur milieu sélectif (i.e. LB additionné de 50 µg.ml⁻¹ d'ampicilline) et les cultures sont ainsi mises à l'étuve pendant 1 nuit à 37 °C.

La validation des clones positifs s'effectue par une PCR sur les colonies.

10 4b.Préparation d'ADN plasmidique de *E. coli*

Les bactéries (i.e. 20 µl de culture glycérolée ou colonie récoltée à l'aide d'une anse de platine) sontensemencées dans 10 ml de milieu LB sélectif. Après une nuit de culture à 37 °C sous agitation (225 rpm), les cultures sont centrifugées
15 pendant 15 min à 4000 rpm et l'ADN plasmidique est extrait à partir des culots bactériens à l'aide du kit GFX™ Micro plasmid prep kit (Amersham) selon les recommandations du fournisseur et repris dans 60 µl de tampon d'élution.

20 5b.Electroporation d'*Agrobacterium tumefaciens* (souche GV3101)

Un à 2 µl d'ADN sont ajoutés à 40 µl d'agrobactéries compétentes qui sont ensuite incubées 2 min dans la glace. L'intégration de l'ADN plasmidique dans les agrobactéries est alors effectué par électroporation (Biorad Gene Pulser system)
25 dans une cuve de 4 mm préalablement refroidie, par application d'une décharge électrique de 2.5 kV (25 µFa ; 200 Ohms). Un ml de milieu SOC froid est alors ajouté aux cellules avant de les incuber pendant 3 h à 28 °C sous agitation (225 rpm).

Des aliquots de la transformation (i.e. 50 à 300 µl) sont
30 étalés sur un milieu sélectif (i.e. LB additionné de 50 µg.ml⁻¹ rifampicine et de 50 µg.ml⁻¹ kanamycine) et les cultures sont ainsi incubées 2 à 3 jours à 28 °C.

6b.Préparation d'ADN plasmidique de *A. tumefaciens* par lyse alcaline

Les agrobactéries sont ensemencées dans 10 ml de milieu LB sélectif et cultivées pendant 30 h (ou plus selon la souche utilisée) à 28 °C sous agitation (225 rpm). Le culot bactérien obtenu après centrifugation des cellules pendant 15 min à 4000 rpm est resuspendu dans 100 µl de Tris 50 mM, d'EDTA 10 mM, de RNaseA 100 µg.ml⁻¹ et de lysozyme 5 mg.ml⁻¹. Après une incubation de 5 min dans la glace, 200 µl de tampon de lyse sont ajoutés (200 mM NaOH, 1 % w/v SDS). La lyse des parois bactériennes est effectuée pendant 4 min à 4°C. Enfin 200 µl d'acétate de sodium 3 M (pH 5.5) sont ajoutés et le mélange est centrifugé pendant 10 min à 13000 rpm à 4 °C. L'ADN contenu dans le surnageant est précipité à l'éthanol (1/10^{ème} v/v 3 M NaAC pH 5.5, 2 volumes éthanol 100 %) pendant 30 min à -20 °C après deux étapes de purification au phénol-chloroforme. L'ADN précipité est culoté par une centrifugation de 45 min à 15000 g à 4 °C. Après une étape de lavage à l'éthanol 70 %, le culot d'ADN est élué dans 60 µl de Tris-HCl pH 8 1M.

C) Protocoles de biologie cellulaire

20 1c. Obtention de protoplastes de tabac (BY2)

Les protoplastes de tabac sont isolés à partir d'une culture de suspensions cellulaires BY2 de *Nicotiana tabaccum* âgées de 2 à 3 jours. Après 20 min de décantation à température ambiante de 50 ml de suspensions cellulaires, le surnageant est retiré et remplacé par 40 ml de mannitol 0.4 M. Les cellules sont plasmolysées à l'issue d'une incubation de 30 min à température ambiante, le mannitol est alors retiré. Une première étape d'isolement des protoplastes est effectuée par une incubation des cellules plasmolysées avec 12.5 ml de solution enzymatique, pendant 30 min à 28 °C sous faible agitation (55 rpm) à l'obscurité. Les agrégats cellulaires sont ensuite dissociés par 5 pipetages et refoulements successifs à l'aide d'une pipette pasteur en plastique. Une deuxième incubation est alors effectuée pendant 2 h à 28 °C

sous agitation (55 rpm) à l'obscurité. Les protoplastes ainsi obtenus sont centrifugés à 100 g pendant 15 min à 4 °C et la solution enzymatique est retirée.

Avant l'électroporation, 20 ml de mannitol 0.4 M sont ajoutés pour le maintien des protoplastes qui sont conservés dans la glace. Le comptage des protoplastes isolés est alors réalisé. Les protoplastes sont ensuite centrifugés à 100 g pendant 15 min à 4°C et repris dans un volume adéquat de mannitol 0.4 M afin d'obtenir une densité 10^6 protoplastes par ml, ils sont alors maintenus dans la glace avant l'électroporation.

1b. Obtention de protoplastes de riz (*O₂₄₂₈*)

Les protoplastes de riz sont isolés à partir d'une culture de suspensions cellulaire de *O₂₄₂₈* d'*O. sativa* âgées de 3 à 5 jours comme décrit précédemment (Brugidou et al., 1995; Ndjiondjop et al., 2001) en apportant quelques modifications. Après une centrifugation de 10 min à 100 g, le surnageant est retiré et remplacé par 15 à 25 ml de milieu PIS additionné de 15 à 25 ml de milieu R2 (en conservant un ratio de 1:1 de chaque milieu) pour 100 ml de cellules sédimentées. Les protoplastes sont ainsi isolés à l'issue d'une incubation de 20 h à 28 °C à l'obscurité sous faible agitation (55 rpm). Quelques millilitres de milieu CPW13% MMA sont ensuite ajoutés à la solution de protoplastes isolés pour faciliter la filtration des protoplastes à travers un tamis (50 µm). Les protoplastes filtrés sont centrifugés pendant 10 min à 100 g à 4 °C, le surnageant est alors éliminé et remplacé par 15 ml de CPW 13% MMA pour le maintien des protoplastes conservés dans la glace avant l'électroporation. Pendant le comptage des protoplastes, ces derniers sont sédimentés par 10 min de centrifugation à 100 g à 4 °C et les culots sont repris dans le volume approprié de CPW 0.04 % MMA de manière à obtenir la densité de protoplastes voulue et sont maintenus dans la glace avant l'électroporation.

1c.Comptage des protoplastes

Le nombre et la viabilité des protoplastes sont évalués par comptage à l'aide d'un hémocytomètre en présence de bleu trypan. Les protoplastes (200 µl) sont dilués au 1/5^{ème} dans une solution de Hank's balanced salts (300 µl) (Sigma) et de bleu trypan (500 µl).

1d.Electroporation de protoplastes de tabac et de riz

Une réaction d'électroporation est réalisée en mélangeant 600 µl de milieu d'électroporation avec 200 µl d'inoculum (i.e. 30 µg de transcrit *in vitro* ou 5 µg d'ADN plasmidique dilués dans du tampon d'électroporation) avec des protoplastes sédimentés à l'issue d'une centrifugation (i.e. 5 min, 100 g, 4 °C) de 1 ml de protoplastes isolés. Le mélange est soumis à une décharge électrique de 250 V (25 µFa, 200 Ohms) par l'utilisation de Biorad Gene Pulser system. Après électroporation, les protoplastes sont maintenus 30 min dans la glace, 5 min à température ambiante et sont centrifugés 10 min à 100 g à 4°C. Le surnageant est retiré et remplacé par un volume adéquat de milieu de culture de protoplastes (i.e. milieu R2 pour le riz), les protoplastes sont alors maintenus pendant 7 jours à 28 °C sous agitation (90 rpm) à l'obscurité.

D) Validation des constructions e vecteurs viraux d'expression et de VIGS

1d.La transcription *in vitro*

L'ADN plasmidique des différentes constructions est linéarisé par restriction à l'aide de l'enzyme HindIII (i.e. 3' du génome viral) suivie d'un traitement de 1 h à 37 °C avec 2 mg.ml⁻¹ de protéinase K. L'ADN linéarisé est purifié par deux traitements au phénol chloroforme et précipité à l'éthanol pendant une nuit à -20 °C.

La transcription *in vitro* est réalisée dans un volume réactionnel de 100 µl, sur 5 µg d'ADN linéarisé en présence de 10 mM DTT, 0.1 mg.ml⁻¹ BSA, 0.5 mM Cap analog structure (m⁷G(5')ppp(5')G, New England Biolabs), rNTP (2 mM rATP, 200 µM

rGTP, 2mM rCTP, 2 mM rUTP), 80 U RNAsin (Promega), 100 U T7 RNA polymerase (Promega) avec son tampon de réaction. A l'issue d'une heure de réaction à 37 °C, 1 µl de transcrits sont migrés sur un gel d'agarose et 12 U de T7 RNA polymerase sont rajoutés pour une deuxième heure de réaction.

A l'issue de la transcription, la qualité et la quantité des transcrits sont évaluées par migration sur gel d'agarose et par mesure de la densité optique à 260 nm.

2d.Extraction d'ARN

Les ARN des différents échantillons ont été extraits à partir de 4 ml de culture de protoplastes (centrifugation préalable de 10 min à 100 g) avec 0.5 ml de TRIzol Reagent (Invitrogen™) selon les recommandations du fournisseur. Les ARN extraits sont repris dans 10 µl d'eau RNase free.

La quantité et la qualité des ARN ont respectivement été évaluées par mesure de la densité optique à 260 nm, et par électrophorèse en conditions non dénaturantes de 2 µg d'ARN dans du TBE 0.5X à 50 V/cm.

3d.Analyse des ARN RT-PCR

Pour s'affranchir du biais de l'amplification de la matrice résiduelle d'ADN (i.e. à l'issue de la transcription *in vitro*) correspondant aux vecteurs recombinants linéarisés, un traitement à la DNase sur les ARN est réalisé. L'efficacité du traitement est évaluée à l'issue d'une amplification PCR sur 2 µl d'ARN DNAsés, en utilisant les mêmes amorces que celles utilisées pour la validation des recombinants.

Sept cent cinquante nanogrammes d'ARN sont traités avec 1 U de RQ1-DNase (Promega) en présence de son tampon dans un volume réactionnel de 10 µl, pendant 30 min à 37 °C. La réaction est stoppée par l'addition de 1 µl de solution soin (Promega) suivie d'une incubation de 5 min à 65 °C. Ce traitement est réalisé en double sur les échantillons, la moitié servira à évaluer l'efficacité du traitement comme cela est décrit ci-dessus, l'autre moitié est utilisée pour valider

les vecteurs selon la démarche qui suit. Les ARN DNAsés sont incubés pendant 5 min à 65 °C avec 10 pmol d'amorce antisens (R20 : 5'CTC CCC CAC CCA TCC CGA GA3' ou oligodT) et 10 nmol de dNTP RNase free. Dans la glace, un mélange de 1X de tampon de RT (Invitrogen), de DTT 10 mM (Invitrogen), de 40U de RNase out (Invitrogen), est ajouté au mélange précédent et incubé pendant 2 min à 42 °C. Enfin, 200 U de Superscript II (Invitrogen) est ajoutée au mélange réactionnel. Le brin complémentaire des ARN est synthétisé à l'issue d'une incubation de 50 min à 42 °C, et la réaction est stoppée après 15 min d'incubation à 70 °C. Les échantillons sont ensuite traités avec 100 U de RNase H (Invitrogen) pendant 30 min à 37°C.

A l'issue de la réaction de rétro-transcription, une PCR est réalisée sur 2.5 ou 5 µl des échantillons dans un volume réactionnel 12.5 µl (ou 5µl de RT dans un volume final de 15 µl) en présence de 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.1 µM de chaque amorce, 0.02 U d'ADN polymérase (Interchim) et de 1 X de tampon d'amplification. Le programme d'amplification débute par une dénaturation de 3 min à 94 °C, puis 30 cycles d'amplification sont réalisés (dénaturation de 45 sec à 94 °C, hybridation de 30 sec au T_m moyen des amorces utilisées, élongation de 1 min par kpb à amplifier à 72 °C), un étape finale d'élongation de 5 min à 72 °C termine la réaction d'amplification.

Dix microlitres des produits d'amplification sont séparés par électrophorèse en conditions non dénaturantes, sur un gel d'agarose dans du TAE 1X, à 100 V/cm.

4d. Analyse des protéines par *Western-blot*

- Séparation des protéines

Dix microgrammes de protéines sont mélangés à ¼ de tampon de charge et dénaturés pendant 15 min à 100 °C. Les protéines sont ensuite séparées en conditions dénaturantes sur un gel

SDS-PAGE de 12.5 %. L'électrophorèse est effectuée en deux temps dans un tampon de migration approprié :

- les échantillons sont concentrés dans la première partie du gel (i.e. stacking) par une migration à 80 V/cm,
- ils sont ensuite séparés à l'issue d'une migration de 3 à 4 h (i.e. jusqu'à la sortie du bleu de charge) à 100 V/cm.

- Electro-transfert

A l'issue de la migration, les protéines sont électro-transférées sur une membrane de nitrocellulose de 0.45 µm (Trans-Blot® Transfer Medium, Biorad) par l'application d'un courant électrique de 100 V pendant 1 h ou de 20 V pendant la nuit à 4 °C.

- Immuno-détection

Toutes les étapes d'incubation et de lavage sont réalisées à température ambiante sous agitation, à l'aide d'un agitateur à plateau, à des vitesses variables de 20-25 rev/min et 45-50 rev/min pour les étapes d'incubation et de lavage respectivement.

La membrane est incubée pendant 1 h dans une solution de blocage contenant du TBSt et 0.5 % w/v de BSA (immuno-détection avec des anticorps monoclonaux) ou 3 % w/v de lait écrémé en poudre (Non-fat dry milk, Biorad) (immuno-détection avec des anticorps polyclonaux). La membrane est ensuite incubée pendant 1 h avec le premier anticorps dilué au 1/1000^{ème} dans la même solution de blocage. L'anticorps monoclonal utilisé, Mab E, a été obtenu à partir d'un épitope du RYMV, alors que la solution d'anticorps polyclonaux, Pab Mali, a été obtenue à partir de la particule virale entière d'un isolat du Mali. La membrane est alors rincée par 6 lavages successifs de 5 min avec du TBSt puis incubée 1 h avec le deuxième anticorps (anti-IgG de souris ou de lapin couplés

à la peroxydase pour révéler respectivement des réactions
sérologiques avec des anticorps monoclonaux ou polyclonaux)
dilué au 1/40000^{ème} dans une solution de blocage neuve. Six
lavages successifs de 5 min dans du TBSt de la membrane sont
5 alors réalisés. La révélation de l'interaction antigène-
anticorps est révélée par chimiluminescence, et l'excitation
est provoquée par une réaction chimique avec la peroxydase en
présence d'une solution de West Pico (Pierce) appliquée sur la
membrane et incubée 5 min à la lumière. La membrane enveloppée
10 dans du Saran est alors exposée à un film autoradiographique
(CL-X PosureTM Film, Pierce) à température ambiante pour une
durée variable selon l'intensité du signal désirée. Le film
d'autoradiographie a été révélé manuellement.

Tampons de biologie moléculaire

15 TBE 10X : 0.9 M Tris-borate, 20 mM EDTA

TAE 50X : 2 M Tris-acétate, 50 mM EDTA

Tampons et solutions pour Western-blot

Gel de séparation : 12 % acrylamide bis acrylamide (29:1),
0.4 M Tris HCl pH8.8, 0.1 % SDS, 0.1 % Persulfate d'ammonium,
20 0.1 % Temed

Gel de concentration : 5 % acrylamide bis acrylamide
(29:1), 125 mM Tris HCl pH6.8, 0.1 % SDS, 0.1 % Persulfate
d'ammonium, 0.1 % Temed

Tampon de migration : 25 mM Tris base, 0.25 M Glycine,
25 0.1 % SDS

Tampon de transfert : 20 mM Tris base, 0.15 M Glycine,
2 % méthanol

Tampon de charge 4X : 200 mM Tris HCl pH 6.8, 400 mM DTT,
8 % SDS, 0.4 % Bleu de bromophénol, 40 % Glycérol

30 TBS pH 7.5 : 20 mM Tris base, 75 mM NaCl, 2.5 mM MgCl₂

TBS-t : TBS, 0.05 % Tween 20

Milieux de culture cellulaire et bactérienne

LB (pH 7) : 10 g.l⁻¹ tryptone, 5 g.l⁻¹ extrait de levure,
10 g.l⁻¹ NaCl

SOC : 20 g.l⁻¹ tryptone, 5 g /L extrait de levure, 0,5 g.l⁻¹ NaCl, 2.5 mM KCl (pH 7)

Du glucose stérile (20 mM) est ajouté au milieu après autoclavage.

5 Milieus de culture cellulaire

Cellules de tabac BY2

Entretien des suspensions de tabac (pH 5.8) : 4.3 g.l⁻¹ MS salts (Duchefa M0221), 1 mg.l⁻¹ Thiamine HCl, 100 mg.l⁻¹ Myo-inositol, 30 g.l⁻¹ Sucrose, 0.2 mg.l⁻¹ 2,4-D

10 **Milieu de culture des protoplastes (pH 5.8) :** 4.3 g.l⁻¹ MS salts (Duchefa M0221), 1 mg.l⁻¹ Thiamine HCl, 100 mg.l⁻¹ Myo-inositol, 10g.l⁻¹ Sucrose , 0.4 M D-Mannitol, 0.2 mg.l⁻¹ 2,4-D

Solution enzymatique pour la préparation de protoplastes (pH 5.5) : 1% Cellulase Onozuka RS, 0.1 % Pectolyase Y-23, 0.4 M D-mannitol. La solution est stérilisée par filtration à 0.22 µm et aliquotée par volume de 25 ml. Stockage à -20 °C

Milieu d'électroporation de protoplastes (pH 5.8) : 0.3 M Mannitol, 70 mM KCl, 5 mM MES

Cellules de riz O₂₄₂₈

20 **Milieu PIS (solution enzymatique pour la préparation des protoplastes) (pH 6) :** 2 % Cellulase RS, 0.1 % Pectolyase Y23. Les enzymes sont diluées dans du CPW 13 % MMA et stérilisées par filtration à 0.22µm. La solution est conservée à -20°C

Milieu CPW 13% MMA (protoplastes) :

25 Solution 100 X : 20 mM KH₂PO₄, 0.1 M KNO₃, 0.2 M MgSO₄

CPW 13% MMA (pH 5.8) : 10 ml/l solution 100X, 10 mg/ml KI, 10 mg/ml CuSO₄.5H₂O, 5 mM MES, 10 mM CaCl₂, 0.7 M Mannitol. Conserver la solution à -20°C.

Milieu CPW 0.04 % MMA (protoplastes) :

30 Le milieu présente la même composition que le milieu CPW13 %MMA, seule la concentration de mannitol varie : 0.4 M

Milieus R2 (protoplastes) :

Macroéléments R2-I (10X) : 40g.l⁻¹ KNO₃, 3.3 g.l⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 3.12 g.l⁻¹ NaH₂PO₄ H₂O, 10 mM MgSO₄

Macroéléments R2-II (10X) : $1.46 \text{ g.l}^{-1} \text{ CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

Microéléments R2 (1000X) : $1.6 \text{ g.l}^{-1} \text{ MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $2.2 \text{ g.l}^{-1} \text{ ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $2.83 \text{ g.l}^{-1} \text{ H}_3\text{BO}_3$, $0.125 \text{ g.l}^{-1} \text{ CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $0.125 \text{ g.l}^{-1} \text{ Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

5 Vitamines R2 (40X) : $40 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Thiamine HCl}$

FeNaEDTA (100X) : $1.25 \text{ g.l}^{-1} \text{ FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.5 \text{ mM Na}_2\text{EDTA}$

Milieu R2 (pH 5.8) : 1X Macroéléments R2-I, 1X Macroéléments R2-II (1X), 1X Microéléments R2, 1X Vitamines R2 (1X), 1X FeNaEDTA, $2.5 \text{ mg.l}^{-1} \text{ 2,4-D}$, 0.4 M Maltose , 0.5 mg.l^{-1}

10 Acide nicotinique, $100 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Myo-inositol}$, $0.5 \text{ mg.l}^{-1} \text{ Pyrodoxine}$.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 5 **Bradford, M.** (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Annal of Biochemistry* **72**, 248-254.
- 10 **Brugidou, C., Holt, C., Yassi, M. N., S., Z., Beachy, R. N. and Fauquet, C.** (1995). Synthesis of an infectious full-length cDNA clone of *Rice yellow mottle virus* and mutagenesis of the coat protein. *Virology* **206**, 108-115.
- 15 **Hacker, D. L. and Sivakumarann, K.** (1997). Mapping and expression of *Southern Bean mosaic virus* genomic and sub-genomic RNAs. *Virology* **234**, 317-327.
- 20 **Hamilton, A. J. and Baulcombe, D. C.** (1999). A Species of Small Antisense RNA in Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science* **286**, 950-951.
- 25 **Pang, S. Z., DeBoer, D. L., Wan, Y., Ye, G., Layton, J. G., Neher, M. K., Armstrong, C. L., Fry, J. E., Hinchee, M. and Fromm, M. E.** (1996). An Improved Green Fluorescent Protein Gene as a Vital Marker in Plants. *Plant Physiology* **112**, 893-900.
- 30 **Sallaud, C., Meynard, D., van Boxtel, J., Gay, C., Bès, M., Brizard, J. P., Larmande, P., Ortega, D., Raynal, M., Portefaix, M. et al.** (2003). Highly efficient production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics. *Theoretical and Applied Genetics* **106**, 1396-1408.

REVENDICATIONS

1/ Utilisation de gènes codant pour un suppresseur de silencing tel les protéines P1 du RYMV présentant une diversité fonctionnelle vis-à-vis du silencing, comprenant le choix du gène ayant le niveau d'efficacité pour construire un vecteur viral de plantes ayant la fonction de surexpression ou de silencing de gènes d'intérêt recherchée.

2/ Utilisation de protéines P1 isolées des isolats du RYMV pour la sélection de protéines P1, on clone les différentes P1, plus particulièrement [Tz3, Tz8, Mg1, BF1, CI63] en aval du promoteur 35S, pour un niveau d'activité donné sur le PTGS, en mettant en œuvre une technique comprenant :

- le clonage de gènes codant des protéines suppresseurs de silencing présentant une diversité fonctionnelle en aval d'un promoteur approprié, tel que le promoteur 35S de RYMV,
- l'inoculation des différentes cassettes d'expression codant pour les protéines suppresseurs par biolistique sur de feuilles de riz,
- l'inoculation mécanique de virus RYMV sur des lignées, telles que les lignées L2,4 et L10,
- le dosage de la charge virale par DAS-ELISA en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre un isolat donné, par exemple un isolat de Madagascar,
- la visualisation de la restauration de l'expression du gène rapporteur (GUS) codant pour la bêta glucoramidase par test histochimique,
- la quantification de la restauration de l'expression du gène rapporteur par dosage de l'activité enzymatique du GUS,
- la détection des siARN (preuves du PTGS) par Northern blot, et

- la sélection de la protéine P1 présentant le niveau d'activité requis pour soit la surexpression, soit le silencing d'un gène d'intérêt.

3/ Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que pour la sélection de protéines P1, on clone les différentes P1, plus particulièrement [Tz3, Tz8, Mgl, BF1, CI63] en aval du promoteur 35S.

4/ Utilisation selon la revendication 3, caractérisée par la mise en œuvre de la protéine P1 CI63 ou Tz3 pour obtenir une forte efficacité dans la suppression du PTGS.

5/ Utilisation selon la revendication 3, caractérisée par la mise en œuvre de la protéine P1 Tz8 une efficacité de PTGS intermédiaire, et de la protéine P1 Mgl ou BF1 pour une faible efficacité dans la suppression du PTGS.

6/ Vecteurs viraux d'expression ou de silencing de gènes d'intérêt, caractérisés en ce qu'ils sont générés à partir du génome de RYMV et comprennent un gène codant pour les protéines P1 de RYMV.

7/ Vecteurs selon la revendication 6, caractérisés en ce qu'ils sont générés à partir du génome de RYMV et comprennent un gène codant pour des protéines P1 exprimant une diversité fonctionnelle comme suppresseurs de silencing, ce gène remplaçant celui du génome de RYMV codant pour une protéine P1.

8/ Vecteurs selon la revendication 7, caractérisés en ce qu'il s'agit de vecteurs viraux d'expression contenant un insert d'un gène d'intérêt à surexprimer ou à éteindre, de taille inférieure à 700 pb.

9/ Vecteurs selon la revendication 6, caractérisés en ce qu'il s'agit de vecteurs VIGS contenant des inserts d'une taille inférieure à 50 pb quelle que soit leur orientation d'insertion dans le génome viral et dont la cible est l'ARNm de l'insert.

10/ Vecteurs selon la revendication 8 ou 9, caractérisés par des tailles d'insert supérieures à 700 pb, utilisant le système amplicon du RYMV.

11/ Vecteurs selon l'une quelconque des revendications 7 à 10, caractérisés en ce qu'ils sont obtenus selon un protocole comprenant les étapes de :

- amplification PCR ;
- digestion ;
- ligation ;
- 10 - transformation de bactéries compétentes.

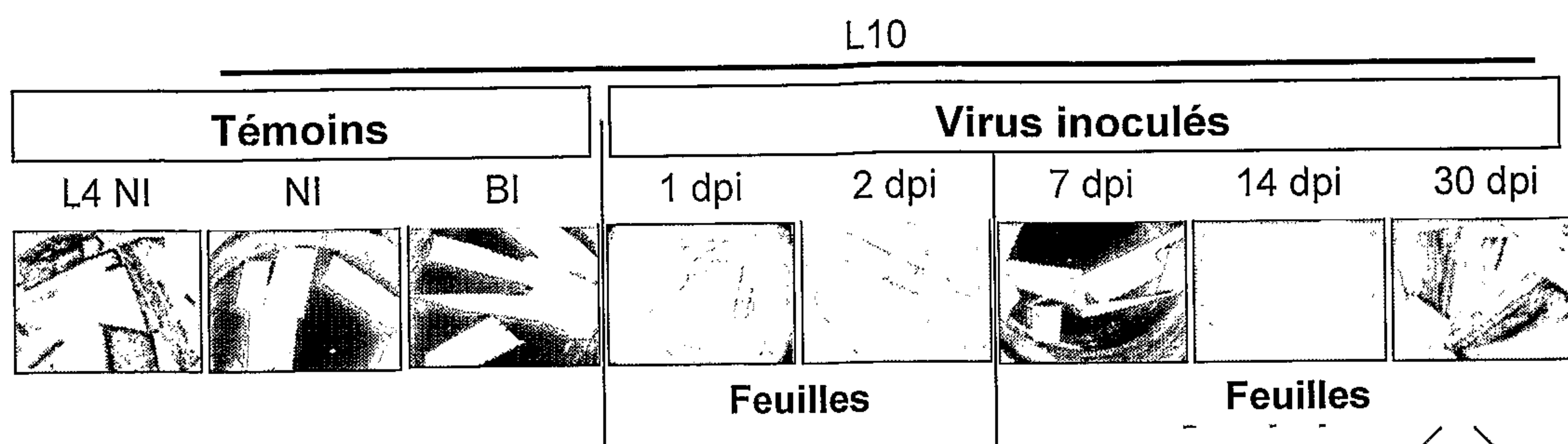
12/ Vecteurs selon la revendication 11, caractérisés en ce que les vecteurs d'expression sont validés selon un protocole comprenant les étapes de

- transcription *in vitro* ;
- 15 - préparation et électroporation de protoplastes avec les transcrits ;
- visualisation des inserts 3 à 7 jours après l'électroporation ;
- extraction d'ARN selon la même cinétique ;
- 20 - validation de la répllication et stabilité des gènes insérés par RT-PCR.

13/ Vecteurs selon la revendication 10, caractérisés en ce que les vecteurs VIGS sont validés selon un protocole comprenant les étapes de :

- 25 - transcription *in vitro* ;
- inoculation mécanique de différentes variétés de riz présentant des degrés de résistance variable au RYMV et des lignées transgéniques avec les transcrits ;
- caractérisation phénotypique avec la visualisation des
- 30 phénotypes de silencing ;
- caractérisation moléculaire avec l'extraction d'ARN totaux, Northern blot en gel de polyacrylamide des ARN de bas poids moléculaire et détection des siARN spécifiques des gènes ciblés par le VIGS.

a-



b-

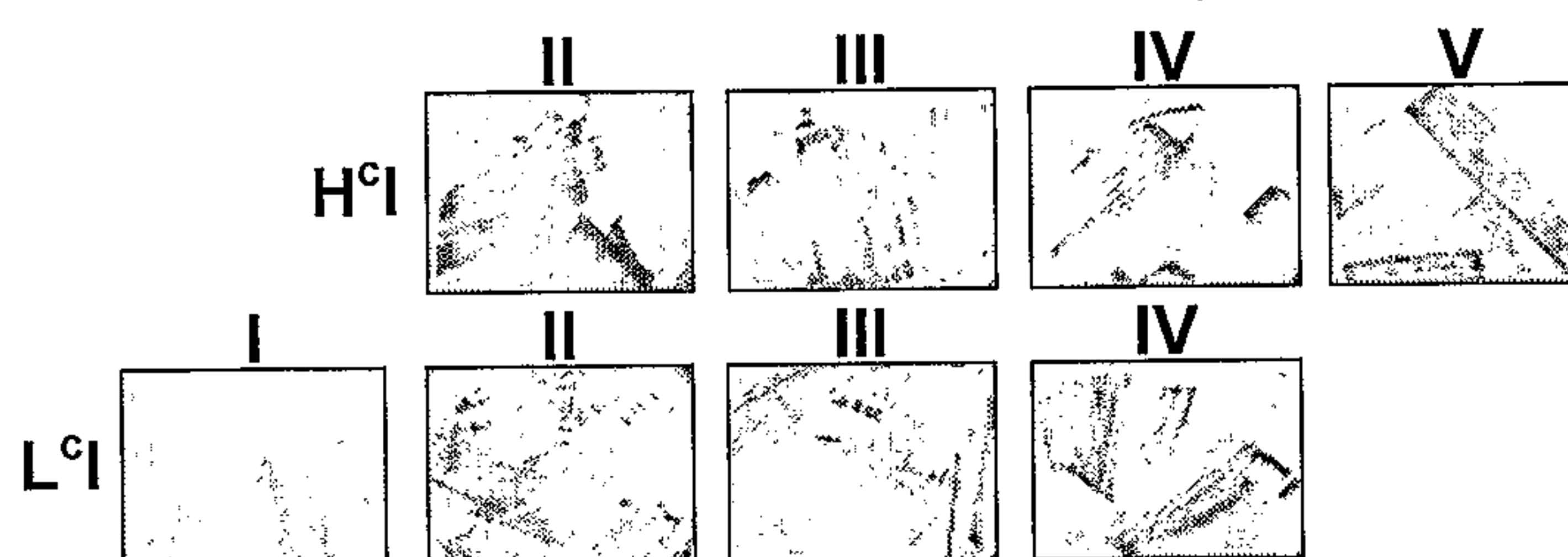


Figure 1

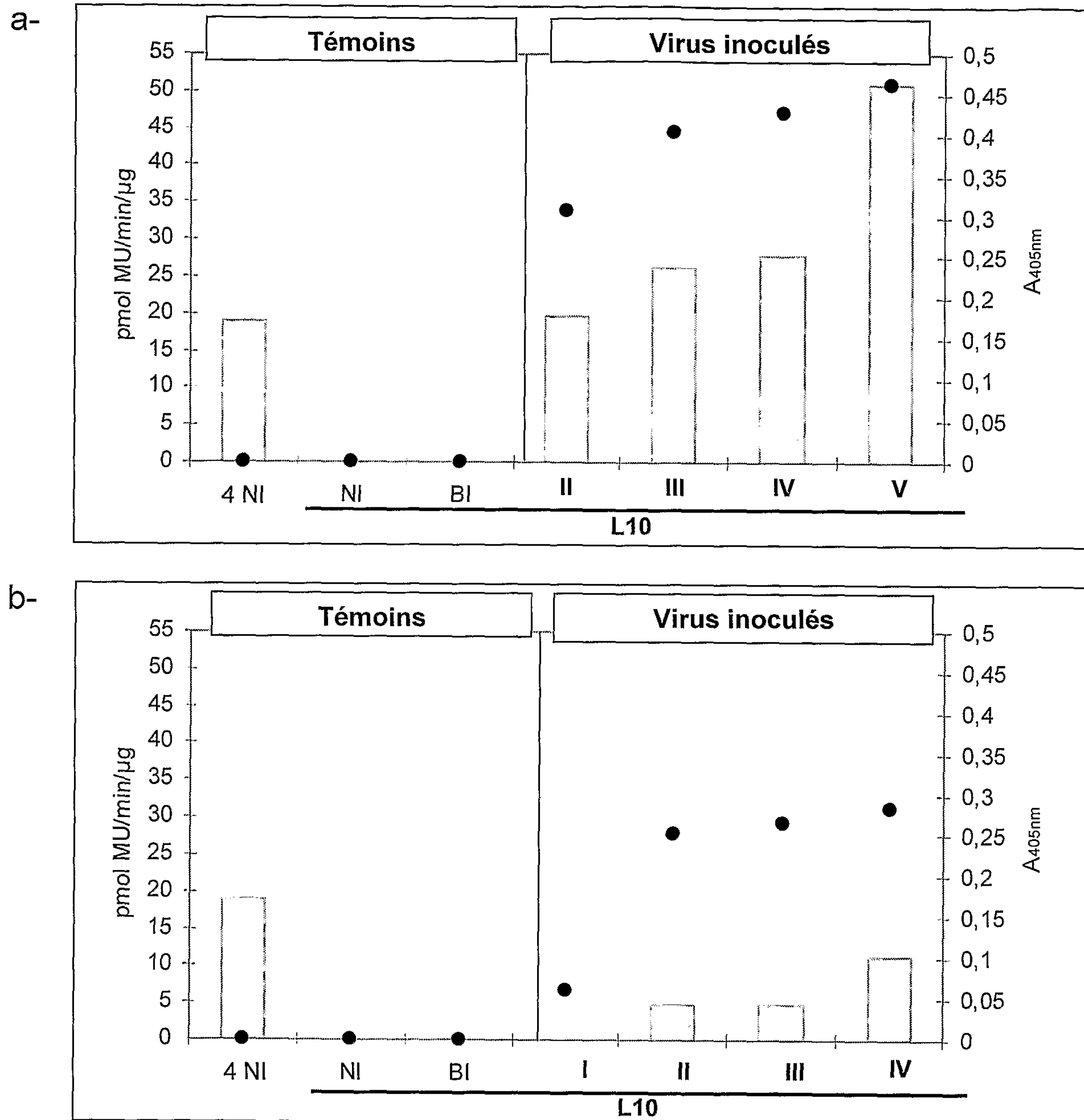


Figure 2

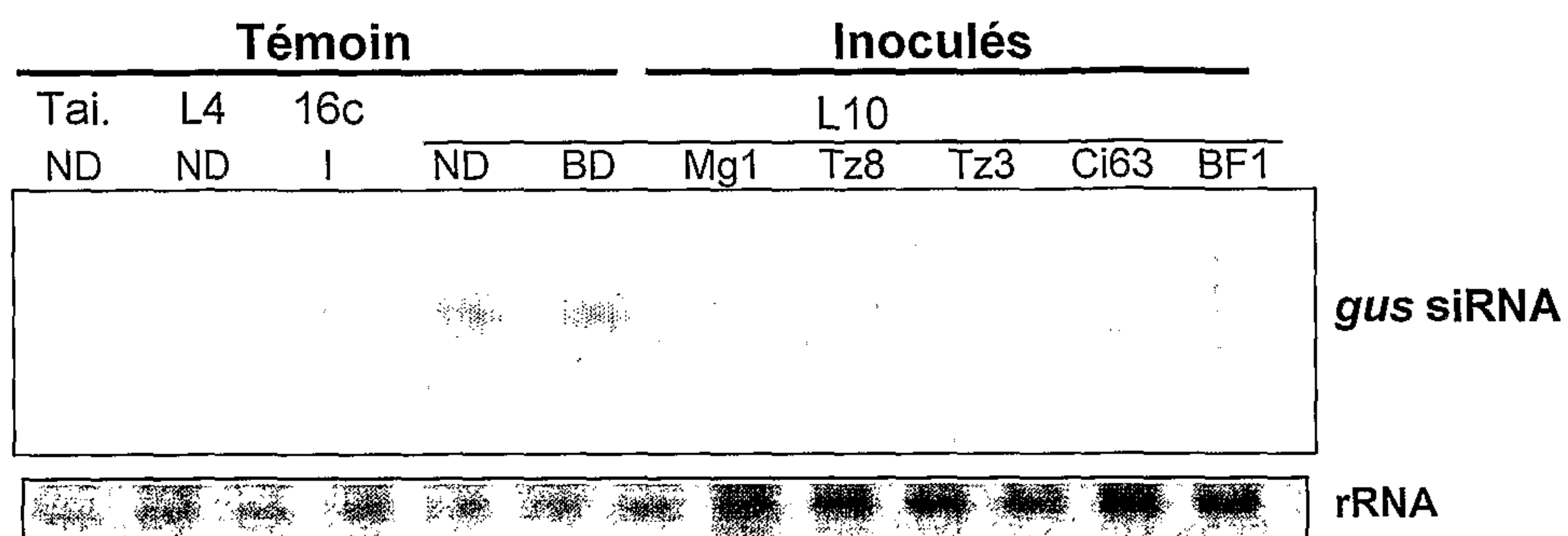


Figure 3

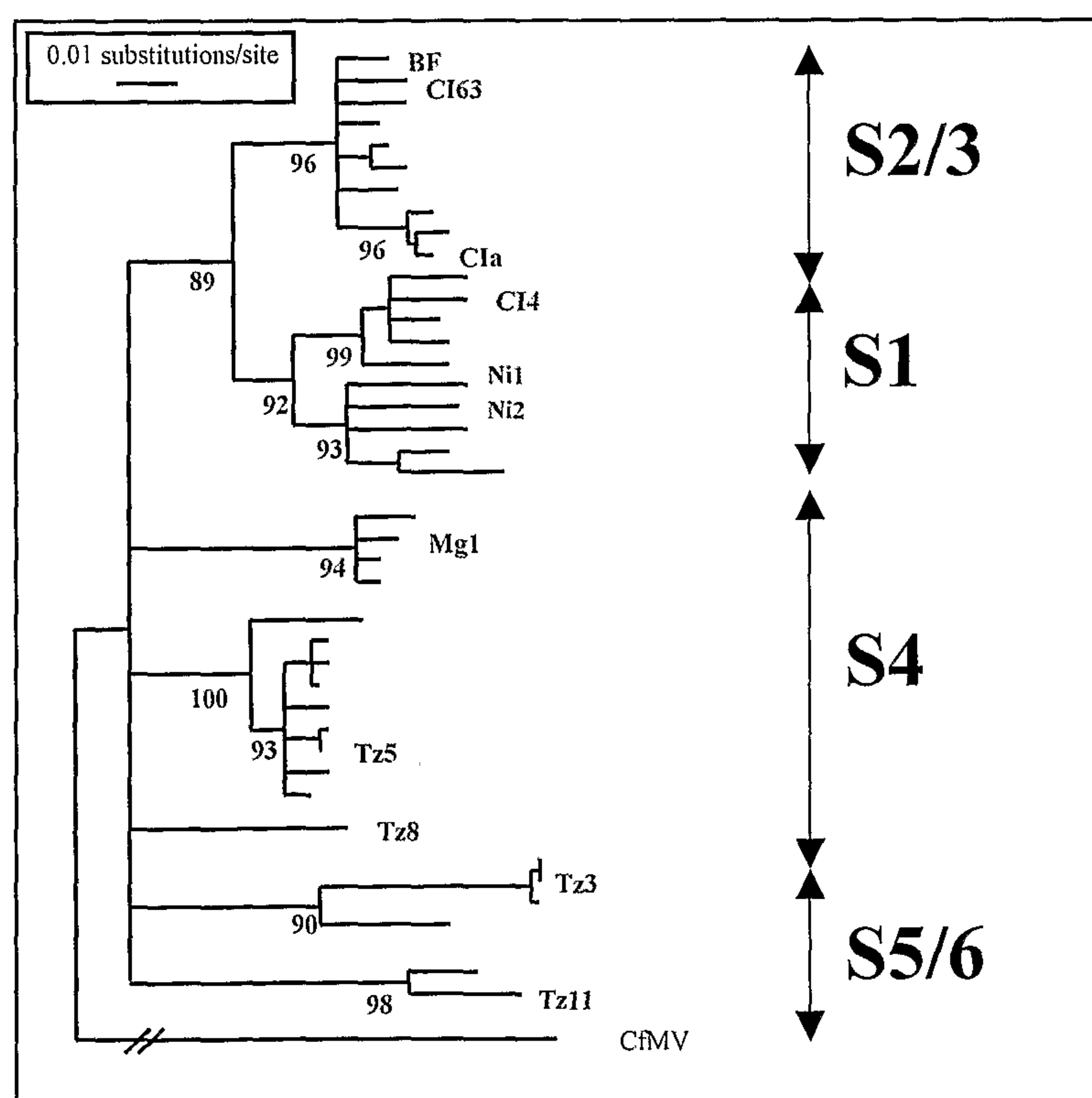
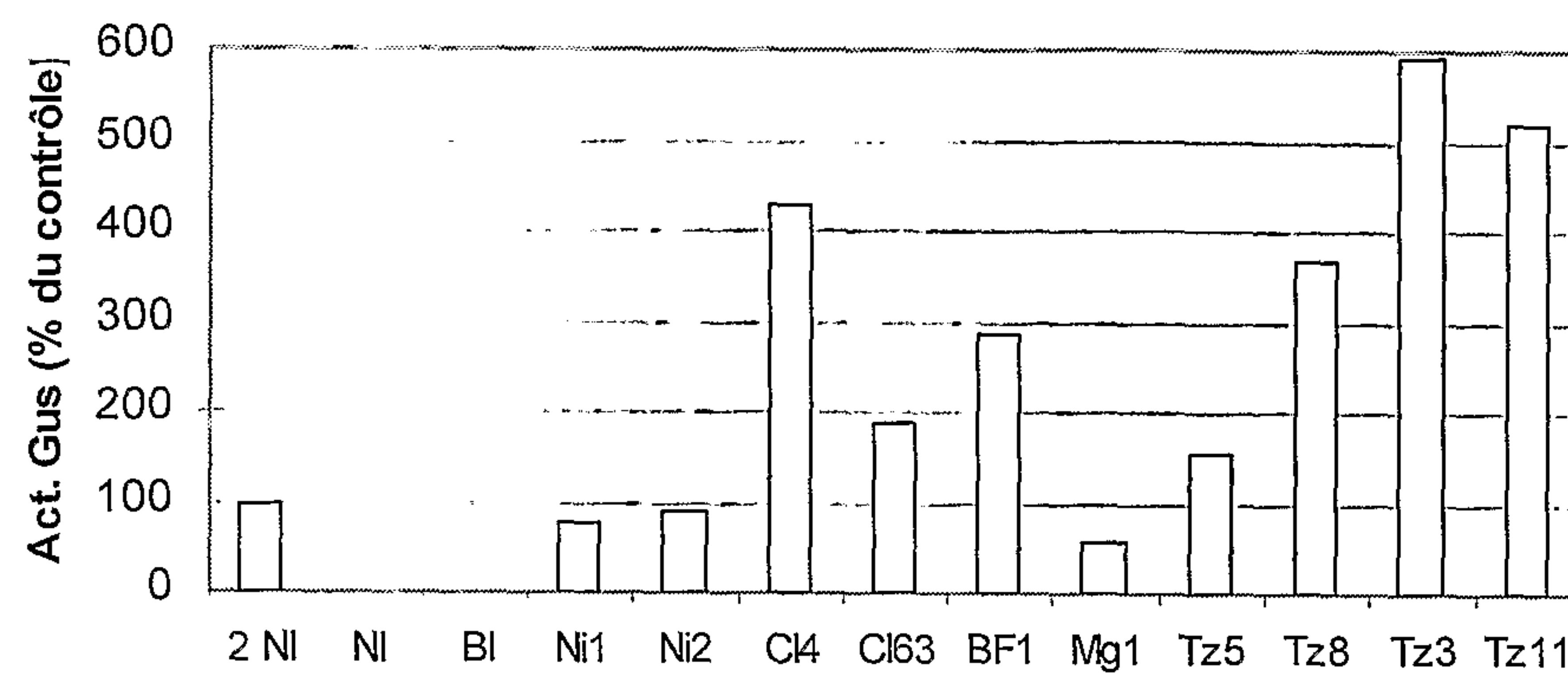


Figure 4

**Figure 5**

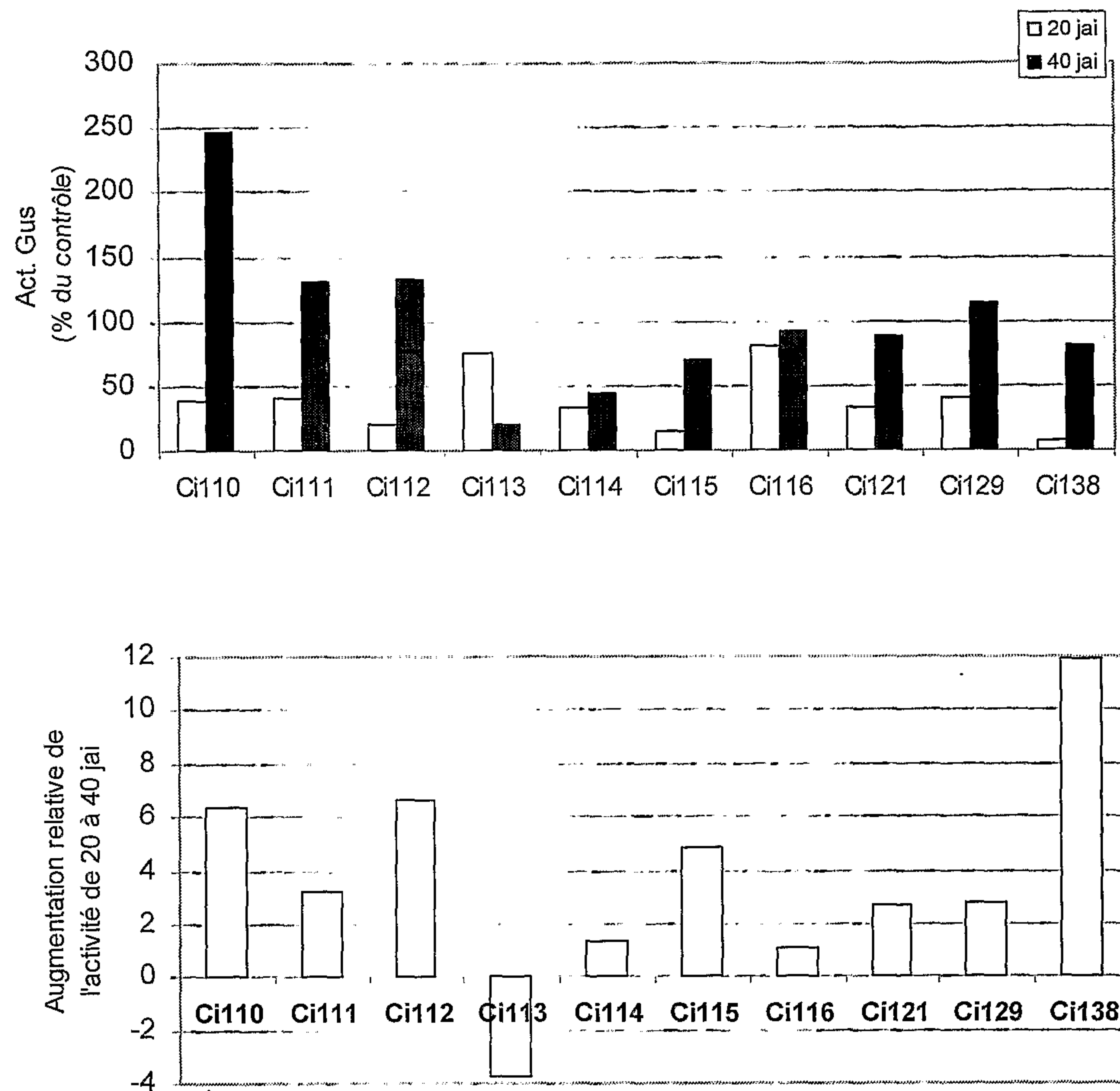
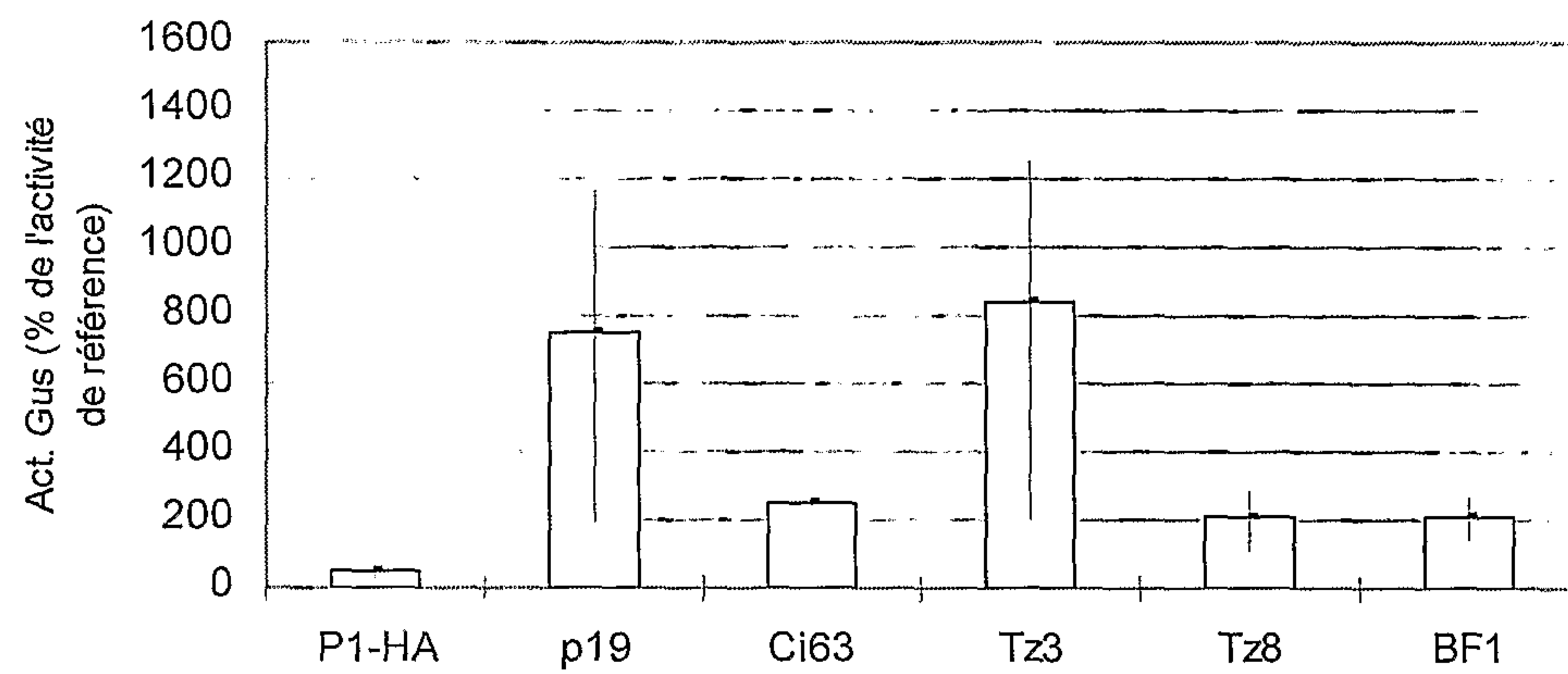
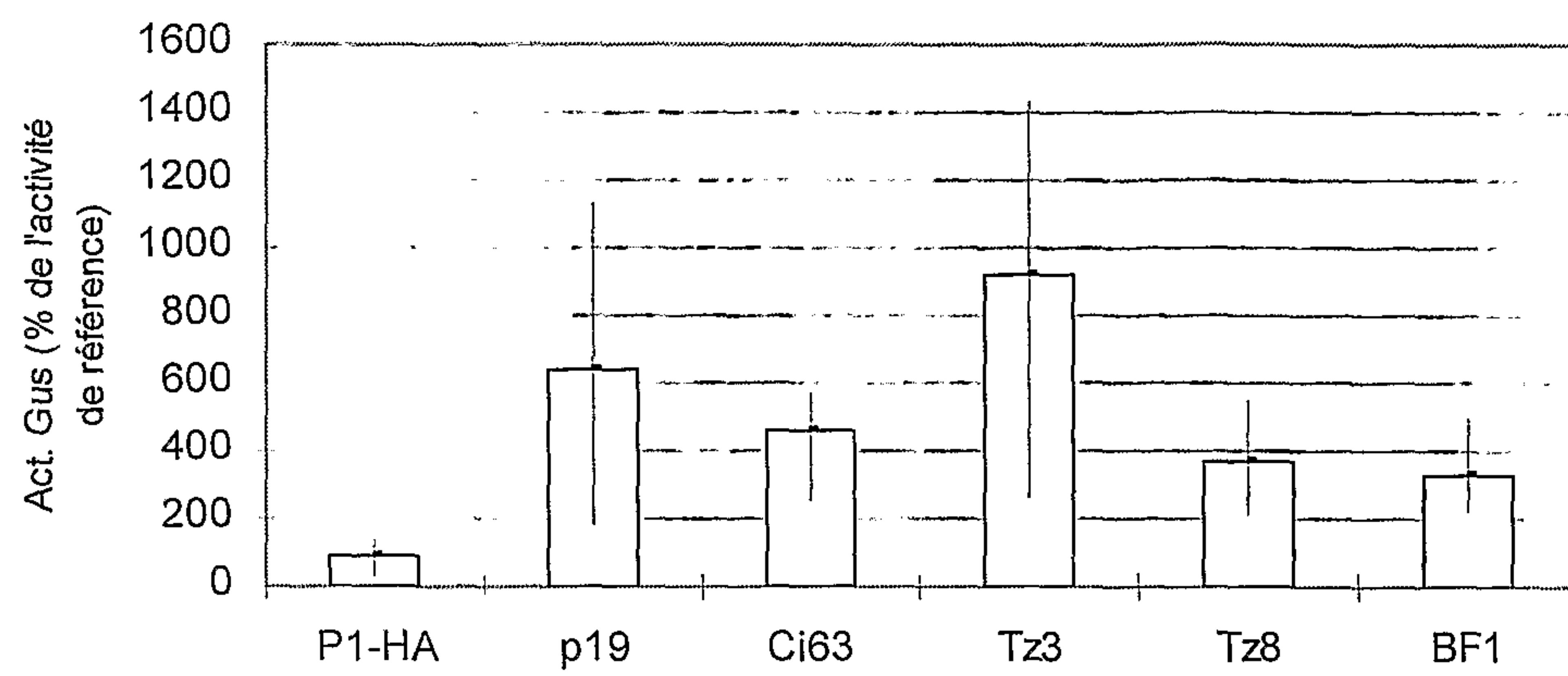
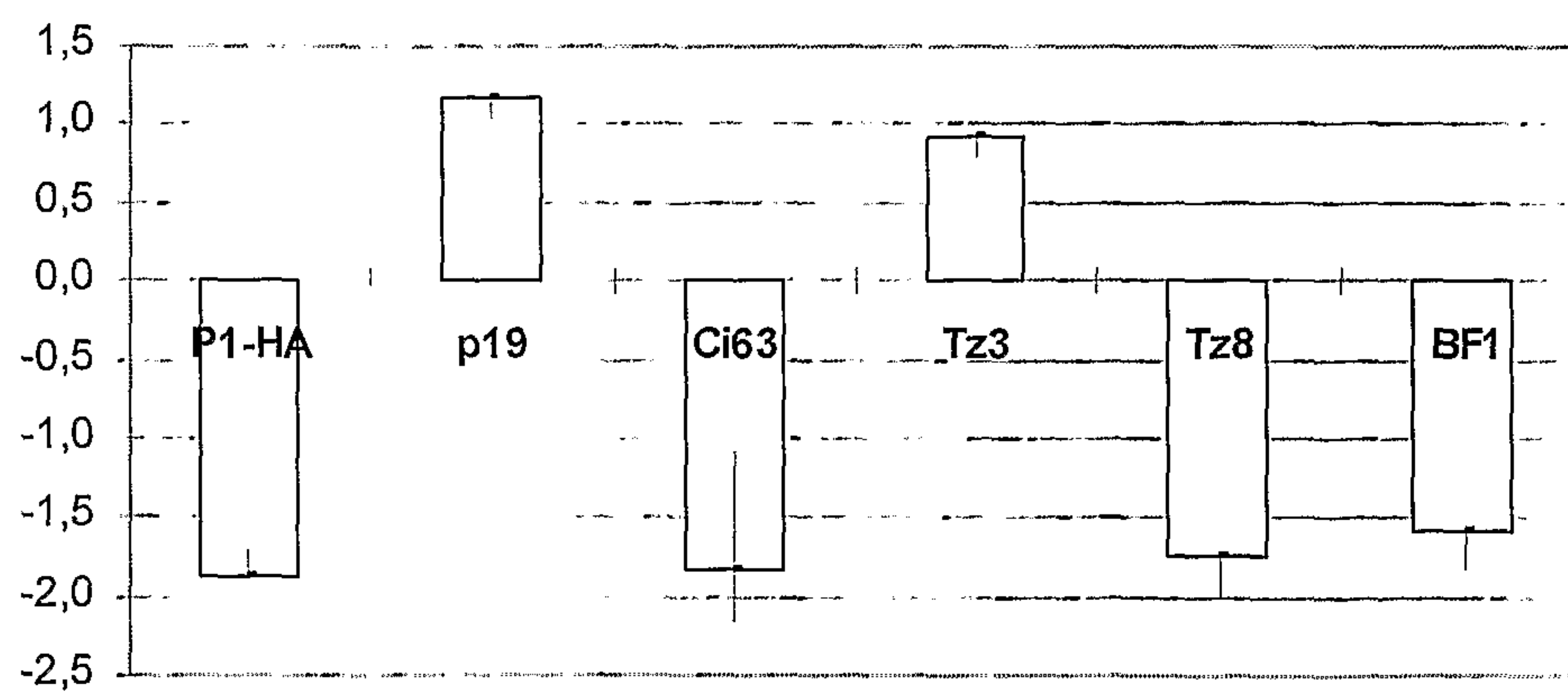


Figure 6



-a-



-b -

Figure 7

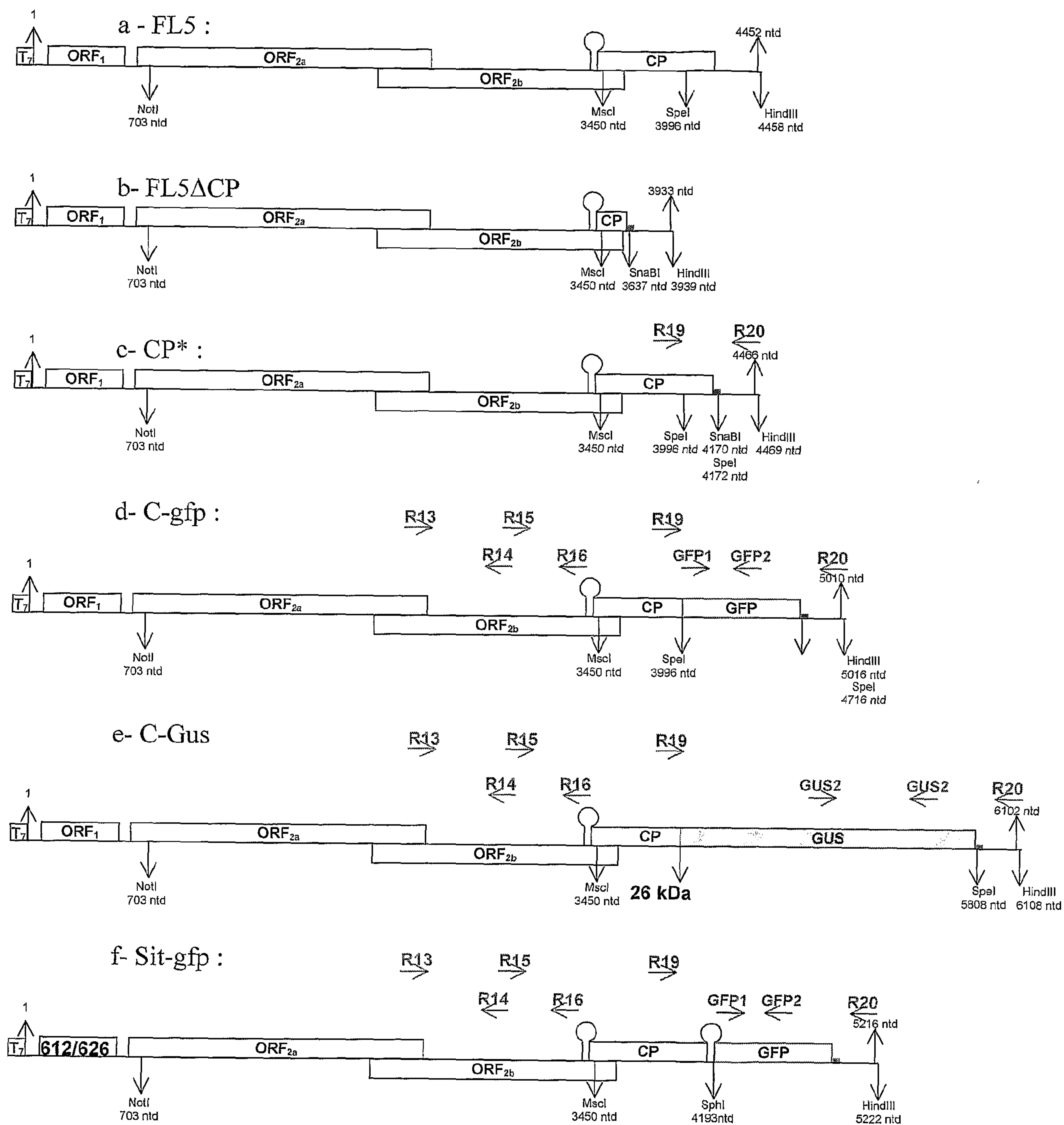


Figure 8

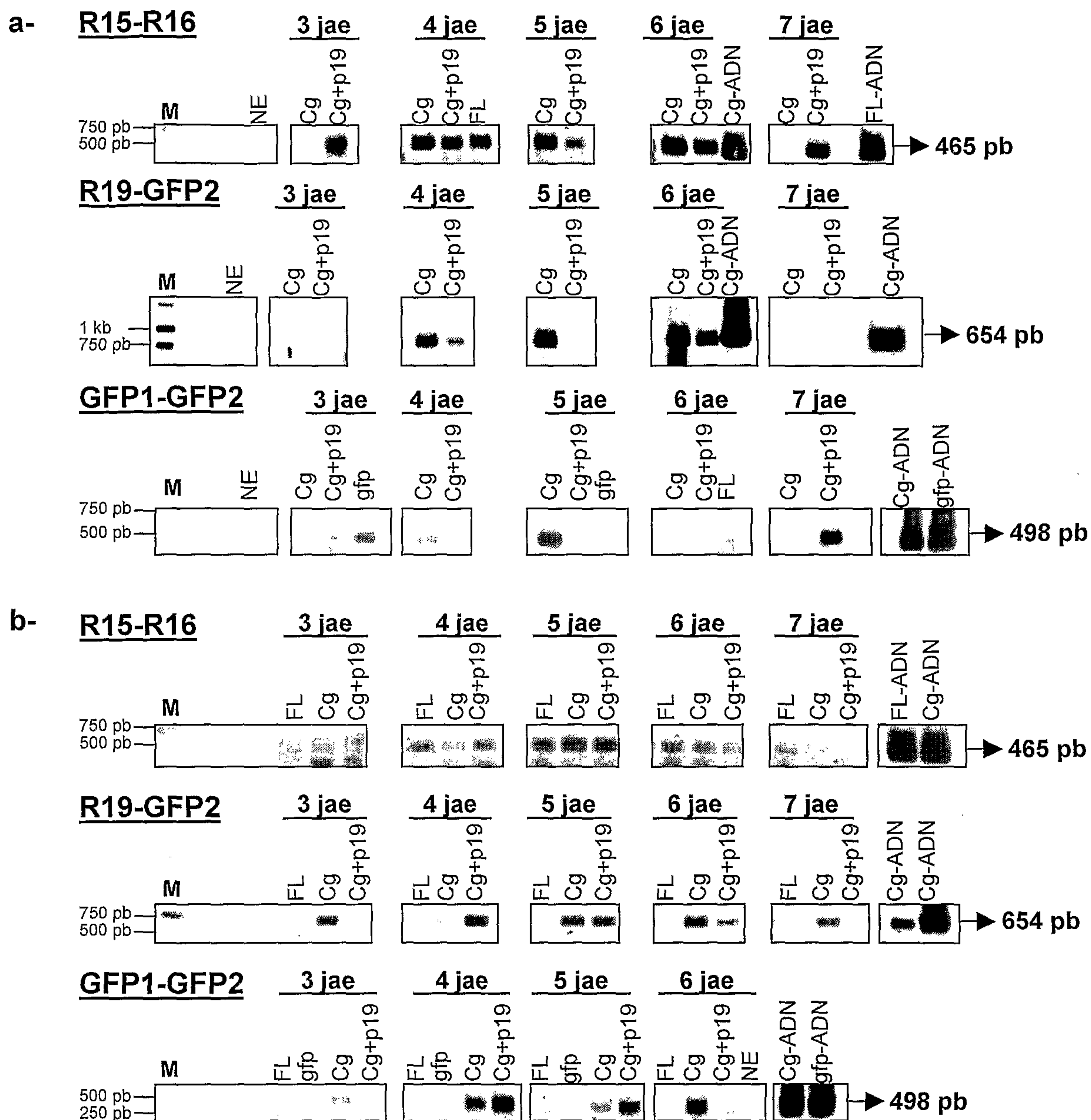


Figure 9

Figure 10

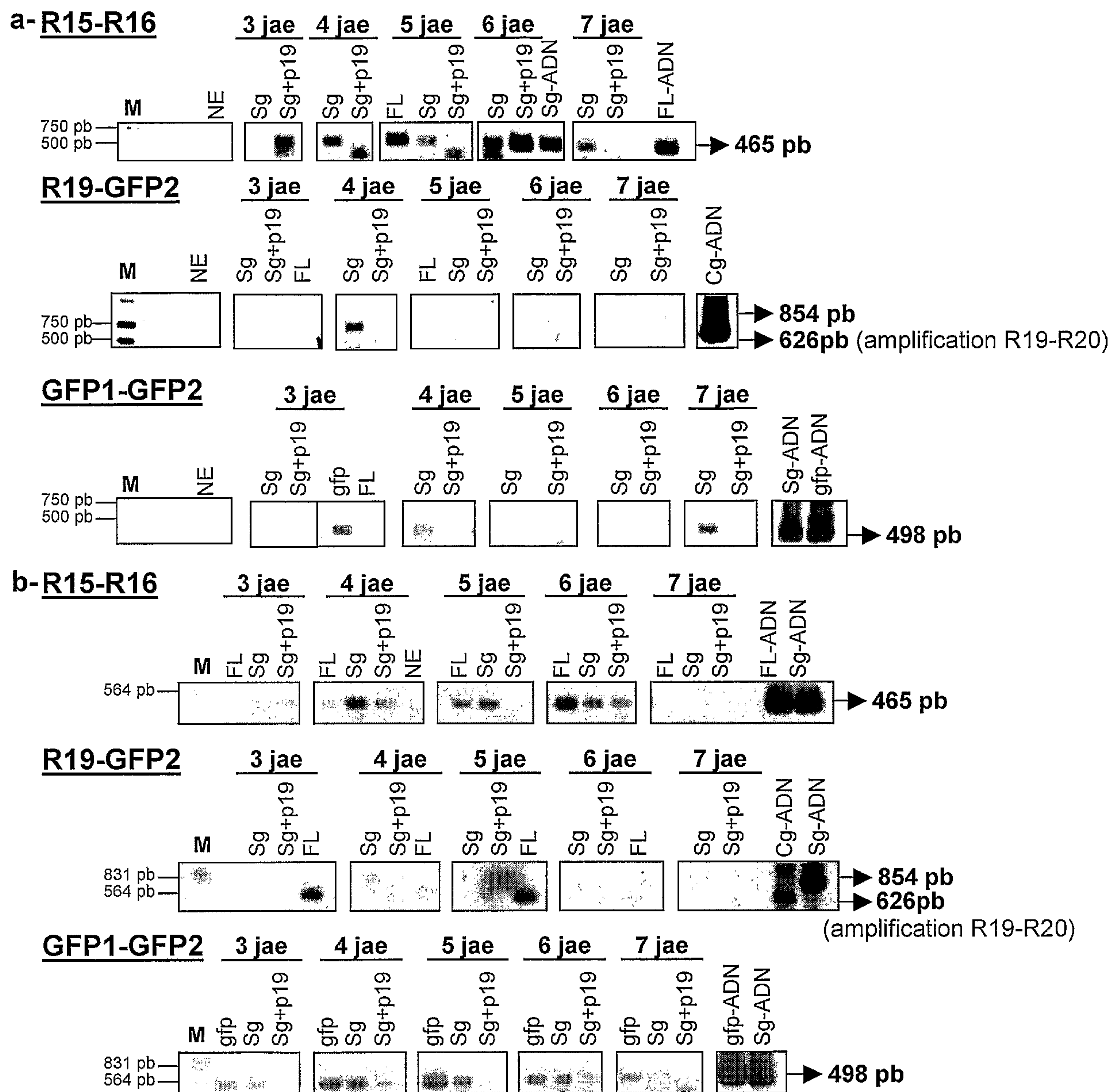


Figure 11

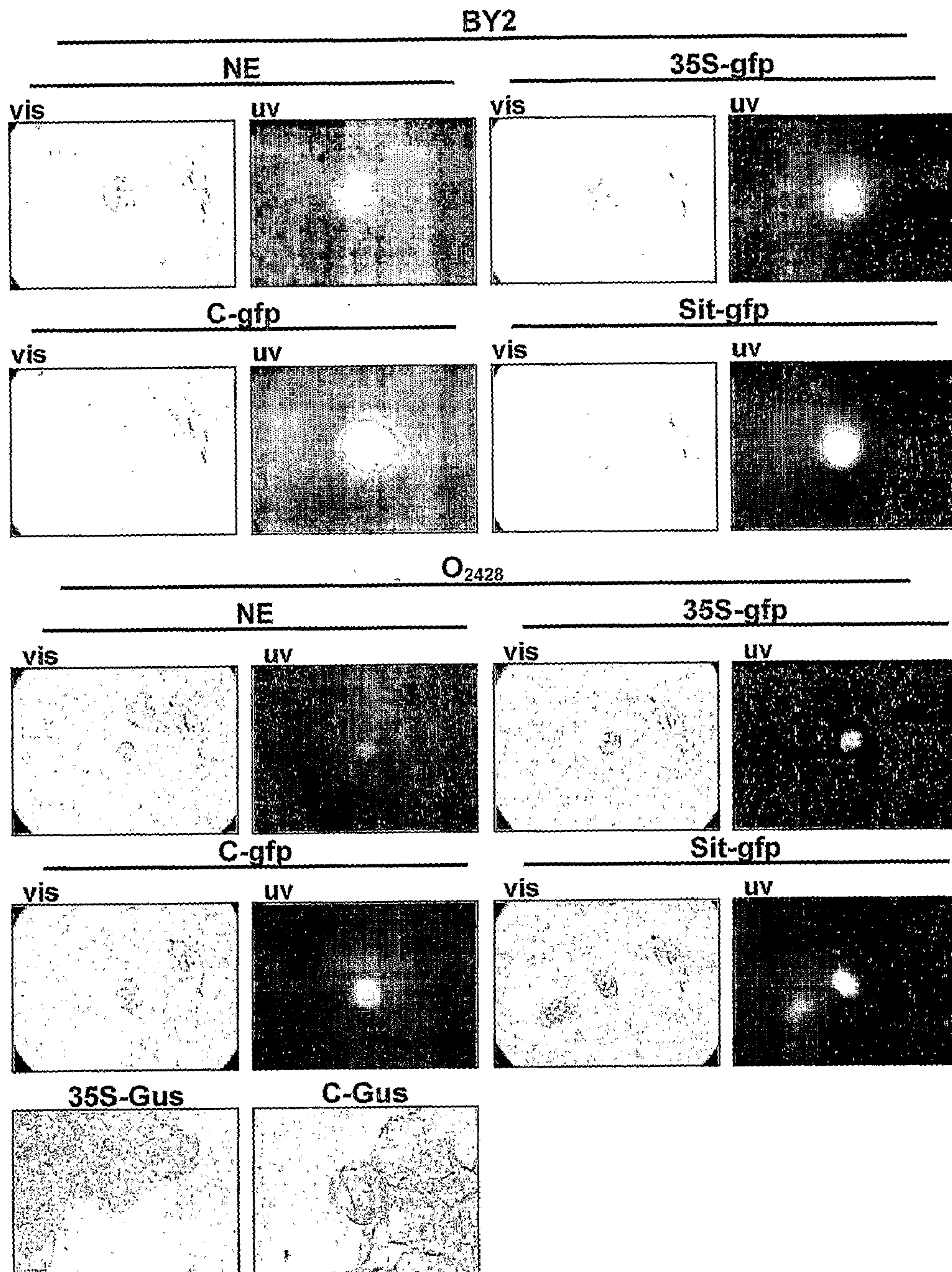


Figure 12