

Mécanismes de résistance aux virus chez les plantes transgéniques

Christelle Dutilleul, Éric Lainé

Les virus des plantes sont des particules pathogènes (virions) porteuses d'une information génétique constituée d'acides nucléiques, ADN ou ARN, simple ou double brin, pouvant être segmentée et protégée par une enveloppe protéique (la capsid) qui peut aussi parfois contenir une ARN polymérase virale assurant la transcription de l'ARN viral. La plupart des virus contiennent une information génétique sous forme d'ARN messenger, noté (+) et pouvant coder pour une polymérase, mais certains possèdent de l'ARN anti-messenger, noté (-), et il faut dans ce cas une polymérase virale présente dès le début de l'infection pour obtenir un ARN messenger à partir de cet ARN anti-messenger. Certaines capsides sont entourées d'une enveloppe lipidique provenant de la plante hôte.

La localisation du virus dans la plante est très hétérogène. Au niveau tissulaire, on distingue deux groupes de virus : les virus à mosaïque, se situant dans les cellules du parenchyme lacuneux et palissadique, et les virus à jaunisse (ou Lutéovirus), localisés dans le phloème (liber) ou les cellules

compagnes. Au niveau cellulaire, les virus se localisent préférentiellement dans le cytoplasme, les vésicules cytoplasmiques ou dans le noyau. À côté des symptômes macroscopiques (mosaïque, nanisme, etc.), on observe des symptômes viraux subcellulaires, caractérisés par des inclusions cristallines ou amorphes constituées d'amas de particules ou de protéines virales.

Les modes de réplication des phytovirus sont très variés et dépendent du type de génome viral. Certains nécessitent une phase nucléaire, d'autres sont uniquement cytoplasmiques. Chaque virus possède un mode de transmission de plante à plante spécifique. En général le vecteur est un invertébré (puceron ou nématode par exemple), mais certains virus se transmettent par les champignons, le pollen ou par contact direct. Suivant le climat et l'environnement, ces modes de transmission sont plus ou moins efficaces, ce qui spécifie les types de maladies que l'on peut y rencontrer : par exemple, dans les sols sableux, il n'y a pas de nématodes, donc pas de Népovirus. Certains virus ont un spectre d'hôte très large (plusieurs centaines d'espèces pour le virus de la mosaïque du concombre) ; à l'inverse, d'autres sont spécifiques d'une espèce végétale déterminée.

Les viroïdes sont de petites molécules d'ARN circulaire infectieuses ayant une forte structure secondaire et dépourvues de fonction messagère. La réplication des viroïdes est différente de celle des virus : elle se situe dans le noyau où il y a transcription de l'ARN par l'ARN polymérase

II des cellules de l'hôte, ce qui sous-entend des analogies structurales entre cet ARN et l'ADN bicaténaire. Tous les modes de transmission des virus sont aussi utilisés par les viroïdes, à l'exception des insectes [1, 2].

Les maladies virales des plantes sont des maladies persistantes ; le végétal reste une source de virus toute sa vie durant et l'infection peut se propager à l'ensemble d'une culture. Toutes les infections virales débutent par des symptômes marqués, puis des mécanismes réactionnels se mettent en place et la maladie devient moins apparente, bien que le virus persiste. On ne connaît pas de traitements phytosanitaires efficaces et peu coûteux contre les maladies virales. On peut cependant prévenir la dissémination de certaines d'entre elles en luttant contre leurs vecteurs (par exemple les pucerons). Signalons cependant l'existence de techniques sophistiquées comme la thérapie thermique ou encore la prémunition (pré-infection avec une souche virale peu pathogène).

Les maladies virales sont à l'origine de pertes de rendement importantes, en particulier pour les plantes à multiplication végétative, et de nombreux travaux ont visé à la création de variétés résistantes aux virus. Avant la mise au point de la transgénèse, l'introgression par voie sexuée était le processus habituel de création de telles variétés, en croisant une variété cultivée sensible avec une plante naturellement résistante (qui peut être une « cousine » sauvage). Il s'agit d'une sélection classique, limitée aux plantes sexuellement compatibles et exigeant un

C. Dutilleul, É. Lainé : Université de Picardie, UFR Sciences, 33, rue Saint-Leu, 80039 Amiens Cedex ; France. <eric.laine@sc.u-picardie.fr>

Tirés à part : É. Lainé

Thèmes : Génétique ; Amélioration des plantes.

Glossaire

ARN antisens (AS-ARN) : ARN ayant une séquence complémentaire de tout ou partie d'un ARN messager. Sa synthèse se fait à partir d'une séquence d'ADN introduite à contresens dans un génome.

Cadre de lecture ou ORF (*open reading frame*) : succession de codons pouvant coder pour un polypeptide car n'étant pas interrompue par des codons stop.

Capside : assemblage de protéines emballant l'acide nucléique d'un virus.

Cosuppression : extinction ou diminution de l'expression de gènes et de transgènes présentant une forte homologie entre eux.

Défectif : virus dont un des gènes ne code pas pour une protéine virale fonctionnelle.

Électroporation : technique utilisant un choc électrique pour faire pénétrer une macromolécule (acide nucléique le plus souvent) dans une cellule. Lorsqu'il s'agit d'une cellule végétale, celle-ci doit au préalable être débarrassée de sa paroi (elle est à l'état de protoplaste).

Encapsulation : emballage de l'acide nucléique du virus par les protéines de la capsid.

Réplicase : enzyme (ARN polymérase) qui réalise la copie d'un brin d'ARN viral en un autre brin d'ARN.

Silencing : extinction de l'activité d'un transgène.

Systémique : se dit de la diffusion d'un composé ou d'un virus dans toute la plante à partir d'un point d'entrée.

Transcrit : ARN résultant de la transcription de l'ADN d'un gène.

Virion : particule virale complète (acide nucléique + capsid + enveloppe éventuelle).

Glossary

travail de longue durée. Pour les plantes à multiplication végétative, la sélection clonale et, éventuellement l'exploitation de la variation somaclonale sont possibles.

La technique de transformation génétique des plantes, qui consiste à intégrer un gène étranger dans le génome d'un végétal afin de le rendre résistant à un ou plusieurs pathogènes, a été développée depuis 1985. Contrairement aux moyens utilisés pour obtenir la résistance aux bactéries et aux cryptogames, qui emploient principalement des gènes de résistance issus de végétaux, la résistance aux virus est majoritairement fondée sur l'utilisation de transgènes qui sont des séquences du génome viral agissant au niveau de la réplication ou de la propagation du virus d'où provient la séquence.

La présence d'un virus dans une plante peut interférer avec l'infection par un autre virus, avec pour résultat une protection croisée. La protéine d'enveloppe du premier virus inhiberait le désassemblage du second virus ou encapsiderait l'ARN de celui-ci, empêchant sa réplication. Cette protection croisée a été mise

en évidence dès 1954 [3] avec des plantes inoculées avec une souche bénigne du virus TSWV (virus de la maladie des taches bronzées de la tomate) qui protégeait contre l'infection ultérieure par une souche virulente (prémunition). C'est à partir de ce phénomène que les premières expériences de transgénèse utilisant des séquences virales ont été effectuées sur le tabac, plante facilement infectée par la plupart des virus et dont la transgénèse est aisée [4].

Les premières plantes transgéniques cultivées à grande échelle ont été des tabacs résistants à un virus en Chine dès le début des années 90. En dépit de l'efficacité du procédé, on connaissait alors encore mal le mécanisme de la résistance apportée par ce type de transgénèse.

Résistances médiées par les protéines

Dans un premier groupe de mécanismes, la synthèse d'une ou de plusieurs pro-

téines est indispensable pour conférer la résistance aux plantes transgéniques.

Protéines codées par des gènes de résistance de plantes (figure 1)

Les agents pathogènes ont développé au cours de leur évolution (qui, en ce qui concerne les virus, est rapide) des stratégies permettant de parasiter les plantes ; celles-ci en retour peuvent mettre en œuvre de nombreux mécanismes de défense. Les barrières physiques imposées par la cuticule et la paroi cellulaire de l'hôte agissent comme une première ligne de défense, complétée par la production de protéines et métabolites secondaires spécifiques. Certains pathogènes peuvent être reconnus spécifiquement par les plantes résistantes, grâce à l'interaction du produit d'un gène de résistance de l'hôte (gène *R*) et du gène d'avirulence complémentaire porté par le pathogène (gène *AVR*). Une transduction complexe du signal déclenche une réaction oxydative rapide et la transcription de gènes de défense de l'hôte codant pour des phytoalexines, hydrolases et protéines PR (*pathogenesis-related*) [5]. Les plantes concernées montrent souvent une réponse hypersensible (HR) qui se traduit par une mort cellulaire localisée au site d'attaque, limitant ainsi la propagation du pathogène. Cette perception locale d'invasion est transmise aux tissus éloignés par un composé diffusible, l'acide salicylique, qui induit un état de résistance systémique acquise (ou SAR pour *Systemic Acquired Resistance*) par expression de gènes de défense. Si l'un des gènes *R* ou *AVR* est dysfonctionnel, il n'y a pas de reconnaissance et la maladie se développe.

Le gène *R* code vraisemblablement pour un récepteur qui reconnaît la protéine AVR comme ligand, sa fixation déclenchant un signal de transduction qui mène à l'expression de la résistance. Dans le cas du gène *N* du tabac, conférant la résistance au virus de la mosaïque du tabac (TMV), la protéine virale qui est reconnue est une hélicase qui constitue une portion de la réplique virale (mais il peut s'agir d'une autre protéine, comme la protéine de mouvement, voir plus loin). Une plante transgénique exprimant ce fragment « hélicase » provoque l'élicitation de la réaction HR [6] et l'arrêt de l'infection. La protéine codée par le gène *N* présente beaucoup

d'homologies avec les protéines IIIR (récepteur de la protéine IIi impliquée dans une réaction immunologique inflammatoire chez l'homme) et Toll agissant par la fixation « récepteur Toll-ligand » qui permet la différenciation dorso-ventrale lors du développement embryonnaire de la drosophile, ce qui suggère une analogie de fonctionnement. Un domaine permet l'interaction protéine-protéine [7] de sorte que la protéine N pourrait activer un facteur de transcription provoquant l'expression de gènes impliqués dans la HR soit directement, soit par l'intermédiaire d'une molécule effectrice (comme une kinase, une phosphatase ou une protéase).

Les cultures de tabac et de tomate (*Solanacées*) sont fortement touchées par le TMV (*photo*). Le gène *N*, introduit dans une variété sensible qui en est dépourvue, induit le développement d'une HR en réponse à l'infection par TMV. Chez la tomate, il existe des gènes induisant une résistance à la plupart des souches de TMV en déclenchant une HR suite à l'infection mais, seul, aucun de ces gènes n'est efficace contre de multiples souches de Tobamovirus (cas du gène *N*). Afin de déterminer si le facteur *N* du tabac peut exprimer ses propriétés dans la tomate, une variété de tomate sensible à TMV a été transformée, avec transfert de ce gène [8]. Alors que les tomates non transformées présentent une infection systémique, une faible croissance et une réduction quantitative et qualitative de production, les lignées transformées présentent, 7 jours après l'inoculation, des nécroses localisées sur les feuilles inoculées. Ces tomates transgéniques ont été inoculées par ailleurs avec deux autres Tobamovirus possédant des homologies de séquence avec la souche utilisée pour les expériences précédentes, avec des résultats comparables.

Ces résultats montrent que la résistance liée au gène *N* dans le tabac est transférable dans la tomate et que, par conséquent, tous les composants requis (expression de *N*, reconnaissance du TMV et transduction du signal) sont présents dans cette espèce. À part le gène *N*, peu de gènes *R* permettant la reconnaissance et la résistance aux virus ont été isolés et caractérisés jusqu'à présent, malgré l'efficacité du transfert de ces gènes *R* entre espèces d'une même famille afin de leur conférer la résistance.

On pourra peut-être dans le futur utiliser aussi une stratégie mettant en œuvre les défenses naturelles de la plante, ceci en

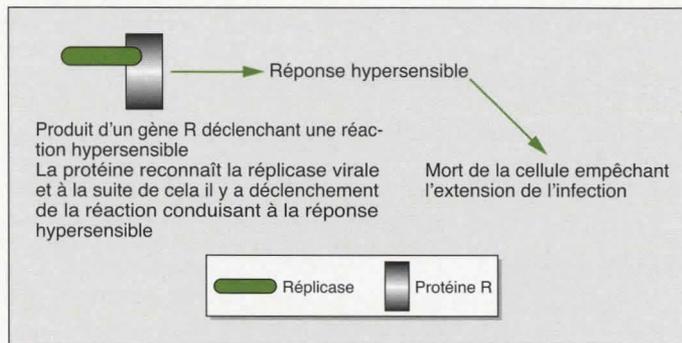


Figure 1. Mécanisme faisant appel à la synthèse d'une protéine : gène *R*. Ce procédé confère à une plante la capacité de réaction de type « politique de la terre brûlée » qu'ont déjà d'autres plantes. Le sacrifice des cellules d'entrée du virus empêche la diffusion de l'infection car le virus a besoin de la machinerie de la cellule (en particulier celle de la synthèse protéique).

Figure 1. Mecanism requiring protein synthesis: *R* gene.

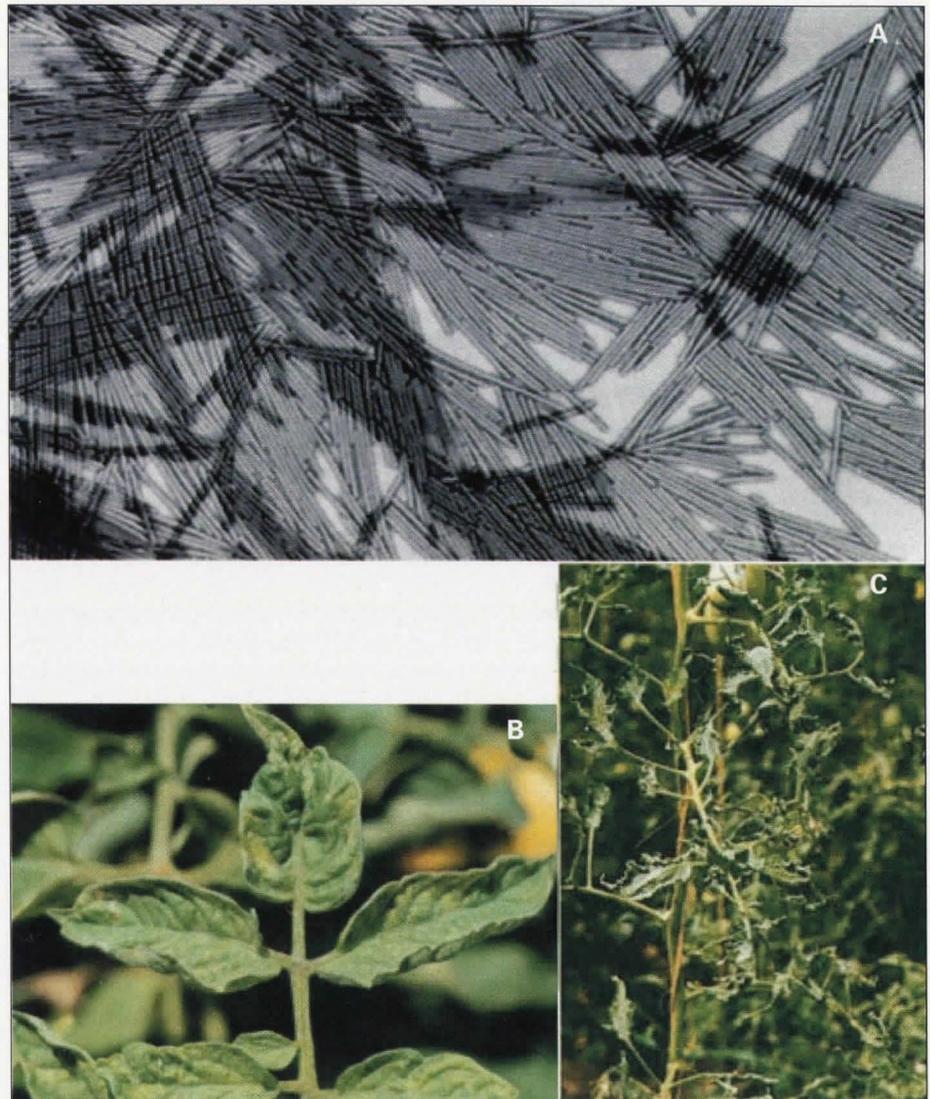


Photo. A : Virus de la mosaïque du tabac (Photo American phytopathological Society). Symptômes d'infection sur tomate (B : TMV, C : CMV).

Photo. A : Tobacco mosaic virus (TMV) (Photo courtesy of American Phytopathological Society). Infection of tomato with TMV (B) and CMV (C).

induisant une réaction de défense constitutive (ce qui présente l'avantage de conférer une résistance étendue à des pathogènes variés) ou en dotant de nouvelles plantes de systèmes de réaction hypersensibles qui seraient déclenchés par l'invasion du pathogène.

Protéine d'enveloppe virale (figure 2)

Les premières expériences de transgénèse induisant une résistance entremise par une protéine d'enveloppe (CP pour *coat protein*) ont produit des plants de tabac transgéniques exprimant un ADNc du gène de la CP de TMV [9].

Le génome du TMV est un ARN simple brin (+) protégé par une capsid constituée de 2 130 unités identiques de protéine d'enveloppe. Il existe trois phases dans le processus d'infection du TMV : une douzaine de molécules de CP sont d'abord dissociées de l'extrémité 5' de l'ARN du virus, puis des sous-unités ribosomales se lient à l'ARN découvert et, enfin, la traduction se poursuit le long du génome avec un déplacement cotraductionnel des CP restantes [10].

Les plantes exprimant le gène CP sont nommées CP+, les autres CP-. Les plantes transgéniques CP+ présentent des symptômes moins marqués ou retardés par rapport aux CP- et exigent un inoculum plus concentré (10^3 à 10^4) pour former le même nombre de sites d'infection que les CP-. Quand une forme non traduisible du gène est utilisée pour la transformation, il n'y a pas de protection. De plus une corrélation positive entre l'accumulation de la CP et le degré de résistance est observée, démontrant que la CP joue un rôle actif dans cette résistance en agissant sur un événement précoce de l'infection. Les caractéristiques de résistance sont identiques, que

l'on inocule des protoplastes ou des feuilles : dès lors l'interférence doit être postérieure à l'entrée du virus. Par contre, elle précède le désassemblage des particules virales car il n'y a pas de résistance quand l'ARN du TMV est utilisé comme inoculum. Des particules virales exposées brièvement à pH 8 (ce qui déplace 60 à 70 sous-unités de CP de l'extrémité 5') surmontent la résistance des protoplastes CP+. Quant à l'inoculation de particules pseudovirales artificielles (ARNm d'une enzyme marqueuse encapsidée par des CP de TMV) dans des protoplastes, elle se traduit par une synthèse de cette enzyme 100 fois moins importante dans les CP+ que dans les CP-. La protéine CP issue du transgène agit donc au niveau du désassemblage des CP du virus dans la première phase de l'infection.

Deux modèles ont été proposés pour expliquer le phénomène de résistance (figure 2) [11] :

- un composé cellulaire, agissant comme récepteur de virus, initialiserait le processus de décapsidation ; dans les plantes CP+, la CP pourrait se lier à ce récepteur, empêchant son association avec les particules infectantes ;
- l'initiation de la décapsidation étant un processus dynamique et réversible, l'équilibre entre le désassemblage et l'assemblage serait modifié en faveur de ce dernier dans le cytoplasme des plantes CP+.

La protection contre une souche apparentée au TMV, et présentant un taux élevé d'homologies de séquence d'acides aminés (80 %) (mosaïque de la tomate), est aussi efficace que la protection homologue, tandis qu'une souche possédant 45 % d'homologie (mosaïque du plantain) peut infecter les plantes CP+. La protection contre d'autres groupes de virus, dont le virus X de la pomme de terre (PVX) ou le virus de la mosaïque

de la luzerne (AIMV), est limitée voire nulle.

Certains transgènes modifiés peuvent induire un meilleur niveau de résistance que ceux correspondant aux CP sauvages. Par exemple, la CP du virus de la marbrure du tabac (TEV) ne protège pas le tabac contre le TEV, à moins que des séquences ne soient délétées de l'extrémité N terminale. La résistance ainsi obtenue est perdue si la protéine tronquée est mutée de telle sorte que l'autoassemblage des CP soit devenu impossible. La détermination de la structure tridimensionnelle des molécules de CP, et de leur rôle dans la régulation de l'infection et/ou de la réplication, devrait identifier les motifs des CP conférant une efficacité et une étendue de protection optimales.

Des expériences en champs réalisées avec des pommes de terre [12] et des concombres [13] transgéniques transformés par introduction d'un gène de CP de PVX et de CMV, respectivement, ont montré une protection efficace, stable au cours du développement de l'hôte et de ses générations successives. Dans le cas des concombres transgéniques, la CP utilisée provenait d'une souche virale non transmissible par pucerons, prévenant ainsi l'éventuelle encapsidation hétérologue d'un ARN viral sauvage par les protéines CP codées par le transgène, qui aurait pu lui conférer le mode de transmission par pucerons. En tout état de cause, comme il n'y a pas de modification du génome viral, une telle transmission hétérologue ne pourrait se faire qu'une fois, ce qui pourrait toutefois infecter des hôtes à propagation végétative.

La résistance induite par les CP, actuellement la plus utilisée, représente donc un moyen efficace pour la lutte antivirale, avec cependant l'inconvénient d'être restreint aux virus dont les protéines d'enveloppe ont une forte homologie avec la CP produite dans la plante transgénique.

Protéine de mouvement du virus dans la plante (figure 3)

La propagation systémique d'un virus dans l'ensemble d'une plante hôte se réalise par des déplacements, de cellule à cellule (et/ou à longue distance par les vaisseaux conducteurs) *via* des protéines de mouvement (PM). Le blocage du

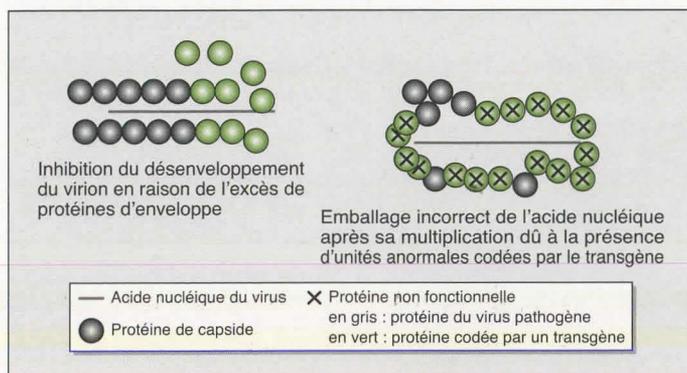


Figure 2. Mécanisme faisant appel à la synthèse d'une protéine : protéine de capsid fonctionnelle ou non fonctionnelle.

Figure 2. Mecanism requiring protein synthesis: regular or mutated capsid protein.

déplacement viral est naturellement présent dans certaines plantes. Par exemple, des plants de tomate portant le gène *Tm2a* (gène *R*) reconnaissent la PM du TMV (gènes *AVR*) avec déclenchement d'une réponse hypersensible conférant la résistance. Ce phénomène est aussi observé chez une pomme de terre sauvage résistante vis-à-vis du PVX et du PVY [14]. Le mouvement d'un virus entre cellules contiguës peut se réaliser selon deux mécanismes liés aux plasmodesmes assurant la continuité cytoplasmique entre deux cellules (continuité symplasmique). Le premier mécanisme correspond au déplacement de particules virales complètes, avec assemblage de tubules spécifiques induits par le virus dans les plasmodesmes.

Dans le deuxième mécanisme (utilisé par le TMV), ce n'est pas le virion qui est déplacé, mais le génome viral, *via* une PM qui agit sur le diamètre d'ouverture du plasmodesme. Dans des conditions normales, la limite d'exclusion des molécules à travers le plasmodesme est de 800 Da alors que, en présence de PM, des dextrans fluorescents de masse moléculaire supérieure à 10 kDa peuvent passer d'une cellule à l'autre [15]. Le ciblage des PM vers le plasmodesme implique l'association de la protéine avec les tubules corticaux. Plusieurs PM se lient *in vitro* aux acides nucléiques simple brin et formeraient, *in vivo*, avec l'ARN viral un complexe ribonucléoprotéique qui serait tracté jusqu'au plasmodesme modifié.

Des gènes de la PM d'une souche sauvage du TMV (PM+), ou d'une souche produisant une PM non fonctionnelle (dPM), sont transférés dans des plants de tabac qui sont ensuite infectés avec différents virus [16]. La quantification de l'évolution de l'accumulation virale montre que la résistance induite par dPM contre un Tobravirus, un Caulimovirus ou un Népotavirus est à peu près équivalente à celle contre le TMV. Alors que la dPM n'a que peu ou pas d'effets sur la quantité de virus hétérologues (autres que TMV) dans les feuilles inoculées, elle limite leur diffusion systémique. Au contraire, les plantes PM+ présentent des lésions étendues qui se développent très rapidement, avec la diffusion du virus dans toute la plante (en la rendant plus « conductrice » ou en supplémentant les fonctions de la PM virale). Ce mécanisme de la résistance fait intervenir la synthèse de la protéine dPM agissant comme protéine mutante négative dominante.

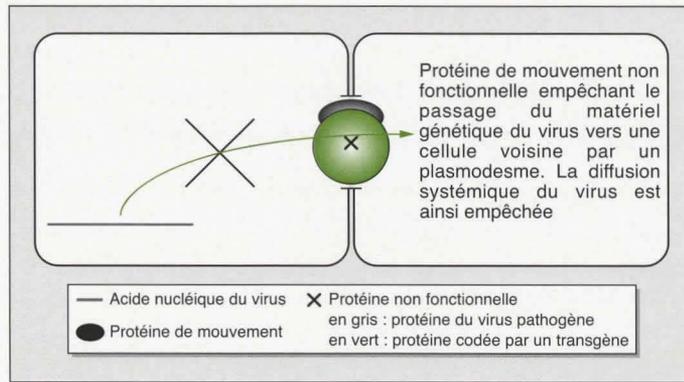


Figure 3. Mécanisme faisant appel à la synthèse d'une protéine : protéine de mouvement anormale.

Figure 3. Mecanism requiring protein synthesis: abnormal movement protein.

Les mécanismes de résistance liés aux PM impliquent généralement l'utilisation d'une protéine mutée, puisque la protéine sauvage facilite l'extension systémique des virus. L'expression d'une PM hétérologue (non adaptée pour un hôte particulier) peut interférer avec le processus induit par la PM homologue [17]. Ainsi, la transformation de *Nicotiana tabacum* avec le gène sauvage de la PM du virus de la mosaïque du brome (une plante non hôte pour ce virus) permet la résistance au TMV.

La résistance entremise par une PM est très efficace et généralement aspécifique, ce qui en fait l'intérêt.

Réplicase virale (figure 4)

La résistance entremise par une réplicase virale (Rep-RM) est fondée sur l'expression de gènes de réplicase sauvages ou mutés. Elle est généralement très spécifique et restreinte aux virus homologues ou étroitement apparentés à celui dont elle provient ; elle est indépendante de la concentration de l'inoculum et n'est pas corrélée au niveau d'expression du transgène. On a suggéré que cette résistance pourrait être induite par les transcrits (ARN) issus du transgène, mais de nombreux exemples établissent la nécessité

d'un ORF (cadre de lecture ouvert, c'est-à-dire codant potentiellement pour une protéine) et donc la synthèse d'une protéine [18] dans la mise en œuvre de cette résistance, dont les mécanismes sont peu connus par ailleurs.

Le génome du TMV code pour une protéine de 54 kDa, dont on pense qu'elle joue un rôle dans la réplication, bien que cette protéine ne soit pas détectable dans les plantes infectées. Les plantes transformées avec ce gène sont résistantes au TMV et aux virus apparentés ; elles ne présentent ni symptôme d'attaque virale, ni accumulation virale. Les nombres de cellules initialement infectées dans les plantes transgéniques et les plantes témoins sont identiques, mais la réplication virale est réduite dans les premières, avec limitation de l'extension de l'infection. Bien qu'elle ne soit pas non plus détectée dans les plantes transgéniques, la protéine est nécessairement impliquée dans la résistance puisque le codon d'initiation (donc la traduction de l'ARNm) est indispensable à sa mise en place [19, 20].

Des plants de tabac transformés avec un gène chimère issu de CMV (mosaïque du concombre (*photo*)), codant pour une réplicase tronquée (le domaine supprimé contient le motif commun à toutes les réplicases des virus à ARN : Gly-Asp-

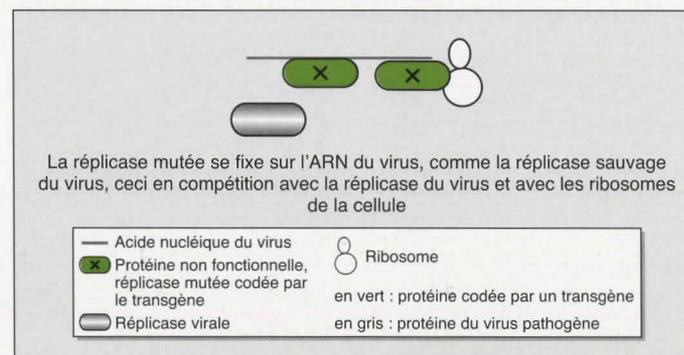


Figure 4. Mécanisme faisant appel à la synthèse d'une protéine : réplicase virale non fonctionnelle.

Figure 4. Mecanism requiring protein synthesis: mutated viral replicase.

Classification des virus et viroïdes cités en fonction de leur acide nucléique

Virus

ARNm (ARN messenger)

Tobamovirus particules allongées
Virus de la mosaïque du tabac (TMV)
Virus de la marbrure douce du poivre (PMMV)
Virus de la mosaïque de la tomate (ToMV)

Potexvirus particules allongées
Virus X de la pomme de terre (PVX)
Virus de la mosaïque du trèfle blanc (WCIMV)

Potyvirus particules allongées
Virus Y de la pomme de terre (PVY)
Virus de la mosaïque jaune du haricot (BYMV)
Virus de la marbrure du tabac (TEV)

Tombusvirus particules sphériques
Virus des taches annelées de l'orchidée (CyRSV)

Népovirus particules sphériques
Virus des anneaux nécrotiques du tabac (TRSV)

Bromovirus particules sphériques
Virus de la mosaïque du brome (BMW)

Virus de la mosaïque de la luzerne (AIMV)

Cucumovirus particules sphériques
Virus de la mosaïque du concombre (CMV)

ARN(-) (ARN antimessager : complémentaire de l'ARNm)

Tospovirus particules sphériques
Virus des taches bronzées de la tomate (TSWV)
Virus des taches chlorotiques de la tomate (TCSV)
Virus des taches annelées de l'arachide (GRSV)

ADN simple brin

Géminivirus particules sphériques
Virus de la mosaïque du manioc africain (ACMV)

ADN double brin

Caulimovirus particules sphériques
Virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV)

Viroïdes

ARN circulaire

Viroïde des tubercules en fuseaux de la pomme de terre (PSTVd)

ARN double brin

Viroïde de l'*exocortis des Citrus* (CEV)

Classification of viruses and viroids referred to the text

Asp), expriment une résistance partielle qui se traduit le plus souvent par un retard dans le développement des symptômes et seulement dans le cas de faibles

concentrations en inoculum ; cependant, quelques lignées montrent une forte résistance. La résistance contre le CMV entremise par la réplicase est très sem-

blable à une résistance au bactériophage observée chez *E. coli* [21]. La sous-unité b de l'ARN polymérase ARN-dépendante du phage est modifiable expérimentalement par mutation de la séquence consensus Gly-Asp-Asp. Les protéines présentant une substitution au niveau de Gly ne peuvent assurer la réplication et confèrent l'immunité, ce qui montre une interférence avec la traduction : la réplicase défectueuse inhiberait la synthèse de protéines par compétition avec les ribosomes pour l'accès au génome. Mais on peut aussi supposer que la réplicase issue du transgène interfère avec la fonction de la réplicase virale, avec diminution de l'expression des gènes viraux (dont ceux des PM) inhibant la diffusion systémique des virus.

Parfois, seule une réplicase mutée confère la résistance à l'infection ; c'est le cas pour une résistance obtenue contre PVY et AIM [22]. Au contraire, seul le gène sauvage de la réplicase du virus du brunissement précoce du pois est capable de doter des plants de tabac d'une résistance [10].

Dans certains cas de transgénèse avec un gène de réplicase, le niveau de résistance est variable et est indépendant du niveau d'accumulation de la protéine codée par le transgène [23]. Il peut même exister une résistance non accompagnée d'une protéosynthèse décelable, ce qui laisse penser que la synthèse de la protéine codée par le transgène ne joue pas un rôle dans la résistance qui serait induite directement par un acide nucléique (voir plus loin).

Protéine antivirale (RIP, pour *ribosome inactivating protein*) (figure 5)

Phytolacca americana et *P. dioica* synthétisent naturellement une famille de protéines dotées d'activité antivirale [24], qui enlèvent un résidu adénine aux ARNr des ribosomes eucaryotes. Leur fonctionnement reste mal connu, leur présence dans le cytoplasme devant théoriquement conduire à une mort cellulaire des plantes productrices. La protéine est exportée vers le compartiment pariétal et ne pénétrerait dans la cellule qu'avec le virus [25]. Le gène de *P. americana* codant pour PAPII a été cloné et introduit dans le tabac. Certaines lignées transgéniques produisent la protéine PAPII sans montrer d'altération de leur développement et

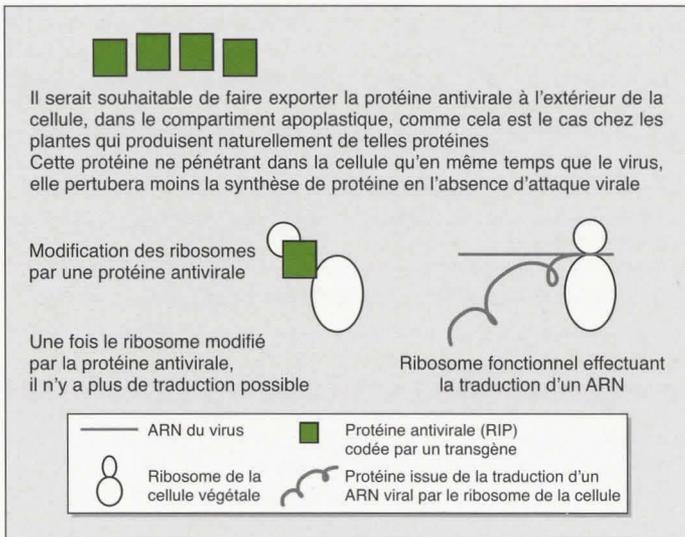


Figure 5. Mécanisme faisant appel à la synthèse d'une protéine : protéine antivirale.

Figure 5. Mecanism requiring protein synthesis: antiviral protein.

sont résistantes au TMV, au PVX et même à *Rhizoctonia solani*, un champignon phytopathogène [26]. Certaines protéines de ce type étant toxiques pour les mammifères, elles ne peuvent être utilisées pour la protection des végétaux.

Production d'anticorps dans les cellules végétales (figure 6)

Il s'agit là de faire synthétiser à un végétal des anticorps dirigés contre un virus, lui conférant ainsi une immunité similaire à celle mise en œuvre par le règne animal. L'anticorps, afin de ne pas nécessiter d'assemblage, sera un fragment simple chaîne (scFv), mais combinant des séquences variables portées normalement par les chaînes « lourde » et « légère ».

L'expression d'un scFv dirigé contre la protéine d'enveloppe du virus de l'artichaut (AMCV) a permis de réduire l'infection et d'en retarder les symptômes [27]. Cet anticorps était exprimé dans le cytosol car c'est là que se déroule la multiplication du virus, mais la stabilité de l'anticorps y est moins importante que s'il est exporté vers l'apoplasme où il peut s'accumuler. L'anticorps peut être dirigé vers le chemin de la sécrétion dans l'apoplasme grâce à un peptide signal de phytohématagglutinine ajouté à la séquence codante [28]. Mais, malgré une accumulation 50 000 fois plus élevée, la résistance observée n'est pas meilleure avec cet anticorps sécrété [29].

Une autre approche consiste à positionner les anticorps dans la membrane plasmique ; à cet effet, un domaine transmembranaire d'origine animale est

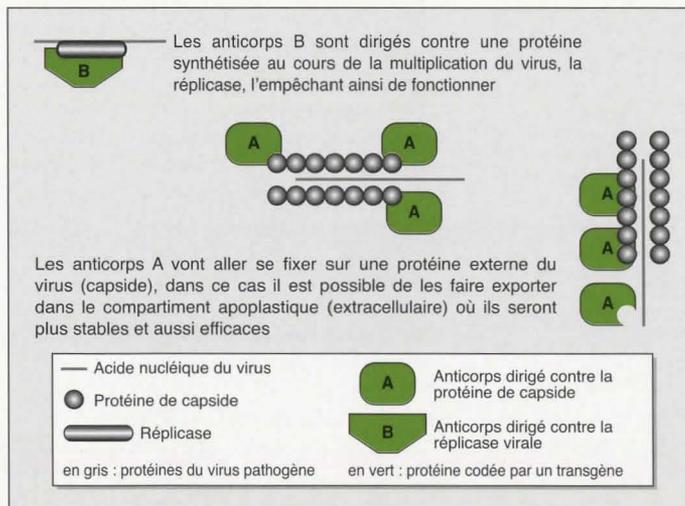


Figure 6. Mécanisme faisant appel à la synthèse d'une protéine : anticorps.

Figure 6. Mecanism requiring protein synthesis: antibodies.

ajouté à la séquence protéique de l'anticorps. La résistance à TMV ainsi obtenue chez le tabac est satisfaisante [30]. L'inconvénient de l'usage d'anticorps dirigés contre la CP est que la protection est limitée à une faible gamme de virus. Des anticorps dirigés contre un domaine conservé de réplicase ou de PM pourraient fournir une protection plus large. Il est même possible de faire produire un anticorps recombinant dirigé contre deux épitopes différents [30]. Les tests d'efficacité peuvent être effectués préalablement à la transgénèse végétale, en réalisant une infection par un virus (PVX) recombinant portant le transgène [31, 32].

Production d'une antiprotéase

Une autre stratégie faisant intervenir la synthèse d'une protéine d'origine non virale consiste à faire produire par la plante transgénique un inhibiteur de protéase. Cela est déjà utilisé pour la lutte transgénique contre les insectes ou les nématodes (oryzacystatine I), et de nombreuses plantes en produisent naturellement. Le cycle de reproduction de certains virus, dont les Potyvirus, fait en effet intervenir une protéase chargée de cliver une longue polyprotéine (346 kDa). L'antiprotéase, spécifiquement inhibitrice de la famille de protéases à inhiber, empêche cette étape de se produire et confère une résistance au virus. Ainsi, récemment, la résistance au virus Y de la pomme de terre (PVY) (ainsi qu'au TEV, virus de la marbrure du tabac) a été induite chez le tabac en faisant exprimer la cystatine du riz, l'oryzacystatine I, inhibant l'activité sulfhydryl-protéase [33]. Les auteurs suggèrent que ce type de protection pourrait être appliqué contre les Poty, Tymo, Népo, Como et Clostéovirus avec la même famille d'antiprotéase et à d'autres virus en utilisant d'autres types d'antiprotéases.

Résistance induite directement par un acide nucléique

Certains mécanismes de résistance s'expriment en l'absence de toute synthèse de protéine. Ils ont le plus souvent été décou-

verts à l'occasion d'expériences de transgène utilisant des gènes fonctionnels destinés à induire une synthèse protéique et dans lesquelles la résistance obtenue n'était pas corrélée au niveau de synthèse de la protéine codée. En utilisant des constructions dotées de gènes similaires mais rendus non fonctionnels ou tronqués, ou encore en orientation antisens, la résistance était encore obtenue, indiquant qu'elle dépendait du seul acide nucléique. Toutefois, l'interprétation de ces données est difficile et parfois encore compliquée par la polyploidie de la plante transformée [34]. Les phénomènes conduisant au *silencing* (c'est-à-dire à l'inhibition de l'expression d'un gène) constituent un domaine d'étude en constante évolution. La plupart des faits expérimentaux montrent la nécessité d'une transcription [35], mais la méthylation de l'ADN pourrait aussi jouer un rôle [34]. Enfin, on a observé des interactions entre infection virale et *silencing* de transgène non viral, d'une interprétation encore plus délicate [36].

ARN antisens (figure 7)

Certaines stratégies de résistance impliquent l'utilisation de gènes codant pour des ARN viraux antisens (AS-ARN, incapables de conduire à la synthèse des protéines) dont l'association avec les ARNm viraux qui leur sont complémentaires inhiberait la synthèse des protéines viraux. L'ARN double brin formé par ARNm viral et AS-ARN pourrait être ensuite dégradé par un mécanisme cellulaire de l'hôte, faisant intervenir des nucléases. La formation d'ARN double brin suivie de sa dégradation dans les plantes exprimant un AS-ARN s'exprime davantage quand celui-ci et l'ARNm cible sont accumulés dans le compartiment nucléaire, car il semble que l'ARN double brin formé dans le cytoplasme

soit très stable. La résistance par un AS-ARN est restreinte au virus (ou viroïde) homologue et aux souches très proches. L'utilisation d'AS-ARN constitue un moyen efficace de régulation génétique dans les organismes procaryotes et eucaryotes, comme le montrent les succès enregistrés en transgène végétale, par exemple pour la maturation retardée des fruits. Mais l'inhibition de la réplication de virus à ARN (ou ADN) nécessite une forte répression de l'activité des gènes viraux pour être efficace, car toute activité résiduelle reste néfaste. Les premières expériences fondées sur les AS-ARN ont utilisé des transcrits antisens de CP. Par exemple, un gène correspondant à la portion C-terminale et à la séquence 3' non codante complète de la CP du virus de la mosaïque jaune du haricot (BYMV) est introduit en orientation antisens dans *Nicotiana benthamiana* pour produire un AS-ARN. Plusieurs phénotypes de résistance ont été obtenus : quelques lignées transgéniques ont une immunité totale, mais la plupart sont infectés, avec des symptômes initiaux équivalents à ceux des témoins. Certaines développent des feuilles avec des symptômes réduits (récupération partielle), d'autres ne montrent plus d'accumulation virale (récupération totale). L'inoculation avec le virus ou l'ARN viral de trois souches différentes de BYMV produit des résistances équivalentes mais, quand deux autres Potyvirus sont utilisés comme inoculum, les plantes sont complètement infectées. Le mécanisme de protection par l'AS-ARN pour les Potyvirus semble résulter de l'interaction directe ARN-ARN entrant en compétition avec l'interaction ARN-protéine. Le manque de résistance aux autres Potyvirus pourrait découler d'une homologie insuffisante de séquence avec BYMV [37]. La région partiellement codante du transgène serait capable d'inhiber la traduction et le fon-

ctionnement de la polymérase virale, et la région 3' non codante pourrait affecter la liaison à cette même polymérase. L'importance des séquences régulatrices pour le ciblage antisens a été aussi établie par le retrait de nucléotides (dont le probable site de liaison de la réplicase) d'un transgène AS de TMV, qui abolit une résistance déjà faible [9]. Par ailleurs, un AS-ARN ciblé sur la région 3' non codante contenant le promoteur du brin (-) réduit significativement la réplication du virus quand il est coélectroporé dans des protoplastes avec des ARN viraux [38].

L'utilisation d'antisens de CP donne de bons résultats chez la pomme de terre (contre PLRV) ou le tabac (contre TEV), mais l'utilisation de séquences antisens autres que celles de CP est également efficace. Par exemple, la résistance au virus de la maladie des taches bronzées de la tomate (TGMV), un virus à ADN, est conférée par un ARN complémentaire à l'ORF codant pour une protéine requise dans la réplication [10]. L'interférence avec la production des brins (-) viraux peut constituer une stratégie efficace, car ceux-ci sont en moindre quantité dans les plantes infectées, ce qui pourrait être une étape limitante et conduire à diminuer la synthèse de brin (+), donc de la traduction. Des ARN antisens ciblant les intermédiaires (-) de la réplication du viroïde de l'*exocortis* des *Citrus* (CEV) sont beaucoup plus efficaces pour conférer une résistance que ceux dirigés contre les brins (+) [39]. Cette stratégie antisens est aussi utilisable pour contrôler l'infection par des Gémivirus, dont le génome à ADN induit la réplication virale dans le noyau. L'AS-ARN ciblé sur l'ARNm correspondant à la protéine Rep (seule protéine nécessaire à la réplication de leur ADN) a été utilisé [40]. Bien que cette résistance puisse s'expliquer par le phénomène de cosuppression, il semble que la diminution de réplication virale puisse être due à la liaison au génome, inhibant ainsi la réplication par interruption de la matrice pour la polymérase. L'inhibition de la traduction et/ou la compétition par rapport aux facteurs viraux ou à l'hôte nécessaires à la réplication pourraient également entrer en ligne de compte, de même que la perturbation de la maturation ou du transport des ARNm viraux.

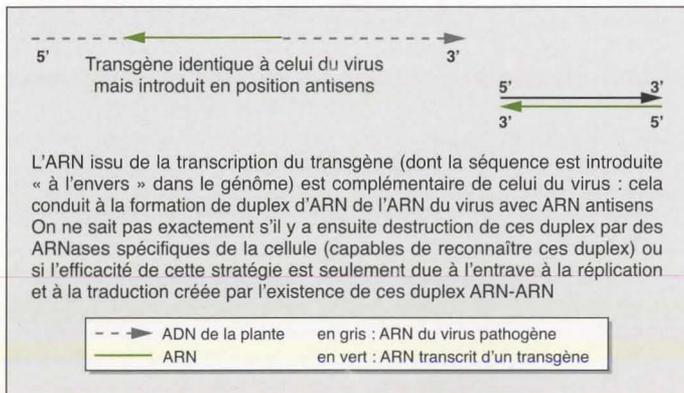


Figure 7. Mécanisme ne faisant pas appel à la synthèse d'une protéine : stratégie antisens.

Figure 7. Mécanisme not requiring protein synthesis: antisense strategy.

ARN « sens » (figure 8)

L'effet inhibiteur de l'accumulation d'ARN « sens » a été découvert lors

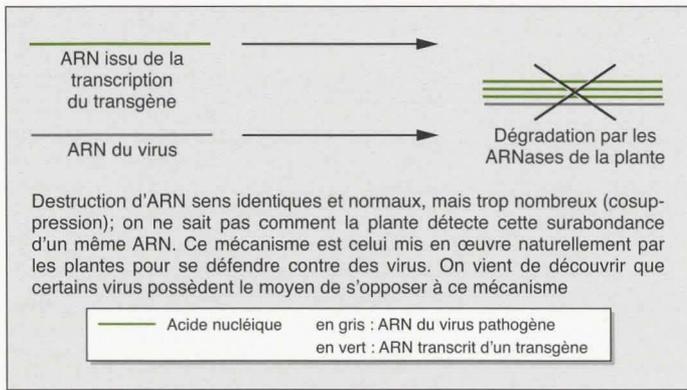


Figure 8. Mécanisme ne faisant pas appel à la synthèse d'une protéine : cosuppression (ARN sens).

Figure 8. Mecanism not requiring protein synthesis: cosuppression (sense RNA).

d'expériences de transgénèse utilisant des gènes de CP où des plantes résistantes étaient obtenues après transformation avec des gènes de CP dont le transcrit était intraduisible (cas pour PLRV et pour TSWV). Dans d'autres cas, la CP et l'ARN induisent tous deux la résistance, mais celle entremise par l'ARN est plus facilement surmontée (et par conséquent moins efficace dans la durée), comme dans les cas du virus de la mosaïque du concombre et du virus X de la pomme de terre [10]. La caractéristique de la résistance médiée par un ARN (ou ARN-RM) est un degré de résistance très spécifique qui n'est pas corrélé au niveau d'accumulation du transcrit.

Des plants de *N. tabacum* transformés avec une séquence codante (ORF) du gène de la CP du TEV, dont le transcrit produit est intraduisible [35], présentent, dans les plantes les plus résistantes, un niveau de transcription élevé mais une faible accumulation du transcrit. Les autres plantes (ayant un phénotype de récupération) présentent une moindre accumulation de l'ARN et de la protéine, mais une même intensité de transcription. Les deux types de résistance possèdent les caractéristiques d'une ARN-RM, les résultats obtenus pouvant s'expliquer par le phénomène de cosuppression, un mécanisme cellulaire actif permettant la dégradation spécifique des ARN issus du transgène et de son homologue viral [41].

Le déclenchement de l'ARN-RM est dépendant du nombre de copies du transgène. Les lignées avec trois insertions au moins du transgène sont très résistantes, alors que les lignées avec une ou deux insertions présentent le phénotype de récupération. En général, les études sur la ARN-RM ont montré que la présence d'une seule ou de plus de huit copies du transgène rend les plantes sensibles. Il existerait donc une limite

inférieure et une limite supérieure d'accumulation du transcrit entre lesquelles le système de dégradation cytoplasmique est déclenché. La présence d'une unique copie ne produirait pas suffisamment de transcrits pour déclencher le système, sauf s'il existe un positionnement optimal du transgène près d'une séquence activatrice [35]. L'utilisation d'autres séquences que celles codant pour la CP s'est aussi montrée efficace, par exemple celle d'un gène de polymérase du PVX [42].

Le phénomène de *silencing* post-transcriptionnel (tout comme le *silencing* transcriptionnel), peut se développer dans des plantes non transformées, en réponse à une infection virale, limitant de la même façon la réplication du virus considéré [43]. Ce phénomène est couramment rencontré lors de la transgénèse « sens » chez les végétaux, lorsque le transgène est identique ou homologue à un gène endogène : au lieu de la surexpression attendue on observe alors une diminution de l'expression par rapport aux témoins non transgéniques. Le mécanisme le plus probable de ces phénomènes (et de la ARN-RM) correspondrait à une cosuppression, l'excès de transcrits dû au transgène déclenchant un système de surveillance cytoplasmique ciblant les ARN contenant la même séquence. Le clivage du transcrit produit par le transgène et l'ARN viral correspondant provoquerait une diminution de la réplication virale. Cette dégradation s'initie par le clivage spécifique de séquences particulières de l'ARN et ne semble donc pas être aléatoire, du moins dans le cas de la résistance au TEV [41] ou dans celui de la résistance des pruniers à la maladie de la Sharka, par expression du gène de la CP du virus responsable [44].

Mais il est possible aussi que le phénomène de ARN-RM soit dû à une com-

pétition entre le transcrit et l'ARNm viral homologue pour l'accès aux facteurs viraux ou à ceux de l'hôte nécessaires à la réplication. Ou encore à la formation d'ARN double brin entre le transcrit et un ARN simple brin (-) complémentaire, intermédiaire de la réplication virale, comme dans le cas de la résistance au PVYN de plantes transformées avec le gène de la CP [45].

La résistance par l'ARN sens est efficace ; cependant, tout comme celle utilisant la stratégie antisens, elle est restreinte au virus homologue. Le mécanisme de cosuppression correspond vraisemblablement à celui mis en œuvre par les plantes elles-mêmes pour lutter contre les virus [46]. Cependant il a été montré que certains virus sont capables d'inhiber ce type de résistance grâce à des protéines empêchant la cosuppression [47, 48]. Ce qui pourrait bien expliquer un phénomène observé chez une plante transgénique qui présentait une cosuppression : la disparition de cette cosuppression consécutive à une infection virale [36]. Cette dernière observation doit d'ailleurs amener à s'interroger sur ce qui peut se passer lors de l'infection d'une plante transgénique résistante à un virus grâce à la cosuppression par un autre virus doté de cette arme anti-cosuppression...

ARN sens et antisens

Une résistance contre le virus PVY a été obtenue chez le tabac en introduisant une construction génétique comportant, associées côte à côte, deux séquences identiques de protéase du PVY, l'une en orientation sens et l'autre en antisens [49]. La proportion de lignées résistantes est plus élevée qu'avec une construction exclusivement sens ou exclusivement antisens. Ceci tend à valider l'hypothèse selon laquelle la formation de duplex d'ARN serait à l'origine du *silencing* post-transcriptionnel. L'injection de duplex d'ARN suffit également à initier un tel *silencing* chez un nématode [50]. Par ailleurs, le signal pour le *silencing* est transmissible par greffe chez un végétal [51].

ARN satellites (figure 9)

Les ARN satellites (Sat-ARN) sont de petites molécules d'ARN dont la réplication est totalement dépendante de la polymérase virale d'un virus assistant (*helper*). Les Sat-ARN n'ont pas de forte homologie de séquence avec le génome de leur virus assistant, excepté au niveau

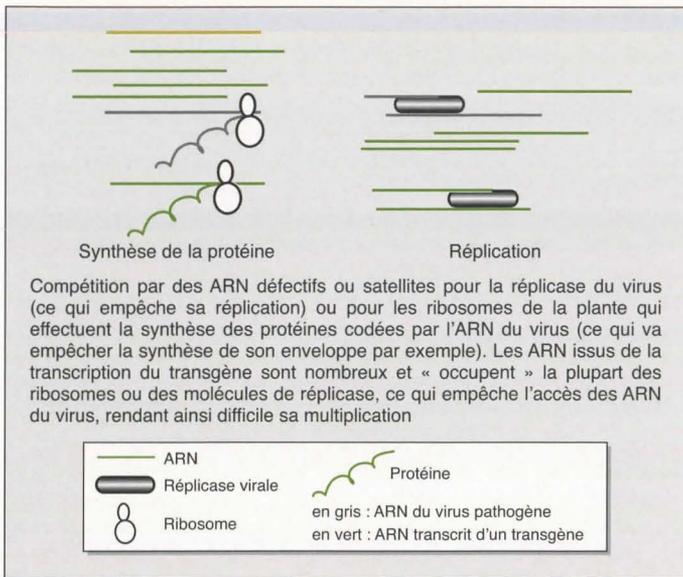


Figure 9. Mécanisme ne faisant pas appel à la synthèse d'une protéine : ARN défectif ou satellite.

Figure 9. Mecanism not requiring protein synthesis: satellite or defective RNA.

du site de reconnaissance de la polymérase. La présence de Sat-ARN dans une plante infectée par un virus est souvent corrélée à une diminution des symptômes, ceci vraisemblablement en raison d'une compétition entre la réplication du virus et celle de l'ARN satellite. Les ARN répliqués par la polymérase virale sont encapsidés par les CP du virus assistant ou s'accumulent dans la cellule infectée. Il est possible que leur transmission soit simultanée et de même type que celle de leur virus assistant. Les Sat-ARN ont un virus assistant spécifique ; cependant si des Sat-ARN ont des homologies de séquence, leurs virus assistants sont interchangeables. Les points communs à tous les Sat-ARN sont :

- leur dépendance vis-à-vis du virus assistant pour leur réplication ;
- leurs différences de séquences par rapport à celui-ci ;
- leur forte stabilité *in vivo* et *in vitro* grâce à une structure secondaire compacte. La plupart des Sat-ARN n'ont pas de fonction messagère *in vitro* (bien qu'il existe des cadres de lecture), ce qui les rend comparables aux viroïdes. Certains Sat-ARN de Népovirus codent pour une protéine de fonction inconnue. Dans la plupart des cas, les Sat-ARN apparaissent soudainement dans un isolat viral qui en est initialement dépourvu. Par exemple, des isolats de CMV n'ont généralement pas de Sat-ARN lors de leur première inoculation dans le tabac, mais seulement au bout du troisième ou quatrième passage ; en revanche, il n'y a pas d'accumulation de Sat-ARN chez les Cucurbitacées infectés par le CMV.

Deux explications possibles rendent compte de la spécificité d'accumulation par rapport à la plante-hôte : soit le Sat-ARN serait initialement présent (en quantité indécélable) dans l'inoculum, soit l'ARN polymérase virale amplifierait un ARN issu de la cellule saine (ou produirait un tel ARN par son activité catalytique).

Certains Sat-ARN pourraient avoir une lointaine origine virale, comme celui du virus des anneaux noirs de la tomate ; d'autres se seraient développés à partir d'un ARN de la plante-hôte à l'exemple du Sat-ARN du virus du rabougrissement de l'arachide. Le Sat-ARN virulent du virus de la frisolée du chou (TCV) possède à la fois des séquences relativement homologues à l'ADN du chou et une séquence homologue à la région non codante de l'ARN génomique de son virus assistant.

Un vecteur chimérique comprenant le Sat-ADNc et le gène codant pour la CP de CMV a été utilisé pour transformer une variété de tabac. Des vecteurs ne contenant que le Sat-ADNc ou le gène de la CP ont également été utilisés pour la transformation, donnant des plantes appelées Sat-ARN+ et CP+. La souche CMVb (qui ne possède pas de Sat-ARN) sert d'inoculum [52]. Les symptômes sont plus marqués chez les plantes CP+ que chez les plantes Sat-ARN+. La réplication du Sat-ARN interférerait avec celle du CMV, conduisant à des symptômes atténués. La concentration de CMV dans les plantes Sat-ARN+ est à peu près égale à 15 % de celle dans les plantes témoins ; elle est de 4 % dans les

plantes CP+/Sat-ARN+. Enfin, 70 % des plantes transformées avec le vecteur chimérique ne développent pas de symptômes 90 jours après l'inoculation, leur résistance est beaucoup plus élevée que celle des plantes transformées avec l'un ou l'autre des gènes.

Des 12 plantes CP+/Sat-ARN+, 12 expriment le Sat-ADNc, 11 expriment la CP, et seulement 9 possèdent un Sat-ARN double brin, détecté après l'infection. Comme le CMVb ne possède pas de Sat-ARN, ce dernier ne peut provenir que de la réplication du Sat-ARN issu du transgène. L'absence de Sat-ARN double brin dans trois plantes peut être due au fait que la CP confère une résistance précoce à l'infection, réduisant de la sorte la réplication du Sat-ARN qui dépend de l'expression de la polymérase de CMV.

La résistance entremise par le Sat-ARN apparaît plus efficace que celle entremise par la CP, la réplication virale étant davantage inhibée. De plus, la combinaison des deux transgènes induit un niveau de résistance plus élevé que chacun isolément, probablement parce qu'ils agissent à deux phases distinctes de l'infection : la CP à une étape précoce en bloquant le développement du virus, le Sat-ARN en limitant la réplication.

Il y a lieu de considérer que certains Sat-ARN peuvent s'avérer extrêmement pathogènes, ce qui crée des dangers potentiels par sélection de Sat-ARN mutants.

ADN et ARN défectifs (figure 9)

À la différence des Sat-ARN, les ARN et ADN viraux défectifs (*defective interfering* = DI-ARN ou DI-ADN) ont une certaine homologie avec leur virus assistant. Ce sont des mutants issus de délétions produites pendant la réplication d'un génome viral ; ils ne peuvent être répliqués de façon autonome mais conservent les séquences nécessaires pour être répliqués par leur virus assistant. La présence d'acides nucléiques défectifs dans une plante est souvent corrélée à une atténuation des symptômes quand celle-ci est infectée par le virus assistant. Comme pour l'ARN satellite, il existerait une compétition au niveau de la réplication s'exerçant aux dépens de l'ARN ou de l'ADN génomique viral.

Des plants de *Nicotiana benthamiana* ont été transformés avec un DI-ADN (D13)

du virus des taches annelées de l'orchidée (CyRSV), dans l'orientation sens ou antisens [53], ce qui fournit des plantes transgéniques dénommées respectivement D13(+) et D13(-). Les plantes sont inoculées avec des transcrits (G11), issus de synthèse *in vitro* à partir d'un clone d'ADN complémentaire du génome complet du CyRSV qui ne possède pas de DI-ARN détectable. Quand G11 et des transcrits synthétisés *in vitro* de D13 sont co-inoculés dans une plante de *N. benthamiana* non transformée, les deux ARN s'accumulent et les plantes sont protégées contre la nécrose apicale, symptôme classique de l'infection par le CyRSV. Des transcrits sont détectés dans les plantes transgéniques non infectées, quelle que soit leur orientation ; cependant, l'inoculation avec le virus parental n'induit l'accumulation du DI-ARN dans les plantes que s'il est orienté positivement avec, dans ce cas, protection vis-à-vis de la nécrose apicale. En effet, après l'inoculation, les plantes D13(+) et D13(-) développent tout d'abord des symptômes équivalents à ceux des témoins (chlorose, nécrose), mais les feuilles qui se forment ensuite sur les plantes D13(+) ont les symptômes typiques d'une infection modulée par les DI-ARN (chlorose moins prononcée, zones vert foncé). Ces plantes peuvent produire des fleurs et des graines, contrairement aux plantes D13(-) et aux non-transgéniques témoins. Une inoculation avec le virus purifié extrait de plantes non transformées inoculées avec les transcrits de G11 produit des résultats identiques à ceux obtenus par inoculation de transcrits. Cette résistance n'est pas surmontée quand des concentrations plus élevées d'ARN viral sont utilisées dans l'inoculum, et elle est indépendante du niveau de transcrits produits. Le fait qu'il n'y ait pas de réplication ni d'accumulation du DI-ARN dans les plantes D13(-) suggère que le brin (-) n'est reconnu par la réplicase virale que dans la forme double brin produite après le premier cycle de réplication du brin (+) [53].

La formation de mutants DI-ARN ou DI-ADN est rare en conditions naturelles, mais il est possible de les construire artificiellement en vue de leur utilisation pour lutter contre diverses souches virales. Ainsi, un DI-ARN artificiel du virus de la mosaïque du brome protège les plantes transformées contre ce virus [54]. L'utilisation des ARN satellites, DI-ADN ou DI-ARN pour entretenir la

résistance est donc très efficace, car elle touche directement la réplication du virus assistant et limite sa dissémination systémique ; elle est cependant très spécifique, ce qui limite ses possibilités d'emploi. Si en général les Sat-ARN et DI-ARN atténuent la maladie due au virus assistant, il n'en est pas toujours de même. Ainsi, le DI-ARN d'un carmovirus accentue les symptômes de son virus parent, tandis que le Sat-ARN du CyRSV accentue les symptômes quand il s'exprime dans la plante hôte avec son virus assistant [53].

Le système des Sat-ARN comporte cependant quelques risques : des souches peu virulentes utilisées en vue de la protection pourraient causer des dégâts aux cultures autres que celle de la plante hôte, muter en souches virulentes ou, par recombinaison avec un autre virus, étendre sa gamme d'hôtes ou sa virulence. Il en va ainsi pour des Sat-ARN de souches peu virulentes du CMV dont la mutation pourrait être néfaste à la plante, car ils ne diffèrent que par quelques nucléotides des Sat-ARN de souches virulentes accentuant les symptômes du virus assistant.

Ribozymes (figure 10)

Les ribozymes, découverts à l'occasion de l'étude des mécanismes d'autoépissage, sont de petites molécules d'ARN capables d'un clivage catalytique très spécifique des ARN messagers ; ils seraient donc théoriquement à même d'inhiber l'expression des gènes. Ces ribozymes peuvent être couplés artificiellement à des séquences d'ARN capables de les fixer spécifiquement par complémentarité sur des ARNm déterminés, afin de couper ces derniers et d'empêcher ainsi la synthèse des protéines correspondantes.

Ainsi, une variété de pomme de terre a été transformée avec différents ribozymes artificiels ciblant l'ARN du viroïde des

tubercules en fuseau de la pomme de terre (PSTVd), dont la réplication est nucléaire et dépendante des enzymes de l'hôte [55]. Une région de l'ARN(-) du PSTVd est choisie pour la construction d'un ribozyme R(-) clivant ce brin (-). Le R(-) est dirigé vers un site probable de liaison de l'ARN polymérase II. Un mR(-) possédant une mutation au niveau du site catalytique a aussi été construit. Un R(+) cible l'ARN(+) au niveau d'un probable site de liaison de l'ARN polymérase cellulaire qui réplique le viroïde. L'observation de l'accumulation du viroïde montre que les ribozymes dirigés contre les intermédiaires de réplication ARN(-) peuvent conférer de hauts niveaux de résistance ; les ribozymes ciblant les ARN(+) de PSTVd n'induisent qu'une faible résistance. Comme on peut s'y attendre, les mR(-), dépourvus d'activité catalytique, sont inefficaces.

Des résultats similaires sont obtenus par l'utilisation d'ARN antisens (AS-ARN) ciblant les ARN(-) ou (+) de PSTVd. Donc l'ARN(-) est apparemment plus accessible à l'AS-ARN ou au ribozyme, peut-être en raison d'une synthèse plus réduite des ARN(-) ou de leur dégradation plus rapide par rapport aux ARN(+). Ceci pourrait permettre une meilleure efficacité de dégradation de l'ARN(-) par le ribozyme, puisqu'ils sont moins nombreux et peut être plus accessibles.

Donc, le R(-) est capable d'inhiber la formation de PSTVd(-) et d'empêcher la synthèse de PSTVd(+), ce qui rend le viroïde indétectable dans la majorité des plantes transgéniques. Cependant, peu de plantes transformées avec R(+) ont été obtenues, et il se pourrait que ce facteur interfère avec la croissance normale des plantes hôtes.

Un autre facteur influençant l'efficacité du ribozyme est l'espèce de la plante transgénique. Des tomates transformées avec R(-) ne modifient pas l'accumula-

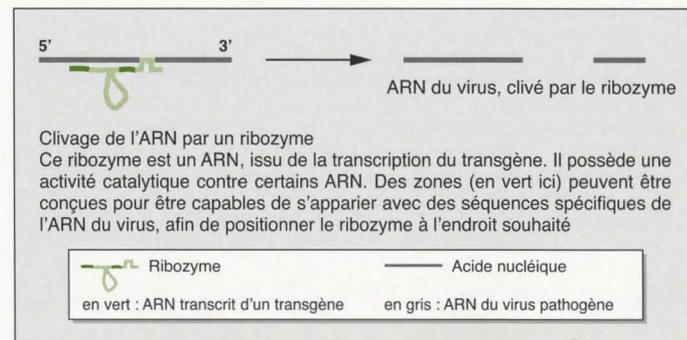


Figure 10. Mécanisme ne faisant pas appel à la synthèse d'une protéine : ribozyme.

Figure 10. Mécanisme ne nécessitant pas de synthèse protéique : ribozyme.

Summary

Virus resistance mechanisms in transgenic plants

C. Dutilleul, É. Lainé

Plant viruses are made of a single or double stranded DNA or RNA genome contained within a protein capsid. Once infected, a plant usually remains a source of virus throughout its life. Unlike fungal diseases, no chemical treatments are available to control viral diseases. During their evolution, some plant species have developed virus resistance traits which can be introgressed into crops, provided they can be crossed with their wild counterparts. Such breeding programmes take time and often result in a loss of quality traits in the resistant hybrids. An exemple is the use of the tobacco N gene to confer tobacco mosaic virus (TMV) resistance in tomatoes. TMV infection of tomato plants expressing the N gene triggers a hypersensitive response capable of preventing virus spread from the initial site of infection. Genetic engineering offers new possibilities for interspecies transfer of virus resistance traits. Very few resistance genes have been cloned so far, and a number of alternative strategies have been developed to increase the level of virus resistance in transgenic plants expressing virus genes.

The first report was that of transgenic tobacco plants expressing the TMV coat protein (CP) gene, which were shown to display delayed or attenuated symptoms following infection. It later appeared that the protection extended to other viruses whose CP were highly homologous to that of TMV. Abundant coat protein in transgenic plants probably interferes with the virus uncoating step, which is a prerequisite to the replication of the viral genome soon after infection. This strategy has since been successfully used on a number of species. For example, the overexpression of CP genes of potato virus X or cucumber mosaic virus in their otherwise susceptible plant species resulted in increased virus resistance of plants grown in the field.

Preventing the spreading of viruses in plants is another way to confer a certain level of resistance. Viruses or their genome use movement proteins to pass from cell to cell via plasmodesmata. The production of a mutated movement protein in transgenic plants interferes with this process, presumably by competing with the wild-type protein for binding sites on the plasmodesmata, on the viral genome or on the virus. Resistance to TMV and other viruses has been recorded in tobacco plants expressing a mutated version of the TMV movement protein gene. The amount of virus at infection sites was not decreased but their diffusion through the plant was impaired. Movement protein-mediated virus resistance is generally efficient and unspecific.

The transformation of plants with virus genes encoding replicase sometimes also results in virus resistance. This has been demonstrated in tobacco plants expressing the TMV replicase. The protection is quite specific and does not extend to unrelated viruses. The mechanisms involved are not clear and there is some uncertainty whether the resistance is caused by the protein itself or by its encoding mRNA. In some cases a mutated replicase gene was more effective than the wild-type gene.

The production of antisense RNAs in transgenic plants has been widely used for decreasing the expression of endogenous genes as a tool for physiological studies or for introducing interesting traits to a given crop. The mechanisms by which antisense RNAs decrease gene expression has been intensively debated. They could act at both transcriptional and translational levels for decreasing gene expression. A number of virus genes have been used as targets for antisense RNAs. In some cases, the antisense RNA produced in the transgenic plants is thought to have interfered with virus replication. The level of resistance was highly variable, ranging from susceptibility to complete resistance, depending on the transgenic lines.

The overexpression of a transgene related to an host-endogenous gene sometimes results in a decrease of expression of the endogenous gene. This cosuppression phenomenon is related to a natural defence mechanism against plant viruses. Cosuppression of virus gene expression successfully resulted in the acquisition of virus resistance in transgenic plants, as shown in potato plants expressing the potato virus X polymerase gene. The level of resistance induced by antisense RNA transgene was highly variable among transgenic lines, and restricted to closely related viruses.

Satellite RNAs (sat-RNAs) are small RNAs whose replication is dependent upon the polymerase of a helper virus. In virus-infected plants, the presence of a sat-RNA usually results in weaker symptoms, probably because the sat-RNA competes with the viral RNA for binding to the polymerase. Apart from a strong homology at the polymerase recognition site, sat-RNAs show no or little homology with virus genomes and do not usually contain any coding sequence. Expression of a sat-cDNA in transgenic tobacco resulted in a decreased concentration of cucumber mosaic virus after infection, as compared to wild-type plants. The resistance was enhanced when the viral coat protein gene was also introduced into transgenic plants, indicating the potential interest of combined strategies. An approach similar to sat-RNA is to transfer to plants defective viral genomes for them to compete with intact virus replication. Some sat-RNA strains, however, induced heavy symptoms, i.e. necrosis in tomatoes.

Ribozymes are small RNA molecules having specific endoribonuclease activity. Their efficiency to decrease virus expression in transgenic plants did not compare so far to that of antisense RNAs, ribozymes directed against viral mRNAs leading to marginal resistance.

A number of strategies can be considered to confer virus resistance, using gene transfer in plants but conclusive field trials are lacking. Strategies could also be combined to decrease the probability of the rapid emergence of viral strains able to overcome resistance of transgenic plants.

Cahiers Agricultures 2001 ; 10 : 105-119.

tion de PSTVd : il se peut que le viroïde soit capable de se répliquer plus vite dans la tomate que dans la pomme de terre de sorte que le ribozyme, même actif, n'aurait pas un pouvoir inhibiteur suffisant [55].

Bien que le clivage de l'ARN par les ribozymes donne de bons résultats *in vitro*, les effets sont parfois moins marqués *in vivo*, ce qui fait que les applications de cette technique tardent à se manifester. L'efficacité optimale du ribozyme semble être liée à la colocalisation avec son substrat dans le noyau : un ribozyme utilisé contre des virus à répllication cytoplasmique retarde seulement le développement des symptômes, alors qu'il bloque totalement la multiplication des virus ou viroïdes à phase nucléaire [56].

Eu égard à la spécificité des séquences de fixation, l'utilisation d'un ribozyme est limitée à la protection contre les molécules homologues.

Conclusion

Il existe divers types de transgènes utilisés pour l'amélioration des plantes dans le but de les rendre résistantes aux virus. Le phénomène de protection croisée ayant été mis en évidence de longue date, la plupart de ces transgènes proviennent du génome viral, car la technique de résistance par transgénèse s'est d'abord développée en partant de l'idée qu'un composant viral pouvait limiter l'infection en étant présent soit sous une forme dysfonctionnelle, soit en excès, soit encore à un stade inapproprié de la répllication. Cependant, certains gènes de résistance naturellement présents dans les plantes ou encore les ribozymes sont également employés de façon efficace comme transgènes.

Les stratégies utilisées appartiennent à deux catégories : celles qui nécessitent la production de protéines et celles qui sont fondées sur la présence ou l'accumulation d'acides nucléiques. En général, les premières permettent une résistance à spectre large, alors que les dernières sont plus spécifiques d'une souche particulière de virus.

Si les protections conférées par les ARN sont plus limitées que celles découlant de la synthèse de protéines, elles sont en revanche potentiellement plus durables, car l'homologie des séquences substantielles ne peut être contournée par de

simples mutations ponctuelles du virus. De plus, cette protection peut être étudiée de façon à ce que les risques découlant de recombinaisons soient limités, en introduisant dans les séquences des codons « stop » qui empêcheront une éventuelle traduction [57]. Dans les cas où des séquences du génome viral sont utilisées, l'utilisation d'un transgène codant pour un ARN non traduisible a l'avantage (par rapport à une forme traduisible conduisant à la synthèse d'une protéine) de ne présenter aucun risque de complémentation avec un virus infectant déjà la plante. En effet, des recombinaisons entre le transcrite d'un transgène et un ARN viral pourraient conduire à accroître la virulence ou le spectre d'hôte du recombinant.

L'utilisation de combinaisons de transgènes peut être efficace pour augmenter la résistance d'une plante à un virus particulier (combinaison d'un ARN satellite et d'un gène de protéine d'enveloppe par exemple) ou à plusieurs groupes de virus (par exemple, combinaison des gènes codant pour les protéines d'enveloppe du PVX et du PVY). Cependant, on ne peut pas créer ces combinaisons au hasard, certaines étant moins efficaces que chaque séquence employée isolément, comme c'est le cas pour la combinaison d'un ribozyme et d'un ARN antisens.

Les techniques utilisées pour rendre les plantes résistantes aux viroïdes sont beaucoup plus restreintes que dans le cas des virus, car les premiers ne contiennent aucune protéine et dépendent des fonctions de l'hôte pour leur répllication : la résistance par transgénèse contre les viroïdes est donc exclusivement fondée sur l'utilisation de ribozymes (ARN ayant des propriétés catalytiques), d'ARN antisens, ou d'une ribonucléase spécifique des ARN double brin formés lors des cycles de répllication.

Les risques potentiels de ces méthodes apparaissent assez limités ; pour la plupart, ils existent déjà car les événements de recombinaison ou de transencapsidation sont possibles lors d'infections naturelles par plusieurs virus. Pour plusieurs stratégies, l'utilisation de séquences modifiées, afin de supprimer la fonctionnalité de la protéine (par exemple, pour CP, capacité à s'assembler ou à conférer un mode de transmission), constitue une précaution souhaitable. Reste le problème des synergies, qui rend nécessaire une évaluation complète des plantes transgéniques pour leur résistance aux virus non visés par la transgénèse, tout du moins

tant que les gènes responsables de cette synergie ne seront pas identifiés. Enfin, les Sat-ARN sont à manier avec précaution étant donnée la rapide évolution possible vers une pathogénicité nouvelle. Un autre aspect à considérer, comme pour tous les transgènes conférant une résistance à un pathogène, est le risque d'évasion du gène vers d'éventuels adventices apparentés (*via* le pollen), ce qui pourrait leur apporter un avantage adaptatif. Pour plus de détails sur ces risques on pourra se référer à l'ouvrage édité par Tepfer et Balazs, *Virus-resistant transgenic plants : potential ecological impact* [58] ainsi qu'à la synthèse de Miller *et al.* [59].

Quelques moyens préventifs ont été imaginés, comme flanquer le transgène de gènes désavantageux pour le récepteur sauvage (gène de domestication, gène de toxine pour lequel un répresseur est codé par un autre transgène porté par un chromosome différent, etc.). Cependant, de nombreuses résistances ont déjà été transférées aux plantes cultivées par des moyens de sélection traditionnelle sans que cela ait posé problème jusqu'à présent. Malgré l'efficacité de la transgénèse comme inductrice de résistances aux virus, les mécanismes cellulaires de la résistance restent encore mal connus. Le rapprochement avec certains mécanismes de reconnaissance étudiés chez les bactéries ainsi que les homologies de séquences permettent parfois d'étayer des hypothèses quant au rôle de certaines protéines impliquées dans les différentes formes de résistance aux virus. Tous les exemples de succès obtenus décrits ici ne doivent pas faire oublier que la stratégie efficace contre un virus donné chez une espèce végétale particulière n'est pas nécessairement transposable à un autre couple virus-plante.

Une connaissance plus détaillée du déroulement de l'infection virale (fonctionnement des réplicases virales, des protéines de mouvement assurant l'infection systémique de l'hôte, assemblage des virions par les protéines d'enveloppe) et des facteurs favorisant l'acquisition des virus et leur transmission par des vecteurs devrait permettre de déterminer le type de stratégie le plus efficace pour induire la résistance des plantes transgéniques vis-à-vis des virus et viroïdes. La multiplicité des stratégies disponibles permet de penser que la lutte par transgénèse contre les virus peut constituer un apport considérable pour l'amélioration des végétaux cultivés ■

Remerciements

À François Guérineau pour son aide, depuis la recherche de documentation jusqu'au résumé en anglais...

Références

- Kummert J, Semal J. Les virus et viroïdes phytopathogènes. In : Semal J, ed. *Traité de pathologie végétale*. Gembloux : Presses Agronomiques, 1989 : 361-79.
- Cornuet P. *Éléments de virologie végétale*. Paris : INRA ; 1987.
- Best RJ. Cross protection by strains of tomato spotted wilt virus and a new theory to explain it. *Aust J Biol Sci* 1954 ; 7 : 415-24.
- Miller ED, Hemenway C. History of coat protein-mediated protection. *Methods Mol Biol* 1998 ; 81 : 25-38.
- Somssich IE, Hahlbrock K. Pathogen defence in plants—a paradigm of biological complexity. *Trends in Plant Science* 1998 ; 3 : 86-90.
- Les Erickson F, Holzberg S, Calderon-Urrea A, et al. The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defence response in tobacco. *The Plant J* 1999 ; 18 : 67-75.
- Whitham S, Dinesh-Kumar SP, Choi D, et al. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*: similarity to Toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* 1994 ; 78 : 1101-15.
- Whitham S, McCormick S, Baker B. The *N* gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 8776-81.
- Powell P, Nelson RS, De B, et al. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 1986 ; 232 : 738-43.
- Fitchen JH, Beachy RN. Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. *Annu Rev Microbiol* 1993 ; 47 : 739-63.
- Register JC, Beachy RN. Effect of protein aggregation state on coat protein-mediated protection against tobacco mosaic virus using a transient protoplast assay. *Virology* 1989 ; 173 : 656-63.
- Jongedijk E, de Schutter A, Stolte T, et al. Increased resistance to potato virus X and preservation of cultivar properties in transgenic potato under field conditions. *Bio/Technology* 1992 ; 10 : 422-9.
- Gonsalves D, Chee P, Provvidenti R, et al. Comparison of coat protein-mediated and genetically-derived resistance in cucumbers to infection by cucumber mosaic virus under field conditions with natural challenge inoculations by vectors. *Biotechnology* 1992 ; 10 : 1562-70.
- Valkonen JP, Pehu E, Jones MGK, et al. Resistance in *Solanum brevidens* to both potato virus Y and potato virus X may be associated with slow cell-to-cell spread. *Gen Virol* 1991 ; 72 : 231-6.
- Nouiery AO, Lucas WJ, Gilbertson RL. Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell* 1994 ; 76 : 925-32.
- Cooper B, Lapidot M, Heick JA, et al. A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility. *Virology* 1995 ; 206 : 307-13.
- Malyshenko SI, Kondakova OA, Nazarova JV, et al. Reduction of tobacco mosaic virus accumulation in transgenic plants producing non-functional viral transport proteins. *J Gen Virol* 1993 ; 74 : 1149-56.
- Zaitlin M, Anderson JM, Perry KL, et al. Specificity of replicase-mediated resistance to cucumber mosaic virus. *Virology* 1994 ; 201 : 200-5.
- Golemboski DB, Lomonosoff GP, Zaitlin M. Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990 ; 87 : 6311-5.
- Carr JP, Marsh LE, Lomonosoff GP, et al. Resistance to tobacco mosaic virus induced by the 54-kDa gene sequence requires expression of the 54-kDa protein. *Mol Plant Microbe Interact* 1992 ; 5 : 397-404.
- Inokuchi Y, Hirashima A. Interference with viral infection by RNA replicase deleted at the carboxy-terminal region. *J Biochem* 1990 ; 108 : 53-8.
- Beachy RN. Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Curt Opin Biotechnol* 1997 ; 8 : 215-20.
- Tenllado F, Garcia Luque I, Serra MT, et al. *Nicotiana benthamiana* plants transformed with the 54-kDa region of the pepper mild mottle tobamovirus replicase gene exhibit two types of resistance responses against viral infection. *Virology* 1995 ; 211 : 170-83.
- Di Maro A, Valbonesi P, Bolognesi A, et al. Isolation and characterization of four type-1 ribosome-inactivating proteins, with polynucleotide : adenosine glycosidase activity, from leaves of *Phytolacca dioica* L. *Planta* 1999 ; 208 : 125-31.
- Lodge JK, Kaniewski WK, Tumer NE. Broad-spectrum virus resistance in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993 ; 90 : 7089-93.
- Wang P, Zoubenko O, Tumer NE. Reduced toxicity and broad spectrum resistance to viral and fungal infection in transgenic plants expressing pokeweed antiviral protein II. *Plant Mol Biol* 1998 ; 38 : 957-64.
- Tavladoraki P, Benvenuto E, Trinca S, et al. Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature* 1993 ; 366 : 469-72.
- Fecker LF, Kaufmann A, Commandeur U, et al. Expression of single-chain antibody fragments (scFv) specific for beet necrotic yellow vein virus coat protein or 25 kDa protein in *Escherichia coli* and *Nicotiana benthamiana*. *Plant Mol Biol* 1996 ; 32 : 979-86.
- Zimmermann S, Schillberg S, Liao YC, et al. Intracellular expression of TMV-specific single-chain Fv fragments leads to improved virus resistance in *Nicotiana tabacum*. *Molecular Breeding* 1998 ; 4 : 369-79.
- Fischer R, Liao YC, Hoffmann K, et al. Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Biol Chem* 1999 ; 380 : 825-39.
- Franconi R, Roggero P, Pirazzi P, et al. Functional expression in bacteria and plants of an scFv antibody fragment against tospoviruses. *Immunotechnology* 1999 ; 3-4 : 189-201.
- Hendy S, Chen ZC, Barker H, et al. Rapid production of single-chain Fv fragments in plants using a potato virus X episomal vector. *J Immunol Methods* 1999 ; 231 : 137-46.
- Gutierrez-Campos R, Torres-Acosta JA, Saucedo-Arias LJ, et al. The use of cysteine protease inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. *Nature Biotech* 1999 ; 17 : 1223-7.
- Ingelbrecht IL, Irvine JE, Mirkov TE. Post-transcriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. *Plant physiology* 1999 ; 119 : 1187-97.
- Goodwin J, Chapman K, Swaney S, et al. Genetic and biochemical dissection of transgenic RNA-mediated virus resistance. *The Plant Cell* 1996 ; 8 : 95-105.
- Beclin C, Berthome R, Palauqui JC, et al. Infection of tobacco or *Arabidopsis* plants by CMV counteracts systemic post-transcriptional silencing of nonviral (trans)genes. *Virology* 1998 ; 252 : 313-7.
- Hammond J, Kamo KK. Effective resistance to Potyvirus infection conferred by expression of antisense RNA in transgenic plants. *Mol Plant Microbe Interact* 1995 ; 8 : 674-82.
- Huntley CC, Hall TC. Interference with brome mosaic virus replication by targeting the minus strand promoter. *J Gen Virol* 1993 ; 74 : 2445-52.
- Atkins D, Young M, Uzzell S, et al. The expression of antisense and ribozyme genes targeting citrus exocortis viroid in transgenic plants. *J Gen Virol* 1995 ; 76 : 1881-96.
- Bendahmane M, Groenberg B. Engineering resistance against tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) using antisense RNA. *Plant Mol Biol* 1997 ; 33 : 351-7.
- Lindbo JA, Silva-Rosales L, Proebsting WM, et al. Induction of a highly specific antiviral state in transgenic plants: implications for regulation of gene expression and virus resistance. *Plant Cell* 1993 ; 5 : 1749-59.
- Mueller E, Gilbert J, Davenport G, et al. Homology-dependent resistance: transgenic virus resistance in plants related to homology-dependent gene silencing. *Plant J* 1995 ; 7 : 1001-13.
- Al-Kaff NS, Covey SN, Kreike MM, et al. Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science* 1998 ; 279 : 2113-5.
- Ravelonandro M. Des pruniers résistant à la maladie de la Sharka. *Biofutur* 1997 ; 172 : 53-5.
- Van der Vlugt R, Ruiters RK, Goldbach R. Evidence for sense RNA-mediated protection to PVYN in tobacco plants transformed with the viral coat protein cistron. *Plant Mol Biol* 1992 ; 20 : 631-9.
- Covey SN, Al-Kaff N, Langara A, et al. Plants combat infection by gene silencing. *Nature* 1997 ; 38 : 781-2.
- Marathe R, Smith TH, Anandalakshmi R, et al. Plant viral suppressors of post-transcriptional silencing do not suppress transcriptional silencing. *Plant J* 2000 ; 22 : 51-9.
- Voinnet O, Pinto YM, Baulcombe DC. Suppression of gene silencing : a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999 ; 96 : 14147-52.
- Waterhouse PM, Graham MW, Wang MB. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998 ; 95 : 13959-64.

50. Fire A, Xu S, Montgomery MK, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998 ; 391 : 806-11.

51. Vaucheret H, Beclin C, Elmayan T, *et al.* Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J* 1998 ; 16 : 651-9.

52. Yie Y, Zhao F, Zhao SZ, *et al.* High resistance to cucumber mosaic virus conferred by satellite RNA and coat protein in transgenic commercial tobacco cultivar G-140. *Mol Plant Microbe Interact* 1992 ; 5 : 460-5.

53. Kollar A, Dalmay T, Burgyan J. Defective interfering RNA-mediated resistance against cymbidium ringspot Tombusvirus in transgenic plants. *Virology* 1993 ; 193 : 313-8.

54. Marsh LE, Pogue GP, Connell JP, *et al.* Artificial defective interfering RNAs derived from brome mosaic virus. *J Gen Virol* 1991 ; 72 : 1787-92.

55. Yang X, Yie Y, Zhu F, *et al.* Ribozyme-mediated high resistance against potato spindle tuber viroid in transgenic potatoes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 ; 94 : 4861-5.

56. Michienzi A, Prislei S, Bozzoni I. U1 small nuclear RNA chimeric ribozymes with substrate specificity for the Rev pre-mRNA of human immunodeficiency virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996 ; 93 : 7219-24.

57. Prins M, Goldbach R. RNA-mediated virus resistance in transgenic plants. *Arch Virol* 1996 ; 141 : 2259-76.

58. Tepfer M, Balazs E. *Virus-resistant transgenic plants: potential ecological impact*. In : Tepfer M, Balazs E, eds. Berlin, Heidelberg : Springer-Verlag, Paris : INRA, 1997.

59. Miller W, Koev G, Mohan BR. Are there risks associated with transgenic resistance to luteo viruses. *Plant Disease* 1997 ; 81 : 700-10.

Résumé

La résistance d'une plante transgénique à un virus est obtenue à partir de transgènes d'origine végétale (gènes de résistance impliqués dans la reconnaissance du pathogène et déclenchant une nécrose localisée autour du point d'entrée du virus) ou, le plus souvent, du virus pathogène lui-même (gènes viraux codant pour des protéines de l'enveloppe du virus, des protéines de mouvement, ou encore la réplicase virale) éventuellement modifiés pour conduire à la synthèse d'une protéine non fonctionnelle. La synthèse d'une protéine n'est pas toujours requise et de nombreux mécanismes de résistance font intervenir des interactions entre acides nucléiques dérivés du transgène et acide nucléique du virus à combattre (résistance fondée sur des mécanismes de co-suppression ou sur la présence de séquence correspondant à des ARN satellites ou défectifs). Enfin, les propriétés catalytiques de certains ARN (ribozymes) sont mises à profit pour lutter directement contre les acides nucléiques des virus et des viroïdes.
