

# Sujet de stage Semestre 4 - Master 2<sup>ème</sup> année

## IBMP | 2021-2022

### Titre/Title

Français : Caractérisation de complexes de réplication de virus de plante en conditions natives

English : Characterization of plant virus replication complexes under native conditions

### Contacts

#### Responsable du projet :

NOM Prénom SCHEER Hélène  
Tél: 03 67 15 53 32  
Courrier-E : helene.scheer@ibmp-cnrs.unistra.fr

#### Responsable de l'équipe :

NOM Prénom RITZENTHALER Christophe  
Tél : 03 67 15 53 32  
Courrier-E : ritzenth@unistra.fr  
[www.ibmp-cnrs.fr/equipes/biologie-et-biotechnologie-des-virus-de-la-vigne/](http://www.ibmp-cnrs.fr/equipes/biologie-et-biotechnologie-des-virus-de-la-vigne/)

### Description du projet (20 lignes max) | Project Description (20 lines max.)

#### Français :

Les étiquettes de type protéines fluorescentes (FP) sont devenues incontournables en biologie pour le suivi spatio-temporel de protéines d'intérêts (POI). Au laboratoire, nous avons ainsi développé un système de visualisation de complexes de réplication viraux (VRC) *in planta* basé sur l'utilisation du domaine de fixation des RNA double-brin de la protéine B2 du flock house virus en fusion avec une FP (B2-FP, (Monsion *et al*, 2018).

Les FP sont aussi largement utilisées pour la capture, via des anticorps hautement spécifiques et affins, de complexes protéiques *in vivo* afin de déterminer la composition des complexes protéiques associés aux POI par spectrométrie de masse. Une telle approche combinée à l'utilisation de plantes exprimant constitutivement la protéine B2-FP, nous a permis d'isoler des VRC de différents virus et d'en caractériser biochimiquement les différentes protéines virales et cellulaires constitutives (Incarbone *et al*, 2020a; Incarbone *et al*, 2020b). L'approche par immunoprécipitation de type anti-FP est en revanche généralement incompatible avec l'étude des complexes protéiques en conditions natives. C'est pourquoi au laboratoire nous avons développé une méthodologie innovante permettant la capture de complexes protéiques natifs via l'utilisation de protéines fluorescentes.

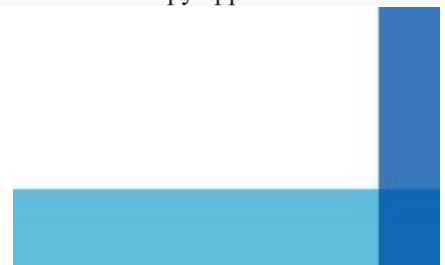
L'objectif du stage de M2 sera de mettre en œuvre cette stratégie de purification de complexes protéiques natifs pour la purification de VRC de différents virus de plantes dans la perspective plus lointaine de déterminer la structure tridimensionnelle à haute résolution de certains de ces complexes par des approches de cryomicroscopie électronique sur particules uniques.

#### English :

Fluorescent protein tags (FP) have become essential in biology for the spatio-temporal monitoring of proteins of interest (POI). In the laboratory, we have developed a system for visualizing viral replication complexes (VRC) *in planta* based on the use of the double-stranded RNA binding domain of the B2 protein of the flock house virus in fusion with a FP (B2-FP, Monsion *et al*, 2018).

FPs are also widely used for the capture, via highly specific and high affinity antibodies, of protein complexes *in vivo* in order to determine the composition of protein complexes associated with POIs by mass spectrometry. Such an approach, combined with the use of plants constitutively expressing the B2-FP protein, has enabled us to isolate VRC from different viruses and to biochemically characterize the different constitutive viral and cellular proteins (Incarbone *et al*, 2020a; Incarbone *et al*, 2020b). The anti-FP-type immunoprecipitation approach, on the other hand, is generally incompatible with the study of protein complexes under native conditions. This is why in the laboratory we have recently developed an innovative methodology allowing the capture of native protein complexes through the use of fluorescent proteins.

The objective of the M2 internship will be to implement this strategy of purification of native protein complexes for the purification of VRC from different plant viruses in the more distant perspective of determining the three-dimensional structure at high resolution of some of these complexes by single particle electron cryo-electron microscopy approaches.



## Méthodologies (mots clés) :

Clonage Golden-Gate, chromatographie d'affinité, expression de protéines recombinantes, biochimie des protéines, microscopie à fluorescence et électronique.

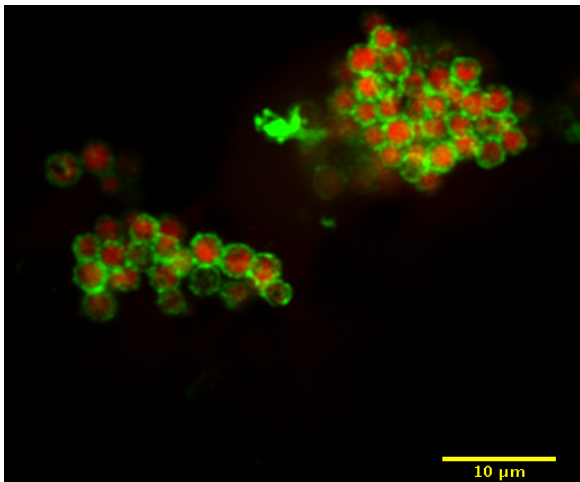
## Références (maximum 3) :

Incarbone M, Clavel M, Monsion B, Kuhn L, Scheer H, Poignavent V, Dunoyer P, Genschik P, Ritzenthaler C (2020a) Immunocapture of dsRNA-bound proteins provides insight into tobacco rattle virus replication complexes and reveals Arabidopsis DRB2 to be a wide-spectrum antiviral effector. *bioRxiv*: 842666.

Incarbone M, Scheer H, Hily JM, Kuhn L, Erhardt M, Dunoyer P, Altenbach D, Ritzenthaler C (2020b) Characterization of a DCL2-Insensitive Tomato Bushy Stunt Virus Isolate Infecting Arabidopsis thaliana. *Viruses* 12: 1121.

Monsion B, Incarbone M, Hleibieh K, Poignavent V, Ghannam A, Dunoyer P, Daeffler L, Tilsner J, Ritzenthaler C (2018) Efficient Detection of Long dsRNA in Vitro and in Vivo Using the dsRNA Binding Domain from FHV B2 Protein. *Front Plant Sci* 9: 70.

## Illustration (1 photo ou 1 schéma, petit format)



**Figure** : Complexes de réplication du TBSV marqués par la protéine B2 :GFP localisées en périphérie de péroxysomes (marqués en rouge)

## Parcours de Master (cochez le ou les parcours souhaités) :

Master « Sciences du Vivant », Faculté des Sciences de la Vie, Université de Strasbourg

- 1- Biologie et génétique moléculaire : X
- 2- Microbiologie : X
- 3- Plantes, biologie moléculaire et biotechnologies : X
- 4- Plantes, environnement et génie écologique :
- 5- Plantes, molécules bioactives et valorisation :
- 6- Virologie : X
- 7- Autres masters équivalents en France ou à l'étranger : X