

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG
ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE
INRA Colmar - UMR Santé de la Vigne et Qualité du Vin

THÈSE

présentée par :

Sylvaine BOISSINOT

soutenue le : 15 février 2013

pour obtenir le grade de : Docteur de l'université de Strasbourg

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Aspects moléculaire et cellulaire de la biologie

Partenaires et rôle dans le cycle viral
des différentes formes de la protéine RT
du *Cucurbit aphid-borne yellows virus*

THÈSE dirigée par :

Véronique BRAULT, Directeur de Recherches, INRA Colmar

RAPPORTEURS EXTERNES :

Sylvie GERMAN-RETANA, Chargé de Recherches, INRA Villenave d'Ornon

Christophe BRUGIDOU, Directeur de Recherches, IRD Montpellier

RAPPORTEUR INTERNE :

Christophe RITZENTHALER, Directeur de Recherches, CNRS-IBMP Strasbourg

EXAMINATEUR :

Hervé LECOQ, Directeur de Recherches, INRA Montfavet

Partenaires et rôle dans le cycle viral des différentes formes de la protéine RT du *Cucurbit aphid-borne yellows virus*

Résumé

Le virus de la jaunisse des cucurbitacées (CABYV) est un polérovirus restreint au phloème et strictement transmis par puceron. Sa capsid est constituée de la protéine majeure (CP) et d'un composant mineur (RT*). Les protéines CP et RT sont essentielles à la transmission du virus et à son mouvement dans la plante. La RT existe sous deux formes, une forme complète retrouvée dans les extraits de plantes infectées (RT) et une forme dépourvue de l'extrémité C-terminale (RT*), présente dans les particules virales. Notre étude a consisté à rechercher les partenaires cellulaires des protéines CP et RT du CABYV dans les cellules du phloème. Une protéine *heat shock*, une profiline, une glycosyl hydrolase et une protéine *response to low sulfur* ont été identifiées en criblant une banque d'ADNc de cellules compagnes d'*Arabidopsis* par la technique du double hybride dans la levure. Probablement en raison de redondance fonctionnelle, l'utilisation de mutants *knock-out* d'*Arabidopsis* touchés dans les gènes candidats n'a pas permis de démontrer l'implication de ces protéines dans le cycle viral ou dans la transmission par puceron. Néanmoins, cette étude a révélé le rôle crucial du domaine C-terminal de la RT dans les interactions avec les partenaires cellulaires. Afin d'analyser le rôle respectif des deux protéines RT dans le cycle viral, j'ai suivi l'accumulation dans les plantes de virus mutants ne produisant que l'une ou l'autre forme de la protéine RT. Les résultats obtenus montrent que les deux formes de cette protéine sont indispensables au mouvement systémique du virus. Ils nous ont permis de proposer un modèle dans lequel la protéine RT, ou sa partie C-terminale, agirait *en trans* sur les particules virales pour promouvoir leur libération dans les tubes criblés.

Abstract

Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) is a polerovirus restricted to phloem cells and strictly transmitted by aphids. Its capsid is composed of the major coat protein (CP) and of a minor component referred to as the readthrough protein (RT*). CP and RT proteins are essential for virus transmission and movement. Two forms of the RT protein have been described: a complete version of the protein (RT) detected in whole plant extracts, and a truncated form (RT*), deleted of the C-terminal part of the protein, only present in virions. This study was conducted to identify phloem proteins interacting with CP and RT proteins. A heat shock protein, a profilin, a glycosyl hydrolase and a protein *response to low sulfur*, were identified by screening a cDNA library of *A. thaliana* companion cells by the yeast two hybrid system. Because of a potential functional redundancy, involvement of these candidate genes in virus accumulation and virus transmission could not be confirmed using *arabidopsis* knock-out mutants. However, the results obtained highlighted the important role of the C-terminal part of the RT protein in the interaction with plant cellular factors. In order to identify the function of both RT proteins in the viral cycle, virus accumulation of CABYV mutants, only producing the complete or the truncated form of the RT protein, was analyzed. The results showed that both forms of the RT protein are essential for CABYV systemic movement. We therefore propose a model for CABYV long-distance transport in which the complete RT protein, or its C-terminal part, would act *in trans* on wild-type virions to promote their release in sieve elements.

Table des matières

| | |
|---|----------|
| Liste des abréviations | 1 |
| Classification des virus cités dans cette étude | 3 |
| Introduction générale | 4 |
| Introduction bibliographique | 6 |
| A. Les interactions entre protéines virales et protéines de l'hôte, et leurs fonctions dans les différentes étapes du cycle viral | 6 |
| A.1. Fonctions dans la réplication virale | 6 |
| A.2. Fonctions dans la traduction des protéines virales | 12 |
| A.3. Fonctions dans le mouvement du virus | 17 |
| A.3.a. Les différents types de mouvements viraux dans la plante | 17 |
| A.3.a.i. Les plasmodesmes : des pores indispensables au trafic moléculaire | 17 |
| A.3.a.ii. Le mouvement intercellulaire des virus | 19 |
| A.3.a.iii. Le mouvement des virus à longue distance | 20 |
| A.3.b. Fonctions dans le mouvement intracellulaire | 21 |
| A.3.c. Fonctions dans le mouvement intercellulaire | 24 |
| A.3.d. Fonctions dans le mouvement à longue distance | 27 |
| A.4. Fonctions dans la symptomatologie | 30 |
| A.5. Fonctions dans les réactions de défense de la plante vis-à-vis des virus | 31 |
| A.5.a. Fonctions dans le gene silencing | 31 |
| A.5.b. Fonctions dans d' autres mécanismes de défense contre le virus | 34 |
| A.6. Fonctions dans la transmission du virus | 37 |
| A.7. Fonctions inconnues | 40 |
| A.8. Quel bilan de ces interactions entre protéines de l'hôte et protéines virales peut-on tirer ? | 40 |
| B - Les polérovirus | 44 |
| B.1. Hôtes, symptômes et moyens de lutte | 45 |
| B.2. Organisation génomique et protéines virales | 46 |
| B.3. La transmission des polérovirus par puceron | 57 |
| B.3.a. Les mécanismes de la transmission circulante non multipliante | 57 |
| B.3.b. Le rôle des protéines de structure dans la transmission | 60 |
| B.3.c. À la recherche des récepteurs... | 61 |
| B.3.d. Les interactions polérovirus-puceron : une relation mutualiste ? | 62 |

CHAPITRE 1 : Identification de partenaires phloémiens du CABYV potentiellement impliqués dans le cycle du virus 64

| | |
|---|----|
| A. Introduction | 64 |
| B. Identification de 4 partenaires phloémiens des protéines du CABYV potentiellement impliqués dans le cycle du virus | 64 |
| B.1. Sous-clonage de la banque d'ADNc de cellules compagnes d' <i>A. thaliana</i> | 64 |
| B.2. Identification de 4 gènes candidats par criblages d'une banque d'ADNc d' <i>A. thaliana</i> avec les protéines codées par les ORF3 et 5 du CABYV | 65 |
| C. Identification de partenaires supplémentaires des protéines de structure du CABYV : les protéines ALY | 71 |
| D. Cartes d'identité des gènes candidats | 73 |
| D.1. La protéine Hsp20-like (Heat shock protein 20) | 73 |
| D.2. Profiline 3 | 76 |
| D.3. Protéine Low Sulfur 3 (LSU3) | 78 |
| D.4. La glycosyl-hydrolase DIN10 | 79 |
| D.5. Les protéines ALY | 79 |
| E. Etude du comportement du CABYV dans des mutants d' <i>Arabidopsis</i> affectés dans l'expression des protéines candidates (DIN10, Profilines, LSU3 et ALY) | 82 |
| E.1. Caractérisation des mutants KO d' <i>A. thaliana</i> touchés dans les gènes candidats | 82 |
| E.2. Accumulation du CABYV dans les mutants KO d' <i>A. thaliana</i> et transmission par puceron à partir des plantes mutantes infectées | 86 |
| E.2.a. Glycosyl-hydrolase DIN10 | 86 |
| E.2.b. Profilines | 86 |
| E.2.c. Les protéines ALY | 90 |
| F. Etude de l'interaction Profiline 3 – RT _{C-ter} <i>in planta</i> | 92 |
| G. Etude du désordre dans la séquence de la protéine RT du CABYV | 94 |
| H. Discussion et perspectives | 96 |

CHAPITRE 2 : Rôle des différentes formes de la protéine RT dans le mouvement du CABYV – Action en *trans* du domaine C-terminal sur la particule virale 103

| | |
|--|-----|
| A - Introduction | 103 |
| A.1. Le mouvement des polérovirus <i>via</i> le phloème | 103 |
| A.1.a. Le phloème | 103 |
| A.1.b. Le mouvement des polérovirus | 105 |
| A.2. Etat de l'art sur le rôle de la protéine RT dans le cycle viral et dans la transmission par puceron | 106 |
| B - Résultats : étude du rôle du domaine C-terminal de la protéine RT du CABYV dans le cycle viral | 110 |
| B.1. Both structural and non-structural forms of the RT protein of CABYV are essential for efficient systemic infection of plants. S. Boissinot, M. Erdinger, B. Monsion, V. Ziegler-Graff and V. Brault. Submitted to <i>Journal of virology</i> , Dec. 2012. | 110 |

| | |
|---|-----|
| B.2. Etude de la transmission du CABYV-RT _{ΔC-ter} et suspicion d'un ARN (-) encapsidé dans les virions du CABYV | 131 |
| B.3. Sous quelle forme le domaine C-ter de la protéine RT intervient-il dans le mouvement systémique du CABYV ? | 132 |
| B.4. Localisation subcellulaire des différentes formes de la protéine RT du CABYV | 133 |
| B.5. Analyse du clivage de la protéine RT du CABYV | 134 |
| B.5.a. Effet du virus sur le clivage de la protéine EGFP:RT du CABYV | 134 |
| B.5.b. Cinétique d'apparition des différentes formes de la protéine RT dans des protoplastes de <i>Chenopodium quinoa</i> | 135 |
| C - Discussion | 137 |

Matériel et méthodes 141

| | |
|--|-----|
| A. Matériel | 141 |
| A.1. Les virus | 141 |
| A.1.a. Le <i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i> (CABYV) | 141 |
| A.1.b. Le <i>Turnip yellows virus</i> (TuYV) | 141 |
| A.2. Souches bactériennes et milieux de culture | 141 |
| A.3. Souche de levures et milieux de culture | 142 |
| A.4. Vecteurs de clonages et d'expression | 143 |
| A.4.a. pGBKT7 | 143 |
| A.4.b. pGADT7-Sfi | 143 |
| A.4.c. pDONR TM 207 | 144 |
| A.4.d. Vecteurs d'expression | 144 |
| A.5. Le matériel végétal | 145 |
| A.6. Les pucerons | 146 |
| A.7. Les anticorps | 146 |
| A.8. Les oligonucléotides | 147 |
| B. Méthodes | 149 |
| B.1. Techniques de biologie moléculaire | 149 |
| B.1.a. Reverse Transcription | 149 |
| B.1.b. Polymerase Chain Reaction (PCR) | 149 |
| B.1.c. Digestion par des enzymes de restriction, purification et ligation des fragments d'ADN dans un vecteur de clonage | 150 |
| B.1.d. Préparation de bactéries compétentes et transformation des bactéries par électroporation | 150 |
| B.1.e. Préparation d'ADN plasmidique bactérien par la technique de la lyse alcaline | 151 |
| B.1.f. Clonage avec la technologie Gateway [®] | 151 |
| B.1.g. Préparation d'ADN plasmidique de levure | 153 |
| B.1.h. Extraction d'ADN génomique d'arabidopsis au CTAB | 153 |
| B.1.i. Extraction d'ARN totaux | 153 |
| B.2. Analyse et détection des protéines | 154 |

| | |
|--|-----|
| B.2.a. Détection du virus par DAS-ELISA | 154 |
| B.2.b. Extraction et solubilisation de protéines | 154 |
| B.2.c. Séparation des protéines par électrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturantes | 155 |
| B.2.d. Coloration des protéines sur gels de polyacrylamide | 155 |
| B.2.e. Immuno-détection des protéines sur membrane de nitrocellulose | 156 |
| B.2.f. Identification des protéines par spectrométrie de masse | 156 |
| B.3. Sous-clonage de la banque d'ADNc de cellules compagnes d' <i>A. thaliana</i> du plasmide pTriplEx2 dans le pGADT7-Sfi - Titration de la banque d'ADNc sous-clonée | 156 |
| B.4. Criblages de la banque d'ADNc par YDH | 157 |
| B.4.a. Transformation de levures par choc thermique | 157 |
| B.4.b. Criblages de la banque d'ADNc par YDH | 157 |
| B.5. Purifications virales | 158 |
| B.6. Inoculation de plantes et protoplastes | 158 |
| B.6.a. Transmission de virus par pucerons | 159 |
| B.6.b. Inoculation de plantes par les virus <i>via</i> les agrobactéries | 159 |
| B.6.c. Agro-inoculation de <i>N. benthamiana</i> pour expression transitoire de protéines marquées | 159 |
| B.6.d. Electroporation de protoplastes de <i>C. quinoa</i> avec des transcrits viraux | 159 |
| B.7. Microscopie | 160 |
| B.7.a. Localisation subcellulaire des protéines fluorescentes par microscopie confocale | 160 |
| B.7.b. Fluorescence Lifetime Microscopy (FLIM) | 160 |
| B.7.c. <i>Immunosorbent</i> Electron Microscopy (ISEM) | 161 |
| B.8. Introduction d'une séquence virale dans le génome d' <i>A. thaliana</i> par la technique du « floral dip » | 161 |
| B.9. Croisement de mutants d'arabidopsis pour l'obtention de doubles mutants | 161 |

Références bibliographiques 167

| | |
|--------------------|-----|
| Table des figures | 179 |
| Table des tableaux | 182 |

Liste des abréviations

| | |
|--|---|
| ABP : Actin binding protein | FAT : Facteur assistant de la transmission |
| ACD : domaine α -cristallin | FLIM : Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy |
| AcLi/TE : Acétate de lithium Tris-EDTA | FRET : Förster resonance energy transfer |
| Actine F : actine filamenteuse | GAPDH3 : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 3 |
| Actine G : Actine globulaire | GDI2 : Rab GDP dissociation inhibitor |
| ADK : Adénosine kinase | GFP : Green fluorescent protein |
| ADN : Acide désoxyribonucléique | GSA : Glandes salivaires accessoires |
| ADNc : ADN complémentaire | GSP : Glandes salivaires principales |
| ADN-T : ADN de transfert | GST : Glutathion sépharose transférase |
| AFM : Microscopie à force atomique | GTP : Guanosine <i>triphosphate</i> |
| AGO : Argonaute | HP : Hairpin |
| AMP : Adénosine <i>monophosphate</i> | HR : Hypersensitive response |
| ANK : ankyrine | Hsc : Heat shock cognate |
| ANR : Agence nationale de la recherche | HSP : Heat shock protein |
| APS : Persulfate d'ammonium | IBMP : Institut de Biologie Moléculaire des Plantes |
| ARL8 : ADP-ribosylation factor 8 | INRA : Institut national de la Recherche Agronomique |
| ARN : Acide ribonucléique | IP ₃ : inositol 1, 4, 5 triphosphate |
| ARNdb : ARN double brin | IP-L : Interacting protein-L |
| ARNm : ARN messenger | IPTG : isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside |
| ARNr : ARN ribosomiaux | IRES : Internal ribosome entry site |
| ARNsg : ARN subgénomique | ISEM : Immunosorbent Electron Microscopy |
| ARNv : ARN viral | kDa : Kilo Dalton |
| ASK : Arabidopsis SKP1-like <i>protein</i> | KO : Knock-out |
| ATP : Adénosine triphosphate | LB : Left border |
| AUX/IAA : Auxin/indol-3-acid acetic | LC-MS-MS : Chromatographie liquide couplée à deux analyses par spectrométrie de masse |
| BSA : Albumine de sérum bovin | LSU : Low sulfur |
| CC : Cellules compagnes | MAP : Myosinase associated protein |
| cdiGRP : Cadmium induced glycine-rich protein | ME : Mésophylle |
| CGP : Cellule de la gaine périvasculaire | MET : Microscopie électronique à transmission |
| Col-0 : Columbia-0 | Milieu LB : Milieu Luria Bertani |
| Complexe RNP : Complexe ribonucleoprotéique | Milieu MS : Milieu de Murashige et skoog |
| CP : Protéine de coque | MLV : Murine leukemia virus |
| CTAB : Cetyl trimethylammonium bromide | MP : Protéine de mouvement |
| C-ter : C-terminal | MPB2C : Movement protein binding 2C |
| CUL1 : Cullin-1 | MT : Microtubule |
| DA : Domaine d'activation | MVB : Multivesicular bodies |
| DAS-ELISA : Double Antibody Sandwich- Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay | NB-LRR : Nucleotide-binding site and leucine rich repeat-containing protein |
| DCL : Dicer like | NRIP1 : N receptor-interacting protein |
| DF : Domaine de fixation | N-ter : N-terminal |
| DIC : Differential Interference Contrast | ORF : Open reading frame |
| DIN10 : Dark inducible 10 | OXS3 : Oxidative stress 3 |
| DMSO : Diméthyl sulfoxyde | PABP : Poly A binding protein |
| dNTP : Désoxyribonucléotide | PAMP : <i>Pathogen-associated molecular patterns</i> |
| DO : Densité optique | PAO3 : Polyamine oxydase 3 |
| DRT : Domaine de readthrough | PAP : Plasmodesmata-associated protein |
| DRTv : Domaine variable de readthrough | PAPK : Plasmodesmata associated protein kinase |
| DTT : Dithiothréitol | Pb : Paires de bases |
| <i>E. Coli</i> : <i>Escherichia coli</i> | PBS : Phosphate buffered saline |
| EB1a : Microtubule End Binding) | PCaP1 : Cation binding protein |
| EC : ecart-type | PCNA : Proliferating cellular nuclear antigen |
| ECL : Electro-chimioluminescence | PCR : Polymerase chain reaction |
| EDIB : Electron- <i>dense</i> inclusion <i>body</i> | PCS : Putative cleavage site |
| EDTA : Acide éthylène-diamine-tétraacétique | PD : Plasmodesme |
| eEF1A : Eukaryotic elongation factor 1A | PDLP : Plasmodesmata located protein |
| ELIB : Electron-lucent inclusion body | PEG : Polyéthylène glycol |
| ESCRT : Endosomal sorting complex required for transport | |

PFN : Profiline
 PIP2 : Phosphatidylinositides
 PLA : Proximity ligation assay
 PM : Poids moléculaire
 PME : Pectine méthyl estérase
 Potéine P : Protéine phloémienne
 PP : Parenchyme phloémien
 PP1, 2 : Phloeme Protein 1, 2
 PR protéines : Pathogenesis Related protein
 pRBR : Retinoblasma-like protein
 PRF : Profiline
 PTGS : Post transcriptional gene silencing
 PVIP : Potyvirus VPg Interacting Protein
 PVP : Polyvinylpyrrolidone
 RACK1 : Receptor for Activated Kinase C
 Rap1 : Replication-associated protein 1
 RB : Right border
 RBX : Ring finger protein
 RCD1 : Required cell differentiation 1
 RDR6 : RNA-Dependent RNA polymerase 6
 RdRp : ARN polymérase ARN dépendante
 RE : Réticulum endoplasmique
 RF C : Facteur C de la réplication
 RFP : Red fluorescent protein
 RISC : RNA induced silencing complex
 RISP : Re-initiation supporting protein
 RME-8 : Receptor-mediated endocytosis
 RNaseA : Ribonucléase A
 RNaseIII : RibonucléaseIII
 ROS : Reactive oxygen species
 RT : Readthrough
 RTM : Restricted TEV movement
 RT-PCR : Reverse transcription – Polymerase chain reaction
 SAMDC1 : S-adenosyl-methionine decarboxylase 1
 SCE : SUMO-conjugating enzyme
 SCF : SKP-Cullin F-box protein complex
 SD : Synthetic dextrose
 SD/-AHWL : Milieu Synthétique dextrose, dépourvu en adénine, histidine, tryptophane et leucine
 SD/-HWL : Milieu Synthétique dextrose, dépourvu en histidine, tryptophane et leucine
 SDS : Sodium dodécyl sulphate
 SDS-PAGE : Electrophorèse sur gel de polyacrylamide, en présence de SDS
 SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
 SE : Sieve element
 SEL : Size exclusion limit
 SGS3 : Suppressor of gene silencing 3
 sHsp : Small heat shock protein
 siRNA : short interfering RNA
 SISK : Shaggy-like kinase
 SKP : S-phase kinase associated protein
 SPE : santé des plantes et environnement
 SUMO : Small ubiquitin-like modifier
 SYTA : synaptotagmine
 TARF : TMV-associated RING Finger protein
 TAV : *Trans*-activateur
 TBE : Tris Borate EDTA
 TC : Tubes criblés
 TCA : Acide trichloro-acétique
 Tcoi1 : Tobacco CMV 1a-interacting protein 1
 TGB : Triple gene block

Ti : Tumor inducing
 TIP : Triple gene block interacting protein
 TOM1, TOM3 : Tobamovirus multiplication 1, 3)
 TOR : Target-of-rapamycin
 UV : Ultra violet
 VIGS : Virus induced gene silencing
 VPg : Viral protein linked genome
 vRdRp : ARN polymérase virale ARN dépendante
 vRNP : Complexe ribocléoprotéique viral
 VSR : Viral suppressor of RNA silencing
 Ws : Wassilewskija
 X : Xylème
 YDH : Yeast double hybrid
 YPD : Yeast Extract Peptone Dextrose

Unités

µL : Microlitre
 g : Gramme
 h : Heure
 kb : kilo-bases
 L : Litre
 mg : Milligramme
 min : Minute
 mL : Millilitre
 mM : Millimolaire
 nm : Nanomètre
 ns : Nanosecondes
 Rpm : Rotation par minute
 s : Secondes

Classification des virus cités dans cette étude

(d'après ICTV 2011)

| <i>Virus</i> | <i>Genre viral</i> | <i>Famille virale</i> |
|--------------|---|-----------------------|
| ACMV | <i>African cassava mosaic virus</i> | <i>Begomovirus</i> |
| BCTV | <i>Beet curly top virus</i> | <i>Curtovirus</i> |
| BDMV | <i>Bean dwarf mosaic virus</i> | <i>Begomovirus</i> |
| BmNPV | <i>Bombyx mori nuclear polyhedrosis virus</i> | <i>Densovirus</i> |
| BMV | <i>Beet mild yellowing virus</i> | <i>Polerovirus</i> |
| BNYVV | <i>Beet necrotic yellow vein virus</i> | <i>Benyvirus</i> |
| BSCTV | <i>Beet severe curly top virus</i> | <i>Curtovirus</i> |
| BWYV-USA | <i>Beet western yellows virus-USA</i> | <i>Polerovirus</i> |
| BYDV-MAV | <i>Barley yellow dwarf virus-MAV</i> | <i>Luteovirus</i> |
| BYDV-PAV | <i>Barley yellow dwarf virus-PAV</i> | <i>Luteovirus</i> |
| BYDV-GAV | <i>Barley yellow dwarf virus-GAV</i> | <i>Luteovirus</i> |
| BYV | <i>Beet yellows virus</i> | <i>Closterovirus</i> |
| BYV-PAV | <i>Beet yellows virus-PAV</i> | <i>Closterovirus</i> |
| CABYV | <i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i> | <i>Polerovirus</i> |
| CaLCuV | <i>Cabbage leaf curl virus</i> | <i>Begomovirus</i> |
| CaMV | <i>Cauliflower mosaic virus</i> | <i>Caulimovirus</i> |
| CGMMV | <i>Cucumber green mottle mosaic virus</i> | <i>Tobamovirus</i> |
| ChiVMV | <i>Chilli veinal mottle virus</i> | <i>Potyvirus</i> |
| CMV | <i>Cucumber mosaic virus</i> | <i>Cucumovirus</i> |
| CNV | <i>Cucumber necrosis virus</i> | <i>Tombusvirus</i> |
| CPMV | <i>Cowpea mosaic virus</i> | <i>Comovirus</i> |
| CYDV | <i>Cereal yellow dwarf virus</i> | <i>Polerovirus</i> |
| CYDV-RPV | <i>Cereal yellow dwarf virus-RPV</i> | <i>Polerovirus</i> |
| GFLV | <i>Grapevine fan-leaf virus</i> | <i>Nepovirus</i> |
| GRV | <i>Groundnut rosette virus</i> | Non classé |
| HIV | <i>Human immunodeficiency virus</i> | <i>Lentivirus</i> |
| IMYMV | <i>Indian mung bean yellow mosaic virus</i> | <i>Begomovirus</i> |
| LMV | <i>Lettuce mosaic virus</i> | <i>Potyvirus</i> |
| MNSV | <i>Melon necrotic spot virus</i> | <i>Carmovirus</i> |
| PepMoV | <i>Pepper mottle Virus</i> | <i>Potyvirus</i> |
| PEMV-1 | <i>Pea enation mosaic virus-1</i> | <i>Enamovirus</i> |
| PEMV-2 | <i>Pea enation mosaic virus-2</i> | <i>Umbravirus</i> |
| PGMV | <i>Peanut green mosaic virus</i> | <i>Potyvirus</i> |
| PLRV | <i>Potato leafroll virus</i> | <i>Polerovirus</i> |
| PMTV | <i>Potato mop-top virus</i> | <i>Pomovirus</i> |
| PRSV | <i>Papaya ringspot virus</i> | <i>Potyvirus</i> |
| PSbMV | <i>Pea seed-borne mosaic virus</i> | <i>Potyvirus</i> |
| PSLV | <i>Poa semilatent virus</i> | <i>Hordeivirus</i> |
| PVA | <i>Potato virus A</i> | <i>Potyvirus</i> |
| PVX | <i>Potato virus X</i> | <i>Potexvirus</i> |
| PVY | <i>Potato virus Y</i> | <i>Potyvirus</i> |
| RCNMV | <i>Red clover necrotic mosaic virus</i> | <i>Dianthovirus</i> |
| RDV | <i>Rice dwarf virus</i> | <i>Phytoreovirus</i> |
| RSV | <i>Rice stripe virus</i> | <i>Tenuivirus</i> |
| RYMV | <i>Rice yellow mottle virus</i> | <i>Sobemovirus</i> |
| SbDV | <i>Soybean dwarf virus</i> | <i>Luteovirus</i> |
| SBMV | <i>Southern bean mosaic virus</i> | <i>Sobemovirus</i> |
| SHMV | <i>Sunn-hemp mosaic virus</i> | <i>Tobamovirus</i> |
| TBRV | <i>Tomato black ring virus</i> | <i>Nepovirus</i> |
| TBSV | <i>Tomato bushy stunt virus</i> | <i>Tombusvirus</i> |
| TCV | <i>Turnip crinckle virus</i> | <i>Carmovirus</i> |
| TEV | <i>Tobacco etch virus</i> | <i>Potyvirus</i> |
| TGMV | <i>Tomato golden mosaic virus</i> | <i>Begomovirus</i> |
| TMGMV | <i>Tobacco mild green virus</i> | <i>Tobamovirus</i> |
| TMV | <i>Tobacco mosaic virus</i> | <i>Tobamovirus</i> |
| ToLCV | <i>Tomato leaf curl virus</i> | <i>Begomovirus</i> |
| ToMV | <i>Tomato mosaic virus</i> | <i>Tobamovirus</i> |
| TSWV | <i>Tomato spotted wilt virus</i> | <i>Tospovirus</i> |
| TuMV | <i>Turnip mosaic virus</i> | <i>Potyvirus</i> |
| TuYV | <i>Turnip yellows virus</i> | <i>Polerovirus</i> |
| TVCV | <i>Turnip vein-clearing virus</i> | <i>Tobamovirus</i> |
| TYLCV | <i>Tomato yellow leaf curl virus</i> | <i>Begomovirus</i> |
| WDV | <i>Wheat dwarf virus</i> | <i>Mastrevirus</i> |
| ZYMV | <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> | <i>Potyvirus</i> |

Introduction générale

Les virus sont parmi les organismes les plus simples qui peuvent infecter une plante. Ce sont des parasites obligatoires qui établissent des relations très étroites avec leurs hôtes afin de s'y multiplier, de se mouvoir et d'être propagés dans l'environnement par leur(s) vecteur(s). Le génome d'un virus est relativement réduit, ce qui en fait un outil facilement manipulable pour son étude. En revanche, son génome ne permet pas l'expression d'un nombre suffisant de protéines pour que le virus soit indépendant de son hôte. Le virus établit donc de nombreuses interactions, notamment avec les protéines de la plante, afin de pouvoir établir son cycle de multiplication et d'envahir son hôte. *A contrario*, la plante va établir des interactions avec les protéines virales afin de limiter la propagation du virus. Ces interactions entre le virus et la plante peuvent suivre le modèle « zig-zag » décrit par Jones et Dangl (2006), dans lequel la plante met en place une stratégie antivirale en reconnaissant des motifs viraux (les PAMPs pour « *pathogen-associated molecular patterns* ») et le virus contrecarre lui, ces mécanismes de défense, grâce à des effecteurs qui vont interférer avec le mécanisme de résistance de la plante hôte. Une réaction « compatible » entre le virus virulent et l'hôte sensible conduit au développement de la maladie et la plupart du temps à l'apparition de symptômes. Une réaction « incompatible » est par contre déclenchée lorsque la plante hôte montre une forte résistance au virus (dit « avirulent »), qui se traduit généralement par l'apparition de lésions nécrotiques (mort cellulaire) au niveau du foyer d'infection primaire, empêchant ainsi la propagation du virus aux cellules voisines ; cette réaction est appelée réaction hypersensible (HR). Le développement du virus dans son hôte est donc le résultat d'une bataille qui s'engage entre le virus et son hôte et qui peut aboutir à différentes situations : soit les réactions de défense de la plante sont très efficaces et le virus ne peut pas s'établir dans la plante, soit le virus parvient à contrecarrer ces réactions de défense et il pourra accomplir son cycle de multiplication. Le virus doit toutefois contrôler sa virulence pour ne pas éliminer son hôte avant d'être propagé à une autre plante. Cet équilibre repose sur des interactions nombreuses et complexes entre le virus et son hôte. L'identification de ces interactions s'est accrue ces 15 dernières années grâce à l'essor de la protéomique et de la génomique et elle devrait à l'avenir nous permettre d'identifier des cibles pour mieux combattre ces pathogènes.

Le premier objectif de cette thèse a été de mettre en évidence les partenaires phloémiens des polérovirus (virus restreints au phloème) et d'étudier le rôle de ces partenaires dans le cycle de ces virus (Chapitre 1). L'identification des partenaires phloémiens des polérovirus impliqués dans le

mouvement du virus et dans leur transmission par puceron conduirait à une meilleure compréhension des étapes clés du cycle de ces virus. Les résultats de cette première partie nous ont amené à étudier plus en détails le rôle du domaine non structural de la protéine RT des polérovirus, dans le mouvement à longue distance des virus car ce domaine possède plusieurs partenaires cellulaires (Chapitre 2). Mais tout d'abord, dans une introduction bibliographique je vais m'attacher à dresser un inventaire, aussi exhaustif que possible, des interactions connues entre des protéines virales et des protéines de l'hôte dont la fonction dans le cycle du virus a été identifiée. Ces Interactions interviennent au niveau (1) de la réplication, (2) de la traduction, (3) du mouvement dans la plante, (4) de la symptomatologie, (5) des réactions de défense et enfin (6) au niveau de la transmission du virus par son vecteur. Puis, je consacrerai la seconde partie de cette introduction bibliographique à la présentation des acteurs principaux de cette étude que sont les polérovirus.

Introduction bibliographique

A. Les interactions entre protéines virales et protéines de l'hôte, et leurs fonctions dans les différentes étapes du cycle viral

A.1. Fonctions dans la **réplication** virale

Les virus de plantes ne peuvent pas se répliquer de façon autonome, ils comptent sur leur hôte pour leur procurer protéines, membranes, et ribonucléotides nécessaires aux étapes de la réplication. Tous les composants viraux et de l'hôte nécessaires à la réplication sont adressés vers le lieu d'assemblage du complexe réplicatif. S'ensuivent la synthèse des formes réplicatives, leur libération et le désassemblage de ces complexes réplicatifs. Dans le paragraphe ci-dessous, je mentionnerai des interactions entre les protéines virales et les protéines de l'hôte nécessaires aux différentes étapes de la réplication. Je tiens seulement à mentionner que plusieurs interactions impliquées dans la réplication ont été identifiées entre des protéines virales (notamment celles du *Tomato bushy stunt virus*, TBSV) et des protéines de levures (Plusieurs exemples dans les articles de Jiang *et al.*, 2006; Kushner *et al.*, 2003; Panavas *et al.*, 2005). Nous ne mentionnerons que celles pour lesquelles un homologue de plante interagit également avec les protéines virales.

L'adressage des ARN viraux et des protéines virales aux membranes (sites de réplication) se fait probablement sous la forme de complexes ribonucléoprotéiques, et constitue une étape importante de la réplication puisqu'elle permet de rassembler en un seul site tous les composants nécessaires à la réplication du génome viral. Cet adressage aux membranes cellulaires met en jeu des protéines de l'hôte impliquées dans le trafic cellulaire telles les protéines **TOM1** et **TOM3** (Tobamovirus multiplication 1 et 3) d'*Arabidopsis thaliana* qui interagissent avec le domaine hélicase de la réplicase virale (130 kDa) du *Tomato mosaic virus* (ToMV) (Nishikiori *et al.*, 2011; Yamanaka *et al.*, 2002; Yamanaka *et al.*, 2000). Ces interactions permettent l'ancrage du complexe de réplication aux membranes et sont indispensables à la réplication du génome viral.

La protéine **ARL8** (ADP-ribosylation factor 8) est également impliquée dans la réplication des tobamovirus, et interagit, elle aussi, avec le domaine hélicase de la réplicase virale (Nishikiori *et al.*, 2011). A partir d'extraits membranaires solubilisés, la protéine TOM1 et les réplicases 130 kDa et 180 kDa du ToMV sont également co-purifiées par la protéine ARL8 (Nishikiori *et al.*, 2011). Nishikiori *et al.* ont également montré que les protéines TOM1 et ARL8 appartiennent au complexe actif de

réplication des tobamovirus. Ces deux protéines, TOM1 et ARL8, n'ont aujourd'hui pas d'autre fonction connue que celle d'être impliquée dans la réplication des tobamovirus. TOM1 est une protéine qui possède plusieurs domaines transmembranaires (Hagiwara *et al.*, 2003; Yamanaka *et al.*, 2000). Chez un mutant d'*A. thaliana* affecté dans l'expression du gène *tom1*, la réplication des tobamovirus est réduite alors que lorsque les deux gènes *tom1* et *tom3* sont mutés, la réplication est complètement inhibée (Ishikawa *et al.*, 1991; Yamanaka *et al.*, 2002). L'implication des gènes *tom1* et *tom3* dans la réplication du ToMV pourrait être un phénomène plus général puisque l'inhibition de l'expression des homologues de ces gènes chez *Nicotiana tabacum* et *N. benthamiana* induit une diminution de l'accumulation des ARN viraux de différents tobamovirus dont le TMV, le ToMV, le *Tobacco mild green mosaic virus* (TMGMV) et le *Pepper mild mottle virus* (PMMoV) (Asano *et al.*, 2005; Cheng *et al.*, 2007).

ARL8 est, quant à elle, une petite protéine de liaison au GTP (GTP binding protein). Il y a 3 gènes paralogues chez *A. thaliana*. L'inhibition de l'expression d'un seul de ces gènes n'a pas d'effet notable sur l'accumulation des tobamovirus alors que l'inhibition simultanée de l'expression de deux de ces gènes entraîne une inhibition complète de la multiplication des tobamovirus (Nishikiori *et al.*, 2011). Ces deux protéines seraient impliquées dans l'addition de la coiffe à l'extrémité 5' de l'ARN viral (Nishikiori *et al.*, 2011).

Le complexe de réplication, localisé au niveau de membranes intracellulaires, rassemble la polymérase virale, l'ARN viral, et probablement d'autres protéines virales et cellulaires. Ces usines virales, encore appelées « virosomes », sont régulées pour protéger l'ARN viral des ribonucléases cellulaires et de la machinerie du *gene silencing*. L'implication du facteur de la traduction¹ eEF1A (Eukaryotic elongation factor 1A) dans cette étape de la réplication a été suggérée lorsque Zeenko *et al.* (2002) ont mis en évidence une interaction entre ce facteur et un domaine en pseudo-noeud de la région 3' non traduite du génome du TMV. Cette hypothèse a été renforcée en 2006 par la mise en évidence d'une interaction entre ce facteur et la polymérase du virus (Yamaji *et al.*). Enfin, en 2008, Thivierge *et al.* ont validé cette hypothèse en montrant l'implication du facteur eEF1A dans la réplication du TuMV. En effet, une interaction a été mise en évidence à la fois entre le facteur eEF1A et la protéine VPg (protéine virale liée à l'extrémité 5' du génome) mais également avec son précurseur, la protéine VPg-Pro. De plus, l'inhibition de l'expression des gènes eEF1A chez *N. benthamiana* conduit à une réduction de l'accumulation du TMV dans les plantes (Yamaji *et al.*, 2010b). La protéine eEF1A est par ailleurs localisée dans des vésicules induites par le précurseur 6K-

¹ Un paragraphe sera consacré aux facteurs de la traduction de l'hôte (page 12).

VPg-Pro lors de l'infection virale (Thivierge *et al.*, 2008). Ces vésicules sont le siège de la réplication virale, dans lesquelles on trouve également les protéines eIF(iso)4E, les PABPs (Poly A binding proteins) et une protéine « heat shock cognate 70-3 » (Hsc70-3). Ces deux dernières ont d'ailleurs été identifiées comme des partenaires de la RdRp (ARN polymérase ARN dépendante) du TuMV (Dufresne *et al.*, 2008a). Enfin, les protéines PABPs de classe II étant indispensables au TuMV pour une multiplication efficace du virus (Dufresne *et al.*, 2008b), l'ensemble de ces résultats suggère que les vésicules induites par le précurseur 6K-VPg-Pro sont le siège de la réplication du TuMV et qu'au moins 3 facteurs de la traduction y sont présents.

Une autre famille de protéines, les protéines ESCRT (Endosomal sorting complex required for transport), est également impliquée dans cette étape de la réplication. Que ce soit dans le domaine animal ou végétal, plusieurs protéines de la famille ESCRT ont été identifiées comme des facteurs de l'hôte participant au cycle viral. Chez les eucaryotes, les protéines ESCRT sont impliquées dans le tri des protéines par la voie endosomale, car elles adressent les protéines soit vers les membranes plasmiques (Figure 1), soit vers les lysosomes lorsqu'il s'agit de protéines ubiquitinylées. Ces protéines participent (i) à la formation de corps multivésiculaires (les MVB, pour « multivesicular bodies ») à partir des protéines néo-synthétisées qui bourgeonnent de l'appareil de Golgi (Gill *et al.*, 2007; Hurley & Emr, 2006) et (ii) à la fusion de ces MVB avec les lysosomes, exposant ainsi les protéines à l'action des lipases lysosomales et des hydrolases (Morita *et al.*, 2007). Chez les phytovirus, et en particulier chez le TBSV, grâce à l'utilisation de mutants *knock-out* (KO) de levures, plusieurs protéines de cette voie de l'endosome ont été identifiées comme des régulateurs positifs de la réplication virale. Il s'agit, entre autres, des protéines Vps23 et Vps28 du complexe ESCRT-I et des protéines Snf7 et Vsp24 du complexe ESCRT-III (Panavas *et al.*, 2005). Des interactions ont été mises en évidence par double hybride dans la levure (YDH) entre la protéine P33 du TBSV (co-facteur de la réplicase virale) et 3 protéines de plantes (*A. thaliana* et de *N. benthamiana*) qui sont des **orthologues de la protéine Vsp23** de levure (Barajas *et al.*, 2009; Barajas & Nagy, 2010). La fonction de ces protéines dans le cycle viral a été validée chez *N. benthamiana*, grâce à l'utilisation de mutants négatifs dominants pour différentes protéines de la famille ESCRT, dans lesquelles la réplication du CNV (*Cucumber necrosis virus*) est affectée (Barajas *et al.*, 2009). L'interaction P33/Vsp23 permet l'adressage de la protéine P33 aux péroxyosomes, lieu de réplication du TBSV (Barajas *et al.*, 2009). L'ubiquitination de la protéine P33 est d'autre part indispensable à son interaction avec la protéine Vsp23 dans la levure, dans les protoplastes ou dans les plantes (Barajas & Nagy, 2010).

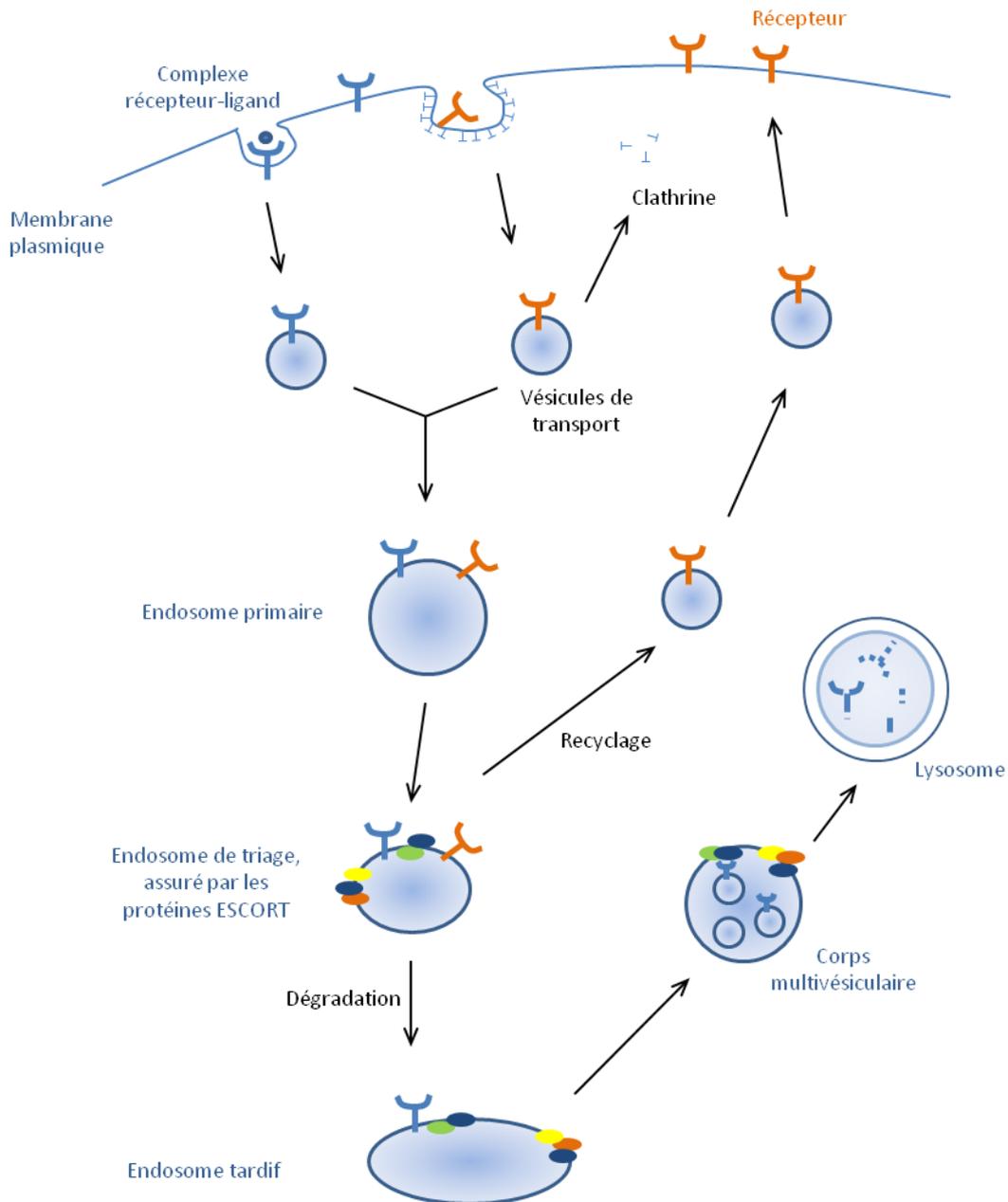


Figure 1 : Représentation schématique de l'implication des protéines ESCRT (symbolisées par les ronds verts, jaunes, orange, bleus) dans le tri des endosomes. Les molécules internalisées au niveau de la membrane plasmique, *via* les vésicules à clathrine ou *via* d'autres mécanismes d'endocytose induits par une interaction entre le récepteur et son ligand, sont adressées aux endosomes primaires pour être triées. Les protéines ESCRT dirigent les protéines vers la voie de la dégradation grâce à la formation de corps multivésiculaires qui vont fusionner avec les lysosomes. Réalisé à partir de Howell et al. (2006) et Slagsvold et al. (2006).

Les protéines de la famille des « Heat shock protein » (HSP) sont également des facteurs de l'hôte impliqués dans l'assemblage du complexe de réplication. Ces protéines, dont les fonctions seront détaillées dans le Chapitre 1, sont des protéines chaperonnes, induites en condition de stress et impliquées dans le remodelage de la structure des protéines. Plusieurs protéines chaperonnes sont

suspectées être impliquées dans le mouvement des virus², mais un cas signale l'implication d'une protéine HSP dans la réplication. Il s'agit des travaux de Mine *et al.* (2012) qui montrent que les protéines HSP70 et HSP90 sont essentielles à la réplication du *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) grâce à leur interaction avec la protéine P27 du virus (cette protéine appartient au complexe de réplication de 480 kDa ancré aux membranes du réticulum endoplasmique (RE)). A l'aide d'inhibiteurs spécifiques de l'une ou l'autre protéine chaperonne, les auteurs ont montré que l'interaction entre la protéine P27 et la HSP70 est essentielle à la formation du complexe réplicatif de 480 kDa. L'inhibition de l'interaction entre la protéine HSP90 et la protéine P27 bloque l'association entre la protéine P27 et l'ARN viral, une étape essentielle à la formation du complexe de réplication. Ces deux protéines chaperonnes sont donc impliquées dans des étapes différentes de l'assemblage du complexe de réplication du RCNMV.

Plusieurs protéines de l'hôte ont également été identifiées comme des facteurs essentiels à la réplication de virus à ADN, comme les géminivirus. Tout d'abord, je citerai une interaction mise en évidence entre la protéine AL1 du *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) et la protéine **SCE-1** (SUMO-conjugating enzyme) de tabac (Castillo *et al.*, 2004). La protéine AL1, encore appelée protéine Rep ou AC1, est nécessaire à la réplication de ces virus. Elle forme des oligomères qui interagissent avec l'ADN double brin. Elle est également capable de cliver et de liguer l'ADN double brin. La protéine SCE-1, quant à elle, est impliquée dans les modifications post-traductionnelles conduisant à la liaison covalente d'un polypeptide « ubiquitin-like » de 10 kDa environ, appelé SUMO, sur une protéine cible. La sumoylation est impliquée dans beaucoup de mécanismes cellulaires, comme le transport du noyau vers le cytoplasme, la régulation de la transcription, ou encore l'apoptose, mais pas dans la dégradation protéique. Grâce à des expériences de mutagenèse dirigée, Sanchez *et al.* (2011) sont parvenus à inhiber l'interaction Rep/SCE-1 sans toutefois modifier les autres fonctions de la protéine Rep. Ces mutations introduites dans des clones complets du virus ont conduit à une réduction partielle ou totale de l'accumulation de l'ADN viral. Ces résultats suggèrent que l'interaction Rep/SCE-1 est essentielle à la réplication virus. De plus, le profil des protéines ayant subi une sumoylation est modifié dans des tabacs exprimant la protéine AL1 de façon ectopique, ce qui laisse penser que la protéine Rep altère la sumoylation de certaines protéines de l'hôte afin d'établir un environnement propice à l'infection virale.

La protéine Rep des géminivirus interagit également avec d'autres protéines de l'hôte comme les protéines de type « cycle regulator retinoblasma-related protein » (protéines **RBRs**) et avec la

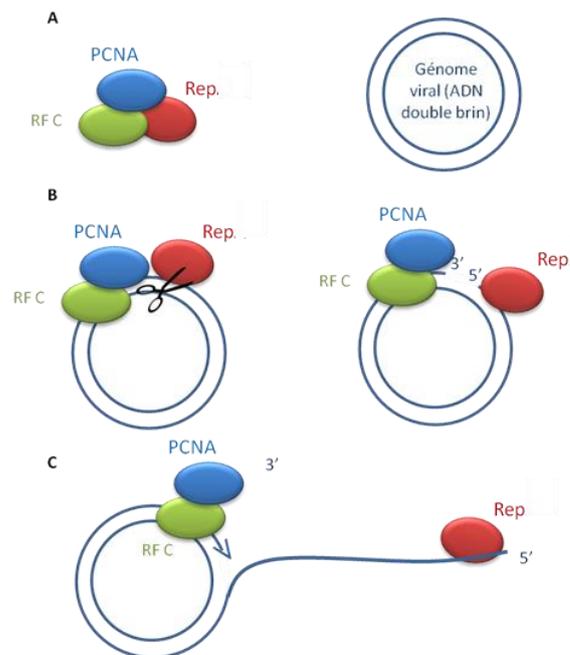
² L'implication potentielle des protéines chaperonnes dans le mouvement des virus sera abordée dans le paragraphe A.3.c de cette introduction, page 27.

protéine **PCNA** (Proliferating cellular nuclear antigen) (Ach *et al.*, 1997; Bagewadi *et al.*, 2004). Or, il faut savoir que les géminivirus infectent essentiellement les cellules à leur stade terminal de différenciation où aucune division cellulaire ne s'effectue plus. Ces cellules contiennent très peu, voire pas d'enzymes nécessaires à la réplication de l'ADN (Castillo *et al.*, 2003). Dans ces cellules, la protéine pRBR (Retinoblasma-like protein) réprime la transcription en séquestrant le facteur E2F et en maintenant les gènes dans un état hétérochromatique inactif (Zhang & Dean, 2001). Suite à l'infection par un géminivirus, le complexe formé par la protéine pRBR et la protéine Rep³ (Ach *et al.*, 1997) relargue la protéine E2F afin d'activer l'expression des gènes placés sous son contrôle. Il en résulte une activation, au moins partielle, du cycle cellulaire qui permet le déclenchement du cycle viral (Egelkroust *et al.*, 2001). Le modèle de la réplication virale de l'IMYMV (*Indian mung bean yellow mosaic virus*) proposé par Bagewadi *et al.* (2004) et schématisé sur la Figure 2, prend en compte les résultats des travaux de différentes études. Lors de l'infection par le TGMV (*Tomato golden mosaic virus*) (Kong *et al.*, 2000) ou l'IMYMV (résultats non publiés) l'expression de la protéine PCNA est induite. La protéine PCNA interagit avec la protéine Rep de l'IMYMV et altère les activités endonucléase et ATPase de la protéine Rep, nécessaires au mécanisme du cercle roulant utilisé par les géminivirus pour se répliquer (Bagewadi *et al.*, 2004). La protéine Rep interagit également avec le facteur C de la réplication (**RF C**) (Luque *et al.*, 2002) qui assiste la protéine PCNA dans le processus de synthèse de l'ADN pour la réplication.

Figure 2 : Représentation schématique du contrôle de la réplication de l'IMYMV par les protéines PCNA et RF C, réalisée à partir du modèle proposé par Bagewadi *et al.* (2004). Ce mécanisme met bien évidemment en jeu d'autres protéines de l'hôte qui ne figurent pas sur ce schéma pour plus de clarté.

En début d'infection virale, lorsque la concentration en protéine Rep est élevée, le complexe Rep/PCNA/RF C se forme (A). Puis, il se dissocie et libère la protéine Rep qui va alors pouvoir cliver un des brins du génome pour initier sa réplication par le mécanisme du cercle roulant (B). PCNA et RF C restent associés, et vont initier la synthèse du nouveau brin d'ADN (C). En fin de cycle, lorsque la concentration en protéine PCNA est élevée, Rep devient inactive et ne peut plus initier ce mécanisme, mettant un terme à la réplication virale et contrôlant ainsi le nombre de copies du génome viral dans le noyau (non représenté sur ce schéma).

IMYMV : *Indian mung bean yellow mosaic virus*, PCNA : Proliferative cell nuclear antigen; RF C : Facteur C de la réplication



³ La protéine Rep est également impliquée dans la symptomatologie et la spécificité tissulaire (Kong *et al.*, 2000).

Pour conclure ce paragraphe, j'ai mentionné dans le Tableau 1, plusieurs interactions entre des protéines virales et des protéines cellulaires qui inhibent la réplication virale, mais pour lesquelles les mécanismes sous-jacents ne sont pas connus.

| Genres viraux | Virus | Acronymes | Protéines virales | Protéines de plantes | (Références) |
|--------------------|---|-----------------|-------------------|---|----------------------------------|
| <i>Tobamovirus</i> | <i>Tomato mosaic virus</i> | ToMV | Réplicase | Tm-1 | (Ishibashi <i>et al.</i> , 2007) |
| <i>Tobamovirus</i> | <i>Tobacco mild green mosaic virus</i> , <i>Pepper mild mottle virus</i> | TMGMV, PMMoV | Réplicase | Tm-1 | (Ishibashi <i>et al.</i> , 2009) |
| <i>Geminivirus</i> | <i>Wheat dwarf virus</i> | WDV | RepA | GRAB1, GRAB2 (Geminivirus Rep A-binding) | (Xie <i>et al.</i> , 1999) |

Tableau 1 : Interactions entre protéines virales et protéines de l'hôte impliquées dans l'inhibition de la réplication virale pour lesquels les mécanismes sont inconnus.

A.2. Fonctions dans la **traduction** des protéines virales

Un très grand nombre d'interactions entre des protéines virales et des protéines appartenant au complexe d'initiation de la traduction a été identifié. Pour en juger, il suffit de se reporter au Tableau 2 ci-contre ; à sa lecture on remarque clairement, que l'essentiel de ces interactions concernent des potyvirus. Ceci reflète probablement plus l'intérêt qu'a suscité la mise en évidence en 1997 de l'implication du facteur d'initiation eIF4E dans le cycle de ces virus (Wittmann *et al.*, 1997), qu'une réalité biologique. Il est important de préciser que toutes ces interactions n'ont pas été confirmées *in vivo*, et que leurs fonctions n'ont, la plupart du temps, pas été démontrées. Cependant, ces études laissent penser que les facteurs eIF4E et eIF4G pourraient être impliqués dans la traduction des protéines virales, mais également dans la réplication virale ou le mouvement. Certaines des protéines du complexe d'initiation de la traduction sont impliquées dans les mécanismes de résistance à de nombreux virus à ARN (Le Gall *et al.*, 2011; Robaglia & Caranta, 2006).

Chez les plantes, les facteurs eIF4E et eIF4G ou leurs isoformes, eIF(iso)4E et eIF(iso)4G, s'associent pour former les complexes eIF4F ou eIF(iso)4F respectivement. Dans les cellules eucaryotes, la traduction des ARN messagers (ARNm) nécessite leur circularisation, ce qui s'effectue grâce à l'action conjointe de multiples facteurs dont eIF4E qui joue un rôle central. Celui-ci interagit avec la coiffe m7G présente en 5' de l'ARNm et permet le recrutement de facteurs tels eIF4G, eIF4A, des PABPs et le facteur eIF3F qui lui-même recrute la sous-unité 40S des ribosomes (Browning, 2004) (Figure 3).

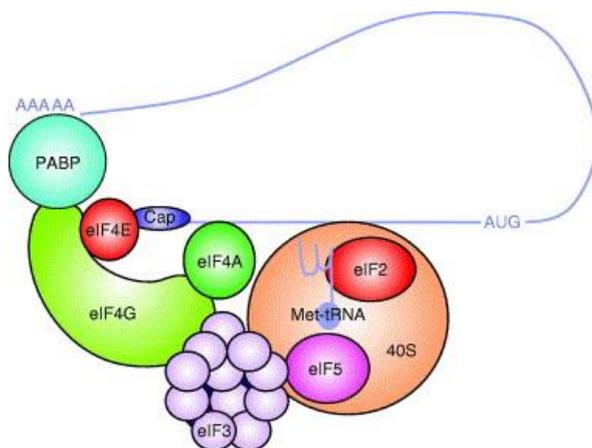


Figure 3 : Le complexe d'initiation de la traduction chez les eucaryotes (Robaglia & Caranta, 2006). PABP : Poly A binding protein ; 40S : sous-unité 40S du ribosome ; Cap : coiffe présente en 5' de l'ARN eucaryotique ; eIF4E, eIF4G, eIF4A, eIF3, eIF5 : Facteurs d'initiation de la traduction nécessaires à la formation de ce complexe.

Chez ces facteurs d'initiation de la traduction/réplication il existe un polymorphisme naturel associé à la résistance aux virus (polymorphisme qui n'existe pas pour d'autres autres facteurs connus de la plante). EIF4E est en particulier associé à la résistance à de nombreux potyvirus dans différentes espèces de plantes (Le Gall *et al.*, 2011) et eIF(iso)4G est associé à la résistance au RYMV chez le riz (Albar *et al.*, 2006; Hebrard *et al.*, 2008). La protéine VPg est un déterminant majeur pour surmonter la résistance induite par les protéines eIF4E et eIF4G mais il y a parfois d'autres protéines virales impliquées, comme par exemple la protéine CI du LMV (Abdul-Razzak *et al.*, 2009) ou la protéine P3 du *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV) (Hjulsager *et al.*, 2006). Les mécanismes moléculaires de la résistance sont basés, dans le cas des potyvirus, sur une interaction physique entre la protéine VPg et les facteurs eIF4E et eIF4G (Beauchemin *et al.*, 2007; Khan *et al.*, 2006; Miyoshi *et al.*, 2008; Wittmann *et al.*, 1997) ; ainsi qu'entre la protéine VPg et la protéine eIF(iso)4G1 dans le cas du RYMV (Hebrard *et al.*, 2010). Contrairement aux ARNm cellulaires, les potyvirus n'ont pas de coiffe à l'extrémité 5' de leur génome, mais ils possèdent une protéine VPg. L'interaction VPg/eIF4E pourrait mimer l'interaction entre la coiffe des ARNm et eIF4E. Les expériences de Khan *et al.* (2008), réalisées *in vitro*, vont dans ce sens puisqu'elles montrent que la protéine VPg bloque le mécanisme de la traduction coiffe dépendante des ARNm pour favoriser celui de la traduction coiffe indépendante. Ceci pourrait donc favoriser la traduction des ARN viraux au détriment des ARNm cellulaires (Grzela *et al.*, 2006; Michon *et al.*, 2006; Miyoshi *et al.*, 2006).

| Genre viral | Virus | Acronyme | Protéines virales | Protéines du complexe d'initiation de la traduction | (Références) |
|----------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|--|---|-----------------------------------|
| Potyvirus | <i>Turnip mosaic virus</i> | TuMV | VPg | eIF(iso)4E | (Gallois <i>et al.</i> , 2010) |
| | | TuMV | VPg | eIFiso4E, eIF(iso)4F | (Khan <i>et al.</i> , 2008) |
| | | TuMV | RdRP, VPg-Pro | PABP classe II | (Dufresne <i>et al.</i> , 2008b) |
| | | TuMV | RdRP | HSc70-3 | (Dufresne <i>et al.</i> , 2008b) |
| | | TuMV | RdRP, VPg-Pro | PABP | (Beauchemin & Laliberte, 2007) |
| | | TuMV | RdRp, VPg-Pro | eIF1A | (Thivierge <i>et al.</i> , 2008) |
| | | TuMV | VPg | eIF(iso)4E | (Miyoshi <i>et al.</i> , 2008) |
| | | TuMV | VPg, 6K-VPg-Pro | Iso(iso)4E | (Beauchemin <i>et al.</i> , 2007) |
| | | TuMV | VPg, 6K-VPg-Pro | Iso(iso)4E, PABP | (Beauchemin & Laliberte, 2007) |
| | | TuMV | VPg | eIF(iso)4E | (Miyoshi <i>et al.</i> , 2006) |
| | | TuMV | VPg | eIF(iso)4E | (Leonard <i>et al.</i> , 2000) |
| | | TuMV | VPg | eIF(iso)4E | (Wittmann <i>et al.</i> , 1997) |
| | | <i>Lettuce mosaic virus</i> | LMV | VPg | eIF4E |
| LMV | VPg | | eIF4E, eIF4G | (Michon <i>et al.</i> , 2006) | |
| LMV | CI-C-ter | | eIF4E | (Abdul-Razzak <i>et al.</i> , 2009) (Tavert-Roudet <i>et al.</i> , 2012) | |
| <i>Tobacco etch virus</i> | TEV | VPg | eIF4E | (Yeam <i>et al.</i> , 2007) | |
| | TEV | VPg | eIF4E1 | (Mazier <i>et al.</i> , 2011) | |
| | TEV | Nia | eIF4E | (Schaad <i>et al.</i> , 2000) | |
| | TEV | HcPro | eIF4E, eIF(iso)4E | (Ala-Poikela <i>et al.</i> , 2011) | |
| <i>Potato virus Y</i> | PVY | VPg | eIF4E | (Strokovskaia <i>et al.</i> , 2007) (Grzela <i>et al.</i> , 2006) | |
| | PVY | HcPro | eIF4E, eIF(iso)4E | (Ala-Poikela <i>et al.</i> , 2011) | |
| | PVY | VPg | EiF4E1, EiF4E2 | (Mazier <i>et al.</i> , 2011) | |
| <i>Chili veinal mottle virus</i> | ChiVMV | VPg | eIF4E, eIF(iso)4E | (Hwang <i>et al.</i> , 2009) | |
| <i>Potato virus A</i> | PVA | HcPro | eIF4E, eIF(iso)4E | (Ala-Poikela <i>et al.</i> , 2011) | |
| <i>Papaya ringspot virus</i> | PRSV | Nia-Pro | eIF3G | (Gao <i>et al.</i> , 2012) | |
| <i>Pepper mottle Virus</i> | PepMoV | VPg | eIF4E1 | (Mazier <i>et al.</i> , 2011) | |
| Sobemovirus | <i>Rice yellow mottle virus</i> | RYMV | VPg | eIF(iso)4G1 | (Hebrard <i>et al.</i> , 2010) |
| Tobamovirus | <i>Tobacco mosaic virus</i> | TMV | RdRp | eEF1A (eukaryotic translation elongation factor 1A) | (Yamaji <i>et al.</i> , 2006) |
| | | TMV | Répliques | GCD10 (homologue d'une sous-unité du facteur eIF3 de levure) | (Osman & Buck, 1997) |
| Caulimovirus | <i>Cauliflower mosaic virus</i> | CaMV | TAV | RISP, eiF3, 60S | (Thiebauld <i>et al.</i> , 2009) |
| Comovirus | <i>Cowpea mosaic virus</i> | CPMV | Domaine central de la protéine de 60 kDa | eEF1-β (eukaryotic elongation factor 1-β) | (Carette <i>et al.</i> , 2002) |
| Polerovirus | <i>Turnip yellows virus</i> | TuYV | VPg, P1-Cter | eIF(iso)4G1 | (Reinbold <i>et al.</i> , 2012) |
| | <i>Beet mild yellows virus</i> | BMVYV | VPg, P1-Cter | eIF4E1, eIF4E2, eIF4E3 | (Reinbold <i>et al.</i> , 2012) |

Tableau 2 : Interactions identifiées entre des protéines virales et des protéines appartenant au complexe d'initiation de la traduction.

Des études récentes réalisées au laboratoire consistant au suivi de l'accumulation de différents polérovirus dans des mutants d'arabidopsis, ont montré que le facteur eIF(iso)4G1 est impliqué dans le cycle viral du TuYV alors que le facteur eIF4E1 intervient dans le cycle viral du BMYV et du BWYV-USA (Reinbold *et al.*, 2012). L'implication de ces facteurs dans le cycle infectieux du TuYV et du BMYV est corrélée à des interactions mises en évidence par la technique du YDH entre les protéines VPg et les facteurs d'initiation de la traduction correspondants. Ces interactions entre les protéines VPg ou leur précurseur et les facteurs d'initiation de la traduction, pourraient participer, comme cela a été suggéré pour le *Potato leafroll virus* (PLRV) (Prufer *et al.*, 1999), à la formation d'un complexe constitué du précurseur de la protéine VPg, de l'ARN viral et du facteur d'initiation de la traduction, permettant d'initier la transition entre l'étape de la réplication virale et de la traduction. De nombreuses questions subsistent néanmoins quant aux rôles exacts de ces facteurs d'initiation de la traduction dans le cycle des virus.

Je voudrais maintenant traiter un exemple particulier d'un facteur de la traduction dont le rôle dans l'expression des protéines virales d'un caulimovirus (le CaMV) a clairement été établi. Chez les caulimovirus, les protéines virales sont synthétisées à partir d'un ARN pré-génomique (ARN 35S) qui possède à la fois des caractéristiques structurales eucaryotiques (coiffe en 5' et queue polyA en 3') et procaryotique (polycistron). Le mécanisme de terminaison/réinitiation semble constituer une des stratégies impliquées dans l'expression des ORFs majeurs portés par l'ARN pré-génomique. Ce mécanisme requiert la présence de la protéine pVI qui agit comme *trans*-activateur (TAV) de l'expression de ces ORFs. Le mécanisme d'action de la protéine TAV n'est pas encore élucidé, mais il est possible que cette protéine s'associe aux ribosomes pour empêcher leur relargage à la fin du processus de traduction du premier ORF, et qu'elle facilite le recrutement des facteurs d'initiation avant que les ribosomes ne se décrochent de l'ARN messenger. Afin d'identifier les facteurs de la plante impliqués dans le mécanisme de la traduction des protéines du CaMV, Thiébeauld *et al.* (2009) ont criblé une banque d'ADNc d'*A. thaliana* par la technique du double hybride dans la levure avec la séquence du domaine N-terminal de la protéine TAV du CaMV. Ils ont ainsi identifié la protéine **RISP** (Re-initiation supporting protein), la protéine **eIF3** et la sous-unité **60S** des ribosomes (Park *et al.*, 2001). Les auteurs ont également observé un retard à l'infection virale dans des mutants KO d'*A. thaliana* touchés dans le gène *rispa* ainsi qu'une réduction significative du niveau de la transactivation par la protéine TAV dans des protoplastes provenant de ces plantes KO. En 2011, Schepetilnikov *et al.* ont apporté des éléments complémentaires à la compréhension de ce mécanisme grâce à l'identification d'un nouveau facteur de la plante, la protéine **TOR** (Target-of-rapamycin), un partenaire additionnel de la protéine TAV, indispensable à la propagation du CaMV dans la plante. En effet, des KO d'*A. thaliana* pour ce gène *tor* sont complètement résistants à

l'infection virale. Les auteurs ont montré que la fonction de ré-initiation de la protéine TAV dépend de son association physique avec la protéine TOR, et que la protéine TAV induit l'activation de la protéine TOR puis la phosphorylation des protéines S6K1 et RISP. Le modèle d'action de ces différentes protéines dans le mécanisme de ré-initiation de la traduction contrôlée par la protéine TAV du CaMV est présenté sur la Figure 4.

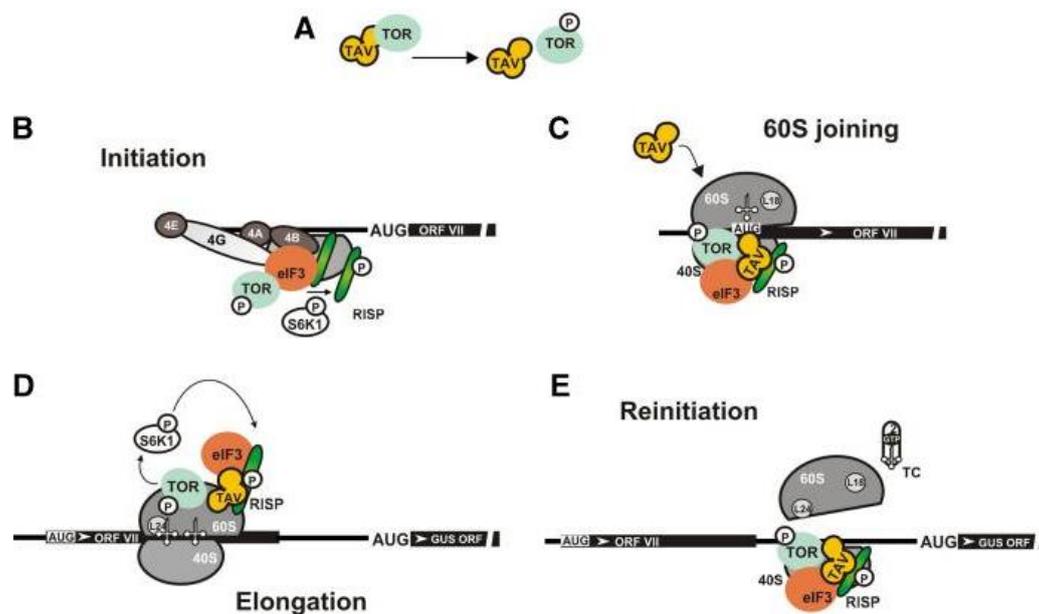


Figure 4 : Modèle proposé du mécanisme de ré-initiation de la traduction des ARN contrôlé par la protéine TAV du CaMV et mettant en jeu les protéines RISP et TOR de l'hôte (Schepetilnikov *et al.*, 2011). (A) la protéine TAV interagit avec la protéine TOR afin de la maintenir dans un état phosphorylé actif. Puis (B) TOR phosphoryle les protéines S6K1 et RISP (S6K1-P et RISP-P) en utilisant la protéine eIF3 du complexe de pré-initiation comme plateforme. (C) Au moment où la sous-unité 60S rejoint le complexe d'initiation, la protéine TAV s'associe au complexe de pré-initiation *via* son interaction avec eIF3 et RISP-P ; ce qui a pour conséquence d'empêcher la dissociation de ces deux protéines du complexe 80S. Pour ne pas interférer avec l'étape d'élongation, le complexe protéique contenant TAV peut, pendant cette étape, être déplacé de la sous-unité 40S à la sous-unité 60S (D). Pendant ces étapes, la protéine RISP demeure phosphorylée grâce à son interaction avec TOR ou avec le complexe TOR/TAV, ce qui conduit à l'activation de la protéine kinase S6K1. Enfin (E), le complexe TAV/eIF3/RISP-P se relocalise dans la sous-unité 40S, grâce à l'interaction entre eIF3 et la sous-unité 40S, afin de former à nouveau un complexe de ré-initiation compétent, capable de recruter les facteurs de la traduction.

RISP : Re-initiation supporting protein ; TAV : *trans*-activateur ; TOR : target-of-rapamycin ; CaMV : *Cauliflower mosaic virus*

Enfin, le dernier cas relatif aux protéines de l'hôte impliquées dans la traduction concerne d'autres virus à ADN, les bégomovirus. Chez ces virus, la protéine TrAP (encore appelée protéine AL2), est incapable de se lier aux séquences régulatrices du gène codant pour la protéine CP mais elle active dans le mésophylle et réprime dans les tissus vasculaires, le promoteur permettant la synthèse de cette protéine. Cette interaction est probablement indirecte et contrôlée par le facteur de transcription **PEAPOD2 (PPD2)** identifié par criblage d'une banque d'ADNc d'*A. thaliana* par la technique du simple hybride dans la levure (Lacatus & Sunter, 2009). La protéine PEAPOD2 interagit

avec la séquence activatrice de la transcription du gène codant pour la protéine CP mais pas avec la séquence qui réprime la transcription de ce gène. La protéine PEAPOD2 se lie également avec la protéine TrAP de plusieurs bégomovirus, TGMV, CaLCuV, ACMV (*African cassava mosaic virus*), PGMV (*Peanut green mosaic virus*), laissant entrevoir pour ces virus un mécanisme conservé d'activation du promoteur du gène codant pour la protéine CP.

A.3. Fonctions dans le **mouvement** du virus

Avant de discuter des interactions établies entre l'hôte et le virus pour permettre le mouvement du virus intra-hôte, il me semble primordial de revenir sur des notions de bases concernant les mouvements des phytovirus et sur une structure de la plante essentielle pour assurer leur transport : les plasmodesmes.

A.3.a. Les différents types de mouvements viraux dans la plante

Contrairement aux virus animaux, la présence d'une paroi autour de la cellule végétale empêche la pénétration du virus dans les cellules *via* des récepteurs membranaires. Les phytovirus doivent donc être directement déposés dans le cytoplasme de la cellule, puis après s'être frayé un chemin dans la cellule (ce que j'appellerai le mouvement intracellulaire), ils utilisent la voie symplastique pour passer dans la cellule adjacente. Ce type de mouvement est qualifié de mouvement « à courte distance », « de cellule à cellule », ou bien encore « intercellulaire » (*cf* paragraphe A.3.a.ii). De plus, pour assurer de façon efficace leur dissémination, les virus empruntent les tissus conducteurs qui leur permettent d'accéder rapidement aux parties distales de la plante en suivant le flux de sève : ce type de mouvement est appelé « mouvement systémique » ou « mouvement à longue distance » (*cf* paragraphe A.3.a.iii).

A.3.a.i. Les plasmodesmes : des pores indispensables au trafic moléculaire

La première description de la structure d'un plasmodesme (PD) a été réalisée en 1963 par Robards puis a été précisée au cours du temps. Le PD possède deux membranes : la première est la membrane plasmique qui assure la continuité entre les deux cellules adjacentes et qui constitue la limite externe du PD (Figure 5-a). La seconde membrane est une invagination du RE qui connecte le RE des deux cellules adjacentes et constitue le desmotubule du PD. L'espace libre entre ces deux membranes est fragmenté en 8 à 10 portions de 2,5 nm environ (Ding *et al.*, 1992). Les extrémités du PD forment une sorte de col qui joue le rôle de sphincter et contrôle le trafic moléculaire.

L'architecture des PDs peut être modifiée en fonction des tissus, et la taille d'exclusion limite (ou SEL pour « Size exclusion limit ») varie en fonction du type de PD. On trouve en particulier, des structures originales des PDs dans le phloème (cf Chapitre 2).

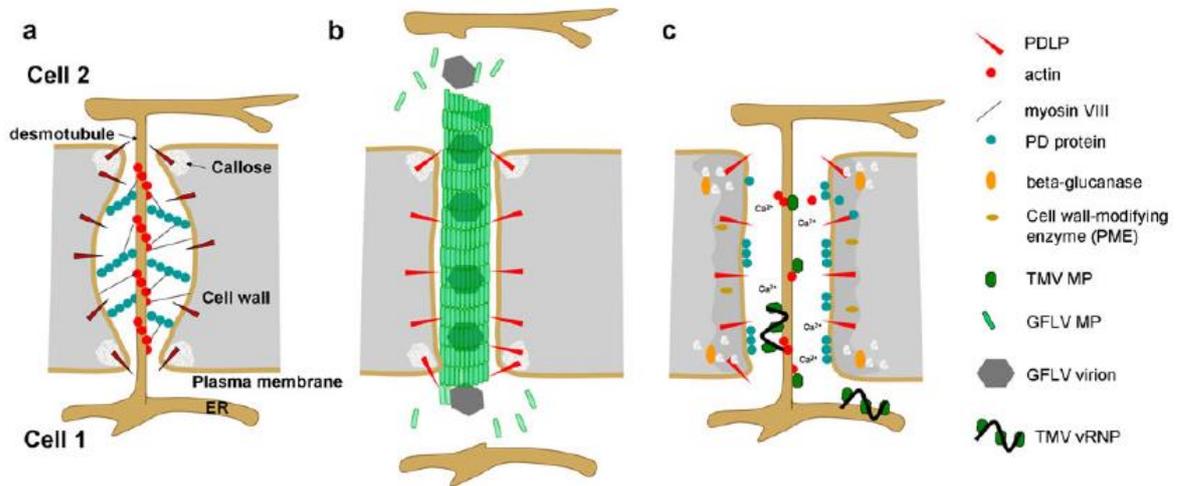


Figure 5 : Modification de la structure des plasmodesmes (PDs) par des virus entraînant la formation de tubules ou se déplaçant de cellule à cellule grâce à la formation de complexes viraux ribonucléoprotéiques (vRNP) (Source : Niehl & Heinlein, 2011). a) Structure d'un PD connectant deux cellules adjacentes. b) Modification du PD par la protéine de mouvement (MP) du GFLV (*Grapevine fanleaf virus*). La protéine MP interagit avec les protéines PDLPs (Plasmodesmata located proteins) et s'associe en tubules. Le tubule prend alors la place du desmotubule qui disparaît, et les virions peuvent alors passer d'une cellule à l'autre au travers du tubule. c) En présence de la protéine MP du TMV (*Tobacco mosaic virus*), des glucanases- β -1,3 sont dirigées vers la paroi et dégradent la callose à l'entrée du PD conduisant ainsi à la dilatation du pore. De plus, les flux ioniques à travers la membrane plasmique activent certaines enzymes de la paroi qui vont en réduire la rigidité. La protéine MP déstabilise également le cytosquelette d'actine, ce qui conduit à une désorganisation structurale du PD et les complexes vRNP peuvent alors diffuser le long du desmotubule.

Une vingtaine de protéines de différentes familles rentreraient dans la composition du PD : il s'agit notamment de protéines associées au cytosquelette comme l'actine, la myosine et les « calcium-binding protein » (centrine et calréticuline) (pour revues voir Aaziz *et al.*, 2001 ; Heinlein, 2002). Le filament d'actine pourrait être enroulé en spirale autour du desmotubule ou être disposé en ligne le long de la membrane plasmique et du desmotubule afin soit d'assurer la liaison entre le cytosquelette des deux cellules, soit de contrôler l'ouverture du pore. En effet, il a été montré qu'une dépolymérisation du filament d'actine par la cytochalasine D (Ding *et al.*, 1996; White *et al.*, 1994) ou la profiline (Ding *et al.*, 1996) avait pour effet de dilater les PDs. La présence de myosine ou « myosine like protein » au niveau des PDs des plantes inférieures et supérieures (Overall *et al.*, 2000) pourrait assurer le maintien de leur structure (Volkman *et al.*, 2003). Les protéines de la famille des « Calcium binding protein », comme la centrine, sont localisées au niveau du col (Blackman *et al.*, 1999). Elles sont un constituant majeur des nanofilaments dont la contraction est

dépendante du calcium, et elles pourraient jouer le rôle de régulateurs d'ouverture des PDs. La calréticuline est une protéine du RE qui remplirait le rôle de chaperonne et régulerait la concentration en calcium (Michalak *et al.*, 1999; Michalak *et al.*, 1992). En influençant l'activité de la myosine et de la centrine, la calréticuline augmenterait la perméabilité des PDs (Waignann *et al.*, 2004). D'autres protéines ont été identifiées au niveau des PDs comme les « Plasmodesmata-associated protein » (PAP) (Yahalom *et al.*, 1991), ou bien encore des protéines de la famille des kinases (Mushegian & Koonin, 1993). Des kinases calcium dépendantes pourraient notamment être impliquées dans la régulation de la perméabilité des PDs (Yahalom *et al.*, 1998). La composition moléculaire exacte des PDs reste donc une énigme, et en particulier on connaît peu de choses quant à leur modification en réponse à un stress biotique (attaque des pathogènes) ou abiotique (froid, sécheresse, salinité...) (Karlson *et al.*, 2003; Murillo *et al.*, 1997). Différents facteurs provoquent la fermeture des plasmodesmes tels que la diminution de la concentration en sucres, la diminution de l'intensité lumineuse, la baisse de la température, l'augmentation de la concentration en ATP, en calcium cytoplasmique ou en inositol 1, 4, 5 triphosphate (IP₃), les réactions de phosphorylation, la plasmolyse ou une brusque variation de pression. Dans ce dernier cas, les plasmodesmes se ferment très rapidement et un dépôt de callose entre la membrane plasmique et la paroi au niveau du sphincter renforce l'efficacité de la fermeture (Epel, 1994; Overall & Blackman, 1996). A l'inverse, l'addition d'inhibiteurs de kinases a pour conséquence d'augmenter la SEL, et donc d'ouvrir les plasmodesmes.

A.3.a.ii. Le mouvement intercellulaire des virus

Le mouvement des virus à courte distance repose sur des interactions avec les protéines de l'hôte qui seront présentées dans le paragraphe A.3.c. Le mouvement à courte distance des virus s'appuie sur la continuité symplastique entre les cellules qui est assurée par les PDs. Cependant, le diamètre des PDs est trop étroit pour permettre le passage des virus sous la forme de virions ou de complexes ribonucléoprotéiques (RNP). Les complexes RNPs sont constitués du génome viral (ARN ou ADN) et de la protéine de mouvement (MP) associé parfois à la protéine de capsid (CP). La protéine MP possède la capacité de dilater les PDs, et par des mécanismes encore méconnus, permet le passage du complexe RNP dans la cellule voisine. L'exemple de mouvement à courte distance le mieux décrit dans la bibliographie concerne le TMV (Beachy & Heinlein, 2000) (Figure 5-c). Une autre stratégie utilisée par les virus pour passer d'une cellule à l'autre est la formation de structures tubulaires constituées essentiellement de protéines MP, qui peuvent être assimilées à des tunnels, et qui relie deux cellules adjacentes (Figure 5-b). A titre d'exemple, les virus qui utilisent cette

stratégie sont le *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) et le *Cowpea mosaic virus* (CPMV) (Laporte *et al.*, 2003; Pouwels *et al.*, 2003; Pouwels *et al.*, 2004).

A.3.a.iii. Le mouvement des virus à longue distance

Pour assurer sa propagation dans les parties distales de la plante, le virus suit le flux des photoassimilats *via* les tissus conducteurs (Leisner & Turgeon, 1993). Ce mouvement implique évidemment des protéines virales et des protéines de l'hôte qui restent largement méconnues (*cf* paragraphe A.3.d). Ce type de mouvement pourrait également être dépendant des conditions environnementales (intensité lumineuse, température) (Matthews, 1991). Le mouvement à longue distance commence lorsque le virus est libéré dans le système vasculaire et peut être divisé en 5 étapes (Figure 6) : (1) l'entrée du virus dans les cellules du parenchyme vasculaire *via* les cellules de la gaine périvasculaire, (2) la pénétration du virus dans le complexe cellule compagne/tube criblé, (3) le transport aux autres organes de la plante *via* les tubes criblés, (4) le déchargement, au niveau des tissus « puits », dans une nouvelle cellule nucléée du phloème et enfin (5) l'invasion de nouvelles cellules du mésophylle après le passage des cellules de la gaine périvasculaire. Le chargement du virus dans les tubes criblés s'effectue généralement à partir des CC mais il existe certaines exceptions : c'est le cas notamment du *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV), du *Sunnehemp mosaic virus* (SHMV), et du *Melon necrotic spot virus* (MNSV) qui peuvent atteindre les tubes criblés *via* les PDs connectant les cellules du parenchyme phloémien aux tubes criblés.

Dans le chapitre 2 je reviendrai plus en détail sur le mouvement spécifique des polérovirus qui sont restreints aux cellules du phloème.

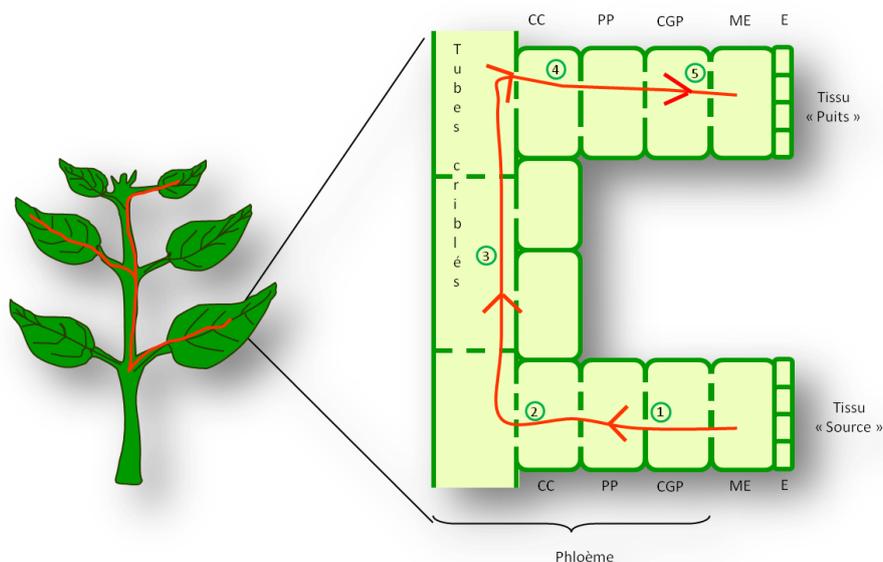


Figure 6 : Représentation schématique du mouvement à longue distance des virus.

CC : Cellule compagne, PP : Parenchyme phloémien, CGP : Cellule de la gaine périvasculaire, ME : Mésophylle, E : Epiderme.

Le mouvement à longue distance des virus nécessite généralement la protéine de capsid ce qui suggère que les virions constituent l'entité mobile qui chemine dans les tubes criblés. La translocation des virions dans les tubes criblés est probablement facilitée par des protéines phloémiennes, comme cela a été suggéré pour le CMV qui interagit avec un homologue de la protéine PP1 (Phloem protein 1) des *Cucurbitaceae* (Requena *et al.*, 2006). Même si le virion est la forme majoritairement utilisée par les virus pour se déplacer dans le phloème, les complexes RNPs, mettant en jeu l'ARN viral ainsi que des protéines virales (TGBp1 du PVX, Lough *et al.*, 2001 ; protéine 3aMP du CMV, Blackman *et al.*, 1998), peuvent également être responsables du mouvement systémique des virus. C'est le cas également des umbravirus comme le *Groundnut rosette virus* (GRV) qui ne possèdent pas de protéine CP (paragraphe A.3.d). Il faut signaler que certains virus comme le PMTV (*Potato mop-top virus*) combinent les deux stratégies (virions et complexes RNPs) pour envahir l'hôte (Torrance *et al.*, 2009).

Ces trois types de mouvements viraux (intracellulaire, intercellulaire et à longue distance) nécessaires au développement de l'infection ne sont pas toujours faciles à différencier sur un plan expérimental. La caractérisation moléculaire des mécanismes liés au trafic cellulaire des virus a commencé avec l'identification de la protéine de 30 kDa du TMV, facteur indispensable au mouvement intercellulaire (Deom *et al.*, 1987; Meshi *et al.*, 1987), et la découverte de ses capacités à augmenter la SEL des PDs (Wolf *et al.*, 1989). Depuis, de nombreuses protéines MPs impliquées dans le mouvement du virus de cellule à cellule ou à longue distance ont été identifiées (pour revues : Lucas, 2006; Scholthof, 2005; Taliansky *et al.*, 2008). Le transport intra- et intercellulaire des protéines virales et des ARN viraux montre l'implication forte du cytosquelette et du système membranaire. Dans les paragraphes suivants, je décrirai les interactions identifiées à ce jour entre les protéines virales et les protéines de l'hôte, impliquées dans le mouvement des virus (ces paragraphes ont été rédigés à partir des revues de Harries et Ding (2009) et de Niehl et Heinlein (2011)).

A.3.b. Fonctions dans le **mouvement intracellulaire**

De nombreux virus se répliquent au niveau des membranes cellulaires (Netherton *et al.*, 2007; Sanfaçon, 2005) mais la réplication virale peut également avoir lieu dans le noyau, comme dans le cas de certains virus à ADN dont le *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Gutierrez, 1999; Lazarowitz *et al.*, 2004), ou bien, comme pour le TMV et le CaMV, dans des inclusions cytoplasmiques spécialisées (Heinlein *et al.*, 1998; Mas & Beachy, 1999) (Modjtahedi *et al.*, 1984). Quel que soit le lieu de cette réplication, le virus doit ensuite se déplacer en périphérie de la cellule pour passer dans une cellule adjacente et pour cela il utilise le cytosquelette, les protéines motrices associées, et le

système membranaire intracellulaire. Pour une discussion complète du rôle du système membranaire dans le transport des virus, les revues de Boevink et Oparka (2005) et de Harries *et al.* (2010) constituent de bonnes références.

Une grande partie des études portant sur le mouvement intracellulaire des virus, concerne l'association de la protéine MP du TMV avec les microtubules (Heinlein *et al.*, 1995; McLean *et al.*, 1995; Padgett *et al.*, 1996). En effet, la protéine MP du TMV interagit fortement avec les microtubules et contient même des motifs caractéristiques de la tubuline (Boyko *et al.*, 2000b). Au début du cycle d'infection, les microtubules pourraient conduire la protéine MP, associée ou non à des ARNs, vers les PDs afin de préparer le mouvement du virus de cellule à cellule (Boyko *et al.*, 2007; Brandner *et al.*, 2008; Ouko *et al.*, 2010; Sambade *et al.*, 2008). Plusieurs interactions ont été mises en évidence entre la protéine MP du TMV et des facteurs de l'hôte associés aux microtubules (MTs) (Tableau 3) tels que la protéine **EB1a** (pour microtubule « End Binding ») (Lucas, 2006), la **tubuline- α,β** (Ferralli *et al.*, 2006), ou bien encore la **tubuline γ** (Sambade *et al.*, 2008).

| Virus | Protéines virales | Nature des interactions | (Références) |
|---|-------------------|--|--|
| Interactions protéines virales avec microtubules | | | |
| BYV | Hsp70h | Interagit <i>in vitro</i> avec les MTs | (Karasev <i>et al.</i> , 1992) |
| PVX | CP | Interagit <i>in vitro</i> avec les MTs | (Serazev <i>et al.</i> , 2003) |
| CaMV | P2 | Interagit avec les MTs et les stabilise. MTs nécessaires à la l'adressage de la protéine P2 au corps d'inclusion nécessaire à la transmission du virus | (Blanc <i>et al.</i> , 1996; Martiniere <i>et al.</i> , 2009a) |
| PMTV | TGB1p | Interagit avec les MTs | (Wright <i>et al.</i> , 2010) |
| TMV | MP | Interagit avec la tubuline et les MTs | (Ashby <i>et al.</i> , 2006; Boyko <i>et al.</i> , 2000a; Boyko <i>et al.</i> , 2000b; Boyko <i>et al.</i> , 2007; Ferralli <i>et al.</i> , 2006; Heinlein <i>et al.</i> , 1995; Heinlein <i>et al.</i> , 1998; McLean <i>et al.</i> , 1995; Netherton <i>et al.</i> , 2007; Sambade <i>et al.</i> , 2008; Sanfaçon, 2005) |
| TMV | MP | Interagit avec la tubuline- γ | (Sambade <i>et al.</i> , 2008) |
| TMV | MP | Interagit avec EB1a | (Lucas, 2006) |
| TMV | MP | Interagit avec la protéine MPB2C | (Kragler <i>et al.</i> , 2003; McLean <i>et al.</i> , 1995) |
| Interactions protéines virales avec microfilaments | | | |
| CMV | MP | Interagit avec l'actine-F et l'actine-G, désorganise les MFs | (Su <i>et al.</i> , 2010) |
| TMV | MP | Interagit avec l'actine | (McLean <i>et al.</i> , 1995) |

Tableau 3 : Protéines virales qui interagissent avec des protéines de plante associées au cytosquelette.

Je voudrais également mentionner deux protéines, la **calréticuline** et la protéine **MPB2C** (Movement protein binding 2C) qui interagissent avec la protéine MP du TMV (Chen *et al.*, 2005; Kragler *et al.*, 2003). La calréticuline est une protéine chaperonne du RE qui contrôle le niveau de calcium cellulaire, et qui est impliquée dans l'adhésion cellulaire et le contrôle de l'expression des gènes (Michalak *et al.*, 1999; Michalak *et al.*, 1992; Padgett *et al.*, 1996). Cette protéine interagit également avec la protéine Hc-Pro du *Papaya ringspot virus* (PRSV) qui a notamment un rôle dans le mouvement du virus (Shen *et al.*, 2010). La protéine **MPB2C**, possède un domaine similaire aux protéines de type myosine et kinésine, des protéines motrices du cytosquelette (Kragler *et al.*, 2003). La surexpression des deux protéines (calréticuline et MPB2C) entraîne une inhibition du mouvement du TMV (Chen *et al.*, 2005; Kragler *et al.*, 2003) corrélée à une augmentation de la quantité de protéines MP au niveau des MTs, ce qui pourrait refléter un ré-adressage de la protéine MP des PDs vers les MTs. Cependant, d'autres études contredisent l'implication des MTs dans l'acheminement de la protéine MP vers les PDs. En effet, des traitements chimiques désorganisant le réseau de microtubules et bloquant leur polymérisation, n'ont pas eu d'effet sur la propagation du TMV (Gillespie *et al.*, 2002; Kawakami *et al.*, 2004). De plus, le transport de mutants viraux du TMV touchés dans la protéine MP, et ayant une affinité réduite pour les MTs, n'est également pas affecté (Gillespie *et al.*, 2002). A un temps plus tardif de l'infection virale, la protéine MP du TMV est localisée au niveau des MTs mais ne se déplace pas (Ashby *et al.*, 2006; Boyko *et al.*, 2007). Des études supplémentaires seront donc nécessaires afin d'éclaircir les fonctions de l'interaction entre la protéine MP du TMV et les MTs. Des protéines de mouvement d'autres virus interagissent également avec les MTs, mais l'implication de cette interaction dans le mouvement du virus n'est pas clairement établie (pour revues voir Benitez-Alfonso *et al.*, 2010; Harries *et al.*, 2010). C'est le cas par exemple de la protéine TGBp1 du *Potato mop-top virus* (PMTV) (Wright *et al.*, 2010) et de la protéine Hsp70h du *Beet yellows virus* (BYV) (Karasev *et al.*, 1992). Cette interaction entre les MTs et la protéine Hsp70 du BYV n'a cependant pas été confirmée *in vivo* par Prokhnevsky *et al.* (2005).

L'implication du cytosquelette d'actine dans le mouvement intracellulaire des complexes de réplication a également été suggérée notamment pour le TMV. En effet, les complexes de réplication du TMV se déplacent le long des microfilaments (Liu *et al.*, 2005a) probablement pour être acheminés vers les PDs. L'implication des microfilaments dans le mouvement du TMV est renforcée par les résultats de plusieurs auteurs (Harries *et al.* (2009), Kawakami *et al.* (2004) et McLean *et al.* (1995)) qui ont notamment montré que la protéine MP du TMV et l'**actine** interagissent *in vitro*. Des résultats contradictoires ont cependant été obtenus par Hofmann *et al.* (2009) qui montrent que le cytosquelette d'actine n'est pas nécessaire à la propagation du TMV. Dans le cas du CMV, la protéine MP interagit *in vitro* avec l'actine globulaire (actine-G) et l'actine filamenteuse (actine-F) (Su *et al.*,

2010) et déstabilise les filaments d'actine, une étape nécessaire à l'augmentation de la taille limite d'exclusion des PDs et donc au mouvement intercellulaire.

Le rôle du cytosquelette d'actine dans le transport intracellulaire des protéines virales et/ou des virus, suggère également l'intervention de protéines motrices de type myosine dans le processus. Chez les plantes, ces protéines sont réparties en deux classes (VIII et XI) selon la séquence impliquée dans l'interaction avec l'actine (Hodge & Cope, 2000; Lee & Liu, 2004). Dès 2001, Von Bargen *et al.* identifient une interaction entre la protéine MP du TSWV et des protéines proches des myosines. Les résultats plus récents d'Avisar *et al.* (2008) montrent que les myosines de classe VIII sont nécessaires à la localisation de la protéine de mouvement (Hsp70h) du BYV au niveau des PDs mais aucune interaction directe entre ces protéines n'a cependant été démontrée. Le rôle des myosines dans le mouvement des virus semble par ailleurs spécifique du virus puisque les travaux de Harries *et al.* (2009) montrent l'implication de différentes myosines dans le transport intracellulaire du TMV, du PVX et du TBSV. Cependant, encore une fois, aucune interaction directe entre les myosines et les protéines virales, n'a été montrée.

Des protéines virales, autres que les protéines MPs, peuvent jouer un rôle dans le mouvement intracellulaire du virus. C'est le cas de la réplicase (126 kDa) du TMV qui forme des corps mobiles (Liu *et al.*, 2005a) et interagit avec la protéine « **Rab GDP dissociation inhibitor** » (**GDI2**) (Kramer *et al.*, 2011). Cette protéine possède des similarités de séquence avec la protéine ratPRA1 impliquée dans le transport vésiculaire (Waigmann *et al.*, 1994) et pourrait donc être impliquée dans le mouvement de ces corps mobiles.

A.3.c. Fonctions dans le **mouvement intercellulaire**

Les PDs constituent une barrière physique que le virus doit franchir pour réussir à passer de cellule en cellule. Pour cela, la protéine MP des virus a la capacité d'augmenter la SEL des PDs (pour revues voir Harries & Nelson, 2008; Waigmann *et al.*, 2004). Comme je l'ai mentionné dans le paragraphe précédent, les travaux de Su *et al.* (2010) réalisés sur la protéine MP du CMV et du TMV suggèrent que ces deux protéines MPs modifient la structure des PDs et contrôlent leur ouverture en interférant avec le cytosquelette d'actine. Malgré l'importance de cette étape nous ne savons que peu de choses aujourd'hui sur les mécanismes moléculaires mis en jeu et le processus de transport des composants viraux et cellulaires au travers des PDs demeure également assez énigmatique.

En plus du cytosquelette d'actine, la callose joue un rôle important dans le mouvement intercellulaire. En effet, lorsqu'une β 1-3 **glucanase** cellulaire, capable d'hydrolyser la callose, est

exprimée à partir du génome du TMV, celle-ci favorise la propagation du virus (Bucher *et al.*, 2001). Ces β -glucanases pourraient également être impliquées dans le mouvement du PVX puisque l'une des protéines MPs de ce virus, la protéine TGB2p, interagit par la technique du YDH, avec trois protéines de l'hôte nommées **TIPs** (pour « **Triple gene block interacting proteins** ») qui, elles-mêmes, sont des partenaires des β -glucanases (Fridborg *et al.*, 2003). Ces résultats qui suggèrent que la protéine TGB2p recrute les β -glucanases *via* les TIPs pour être adressée aux PDs, doivent être confirmés *in vivo*. L'implication de la callose dans la régulation du mouvement des virus au travers des PDs a été montrée pour le TMV. En effet, la protéine 30 kDa du TMV interagit avec une protéine **ankyrine (ANK)** (Ueki *et al.*, 2010) ce qui conduit à une diminution de l'accumulation de la callose au niveau des PDs et favorise le mouvement des virus vers la cellule adjacente. Notons qu'à l'inverse, il a été suggéré que le dépôt de callose au niveau des tubes criblés pourrait être une voie de résistance au TMV (*cf* paragraphe A.5.b page 36).

La **synaptotagmine (SYTA)** est un partenaire de la protéine MP du TMV et du *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) qui a été identifiée au cours du criblage d'une banque d'ADNc d'*A. thaliana*. Cette protéine est une protéine dite « senseur calcique » qui régule le trafic des vésicules d'endo- et d'exocytose (Lewis & Lazarowitz, 2010). Dans des mutants d'arabidopsis affectés dans l'expression de la protéine SYTA, l'infection systémique par les deux virus est retardée et la propagation intracellulaire de la protéine MP est inhibée. Les auteurs émettent l'hypothèse que les protéines MPs sont adressées vers les vésicules endosomales *via* leur interaction avec la protéine SYTA, et que ces vésicules seraient ensuite acheminées vers les PDs. Un modèle similaire a également été proposé pour le *Potato mop-top virus* (PMTV) dont la protéine MP interagit avec une protéine de plante de la famille des **chaperonnes DnaJ-like** de type **RME-8** (Receptor-mediated endocytosis) (Haupt *et al.*, 2005a). Les voies de sécrétion sont également utilisées par le *Turnip mosaic virus* (TuMV), pour adresser la protéine de mouvement CI et la protéine P3N-PIPO vers les PDs (Wei *et al.*, 2010). Cette protéine P3N-PIPO interagit avec la protéine CI et semble importante pour la formation, au niveau des PDs, de structures coniques essentielles pour le mouvement du virus (Wei *et al.*, 2010). P3N-PIPO interagit, notamment par YDH et BiFC (Biomolecular Fluorescence Complementation), avec la protéine **PCaP1 (Cation binding protein)** qui s'associe aux membranes par des myristoylations (Vijayapalani *et al.*, 2012). L'implication de la protéine PCaP1 dans le mouvement du TuMV a été confirmée par une accumulation virale plus faible, corrélée à des symptômes atténués, dans des mutants d'arabidopsis n'exprimant plus la protéine PCaP1 (Vijayapalani *et al.*, 2012). Les auteurs proposent que l'interaction de la protéine P3N-PIPO avec la protéine PCaP1 entrainerait la formation de complexes RNPs au niveau des membranes, qui seraient ensuite acheminés vers les PDs.

Les protéines **PDLPs (Plasmodesmata located proteins)** sont des protéines qui sont localisées au niveau des PDs et qui interagissent avec la protéine MP du CaMV et du GFLV. Il a été montré que la propagation du GFLV et du CaMV est ralentie dans des plantes mutantes n'exprimant plus les protéines PDLPs et que la présence de ces protéines est importante pour la formation des tubules constitués de la protéine MP du GFLV (Amari *et al.*, 2010). L'implication de ces protéines dans le mouvement viral semble spécifique des virus utilisant des tubules car l'inhibition de l'expression de plusieurs protéines PDLPs n'a pas eu d'effet sur l'accumulation de l'ORMV (*Oil-seed rape mosaic virus*) qui utilise une stratégie de mouvement indépendante de la formation de ces structures. Ces protéines PDLPs pourraient donc servir de récepteurs aux protéines MPs au niveau des PDs pour permettre la formation des tubules.

Plusieurs protéines kinases ont également été identifiées comme des facteurs potentiels de la régulation du mouvement intercellulaire des virus *via* les PDs. Une étude récente a montré que la majorité des protéines MPs sont phosphorylées au niveau du RE avant d'atteindre les PDs (Tyulkina *et al.*, 2010). L'exemple que je citerai est une nouvelle fois celui de la protéine MP du TMV qui est phosphorylée suite à son interaction avec une protéine kinase appelée **PAPK (Plasmodesmata associated protein kinase)** (Noueiry *et al.*, 1994). La phosphorylation de la protéine MP du TMV s'effectuerait lors du passage du complexe RNP à travers les PDs et permettrait de contrôler la transition moléculaire entre l'étape de transport et celle de la traduction/réplication (Rhee *et al.*, 2000). D'autres protéines kinases capables de phosphoryler des protéines MP ont été identifiées (Tableau 4) mais le rôle de ces modifications post-traductionnelles dans le cycle viral reste à établir.

| Virus | Protéines virales | Protéines de l'hôte | (Références) |
|----------------------|------------------------------|---|-----------------------------------|
| PVX | MP (TGBp1) | Kinase de type 2 | (Modena <i>et al.</i> , 2008) |
| ToMV | MP | Kinase de type 2 | (Matsushita <i>et al.</i> , 2000) |
| ToMV, CMV | MP | MIP-T7 | (Yoshioka <i>et al.</i> , 2004) |
| PLRV | MP (17 kDa) | Kinase C | (Sokolova <i>et al.</i> , 1997) |
| CaLCuV, TGMV, TCrLYV | NSP (Non structural protein) | Proline-rich extensin-like receptor protein kinase (PERK)= NsAK (NSP-associated kinase) | (Florentino <i>et al.</i> , 2006) |

Tableau 4 : Protéines virales qui interagissent avec des protéines kinases.

Je citerai également une interaction identifiée entre la protéine P8, une des deux protéines de mouvement du *Turnip crinkle virus* (TCV), et la protéine d'arabidopsis **Atp8** (At1g32230), encore appelée protéine **RCD1 (Required cell differentiation 1)**. Cette protéine contient plusieurs motifs

« RGD » (Lin & Heaton, 2001) qui sont caractéristiques des protéines de la matrice extracellulaire participant à l'adhésion cellulaire (Taliany *et al.*, 2008). Il est donc envisageable que l'interaction entre les protéines MPs et la protéine RCD1 soit responsable d'interactions au niveau de la membrane plasmique facilitant le mouvement intercellulaire mais d'autres études seront nécessaires pour le préciser.

Enfin, plusieurs protéines **chaperonnes** ont été identifiées comme partenaires des protéines de mouvement et des protéines de capsid (Tableau 5). Ces interactions pourraient permettre le remodelage des protéines virales pour assurer leur passage au travers les PDs.

| Chaperonnes | Virus | Protéines virales | Fonctions potentielles | (Références) |
|-----------------|-------|-------------------------|---|--|
| NtMPIP1 | TMV | MP | Protéine de la famille des protéines DnaJ de type I | (Shimizu <i>et al.</i> , 2009) |
| NtCPIP1 | PVY | CP | Recrutement de la protéine HSP70 | (Hofius <i>et al.</i> , 2007) |
| NtDNAJ_like | TSWV | NSm | Protéine de la famille des HSP40, pourrait recruter les HSP70 | (Soellick <i>et al.</i> , 2000) (Von Bargen <i>et al.</i> , 2001) |
| cpHSC70-1 | AbMV | MP | Heat shock cognate 70 : transport viral ou induction de symptômes | (Krenz <i>et al.</i> , 2010) |
| NbDnaJ | PVX | CP | Chaperonne (réplication ou mouvement) | (Cho <i>et al.</i> , 2011) |
| DNAJ_like (Riz) | RSV | Pc4 (MP potentielle) | Dna-J like protein type I | (Lu <i>et al.</i> , 2009) |
| HSC70 (Tomate) | PepMV | CP | Heat shock cognate 70 | (Mathioudakis <i>et al.</i> , 2011) |

Tableau 5 : Protéines virales qui interagissent avec des protéines chaperonnes.

A.3.d. Fonctions dans le **mouvement à longue distance**

Les virus se déplacent à longue distance majoritairement *via* le phloème mais également, dans de très rares cas, *via* le xylème. Cependant, contrairement aux nombreuses études portant sur les facteurs de l'hôte impliqués dans le mouvement intra- ou intercellulaire, celles portant spécifiquement sur le mouvement des virus à longue distance ne sont pas aussi abondantes. Ce manque de données provient de la difficulté d'étudier le phloème, un tissu enfoui au cœur de la plante. De plus, les expériences mises en œuvre pour étudier le mouvement du virus dans la plante ne permettent généralement pas de dissocier le mouvement intercellulaire de celui à longue distance. Néanmoins, j'ai pu relever dans la littérature un certain nombre d'interactions entre les protéines cellulaires et virales qui semblent essentielles pour le mouvement à longue distance.

Il a notamment été démontré que la **pectine méthyl estérase (PME)** de tabac interagit avec les protéines MPs du TMV, du *Turnip vein-clearing virus* (TVCV) et du CaMV (Chen *et al.*, 2000; Dorokhov *et al.*, 1999) et qu'elle joue potentiellement un rôle dans le mouvement à longue distance des virus. En effet, l'inhibition de l'expression de cette PME, par une construction antisens introduite dans le génome du tabac, entraîne un retard du mouvement systémique du TMV (Chen & Citovsky). L'interaction entre la protéine PME et la protéine MP du TMV permettrait à cette dernière d'être adressée aux PDs grâce aux voies de sécrétion, mais cette hypothèse a récemment été rejetée par plusieurs études qui ont montré que les voies de sécrétion ne sont pas impliquées dans l'adressage des protéines de mouvement vers les PDs (Amari *et al.*, 2010; Boutant *et al.*, 2009; Tagami & Watanabe, 2007). Le rôle exact de la PME dans le mouvement du virus à longue distance reste donc à éclaircir.

L'implication des voies de sécrétion dans le mouvement à longue distance du TMV, bien que controversée, a également été suggérée pour d'autres virus (Tableau 6). En effet, ces voies seraient impliquées dans le retrait des protéines de mouvement au niveau des PDs.

| Virus | Protéines virales | Protéines de plantes associées au système sécrétoire et au trafic vésiculaire | (Références) |
|--------------------|-------------------|---|---------------------------------|
| TMV | 126-kDa | Protéine TOM1 associée aux vacuoles, au RE et aux autres membranes | (Yamanaka <i>et al.</i> , 2000) |
| TMV, CaLCuV, SqLCV | MP | Protéine SYTA associée aux endosomes et autres membranes | (Lewis & Lazarowitz, 2010) |
| CPMV | 60K | Protéine SNARE-like associée à la fusion des vésicules | (Carette <i>et al.</i> , 2002) |
| CaMV | MP | M17 : Rab acceptor homolog associé aux membranes des vésicules | (Huang <i>et al.</i> , 2001) |
| GFLV | MP | Protéine KNOLLE (ou SYP111), famille des protéines syntaxines impliquées dans l'exocytose | (Laporte <i>et al.</i> , 2003) |
| BMV | 3aMP | NbNACa1 potentiellement impliquée dans le transport des protéines vers le réticulum endoplasmique | (Padgett <i>et al.</i> , 1996) |

Tableau 6 : Protéines virales qui interagissent avec des protéines de plantes associées au système sécrétoire et au trafic vésiculaire.

Des études particulièrement intéressantes portant sur le *Groundnut rosette virus* (GRV) ont montré que des protéines nucléaires peuvent jouer un rôle dans le mouvement du virus à longue distance. Au cours du cycle viral, la protéine cytoplasmique codée par l'ORF3 (P3) de ce virus est transférée dans le noyau où elle interagit avec la fibrillarine et réorganise les corps de Cajal qui vont ensuite fusionner avec le nucléole. La localisation nucléolaire de la protéine P3 est essentielle au mouvement

à longue distance de cet umbravirus qui ne code pour aucune protéine de capsid (Kim *et al.*, 2007b). L'interaction de la protéine P3 avec la **fibrillarine** entraîne la redistribution de cette dernière du noyau vers le cytoplasme, une étape également indispensable pour le mouvement systémique du virus (Kim *et al.*, 2007a). Lors de ce transfert, le complexe P3/fibrillarine serait associé à l'ARN viral sous la forme d'un complexe RNP (Kim *et al.*, 2007a; Kim *et al.*, 2007b). Des études par microscopie à force atomique (AFM) ont également montré que la protéine P3, la fibrillarine et l'ARN viral, forment *in vitro* et *in vivo* des structures en anneau (Canetta *et al.*, 2008; Taliansky *et al.*, 2003) qui pourraient être impliquées dans le mouvement à longue distance du virus (Kim *et al.*, 2007a). Enfin, la découverte récente d'une interaction entre la fibrillarine et la protéine de mouvement TGB1p d'un hordeivirus (le *Poa semilatent virus*, PSLV) (Semashko *et al.*, 2012a) renforce l'implication de cette protéine dans le mouvement des virus.

La protéine 1a du CMV n'est pas seulement impliquée dans la réplication virale mais également dans le mouvement systémique du virus (Palukaitis & Garcia-Arenal, 2003). En criblant une banque d'ADNc de tabac par YDH, Kim *et al.* (2008) ont identifié une **méthyltransférase (Tcoi1** pour « Tobacco CMV 1a-interacting protein 1 »), qui interagit avec la protéine 1a par son domaine méthyltransférase. La surexpression de Tcoi1 favorise la propagation du CMV alors que son inhibition ralentit l'infection. La protéine Tcoi1 est capable de méthyliser *in vitro* et *in vivo* la protéine 1a du CMV (Kim MJ, 2008) mais le rôle de la méthylation dans le mouvement du virus n'est pas connu.

Par une approche similaire, Li *et al.* (2005) ont identifié une protéine de tabac appelée **IP-L** pour « Interacting protein-L », capable d'interagir avec la protéine CP du ToMV. Le niveau d'expression de cette protéine (accumulation des ARNm) augmente suite à l'infection par le ToMV et des plants de tomate n'exprimant plus cette protéine présentent un retard à l'infection. Selon les auteurs, l'interaction CP/IP-L serait impliquée dans le mouvement à longue distance du virus. En 2008, Zhang *et al.* ont montré que les protéines CP et IP-L colocalisent au niveau des membranes des thylakoïdes des chloroplastes suggérant que cette interaction CP/IP-L pourrait également affecter la fonction des chloroplastes conduisant à la chlorose observée chez les plantes infectées. Une protéine homologue de la protéine IP-L (89 % d'identité en acides aminés) a également été identifiée chez le tabac (**NbPCIP1**) et interagit *in vitro* et *in vivo* avec la protéine CP du PVX (Park *et al.*, 2009). Le gène codant pour la protéine NbPCIP1 est surexprimé lors de l'infection virale. L'inhibition de l'expression du gène par la technique du VIGS (Virus-induced gene silencing) entraîne une baisse de l'accumulation virale et, *a contrario*, sa surexpression entraîne une augmentation de la charge virale. Les auteurs proposent que cette interaction soit impliquée, directement ou indirectement, dans le mouvement du virus, ou dans sa réplication.

Enfin, on peut mentionner la protéine **PVIP** (Potyvirus VPg interacting protein) identifiée en criblant une banque d'ADNc de pois (*Pisum sativum*) avec la protéine VPg du PSbMV (*Pea seed-borne mosaic virus*) (Dunoyer *et al.*, 2004). Cette protéine possède des similarités de séquence avec les protéines PVIP1 (encore appelée OBE2) et PVIP2 (encore appelée OBE1) d'arabidopsis qui sont des protéines riches en cystéine mais de fonction inconnue. PVIP possède un domaine « PHD » qui suggère un rôle de cette protéine dans le remodelage de la chromatine et dans le contrôle de la transcription. L'absence d'interaction entre une protéine VPg mutée du PSbMV et la protéine PVIP entraîne une diminution de l'accumulation du virus, ce qui suggère l'implication de cette protéine dans le mouvement du virus (Dunoyer *et al.*, 2004). L'interaction PVIP1/VPg n'est pas spécifique du PSbMV puisqu'elle a également été mise en évidence dans le cas du TuMV et du LMV. A l'inverse, aucune interaction n'a été observée entre PVIP1 et les protéines VPg du TEV (*Tobacco etch virus*), du CPMV, du TBRV (*Tomato black ring virus*) et du GFLV suggérant une action virus spécifique de la protéine.

A.4. Fonctions dans la **symptomatologie**

L'expression des symptômes induits par l'infection virale, tels que les jaunissements, rougissements, le nanisme, les nécroses, sont le reflet de dérèglements qui perturbent le métabolisme cellulaire. Peu de données sont connues sur les interactions entre les facteurs viraux et les facteurs de l'hôte qui conduisent à l'apparition de symptômes. Etudier l'expression des symptômes dans le contexte général de l'infection virale peut se révéler difficile car leur extériorisation peut résulter d'un ensemble de perturbations métaboliques résultant elles-mêmes d'un ensemble d'interactions virus-hôte. Seule la reproduction des symptômes viraux dans des plantes transgéniques exprimant une protéine virale permet sans ambiguïté d'identifier la protéine responsable des perturbations métaboliques et permet de rechercher ses partenaires. Cette approche a été suivie pour le CMV dont la protéine 2b, suppresseur de *gene silencing*, est également impliquée dans le mouvement du virus (Ding *et al.*, 1995; Ji & Ding, 2001; Shi *et al.*, 2003; Soards *et al.*, 2002). Cette protéine induit des symptômes après expression dans des plantes transgéniques (Brigneti *et al.*, 1998; Lucy *et al.*, 2000). En criblant une banque d'ADNc d'*A. thaliana* par la technique du YDH avec la protéine 2b, Inaba *et al.* (2011) ont identifié une catalase (**CAT3**). Les catalases sont des enzymes universelles, présentes chez presque tous les organismes vivants, qui contrôlent l'homéostasie des dérivés oxydatifs de l'oxygène (ou ROS pour « reactive oxygen species ») produits suite à une infection par un pathogène (Du *et al.*, 2008). Les auteurs ont confirmé cette interaction *in planta* par des tests « de ligation de proximité » (ou PLA pour « proximity ligation assay ») et observé que la protéine CAT3, habituellement cytoplasmique, est relocalisée dans le noyau après l'interaction

avec la protéine 2b. Cette interaction semble neutraliser les mécanismes de défense de la plante, favoriser la réplication virale et induire l'apparition de chloroses.

On relève également dans la bibliographie un autre exemple qui identifie une voie hormonale comme une voie potentiellement responsable de l'extériorisation des symptômes. Une interaction a en effet été mise en évidence entre la protéine P2, une des 7 protéines de structure du *Rice dwarf virus* (RDV) et différentes protéines « **Ent-kaurene oxidase** » de riz (Zhu *et al.*, 2005). Ces protéines sont impliquées dans la voie de synthèse des gibbérellines et les auteurs émettent l'hypothèse que l'interaction de cette protéine avec la P2 du RDV pourrait conduire à une réduction de l'accumulation de gibbérellines dans les plantes infectées, et donc au nanisme de ces plantes.

Pour conclure ce paragraphe, je souhaiterais mentionner à nouveau l'interaction entre la protéine AL1 du TGMV et un homologue de la protéine **pRBR (Retinoblasma-like protein)**, préalablement citée dans le paragraphe réplication, mais qui joue également un rôle dans la symptomatologie et dans la spécificité tissulaire (Kong *et al.*, 2000).

A.5. Fonctions dans les **réactions de défense de la plante vis-à-vis des virus**

A.5.a. Fonctions dans le **gene silencing**

Parmi les étapes clés qui vont permettre l'établissement de l'infection virale il y a l'inhibition des mécanismes de défense de la plante et notamment celui de la voie du *gene silencing*. Pour ce faire, les virus expriment des protéines virales dites « supprimeurs de *silencing* » (ou VSR pour « Viral suppressor of RNA silencing ») qui, selon les virus, vont agir à différentes étapes de la voie du *gene silencing*. Aujourd'hui encore la compréhension de ces mécanismes reste partielle, même si ces dernières années des avancées majeures ont été faites avec l'identification de facteurs de la plante qui interagissent avec les supprimeurs de *silencing*.

Tout d'abord, les protéines **ALY** d'*A. thaliana* et de *N. benthamiana* sont des partenaires du VSR du *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), la protéine P19 (Uhrig *et al.*, 2004). Ces protéines ALY sont majoritairement nucléaires et interviennent dans l'activation de la transcription, dans la maturation des ARN et dans leur export vers le cytoplasme (Bruhn *et al.*, 1997; Le Hir *et al.*, 2000a; Le Hir *et al.*, 2000b; Stutz *et al.*, 2000; Virbasius *et al.*, 1999; Zhou *et al.*, 2000). Dans leurs travaux, Uhrig *et al.* ont montré que certaines des protéines ALY étaient redirigées du noyau vers le cytoplasme en

présence de la protéine P19. En 2006, Canto *et al.* ont constaté que certaines protéines ALY étaient également capables de relocaliser la protéine P19 du cytoplasme vers le noyau. Cette relocalisation entraîne la perte de fonction de VSR de la protéine P19. Ces protéines pourraient donc avoir un rôle actif dans la régulation de la pathogénicité du virus.

Un certain nombre d'interactions a également été identifié entre des protéines de la famille argonaute (AGO) et différents VSR comme la protéine 2b du CMV (Gonzalez *et al.*, 2010; Hamera *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2006), la protéine P25 du PVX (Chiu *et al.*, 2010) et la protéine P0 du TuYV (Bortolamiol *et al.*, 2007). Les protéines AGO appartiennent au complexe RISC (RNA induced silencing complex) (Figure 7 - volet gauche) et ont une activité catalytique ribonucléasique. Les protéines AGO sont capables de cibler les ARNs complémentaires des siRNA (small interfering RNA) simple brin pris en charge dans le complexe RISC, et de les cliver. Concernant les polérovirus, Bortolamiol *et al.* (2007) ont montré que la protéine P0 du TuYV cible la protéine AGO1 et entraîne sa dégradation par un mécanisme qui met en jeu une interaction spécifique entre la protéine P0 et une protéine de la famille SKP (S-phase kinase associated protein) appartenant au complexe SCF (SKP-Cullin F-box protein complex) (Pazhouhandeh *et al.*, 2006) (Figure 7 - volet droit).

Cette voie du *gene silencing* anti-viral pourrait être également la cible de la protéine P25 du *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV). En effet, Thiel *et al.* (2012) ont montré récemment la capacité de cette protéine à interagir avec la protéine **FBK** appartenant au complexe SCF et possédant un domaine F-box ainsi que deux domaines Kelch. Cette protéine FBK interagit avec les protéines ASK1 et ASK2 qui sont également des partenaires de la protéine P0 du TuYV Pazhouhandeh *et al.* (2006).

Plusieurs partenaires des suppresseurs de *gene silencing* des bégomovirus ont également été identifiés ces dernières années. On peut citer tout d'abord les interactions observées entre la protéine AL2 du *Tomato golden mosaic virus* (TGMV) ou la protéine L2 du *Beet curly top virus* (BCTV) avec une adénosine kinase (**ADK**), enzyme clé du métabolisme qui convertit l'adénosine en 5'-AMP et qui est impliquée dans le cycle du méthyl. Les auteurs ont montré que les protéines AL2 et L2 suppriment le *gene silencing* au niveau transcriptionnel en inactivant la protéine ADK (Buchmann *et al.*, 2009; Raja *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2003) et en interférant probablement avec la méthylation du génome viral nécessaire à la mise en place du *gene silencing* (Bisaro, 2006; Wang *et al.*, 2005).

Les protéines AL2 et L2 interagissent également avec une protéine kinase d'*A. thaliana* de la famille **SNF1** (également appelée AKIN11), impliquée dans la régulation du métabolisme cellulaire (Hao *et al.*, 2003), et l'inactivent ce qui conduit à une augmentation de l'accumulation virale (Hao *et al.*, 2003).

L'AMP synthétisé par la protéine ADK, pouvant stimuler l'activité de la kinase SNF1, Wang *et al.* (2005) proposent que l'inactivation de la protéine ADK par les protéines virales (AL2 et L2) conduise à une diminution de l'AMP et donc à une diminution de l'activité de la protéine SNF1. L'action des protéines AL2 et L2 sur SNF1 serait donc d'une part directe, *via* leur interaction avec cette protéine, et d'autre part indirecte, *via* leur interaction avec la protéine ADK, qui agit sur la concentration en AMP et donc sur SNF1. L'ensemble de ces interactions renforcerait l'affaiblissement des mécanismes de défense de la plante et conduirait à une accumulation accrue du virus.

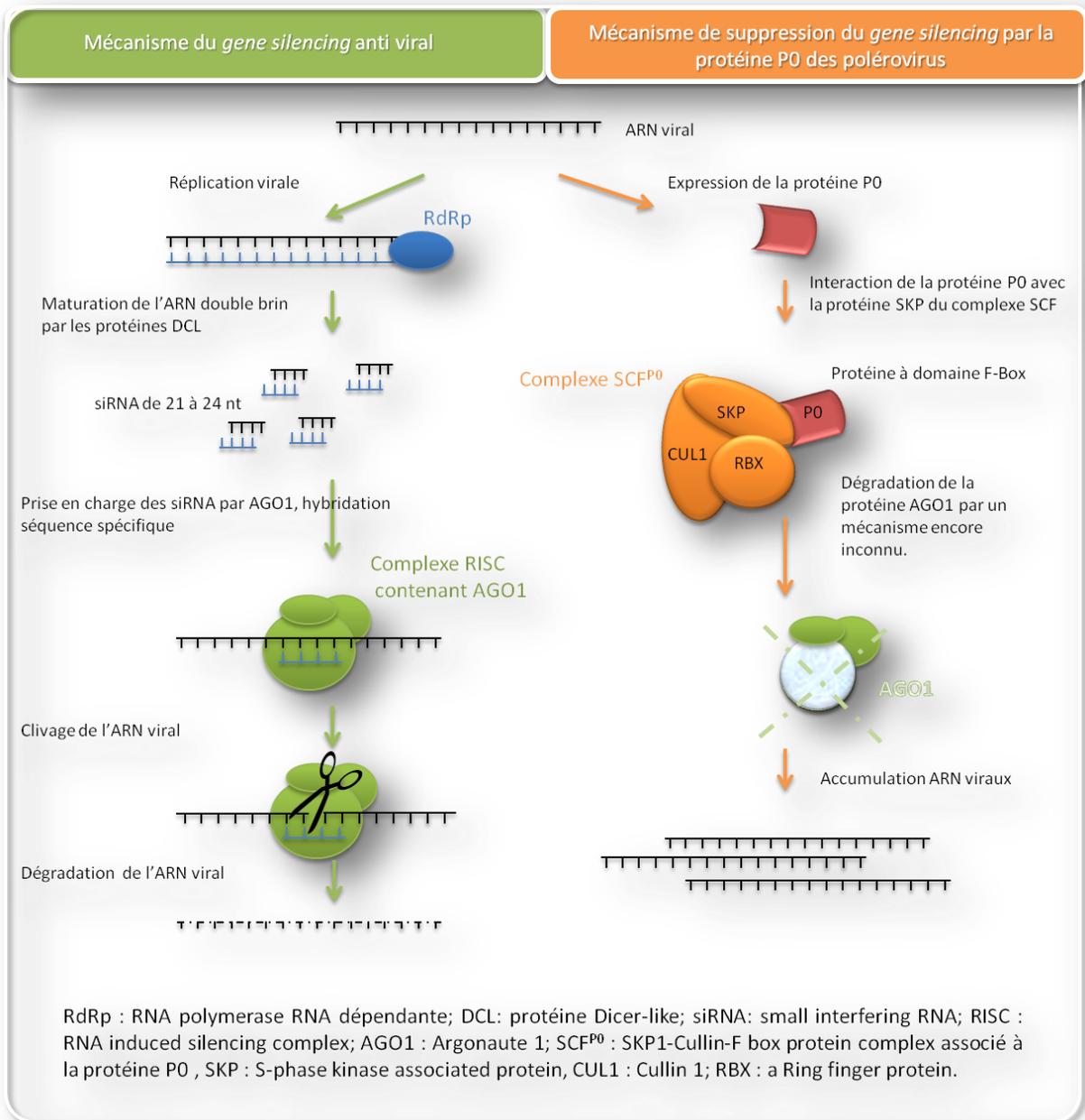


Figure 7 : Le mécanisme de *gene silencing* anti-viral chez les plantes (rôle de la protéine AGO1) et suppression de ce mécanisme par la protéine P0 des polérovirus. D'après Bortholamiol *et al.* (2008).

D'autres partenaires de protéines suppresseurs du *gene silencing* ont également été identifiés sans que les mécanismes induits par ces interactions soient connus. Il s'agit d'une part, de la protéine **SGS3 (Suppressor of gene silencing 3)** de tomate qui interagit avec la protéine V2 du *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) (Glick *et al.*, 2008) et d'autre part, d'une protéine kinase (**Shaggy-like kinase, SISK**) qui interagit avec la protéine C4 du *Tomato leaf curl virus* (ToLCV) (Dogra *et al.*, 2009). Dans les deux cas, les auteurs ont montré que l'interaction entre le suppresseur de *gene silencing* et la protéine de l'hôte identifiée, était indispensable à la suppression du mécanisme de *gene silencing*. Une protéine de riz, **OsSGS3**, homologue de la protéine SGS3 d'arabidopsis a également été identifiée comme partenaire de la protéine P2 du *Rice stripe virus* (RSV) (Du *et al.*, 2011). Cette protéine SGS3 est impliquée dans la biogénèse des ta-siRNA (trans acting-small interfering RNA) en agissant comme co-activateur de la polymérase RDR6 et en protégeant l'ARN simple brin de la dégradation (Elmayan *et al.*, 2009). L'interaction entre la protéine P2 du RSV et la protéine OsSGS3 bloquerait les étapes du mécanisme de *gene silencing* contrôlées par les protéines RDR6 et SGS3.

Chez les curtovirus, des travaux récents ont montré l'implication de la voie de la méthylation dans les mécanismes de défense de la plante. Cette modification épigénétique permet l'inhibition de l'expression du génome viral. Zhang *et al.* (2011) ont en effet mis en évidence une interaction entre la protéine S-adenosyl-méthionine decarboxylase 1 (**SAMDC1**), limitant la méthylation du génome viral, et la protéine C2 (suppresseur de *gene silencing*) du BSCTV (*Beet severe curly top virus*). En interagissant avec la protéine SAMDC1, la protéine C2 du BSCTV réduit la dégradation de SAMDC1 contrôlée par le protéasome 26S, ce qui conduit à une inhibition de la méthylation de l'ADN viral et donc à une diminution des mécanismes de défense de la plante. Cette interaction, a été révélée en criblant une banque d'ADNc d'*A. thaliana* par la technique du YDH, a été confirmée *in vitro* et *in planta*.

A.5.b. Fonctions dans d'autres mécanismes de défense contre le virus

Outre le mécanisme de *gene silencing* visant à inhiber l'expression du génome viral, les plantes ont également établi d'autres mécanismes de défense qui reposent par exemple sur la reconnaissance d'un facteur de virulence du pathogène par un facteur de résistance de l'hôte. Ces interactions conduisent à une réaction HR entraînant la mort des cellules infectées et donc limitant la propagation du virus. Ce type de défense a été décrit pour le TMV vis-à-vis duquel les plants de tabac portant le gène *N* développent une réaction HR suite à une infection par ce virus (Holmes, 1938). Le gène *N* code pour une protéine de la famille des NB-LRR (Nucleotide-binding site and leucine rich repeat protein) (Whitham *et al.*, 1994). Le domaine hélicase de la réplicase du TMV (la protéine p50) est un éliciteur de la résistance contrôlée par la protéine N (Abbink *et al.*, 1998; Erickson *et al.*, 1999;

Padgett *et al.*, 1997). La protéine p50 interagit avec les protéines **14-3-3** et des protéines chloroplastiques de tabac **NRIP1** (N receptor-interacting protein) (Caplan *et al.*, 2008; Konagaya *et al.*, 2004). En présence de la protéine p50, la protéine NRIP1 est relocalisée des chloroplastes vers le cytoplasme et le noyau, où elle va former un complexe avec les protéines N et p50 (Caplan *et al.*, 2008). Dans leur modèle, Caplan *et al.* proposent que le complexe protéique « p50/NRIP1/N » (et probablement d'autres protéines de l'hôte) active la protéine N, conduisant à l'adressage nucléaire de la protéine N et à l'activation de la réaction HR. Les protéines 14-3-3 sont, quant à elles, des protéines multifonctionnelles qui ont de multiples partenaires cellulaires impliqués dans la régulation des fonctions du cycle cellulaire (Roberts, 2003; Sehnke *et al.*, 2002). Elles pourraient donc également s'associer à la protéine N (Konagaya *et al.*, 2004) mais le rôle du complexe p50/14-3-3/N n'a pas été décrit.

L'écotype Dijon d'*Arabidopsis* (Di-0) possède une résistance naturelle au *Turnip crinckle virus* (TCV), qui ralentit le mouvement vasculaire du virus (Simon *et al.*, 1992). L'éliciteur de cette réaction de défense est la protéine CP du TCV (Oh *et al.*, 1995; Simon *et al.*, 1992). La protéine **TIP** d'*Arabidopsis* (TCV-interacting protein) a été identifiée comme un partenaire de la protéine CP du TCV lors d'un criblage de banque d'ADNc par la technique du YDH (Ren *et al.*, 2000). Ren *et al.* ont observé que l'absence d'interaction entre la protéine TIP et une protéine CP mutée conduit à l'absence d'induction de la réaction HR et à l'absence de résistance dans l'écotype Di-0. L'interaction CP/TIP semble donc impliquée dans le mécanisme de résistance au TCV, et la protéine CP pourrait être un éliciteur de la réaction HR, en relocalisant, par exemple, la protéine TIP du noyau vers le cytoplasme (Ren *et al.*, 2005). Ces résultats sont cependant controversés car les travaux de Jeong *et al.* (2008) ne valident pas cette hypothèse.

La protéine **IAA26** de tomate et les protéines **IAA26 (ou PAP1)**, **IAA27** et **IAA18** d'*A. thaliana* appartiennent à la famille des protéines « Auxin/indol-3-acide acétique » (AUX/IAA) et interagissent également avec le domaine hélicase de la réplicase du TMV (Padmanabhan *et al.*, 2005; Padmanabhan *et al.*, 2008; Padmanabhan *et al.*, 2006). Cette interaction, conservée chez différents hôtes, semble donc nécessaire à l'établissement du cycle infectieux du TMV. Les protéines AUX/IAA sont des facteurs de transcription qui régulent l'expression des gènes impliqués dans la réponse à l'auxine. Néanmoins, la voie de l'auxine qui régule la croissance de la plante et son développement, n'est à ce jour pas décrite comme une voie métabolique impliquée dans le cycle viral. La relocalisation de la protéine IAA26 en présence du TMV (Padmanabhan *et al.*, 2006), suggère que le virus modifie les fonctions de facteur de transcription de la protéine IAA26. Padmanabhan *et al.* (2008) ont montré que cette interaction est particulièrement indispensable au virus pour son

accumulation dans les tissus matures où se localise majoritairement la protéine IAA26. Selon les auteurs, le virus pourrait modifier les fonctions de la protéine IAA26 de manière à reprogrammer la cellule et établir un environnement favorable à sa multiplication.

Le facteur de transcription **ATAF2**, identifié par criblage de banque d'ADNc d'*A. thaliana* par la technique du YDH, est un régulateur positif des mécanismes de défense gouvernés par l'acide salicylique. Le domaine NAC de ce facteur de transcription se lie au domaine hélicase de la réplicase du TMV (protéines de 126 et 183 kDa) (Wang *et al.*, 2009). La transcription du gène *Ataf2* est augmentée suite à l'infection par le TMV (augmentation du niveau d'ARNm), et la surexpression d'ATAF2 réduit significativement l'accumulation du virus. Une étude récente de Wang *et al.* (2012) a permis d'identifier les gènes cibles du facteur de transcription ATAF2. Parmi ceux-ci, on trouve le gène *Pao3* qui code pour une « Polyamine oxydase 3 » et qui est positivement régulé par ATAF2. Les polyamines s'accumulent suite à l'attaque d'un pathogène (Hussain *et al.*, 2011) et sont métabolisés par PAO3 pour produire du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) dans les péroxysomes et ainsi générer un signal d'activation des réactions de défense de la plante (Uehara *et al.*, 2005).

Un autre gène de défense positivement régulé par ATAF2 est *Oxs3*, qui code pour la protéine « Oxidative Stress 3 ». Il est intéressant d'observer que la protéine OXS3 est nécessaire pour la résistance au cadmium qui se manifeste par un dépôt de callose au niveau des PDs (Ueki & Citovsky, 2002; Zavaliev *et al.*, 2011). Un traitement au cadmium stimule la résistance des plantes au TMV, probablement grâce à l'induction de la protéine cdiGRP (cadmium induced glycine-rich protein) qui favorise le dépôt de callose (Ueki & Citovsky, 2005).

Ainsi, dans ces deux exemples, on constate qu'ATAF2 régule l'expression de deux gènes, *Pao3* et *Oxs3*, ayant un effet délétère sur le cycle du TMV. Le virus ciblerait le facteur ATAF2 pour contrecarrer les mécanismes de défense de la plante.

Le second facteur de la plante impliqué dans l'accumulation du TMV a été identifié plus récemment (Yamaji *et al.*, 2010a) en criblant cette fois une banque d'ADNc de *N. tabacum* par la technique du YDH avec le domaine polymérase de la protéine RdRp (domaine présent uniquement dans la protéine de 183 kDa). Il s'agit d'une protéine qui contient un domaine RING, encore appelée **TARF** pour « **TMV-associated RING Finger protein** ». Les auteurs ont montré que cette protéine est surexprimée suite à l'inoculation du TMV et que l'inhibition de l'expression de la protéine TARF par la technique du VIGS, entraîne une augmentation de l'accumulation de l'ARN viral. Une surexpression de la protéine TARF entraîne au contraire une diminution de l'accumulation du TMV. Ces résultats indiquent que la protéine TARF de *N. tabacum* inhibe l'accumulation du TMV *via* son interaction avec la protéine RdRp. Cette protéine TARF possède un motif RING-H2 similaire à celui de la protéine EL5

qui a une activité « ubiquitin ligase ». La protéine TARF pourrait donc, elle aussi, posséder cette activité et ubiquitinyler la protéine RdRp du TMV, conduisant ainsi à sa dégradation et donc à une diminution de l'accumulation du TMV. Cette hypothèse reste à vérifier notamment en analysant l'activité « ubiquitin ligase » de la protéine TARF.

Enfin, pour finir ce paragraphe sur les interactions impliquées dans l'accumulation virale, j'ai reporté dans le Tableau 7, des protéines cellulaires qui ont un effet sur la charge virale, mais pour lesquelles le mode d'action n'a pas encore été élucidé.

| Virus | Acronyme | Protéines virales | Protéines de l'hôte | Action sur l'accumulation virale | (Références) |
|--------------------------------|----------|-----------------------------|--|----------------------------------|---|
| <i>Tobacco mosaic virus</i> | TMV | Réplicase, domaine Hélicase | AAA-ATPase | Augmentation | (Abbink <i>et al.</i> , 2002) |
| <i>Tobacco mosaic virus</i> | TMV | Réplicase, domaine Hélicase | Sous-unité de 33 kDa du complexe de l'oxygène du photosystème II | Augmentation | (Abbink <i>et al.</i> , 2002) |
| <i>Tomato leaf curl virus</i> | TLCV | V1 | SIUPTG1 | Augmentation | (Selth <i>et al.</i> , 2006) |
| <i>Cucumber mosaic virus</i> | CMV | 1a, 2a | Tsi-p (Tsi-1 interacting protein) | Régulation | (Huh <i>et al.</i> , 2011) |
| <i>Cabbage leaf curl virus</i> | CaLCuV | NSP | AtNSI (acétyltransférase) | Augmentation | (Carvalho <i>et al.</i> , 2006; McGarry <i>et al.</i> , 2003) |

Tableau 7 : interactions entre protéines virales et protéines de l'hôte, impliquées dans la charge virale mais pour lesquelles le mode d'action n'a pas encore été identifié.

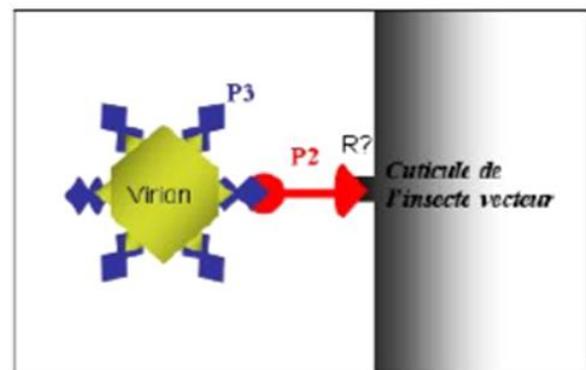
A.6. Fonctions dans la **transmission du virus**

Très peu d'éléments sont aujourd'hui connus sur les facteurs de l'hôte impliqués dans la transmission des virus par des vecteurs. On peut toutefois signaler une étude réalisée dans notre laboratoire (Bencharki *et al.*, 2010a) qui montre l'effet stimulant des protéines extraites de sève de concombre, en particulier des lectines **PP2 (Phloem Protein 2)**, sur la transmission d'un polérovirus (le *Cucurbit aphid-borne yellows virus*, CABYV). Des interactions *in vitro* entre les lectines phloémiennes du concombre et le virion ont été observées et nous avons montré que les deux protéines orthologues d'*Arabidopsis* (PP2-A1 et PP2-A2) favorisent l'internalisation du virus dans le puceron. Néanmoins, l'effet stimulateur des lectines sur la transmission du virus n'est pas spécifique des protéines phloémiennes puisqu'un effet similaire a été observé en présence d'autres protéines d'origine végétale ou même animale (l'albumine de sérum bovin, BSA). Il se pourrait donc que seule la présence de protéines autour du virion le protège de la dégradation dans le corps du puceron et favorise ainsi son internalisation dans les cellules de l'insecte.

Le modèle d'étude qui à ce jour, a réellement démontré le rôle des facteurs de l'hôte dans la transmission du virus est sans conteste le couple CaMV/puceron. L'implication potentielle des **MTs**

dans le cycle du CaMV, et en particulier dans sa transmission par puceron, remonte à 1996 lorsque Blanc *et al.* observent dans des cellules d'insectes Sf9, une co-localisation des MTs avec le facteur assistant de la transmission (encore appelé « FAT », ou protéine P2). L'interaction entre les MTs et le FAT a été confirmée *in vitro* et *in planta*, mais ce n'est que très récemment que la fonction des MTs dans la transmission du CaMV a été réellement élucidée (Martiniere *et al.*, 2009a). Pour comprendre ce rôle, il faut resituer les différentes étapes nécessaires à la transmission non circulante du CaMV : la transmission de ce virus nécessite la formation d'un complexe dit « complexe transmissible » qui comprend la particule virale décorée de la protéine P3 et la protéine P2 qui sert de pont moléculaire entre le virion et le récepteur (Figure 8).

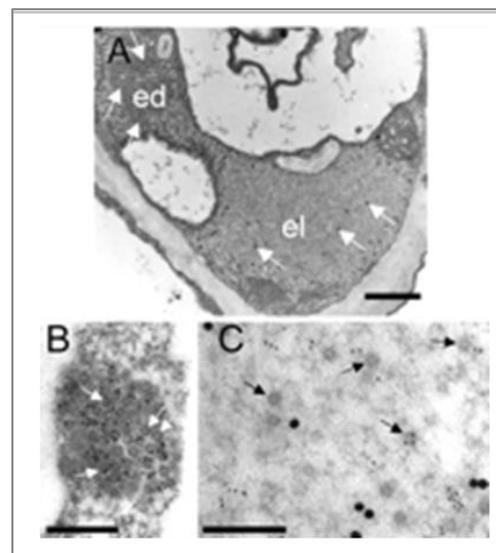
Figure 8 : Représentation schématique du complexe transmissible constitué des particules virales du CaMV décorées de protéines P3. La protéine P2 interagit par son extrémité N-terminale avec la partie C-terminale de la protéine P3 et forme un pont moléculaire avec le récepteur (R?) présent à la surface des stylets maxillaires du puceron.



Il faut cependant préciser que les virions décorés de protéines P3 sont localisés pour 95 % dans des corps denses aux électrons (les EDIBs ou usines virales) alors que les protéines P2 et P3, ainsi que les rares particules virales restantes, sont localisées dans des corps clairs (les ELIBs) (Drucker *et al.*, 2002). Il est intéressant de signaler qu'il n'existe qu'un seul corps clair par cellule infectée et que cette structure semble exclusivement dédiée à la transmission puisqu'il a été montré qu'un virus muté incapable d'induire la formation de corps clairs dans la plante était tout à fait infectieux mais non transmis par puceron (Khelifa *et al.*, 2007) (Figure 9).

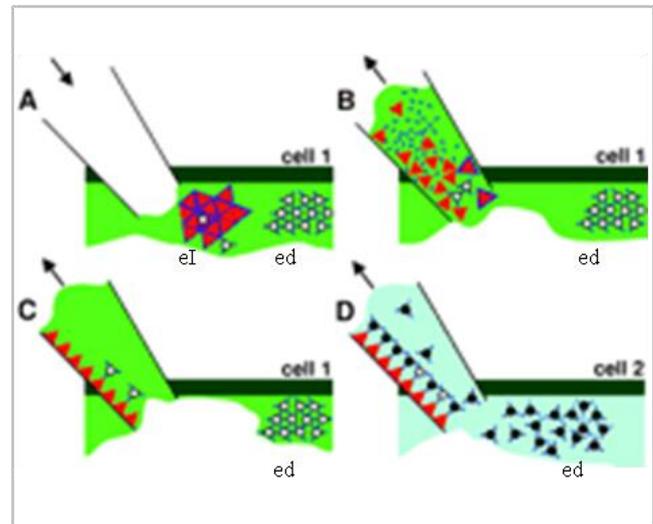
Figure 9 : Répartition des composés du complexe transmissible à l'intérieur d'une cellule de mésophylle de navet infectée par le CaMV. (A) Vue générale d'une cellule infectée. On peut observer la présence de l'usine virale (EDIB ou ed sur la figure) et du corps à transmission (ELIB ou el sur la figure). Immunomarquages des usines virales en (B) et des corps à transmission en (C) où est exclusivement localisée la protéine P2 (billes d'or de 30 nm). P3 est présente dans les deux types de corps d'inclusion (billes d'or de 10 nm). Les virions se retrouvent majoritairement au niveau des usines virales. D'après Drucker *et al.* 2002.

Les flèches désignent des particules virales. La barre représente 0,6 µm sur la photo (A) et 0,3 µm sur les photos (B et C).



On peut alors se demander comment les particules virales et les protéines P2, physiquement séparées dans ces corps d'inclusions peuvent entrer en contact et permettre la transmission du virus. Le modèle proposé (Figure 10) et validé par les résultats des expérimentations (Drucker *et al.*, 2002) comprend deux étapes successives : la première est l'ingestion par le puceron d'un corps à transmission qui se désagrège immédiatement du fait d'interactions très labiles entre la protéine P2 et la forme de la protéine P3 non-complexée au virion. La protéine P2 ainsi libérée peut se fixer aux sites récepteurs au niveau des stylets. Dans une deuxième étape, l'ingestion de corps denses composés des complexes « P3/virions » peut conduire à la formation du complexe transmissible P2/P3/virions. Il est intéressant de noter que cette ingestion des corps denses peut se faire dans la même cellule, dans une autre cellule de la plante, et même dans une autre plante.

Figure 10 : Modèle de l'acquisition séquentielle du CaMV par puceron dans une cellule infectée proposé par Martin *et al.*, 2002. (A) Dans la cellule de plante infectée les composants viraux impliqués dans la transmission sont séparés spatialement dans des usines virales (ed) et les corps à transmission (el). Alors que la plupart des virions (cercles vides) décorés de protéines P3 (barres bleues) sont stockés dans les ed, P2 (triangle rouge) associée à P3 est localisée exclusivement dans les corps el. (B) Le puceron ingère, grâce à son stylet, une partie du contenu cellulaire, dont les corps d'inclusion clairs qui se désintègrent hors contexte cellulaire. (C) Les protéines P2 se fixent aux récepteurs avec éventuellement les quelques virions présents dans les inclusions claires. (D) L'acquisition ultérieure des complexes P3/virions permet de reconstituer le complexe transmissible du CaMV. Cette acquisition peut se faire à partir de la même cellule (cell 1) ou d'une autre cellule (cell 2).



La manière dont les protéines P2 et P3 produites dans les usines virales (EDIBs) pouvaient être acheminées vers le corps clair à transmission (ELIB) restait à élucider. Ce sont les travaux de Martinière *et al.* (2009) qui ont récemment apporté les éléments de réponse. En effet, ils montrent que dans les plantes infectées par le CaMV, les protéines virales P2 et P3 sont donc d'abord produites dans des corps denses aux électrons. Elles sont ensuite exportées grâce au réseau des MTs, afin d'être concentrées dans les corps à transmission. Concernant la protéine motrice responsable du transport actif de P2 et P3, il pourrait s'agir de la kinésine TBK5 identifiée par Goto et Asada (2007) dans des protoplastes de tabac, ou de son orthologue chez arabidopsis, codée par le gène At5g27950 (Bak *et al.*, 2012). En effet, dans des expériences d'expression transitoire, ces deux protéines co-localisent avec la protéine P2 et les MTs, ainsi que dans le corps à transmission (Martinière *et al.*, 2009b).

A.7. Fonctions inconnues

Pour finir cette première partie d'introduction, je souhaitais également faire figurer dans ce manuscrit les interactions entre des protéines virales et des protéines de plante que j'ai pu relever dans la bibliographie, et qui par manque d'informations sur leur fonction n'ont pas été signalées dans cette introduction (

Tableau 8). Nul doute qu'à l'avenir, certaines de ces interactions seront confirmées et leurs rôles élucidés.

A.8. Quel bilan de ces interactions entre protéines de l'hôte et protéines virales peut-on tirer ?

A la lecture de ces données, on peut essayer de dégager des voies communes utilisées par les virus ou certains genres viraux pour accomplir leur cycle infectieux. Vu la diversité des protéines cellulaires interagissant avec les protéines virales, cette tâche n'est pas aisée, mais on peut mentionner les facteurs d'initiation de la traduction qui semblent jouer un rôle important dans le cycle de nombreux virus appartenant à des familles différentes (*cf* paragraphe A.2). Le rôle exact de ces facteurs n'est pas encore connu mais ils interviendraient dans la réplication du virus et/ou la traduction des protéines virales. On peut également noter que l'implication dans le cycle viral des protéines du cytosquelette (microtubules et actine) et des protéines associées (comme les myosines par exemple) a souvent été observée, mais là encore, rares sont les cas où les mécanismes moléculaires sont clairement établis.

Je citerai également deux grandes familles de protéines, les protéines chaperonnes et les kinases, pour lesquelles un grand nombre de partenaires viraux ont été identifiés (*cf* paragraphe A.3.c). Certaines de ces interactions sont impliquées dans le mouvement du virus et d'autres jouent un rôle dans la réplication virale. La redondance fonctionnelle de ces protéines est sans aucun doute un frein pour l'identification des mécanismes moléculaires responsables de leurs actions. Les protéines associées aux PDs, ou à la paroi des cellules, sont impliquées dans le mouvement intercellulaire de plusieurs virus et nous pouvons nous attendre, dans les prochaines années, à obtenir la confirmation de l'importance des voies de sécrétion dans le mouvement des virus. Concernant les mécanismes de défense de la plante vis-à-vis du virus, je relèverai simplement l'interaction des VSP avec les protéines AGO qui représente un moyen qu'utilisent plusieurs virus pour contrecarrer les défenses de la plante.

Dans ce travail bibliographique, j'ai relevé l'implication de plusieurs voies métaboliques qui seraient affectées par des interactions directes entre les protéines des différentes voies et les protéines virales. Il s'agit des voies métaboliques de l'auxine, de l'acide salicylique, ou de la gibbérelline. Il y a néanmoins une évidence à la lecture de cette introduction : le TMV a su éveiller la curiosité des scientifiques car il est au centre de l'essentiel des études présentées ici, et un très grand nombre d'interactions entre les protéines du TMV et les protéines de l'hôte ont été mises en évidence, et ce à toutes les étapes du cycle viral (Figure 11). Le challenge pour les prochaines d'années sera, sans aucun doute, d'acquérir, pour d'autres virus, autant d'informations sur les partenaires cellulaires que celles disponibles pour le TMV.

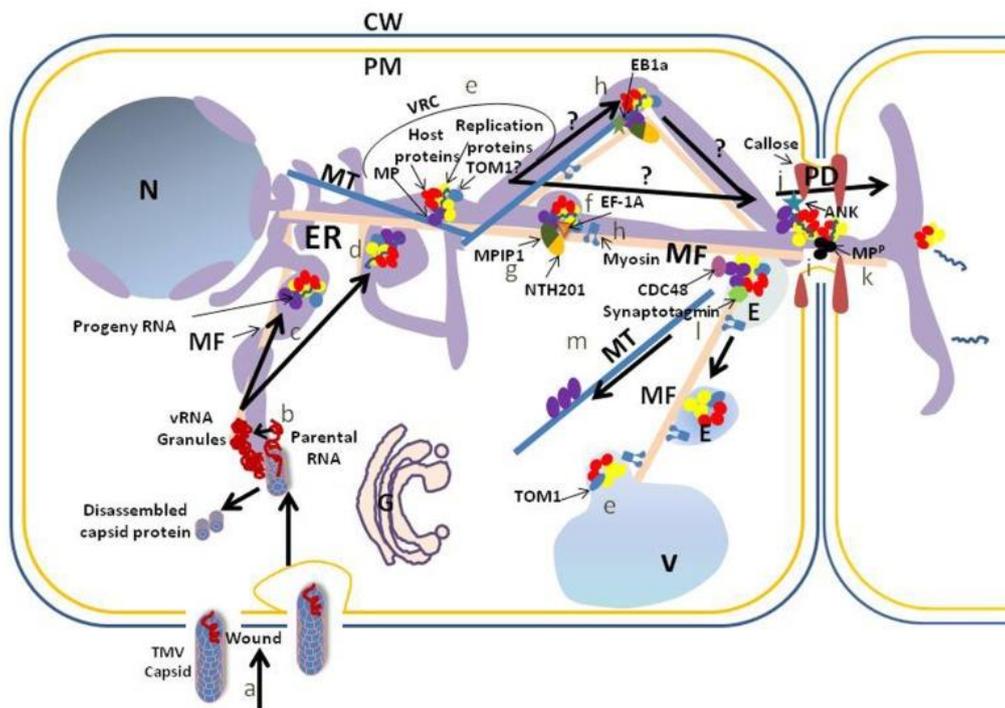


Figure 11 : Représentation simplifiée du modèle de l'accumulation du TMV et de son mouvement dans la cellule grâce à l'implication de plusieurs protéines dans les différentes étapes du cycle viral. D'après Liu et Nelson, 2013.

La capsid du TMV pénètre par une ouverture présente dans la paroi cellulaire (CW) et dans la membrane plasmique ou par pinocytose après une blessure (a). L'ARN viral est libéré de la capsid (vRNA) au niveau de granules en formation (b). Les granules sont associées au réticulum endoplasmique (ER), elles pourraient servir de lieu de réplication et permettre le transport de l'ARN viral vers le RE. Ce transport nécessite les microfilaments (MF) (c). D'autres membranes, comme les membranes vacuolaires (V), pourraient servir de lieu d'ancrage pour la réplication virale. Un complexe de réplication viral (VRC) est formé au niveau du ER (d). Les VRCs contiennent l'ARN viral, la protéine de mouvement (MP), les réplicases et des protéines de l'hôte. **TOM1**, une protéine membranaire, interagit avec les réplicases et permet l'ancrage des réplicases au niveau des membranes de l'hôte, comme au niveau du ER (TOM1?), des vacuoles (TOM1) ou d'autres membranes (e). Pour le mouvement intercellulaire du TMV, les VRCs se déplacent du lieu de réplication vers les plasmodesmes (PDs). Le facteur d'élongation 1A (**EF-1A**) interagit avec l'ARN viral, les réplicases, les MF et les microtubules (MT) pour permettre le transport intracellulaire du TMV (f). Une interaction entre la protéine MP du TMV et une protéine **DnaJ-like (MPIP1)**, pourrait aider au transport du virus vers les PDs (g). Le mouvement des VRC vers les PD nécessite des membranes et pourrait être influencé par les MF, des **myosines** et les **MT** (h). La protéine **EB1-a** influe sur le mouvement du virus vers les PD (h). La dégradation des MF par la protéine MP permettrait d'augmenter la taille limite d'exclusion (SEL) des PD (i). De plus, l'interaction entre la protéine MP et une protéine à domaine "ankyrine" (**ANK**) est corrélée avec une augmentation de la SEL grâce à un dépôt de callose au niveau des PD (j). Les ARN viraux sont transportés via les PD au sein du VRC, ou simplement associé à la protéine MP phosphorylée (**MP^P**) dans les PD. Ils sont libérés dans la cellule adjacente pour l'étape de traduction (k). Après transfert de l'ARN viral à la cellule voisine, les VRC restent associés aux endosomes (E) pour le transport vers les vacuoles, potentiellement grâce à une interaction entre la protéine **synaptotagmine** et la protéine MP (l). Le transport est supposé impliquer le réseau d'**actine-myosine**. Préalablement à ce transport, la protéine **CDC48** (cell-division cycle protein 48) extrairait la protéine MP associée au VRC au niveau du ER pour la transférer aux MT qui la conduirait plus tard vers sa dégradation (m). N : noyau.

Tableau 8 : Relevé des interactions protéines virales-protéines de plantes dont le rôle dans le cycle viral n'est pas connu. La fonction potentielle de ces interactions, sur la base de la nature du facteur cellulaire, est indiquée dans le tableau. Un « ? » signifie qu'aucune fonction ne peut être déduite de la nature de la protéine.

| Genres viraux | Virus | Acronymes | Protéines virales | Protéines de plante | Fonctions potentielles proposés par les auteurs | (Références) |
|----------------------|--|---------------------------|-------------------|--|---|---|
| <i>Bromovirus</i> | <i>Brome mosaic virus</i> | BMV | MP | NbNACa1 : protéine similaire à la chaîne alpha du "nascent-polypeptide-associated complexe » | Mouvement de cellule à cellule | (Kaido <i>et al.</i> , 2007) |
| <i>Carmovirus</i> | <i>Hibiscus chlorotic ringspot virus</i> | HCRSV | CP | Sulfide oxidase | Association aux péroxisomes impliqués dans le mécanisme de résistance | (Zhang & Wong, 2009) |
| <i>Comovirus</i> | <i>Cowpea mosaic virus</i> | CPMV | CPMV | Vimentine | Internalisation du virus | (Koudelka <i>et al.</i> , 2009) |
| <i>Cucumovirus</i> | <i>Cucumber mosaic virus</i> | CMV | 1A | TIP1, TIP2 : Tonoplast Intrinsic Protein | Réplication | (Kim <i>et al.</i> , 2006) |
| <i>Cucumovirus</i> | <i>Cucumber mosaic virus</i> | CMV | 1A | TLP1 : thaumatin-like protein | Mouvement de cellule à cellule ou TLP facteur anti-viral | (Kim <i>et al.</i> , 2005) |
| <i>Begomovirus</i> | <i>Beet curly top virus, Tomato golden mosaic virus</i> | BCTV, TGMV | C4 | AtSKeta | ? | (Piroux <i>et al.</i> , 2007) |
| <i>Begomovirus</i> | <i>Cabbage leaf curl virus</i> | CaLCuV | NSP | AtNSI : nuclear shuttle protein interactor | Export nucléaire du génome viral, réplication | (Carvalho <i>et al.</i> , 2006; McGarry <i>et al.</i> , 2003) |
| <i>Begomovirus</i> | <i>Bean Dwarf mosaic virus</i> | BDMV | MP, NSP, CP | Histone H3 | Passage des pores nucléaires et des plasmodesmes | (Zhou <i>et al.</i> , 2011) |
| <i>Phytoreovirus</i> | <i>Rice dwarf virus</i> | RDV | P8 | GOX : Glycolate oxydase | Réplication | (Zhou <i>et al.</i> , 2007) |
| <i>Potexvirus</i> | <i>Potato Virus X</i> | PVX | PGBp1 | REM : Rémorine | Mouvement intracellulaire | (Raffaele <i>et al.</i> , 2009) |
| <i>Potyvirus</i> | <i>Papaya ringspot virus</i> | PRSV | Nia-Pro | FBPA1, FK506BP, GTPBP, MSRB1, MTL | ? | (Gao <i>et al.</i> , 2012) |
| <i>Potyvirus</i> | <i>Plum pox virus</i> | PPV | CI | PSI-K : Protéine K du photosystème I | ? | (Jimenez <i>et al.</i> , 2006) |
| <i>Potyvirus</i> | <i>Potato virus Y</i> | PVY | HC-Pro | NtMinD, PAA, PBB et PBE (3 Sous-unités du protéasome 20S) | ? | (Jin <i>et al.</i> , 2007a; Jin <i>et al.</i> , 2007b) |
| <i>Potyvirus</i> | <i>Sugar cane mosaic virus</i> | SCMV | HC-Pro | Ferredoxine-5 | ? | (Cheng <i>et al.</i> , 2008) |
| <i>Potyvirus</i> | <i>Shallot yellow stripe virus onion, Onion yellow dwarf virus, Soybean mosaic virus Pinellia isolate, Turnip mosaic virus</i> | SYSV-O, OYDV, SMV-P, TuMV | P3 | Grande sous-unité de la protéine RubisCO (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) | Développement des symptômes | (Lin <i>et al.</i> , 2011) |
| <i>Potyvirus</i> | <i>Tobacco etch virus, Tobacco mosaic virus</i> | TEV, TMV | Réplacase | P58 ^{IPK} | Pathogénèse | (Bilgin <i>et al.</i> , 2003) |
| <i>Potyvirus</i> | <i>Zucchini yellow mosaic virus</i> | ZYMV | HcPro | HEN1 | Suppression de l'ARN interférence | (Jamous <i>et al.</i> , 2011) |
| <i>Potexvirus</i> | <i>Potato Virus X</i> | PVX | CP, TGBp1, TGBp2 | NbMPB2Cb : <i>N. benthamiana</i> TMV-MP30 binding protein 2C | Mouvement (inhibition) | (Cho <i>et al.</i> , 2012) |

Introduction bibliographique - Les interactions entre protéines virales-protéines de l'hôte de **fonctions inconnues**

| Genres viraux | Virus | Acronymes | Protéines virales | Protéines de plante | Fonctions potentielles proposés par les auteurs | (Références) |
|--------------------|--|-------------------|----------------------------------|--|---|-----------------------------------|
| <i>Rhabdovirus</i> | <i>Sonchus yellow net virus</i> | SYNV | Sc4, N, M | Sc4i17 et Sc4i21 (sc4 interactor 17 et 21), Ni67 (N interactor 67), Mi7 (M interactor 7) | Mouvement | (Min <i>et al.</i> , 2010) |
| <i>Tobamovirus</i> | <i>Tobacco mosaic virus</i> | TMV | Domaine hélicase de la réplacase | ADRC : Arginine décarboxylase | ? | (Shimizu <i>et al.</i> , 2004) |
| <i>Tobamovirus</i> | <i>Tomato mosaic virus, Crucifer tobamovirus, Cucumber mosaic ovirus</i> | ToMV, CTMV-W, CMV | MP | KELP : Coactivateur de la transcription | ? | (Matsushita <i>et al.</i> , 2001) |
| <i>Tobamovirus</i> | <i>Tomato mosaic virus, Crucifer tobamovirus</i> | ToMV, CTMV-W | MP | MBF1 : multiprotein binding factor 1 | Régulation de l'expression des gènes de l'hôte | (Matsushita <i>et al.</i> , 2002) |
| <i>Tombusvirus</i> | <i>Tomato bushy stunt virus</i> | TBSV | MP | Protéine à homéodomaine et à domaine « leucine-zipper » | ? | (Desvoyes <i>et al.</i> , 2002) |
| <i>Tombusvirus</i> | <i>Tomato bushy stunt virus</i> | TBSV | MP | HFi22 | Mouvement de cellule à cellule | (Fujiwara <i>et al.</i> , 1993) |
| <i>Tospovirus</i> | <i>Tomato spotted wilt virus</i> | TSWV | MP | At-4/1 (protéine inconnue) | Mouvement via les plasmodesmes | (Paape <i>et al.</i> , 2006) |
| <i>Hordeivirus</i> | | ? | MP | Coiline (constituant des corps de cajal) | ? | (Semashko <i>et al.</i> , 2012b) |

B - Les polérovirus

Les polérovirus appartiennent à la famille des *Luteoviridae* qui regroupe 3 genres viraux : *Polerovirus*, *Luteovirus*, et *Enamovirus*. Les membres types de chacun de ces genres viraux sont respectivement le *Potato leafroll virus* (PLRV), le *Barley yellow dwarf virus-PAV* (BYDV-PAV) et le *Pea enation mosaic virus-1* (PEMV-1), seul membre des *Enamovirus* (Tableau 9). La capsid de ces virus est icosaédrique et constituée de deux protéines : la protéine majoritaire que l'on appelle la protéine CP et la protéine mineure que l'on appelle la protéine RT (Figure 12) (cf paragraphe B.2). La capsid mesure environ 25 nm de diamètre et renferme un ARN simple brin de polarité positive d'environ 5,5 à 6 kb. L'information génétique compactée sur cet ARN s'exprime grâce à différentes stratégies d'expression qui seront développées dans le paragraphe B.2.

| Genres | Espèces |
|-----------------------------|--|
| Luteovirus | <i>Barley yellow dwarf virus-MAV</i> |
| | <i>Barley yellow dwarf virus-PAS</i> |
| | * <i>Barley yellow dwarf virus-PAV</i> |
| | <i>Bean leafroll virus</i> |
| | <i>Rose spring dwarf-associated virus</i> |
| | <i>Soybean dwarf virus</i> |
| Polerovirus | <i>Beet chlorosis virus</i> |
| | <i>Beet mild yellowing virus</i> |
| | <i>Beet western yellows virus</i> |
| | <i>Carrot red leaf virus</i> |
| | <i>Cereal yellow dwarf virus-RPS</i> |
| | <i>Cereal yellow dwarf virus-RPV</i> |
| | <i>Chickpea chlorotic stunt virus</i> |
| | <i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i> |
| | <i>Melon aphid-borne yellows virus</i> |
| | * <i>Potato leafroll virus</i> |
| | <i>Sugarcane yellow leaf virus</i> |
| | <i>Tobacco vein distorting virus</i> |
| <i>Turnip yellows virus</i> | |
| Enamovirus | * <i>Pea enation mosaic virus-1</i> |
| Virus non assignés | <i>Barley yellow dwarf virus-GPV</i> |
| | <i>Barley yellow dwarf virus-RMV</i> |
| | <i>Barley yellow dwarf virus-SGV</i> |
| | <i>Chickpea stunt disease associated virus</i> |
| | <i>Groundnut rosette assistor virus</i> |
| | <i>Indonesian soybean dwarf virus</i> |
| | <i>Sweet potato leaf speckling virus</i> |
| | <i>Tobacco necrotic dwarf virus</i> |

Tableau 9 : Taxonomie des virus de la famille des *Luteoviridae*. Source : ICTV, 2011, <http://ictvonline.org/virusTaxonomy>.

* : Espèces types du genre.

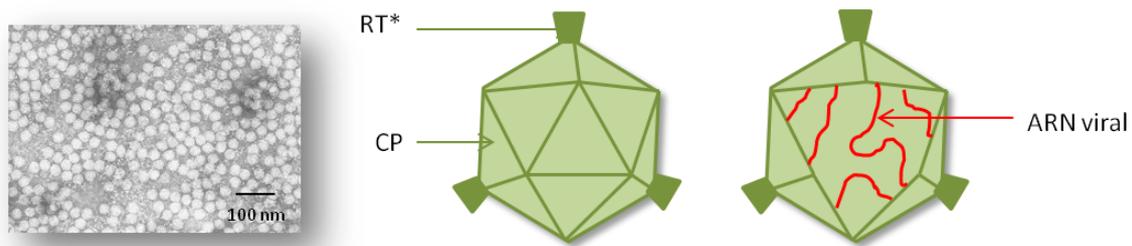


Figure 12 : (A) Observation par MET de particules virales du CABYV. (B) Représentation schématique de la structure icosaédrique de la particule des membres de la famille des *Luteoviridae*, renfermant l'ARN viral simple brin.

CP : Protéine majeure de la capsid; RT* : Protéine mineure de la capsid (Readthrough protein) dépourvue de son extrémité C-terminale.

B.1. Hôtes, symptômes et moyens de lutte

Les virus de la famille des *Luteoviridae* infectent un très grand nombre de plantes cultivées ce qui les rend très dommageables pour les producteurs. En effet, même si la plupart des virus ont une gamme d'hôte restreinte, ces virus peuvent infecter plus de 150 espèces parmi 23 familles de plantes. Par exemple, le BYDV et le *Cereal yellow dwarf virus* (CYDV) infectent les monocotylédones de la famille des *Poaceae* (maïs, avoine, orge, riz,...), alors que le PLRV est essentiellement restreint aux *Solanaceae* (pommes de terre, tabac). Le CABYV, de son côté, provoque des dégâts sur les plantes de la famille des *Cucurbitaceae* (concombre, potiron...). Le *Soybean dwarf virus* (SbDV) et le PEMV-1 sont limités à la famille des *Fabaceae* (pois, soja) alors que le *Turnip yellows virus* (TuYV) peut infecter jusqu'à 23 familles de plantes (*Chenopodiaceae*, *Asteraceae*, *Solanaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*...).

Le symptôme foliaire le plus fréquemment provoqué par ces virus étant le jaunissement (d'où le nom de cette famille de virus, « *luteo* » signifiant jaune en latin) (Figure 13), l'infection des plantes n'est pas toujours évidente à diagnostiquer par la seule prise en compte des symptômes qui peuvent être confondus avec des carences en nutriments. L'infection peut également entraîner des rougissements, des enroulements, des rabougrissements, des étiations et/ou des avortements des bourgeons floraux conduisant à des pertes de rendements. En plus de la diversité de l'expression des symptômes, ceux-ci peuvent varier en fonction de la saison, et parfois même, en fonction du cultivar (Lecoq *et al.*, 1992). Les dommages ainsi causés entraînent des pertes évidentes de rendements (diminution du nombre et/ou du poids des grains, des fruits, des tubercules...) avec des conséquences économiques importantes. Beuve *et al.* (1999) mentionnent, par exemple, des chutes de rendements de 15 à 20 % pour une culture de maïs infectée par le BYDV-PAV. De leur côté, Edwards *et al.* (2001) indiquent des pertes allant jusqu'à 38 % sur des cultures d'orge infectées par le même virus.

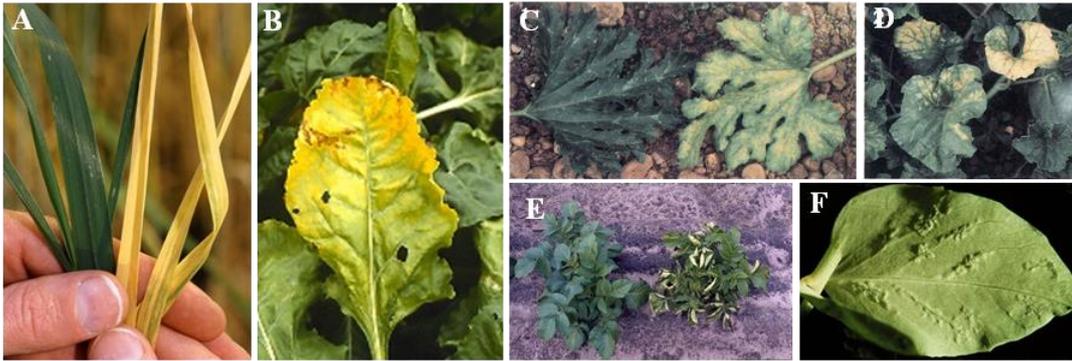


Figure 13 : Symptômes causés par (A) le *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) sur blé; (B) le *Beet mild yellowing virus* (BMV) sur betterave. <http://www.agris.be/fr/>; (C) le *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) sur courgette (à gauche plante saine, à droite plante infectée). Lecoq H., 1992 ; (D) le CABYV sur melon. Lecoq H., 1992 ; (E) le *Potato leafroll virus* (PLRV) sur pomme de terre. <http://www.forestryimages.org/>; et par (F) le *Pea enation mosaic virus* (PEMV) sur pois. <http://www.dpvweb.net>.

La propagation de ces virus se fait exclusivement par pucerons et les seuls moyens actuels de lutte contre ces infections virales sont l'arrachage des plantes infectées et la lutte chimique contre les vecteurs. Ces traitements ne sont malheureusement pas sans risque d'apparition de populations de pucerons résistantes, sans compter les effets néfastes sur l'environnement que provoque l'emploi d'insecticides. L'utilisation de variétés résistantes aux vecteurs, comme par exemple des variétés de melon possédant le gène *vat* conférant la résistance à *A. gossypii*, est bien sûr fortement recommandée quand elles sont disponibles. Bien qu'*A. gossypii* soit un vecteur efficace du CABYV, cette résistance n'est cependant pas efficace sur la transmission de ce virus et ne semble s'appliquer qu'aux virus transmis de manière non persistante (comme le CMV et différents potyvirus comme le ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*) et le PRSV (*Papaya ringspot virus*)) (Dogimont *et al.*, 2008)). L'utilisation de plantes résistantes aux virus peut également être un autre moyen de lutte. Il existe en effet des variétés de melon qui possèdent les gènes *cab-1* et *cab-2* conférant la résistance au CABYV (Dogimont *et al.*, 1997) ainsi que des variétés de laitues comme « Crystal Heart » qui confèrent une résistance partielle au BWYV grâce à la présence du gène *Bw* (Maisonneuve *et al.*, 1991; Pink *et al.*, 1991; Walkey & Pink, 1990). Plusieurs variétés de navet et de colza sont également résistantes au PLRV (Thomas *et al.*, 1990).

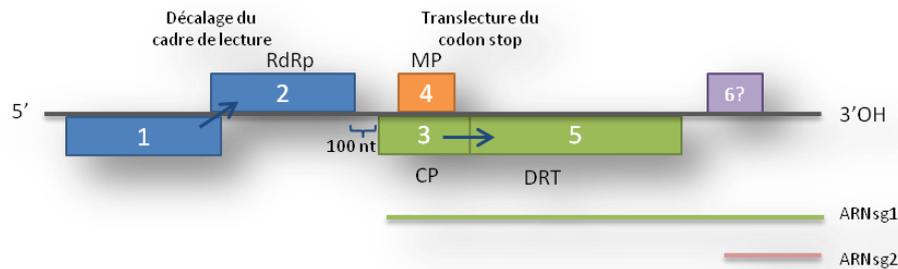
B.2. Organisation génomique et protéines virales

L'organisation de l'information génétique des trois genres viraux est très conservée au sein de la famille des *Luteoviridae* (Figure 14) mais plusieurs caractéristiques les distinguent cependant. Le genre *Luteovirus* se caractérise par la présence en 5' de deux ORF se chevauchant sur 8 à 13 nt. Ces ORFs sont séparés des ORFs situées en 3' par une centaine de nucléotides environ. Les genres *Polerovirus* et *Enamovirus* possèdent, quant à eux, trois ORFs à l'extrémité 5' de leur génome. Les

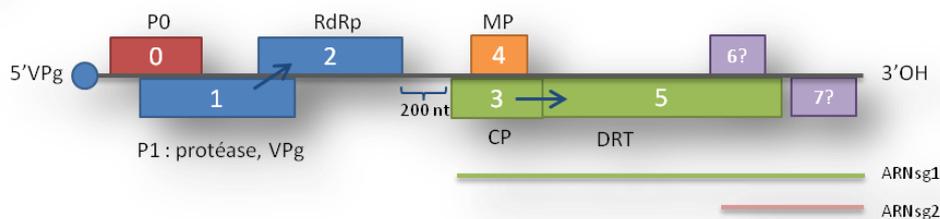
ORF0 et ORF1 se chevauchent sur plusieurs centaines de nucléotides (environ 600) ; de même les ORF1 et 2 se chevauchent sur 500 nt en moyenne et sont séparés d'environ 200 nt des ORFs situées en 3'. A l'extrémité 5' de l'ARN viral des polérovirus et énamovirus on trouve une protéine VPg liée de façon covalente. Cette protéine VPg est obtenue après clivage du produit d'expression de l'ORF1 (cf paragraphe P0 page suivante).

Ces virus présentent également une organisation génomique variable à l'extrémité 3'. En effet, contrairement aux énamovirus qui expriment deux ORFs à partir d'un ARN subgénomique (ARNsg1), les lutéovirus et les polérovirus possèdent trois ORFs sur cet ARN subgénomique. L'ORF supplémentaire sur le génome des lutéovirus et des polérovirus code pour une protéine « conventionnelle » de mouvement, la protéine P4 (cf paragraphe P4 page 55). De plus, les lutéovirus et les polérovirus possèdent respectivement une et deux ORFs supplémentaires à l'extrémité 3' du génome qui seraient traduites grâce à un second ARN subgénomique (ARNsg2) (Ashoub *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 1999).

Luteovirus



Polerovirus



Enamovirus

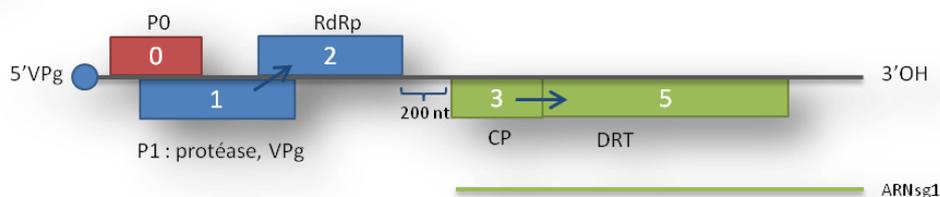


Figure 14 : Représentation schématique de l'organisation génomique des 3 genres viraux appartenant à la famille des *Luteoviridae*. Les rectangles symbolisent les différentes ORF portées par l'ARN viral.

RdRp : ARN polymérase ARN dépendante; MP : protéine de mouvement; CP : protéine de coque; DRT : domaine de readthrough; VPg : protéine virale liée au génome ; ARNsg : ARN subgénomique., nt : nucléotides.

Afin d'exprimer les protéines nécessaires à l'établissement de leur cycle viral, les polérovirus utilisent toute une panoplie de stratégies d'expression dont :

- Le décalage du cadre de lecture ou *frameshift*, pour l'expression de l'ORF2,
- L'initiation interne par le mécanisme de *leaky scanning* pour la synthèse des ORF1 et ORF4,
- La synthèse d'ARN subgénomiques pour les ORFs placées à l'extrémité 3' du génome,
- Le mécanisme de translecture ou *readthrough* du codon stop de l'ORF3 pour l'expression de l'ORF5,
- La maturation d'une polyprotéine notamment pour l'expression de la VPg.

L'étude du rôle de chacune des ORFs a pu être abordée grâce aux techniques de génétique inverse et grâce au développement de la technique d'agroinfection utilisée pour le TuYV (Leiser *et al.*, 1992), pour le PLRV (Commandeur & Martin, 1993), puis en 1995 pour le CABYV (Prufer *et al.*, 1995). Une description de l'organisation des domaines fonctionnels de chacune des protéines codées par le génome des polérovirus va être détaillée ci-dessous en attachant une attention particulière aux protéines de la capsid virale qui ont fait l'objet du sujet d'étude au cours de cette thèse. De plus, une présentation approfondie des connaissances actuelles sur les rôles de la protéine RT dans le cycle des polérovirus sera faite dans le chapitre 2.

➤ Protéine P0

Initialement identifiée comme un facteur viral impliqué dans la pathogénicité et la symptomatologie du PLRV (van der Wilk *et al.*, 1997), le rôle de cette protéine s'est peu à peu précisé et il est maintenant reconnu qu'elle est impliquée dans la suppression du mécanisme de *gene silencing* (Pfeffer, 2002) (*cf* Introduction bibliographique, Figure 7). Une avancée majeure, qui a permis de mieux comprendre les mécanismes d'action de la protéine P0, est la découverte en 2006 d'un de ses partenaires : la protéine SKP (S-phase kinase-associated protein) (Pazhouhandeh *et al.*, 2006), identifiée en criblant une banque d'ADNc totale d'*A. thaliana* avec la protéine P0 du TuYV (se reporter à la partie A de l'introduction, partie gene silencing, pour plus de détails sur le mécanisme d'action de la P0).

Notons que la protéine P0 est exprimée seulement par les virus appartenant aux genres *Polerovirus* et *Enamovirus* et que chez les virus du genre *Luteovirus* sa fonction doit être assurée par une autre protéine virale encore non-identifiée.

➤ Protéines P1, P1-P2

L'ORF1 est exprimé grâce à un mécanisme de *leaky scanning* qui permet aux ribosomes de passer au travers du premier codon d'initiation situé à l'extrémité 5' du génome et d'initier la traduction au niveau du deuxième codon AUG qui se trouve dans un contexte plus favorable (Tableau 10) (Cavener & Ray, 1991).

| Virus | 1 ^{er} AUG ORF 0 (ARNg) | 2 ^{ème} AUG ORF 1 (ARNg) | 1 ^{er} AUG ORF 3 (ARNsg1) | 2 ^{ème} AUG ORF 4 (ARNsg1) | Contexte d'initiation consensus chez les |
|----------|--|---|--|---|---|
| TuYV | UUG AUG CA | AUA AUGUA | UU A AUGAA | UC A AUGGA | dicotylédones |
| PLRV | CAU AUG AU | AUCA AUGAA | UU A AUGAG | GA A AUGUC | A AN C AUGGC |
| CYDV | CGCA AUG UU | AAA AUGAA | UU A AUGAG | CCA AUGGC | monocotylédones |
| BYDV-PAV | | | UG A AUGAA | AAA AUGGC | A CNAUGGC G |

Tableau 10 : Contexte d'initiation de la traduction d'ORFs se chevauchant. Le codon AUG initiateur de la traduction est représenté en caractère gras. Les caractères rouges indiquent les positions conservées par rapport à la séquence consensus (dicotylédones pour le TuYV et PLRV, monocotylédones pour le CYDV et le BYDV-PAV) (Cavener & Ray, 1991). Les codons d'initiation des ORF 1 et 4 sont placés dans un meilleur contexte que ceux des ORF 0 et 3, ce qui favorise le mécanisme de *leaky scanning*. N=A,T,C ou G.

La protéine P1 est une polyprotéine qui possède plusieurs domaines dont un domaine hélicase et un domaine de fixation à l'ARN. Chez les virus appartenant aux genres *Polerovirus* et *Enamovirus*, la protéine P1 possède également un domaine homologue avec une « chymotrypsin-like serine protease » capable d'induire en *trans* le clivage de la protéine P1, libérant ainsi un peptide à son extrémité C-terminale contenant la séquence de la VPg. Ce peptide, d'environ 25 kDa, possède un domaine basique qui pourrait se lier à l'ARN et induire la maturation de la protéine VPg (Prufer *et al.*, 1999). Une hypothèse émise par Osman *et al.* (2006), serait que la protéine VPg, liée à 2 nucléotides (VPg-A ou VPg-AC) à l'extrémité 3' de l'ARN, serve d'amorce pour la synthèse de l'ARN (-) lors de la réplication du CYDV. Aucune homologie de séquence avec des domaines protéases n'a pu être identifiée dans la protéine P1 des virus appartenant au genre *Luteovirus*.

La protéine P2 n'est pas exprimée en tant que telle mais sous la forme d'une protéine de fusion avec P1 et ce, grâce à un mécanisme de décalage du cadre de lecture -1 au niveau d'un heptanucléotide de type « XXXYYZ » (X=A, U, G ; Y=A, U ; et Z=A, U, C) dans la région commune aux deux ORFs. Cette séquence est située en aval d'une région structurée en pseudo-nœud qui va favoriser l'efficacité du

mécanisme (Miller *et al.*, 1995) (Figure 15). La protéine de fusion P1-P2 (Figure 16) code pour une ARN polymérase (motif « GDD » présent) dont les caractéristiques phylogénétiques varient selon le genre. En effet, la polymérase des polérovirus et des énamovirus est génétiquement proche de celle des carmovirus alors que celle des lutéovirus se rapproche de celle des sobémovirus.

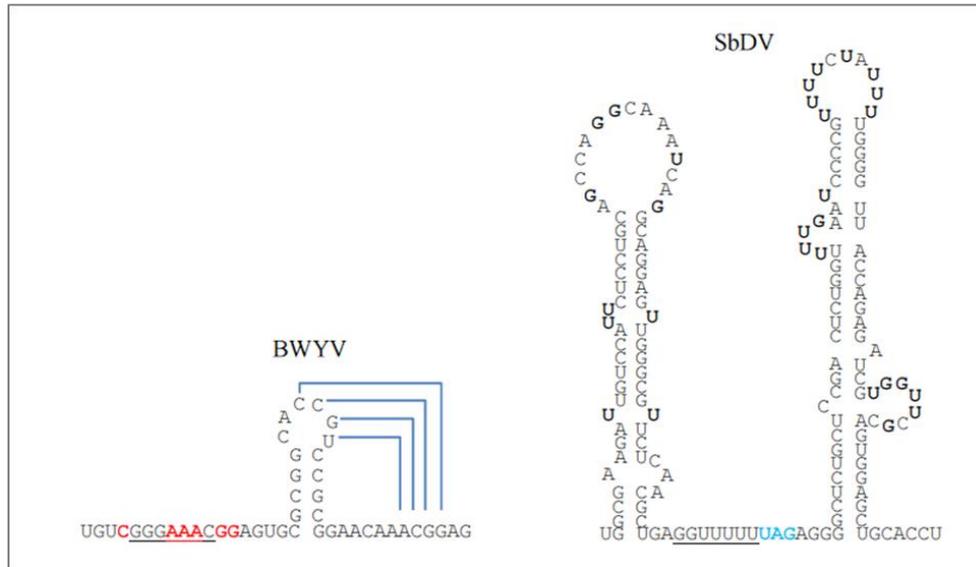


Figure 15 : Structure secondaire de l'ARN génomique au niveau du site de *frameshift* -1 permettant la synthèse de la protéine de fusion P1-P2. L'heptanucléotide facilitant le glissement du ribosome est souligné. En rouge, des nucléotides conservés chez tous les polérovirus. Le pseudo-nœud est schématisé par les lignes bleues. La particularité des lutéovirus (cas du SbDV présenté), en plus de la complexité de leur structure en épingle à cheveux, est que le *frameshift* s'opère quelques nucléotides avant le codon stop de l'ORF 1 (en bleu), contre 475 à 628 nucléotides pour les polérovirus (d'après Miller *et al.*, 1995).

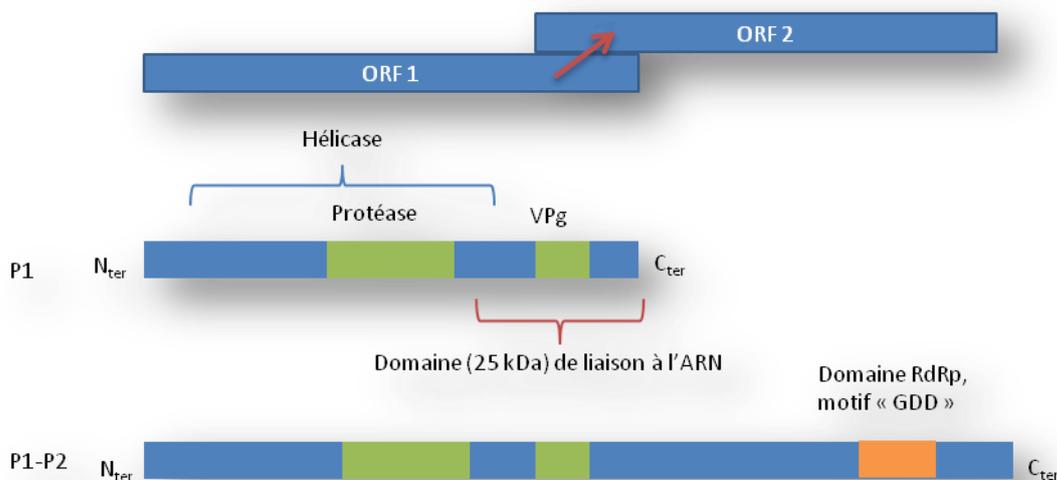


Figure 16 : Domaines fonctionnels des protéines P1 et P2 des polérovirus. La localisation du mécanisme de *frameshift* est indiquée par une flèche rouge.
VPg : protéine virale liée au génome ; RdRp : ARN polymérase ARN dépendante

➤ Protéines P3, P3-P5

Ces deux protéines sont les protéines de structure du virus qui entrent dans la composition des particules virales. En effet, l'ORF3 permet l'expression d'une protéine de 22 kDa environ, la protéine majeure de la capsid, encore appelée protéine de coque ou protéine CP. La protéine P3-P5 est une protéine de fusion d'environ 75 kDa, généralement appelée protéine de *readthrough* (ou protéine RT), qui présente la particularité, dans les particules virales, d'être tronquée à son extrémité C-terminale, donnant ainsi une protéine d'environ 55 à 65 kDa (PLRV, Bahner *et al.* (1990) ; BYDV, Filichkin *et al.* (1994) ; TuYV, Brault *et al.* (1995) et Wang *et al.* (1995) ; CABYV, Revollon *et al.* (2010)). La capsid virale est de symétrie T=3 (Waterhouse, 1988) et constituée de 180 sous-unités, majoritairement de protéines CP et de quelques sous-unités de protéines RT dont un domaine est localisé à la surface des virions (Brault *et al.*, 1995). Le nombre exact de protéines RT par virion reste inconnu. En effet, un ratio RT:CP de 1:100 à 1:4 a été signalé pour le PLRV et le BYDV respectivement (Bahner *et al.*, 1990; Filichkin *et al.*, 1994) alors que dans le cas du TuYV, celui-ci est estimé à 1:20 (Mutterer *et al.*, 1999). L'incorporation de la protéine RT dans les particules virales se fait par le biais de la protéine CP.

L'ORF3 est exprimée à partir de l'ARNsg1, vraisemblablement produit à partir du brin génomique (-) qui sert de matrice pour l'amplification virale. La régulation de l'expression des ORFs portés par cet ARNsg1 pourrait se faire grâce à un second ARNsg (ARNsg2) qui inhiberait l'expression de l'ARNg, de par la présence d'une séquence pouvant s'associer à l'extrémité 5' de l'ARNg. Ceci permettrait dans les phases tardives de l'infection, d'opérer une bascule vers l'expression des protéines structurales à partir de l'ARNsg1 sur lequel l'ARNsg2 n'aurait aucun effet (Shen *et al.*, 2006).

L'initiation de la transcription se fait au niveau d'un promoteur interne constitué d'une quinzaine de nucléotides (ACA AAA suivi d'une région riche en U), homologues entre la région 5' de l'ARN génomique et de l'ARNsg. Le premier AUG rencontré sur cet ARNsg est celui de l'ORF3. Bien que située dans un contexte défavorable à l'initiation de la traduction (Tableau 10), cette protéine est cependant bien synthétisée au cours du cycle viral et facilement détectée dans les plantes infectées grâce à des anticorps spécifiques.

La protéine CP possède un domaine N-terminal riche en arginines, appelé le domaine R, qui est impliqué dans l'interaction avec l'ARN viral et permettant ainsi son encapsidation (Figure 17). Le domaine C-terminal correspond, quant à lui, au domaine structurel de la protéine CP, il est appelé le domaine S (pour Shell en anglais) (Rossmann & Johnson, 1989). Cette organisation en deux domaines est très conservée chez les virus de la famille des *Luteoviridae*.

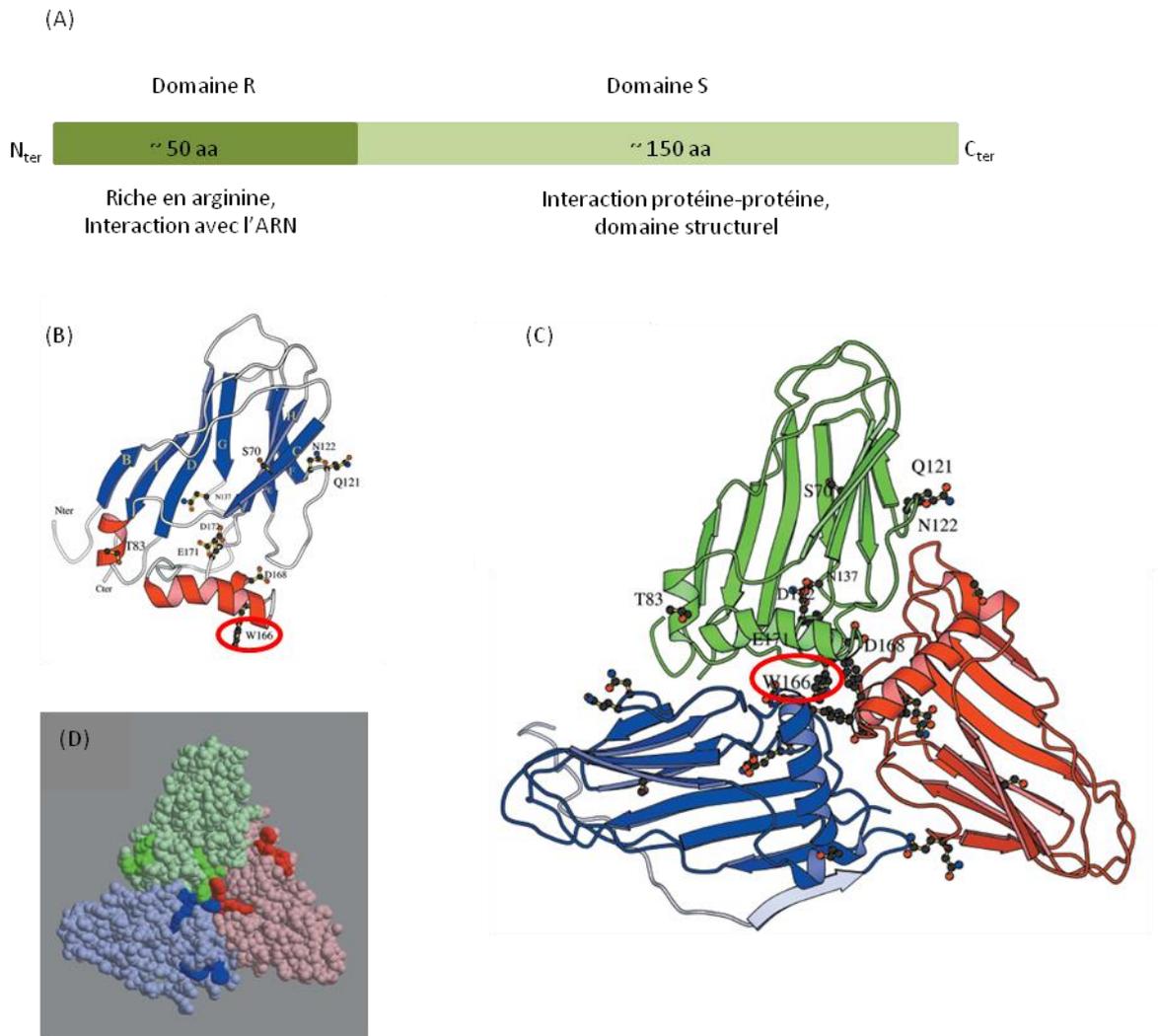


Figure 17 : (A) Domaines fonctionnels et structurels de la protéine CP des polérovirus. (B) Structure prédite par Brault *et al.* 2003, de la CP du TuYV et (C) d'un trimère de CP, composant de la capsid des polérovirus. En son centre le résidu **W166 est supposé impliqué dans les interactions entre les différentes sous-unités. (D) Représentation de la surface du trimère. Les couleurs plus foncées sur chaque sous-unité correspondent à la position des résidus de l'épitope 5 du PLRV (structures allongées en bordure du triangle), et de l'épitope 10 (au centre du trimère). Ces épitopes sont fortement immunogènes et probablement localisés en surface de la particule. aa: acides aminés**

A ce jour, ni la structure cristalline de la protéine CP, ni celle de la capsid, n'ont été résolues. Néanmoins, des similarités de séquences entre la protéine de capsid du TuYV et du PLRV avec celle du *Southern bean mosaic virus* (SBMV), dont la structure est résolue, ont permis de proposer un modèle tridimensionnel des protéines majeures de la capsid de ces deux virus (Brault *et al.*, 2003; Kaplan *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2005) (Figure 17). Cette structure a de plus été validée par des études de mutagenèse dirigée qui ont montré que des mutations affectant des acides aminés potentiellement en surface affectent la formation de particules virales et la dissémination du virus

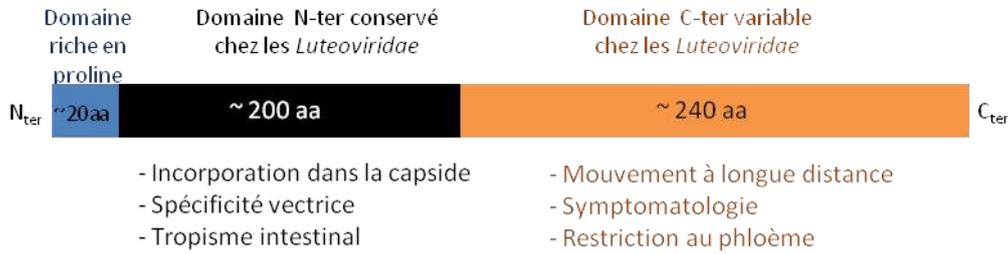
dans les plantes (Brault *et al.*, 2003). La protéine CP n'est pas indispensable à la réplication du virus dans des protoplastes (Reutenauer *et al.*, 1993) mais l'accumulation des ARN viraux est fortement diminuée pour des mutants n'exprimant pas la protéine CP, ce qui suggère que les ARN non protégés par la protéine CP seraient soumis à des dégradations par les RNases cellulaires. La protéine CP est également impliquée dans le mouvement systémique du TuYV, puisqu'aucun mutant du TuYV affecté dans l'expression de la protéine CP, et ne formant pas de particules virales, n'a la capacité de se déplacer à longue distance (Ziegler-Graff *et al.*, 1996). Ces résultats suggèrent que les particules virales seraient les entités responsables du mouvement systémique des polérovirus. De la même façon, les particules virales étant acquises dans la sève par le puceron, la protéine CP est strictement essentielle à la transmission du virus par puceron (Brault *et al.*, 2003). Plus récemment, il a été suggéré que, de par sa localisation nucléaire et nucléolaire (PLRV, Haupt *et al.* (2005b) ; CABYV, TuYV, De Cillia (2011)), la protéine CP pourrait être également impliquée dans la régulation des gènes de l'hôte (De Cillia, 2011).

L'ORF5 est traduite par un mécanisme de *readthrough* du codon stop de l'ORF3. Ce mécanisme permet la synthèse d'une protéine de fusion (protéine RT) ayant à son extrémité N-terminale la séquence de la protéine CP et dans sa partie C-terminale, le domaine de *readthrough* (DRT) correspondant à l'ORF5. Ces deux séquences protéiques, CP et DRT, sont reliées entre elles par une séquence riche en proline qui suit le codon stop de la CP (Figure 18). Deux séquences nucléotidiques de l'ORF5 seraient indispensables à la translecture du codon stop de l'ORF3 et donc à la synthèse de la protéine de fusion. La première de ces séquences est localisée dans la queue de proline et la seconde séquence se trouve environ 700 bp en aval de ce codon stop, entre les bases 4774 et 4851 pour le BYDV-PAV (Brown *et al.*, 1996) et entre les bases 4723 et 4821 pour le TuYV (Bruyere *et al.*, 1997).

Le DRT est constitué de deux domaines : un domaine N-terminal d'environ 200 acides aminés très conservé chez les virus de la famille des *Luteoviridae* et un domaine C-terminal d'environ 240 acides aminés dont la séquence est plus variable (également nommé DRTv) (Figure 18). Cependant, au sein de ce domaine variable, une séquence d'environ 45 acides aminés demeure fortement conservée entre le TuYV, le CABYV et le PLRV (Guilley *et al.*, 1994).

La protéine RT n'est ni nécessaire à la réplication virale, ni à la formation des virions (Brault *et al.*, 1995). Puisque cette protéine RT a été l'objet principal de cette thèse, les connaissances actuelles sur ses fonctions dans le cycle des polérovirus sont présentées en détail dans le chapitre 2.

(A)



(B)

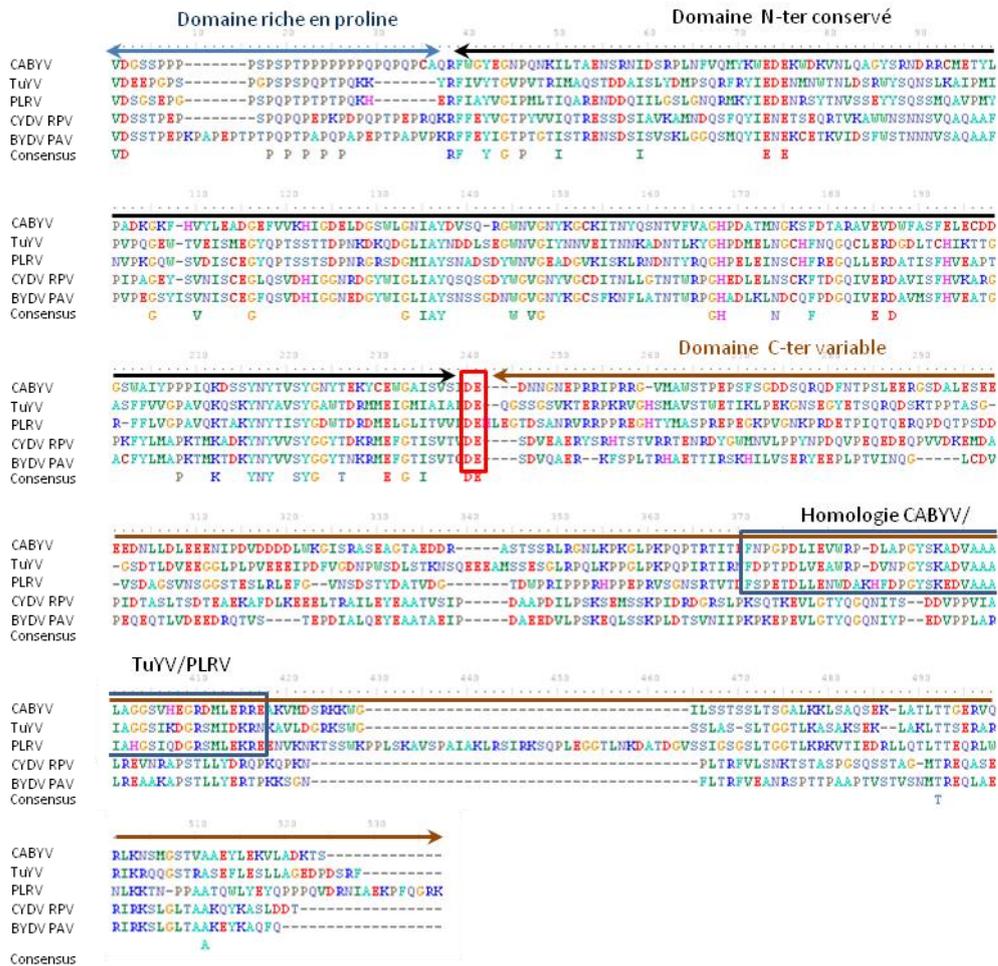


Figure 18 : (A) Organisation et fonctions du domaine de *readthrough* (DRT) des virus appartenant à la famille des *Luteoviridae*. (B) Alignement des séquences protéiques du DRT de différents *Luteoviridae*. La région riche en proline, le dipeptide “DE”, la région conservée chez les 3 polérovirus (CABYV, TuV et PLRV), le domaine C-terminal variable sont également positionnés sur l’alignement.

Numéro d’accession des séquences utilisées : CABYV (gi:293612873), TuV (gi:124021704), PLRV (gi:18656761), CYDV-RPV (gi:145424151), BYDV-PAV (gi:3660475).

➤ Protéine P4

L'ORF4, incluse dans l'ORF3, est exprimée à partir de l'ARNsg1 grâce à un mécanisme de *leaky scanning* du ribosome qui ignore ainsi le codon d'initiation de l'ORF3 situé dans un mauvais contexte pour l'initiation de la traduction. La protéine P4 est une protéine de petite taille (environ 20 kDa), qui possède toutes les caractéristiques des protéines de mouvement : adressage aux plasmodesmes (Schmitz *et al.*, 1997), interaction avec l'ARN et augmentation de la SEL (Hofius *et al.*, 2001). Il faut également signaler que cette protéine est phosphorylée dans la plante (Sokolova *et al.*, 1997). L'organisation des domaines fonctionnels de la protéine P4 est très conservée chez les polérovirus (à l'exception du PLRV pour lequel il manque 50 acides aminés du côté N-terminal de la protéine) (Figure 19).

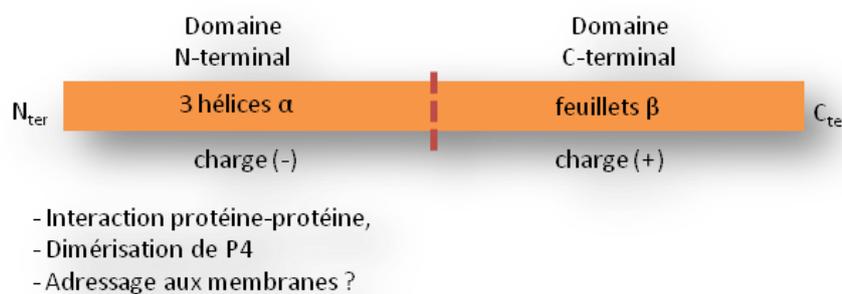


Figure 19 : Domaines fonctionnels de la protéine P4 des polérovirus.

Le domaine N-terminal possède trois hélices α et a une charge nette négative, alors que le domaine C-terminal est constitué de feuillets β et a une charge nette positive. Le domaine N-terminal serait probablement impliqué dans l'adressage aux membranes de la cellule hôte (Tacke *et al.*, 1993). De plus, dans l'hélice α de la protéine P4 du PLRV, tous les acides aminés chargés négativement sont exposés sur un même côté de l'hélice, permettant ainsi les interactions protéine-protéine, ce qui pourrait expliquer la propension de cette protéine à former des dimères. Le domaine C-terminal, quant à lui, pourrait interagir avec l'ARN. L'implication de cette protéine dans le mouvement des virus a été suggérée dès 1996 par les travaux de Chay *et al.*, qui ont montré que cette protéine est nécessaire pour l'infection systémique de l'avoine par le BYDV-PAV. Cette hypothèse a été renforcée en 1997 par Schmitz *et al.* par la localisation de la protéine P4 du PLRV au niveau des PDs (Hofius *et al.*, 2001). Plus récemment encore, c'est le mécanisme d'adressage aux PDs qui a été décrypté. Il a ainsi été montré, pour le PLRV, que l'adressage de la protéine aux PDs serait dépendant des voies de sécrétion (RE/Golgi) et du réseau d'actine (Vogel *et al.*, 2007). Ainsi, la protéine P4 possède toutes les caractéristiques d'une protéine de mouvement mais son action serait cependant hôte spécifique. En effet, Lee *et al.* (2002) ont observé qu'un mutant du PLRV n'exprimant plus la protéine P4 était

incapable d'envahir de façon systémique des plants de pomme de terre ou de *Physalis floridana*. Par contre, ce même mutant est capable d'envahir de façon systémique *Nicotiana benthamiana* et *Nicotiana clevelandii*. De la même manière, Ziegler-Graff *et al.* (1996) ont montré que la protéine P4 n'était pas indispensable au mouvement systémique du TuYV dans *N. clevelandii* mais qu'elle était requise pour l'infection de l'hôte naturel de ce virus qu'est la laitue. Ainsi, ces résultats montrent le rôle hôte-dépendant de la protéine P4, mais également l'existence d'un second type de mouvement P4-indépendant chez certaines espèces. Le mécanisme par lequel la protéine P4 permet le mouvement du virus dans la plante reste mystérieux puisqu'aucune interaction entre la protéine P4 et des protéines des PDs n'a pour l'instant été identifiée. Par ailleurs, la localisation nucléaire de la P4 du BYDV-GAV (Liu *et al.*, 2005b; Nass *et al.*, 1998) et sa capacité à interagir avec l'ARN laisse penser que cette protéine pourrait avoir plusieurs fonctions et être impliquée dans la réplication virale.

➤ Trois protéines virales hypothétiques

- Rap1

Une ORF codant potentiellement pour une protéine de 5 kDa (Rap1 pour « Replication-associated protein 1 ») a été identifiée chez le PLRV par Jaag *et al.* (2003). Cette ORF est incluse dans l'ORF1 et serait exprimée par un mécanisme d'initiation interne lié à la présence d'une séquence IRES constituée du motif symétrique « GGAGAGAGAGG » localisé, de façon surprenante, 22 pb après l'AUG de cette ORF. Cette protéine pourrait intervenir dans la réplication du PLRV mais également dans la synthèse de l'ARNsg1. En effet, un mutant ponctuel du PLRV affecté dans l'expression de cette ORF (PLRV Δ Rap1) est capable, dans des protoplastes transfectés avec les clones ADN complets de ces virus, de synthétiser la protéine P1 mais pas la protéine CP exprimée à partir de l'ARNsg1, qui n'a d'ailleurs jamais pu être détecté dans les protoplastes infectés par mutant PLRV Δ Rap1.

- Les protéines P6 et P7

Une ou deux ORF additionnelles ont été décrites en 3' du génome des virus appartenant à la famille des *Luteoviridae*. Ces ORFs seraient traduites grâce à un ARN subgénomique supplémentaire couvrant l'extrémité 3' de l'ARN viral (ARNsg2). Cet ARNsg2, ainsi qu'un ARNsg3 non codant, ont été mis en évidence dans les plantes et les protoplastes infectés par le BYDV (Dinesh-Kumar *et al.*, 1992). Les séquences promotrices de ces ARNsg sont très différentes de celle de l'ARNsg1 ce qui suggère une régulation différente de ces différents ARNsg. La présence des ORFs 6 et 7 relève cependant d'une analyse *in silico*, leur synthèse *in vivo* n'a jamais été mise en évidence à ce jour, ni leurs rôles dans le cycle viral.

L'ORF6, chez les lutéovirus, coderait pour un peptide de 4,3 à 7,2 kDa (Ashoub *et al.*, 1998). Cette ORF a pu être traduite *in vitro* (Wang *et al.*, 1999) mais n'a jamais été détectée *in planta*. Ashoub *et al.* (1998) ont prédit la présence des ORF6 et ORF7 chez le PLRV, le CABYV et le BYDV-PAV alors qu'une seule ORF7 serait présente chez le TuYV et le BMVYV. Les fonctions de ces protéines, si elles sont exprimées *in vivo*, restent inconnues et seule une interaction *in vitro* entre la P7 du PLRV et l'ARN viral a été mise en évidence par Ashoub *et al.*

B.3. La transmission des polérovirus par puceron

B.3.a. Les mécanismes de la transmission circulante non multipliante

Les virus utilisent différentes stratégies de propagation dans la nature, comme la propagation sans vecteur (par la graine, le pollen ou par multiplication végétative,...) ou avec vecteur (arthropodes, champignons du sol, nématodes, homme, ...). Les polérovirus ne sont ni transmis mécaniquement, ni transmis par la graine mais comptent exclusivement sur les pucerons pour assurer leur propagation dans l'environnement. C'est en effet grâce à leur appareil buccal, de type « piqueur-suceur », que les pucerons peuvent ingérer et inoculer les particules virales qui circulent *via* les canaux alimentaire et salivaire délimités par les stylets maxillaires (Figure 20). Les stylets mandibulaires, quant à eux, protègent les stylets maxillaires et ont un rôle de « forage » pour accéder aux cellules du phloème. Ainsi, les stylets du puceron sont parfois comparés à des aiguilles très fines, à la fois flexibles pour passer entre les cellules et accéder aux cellules du phloème, et solides pour percer les parois des cellules végétales.

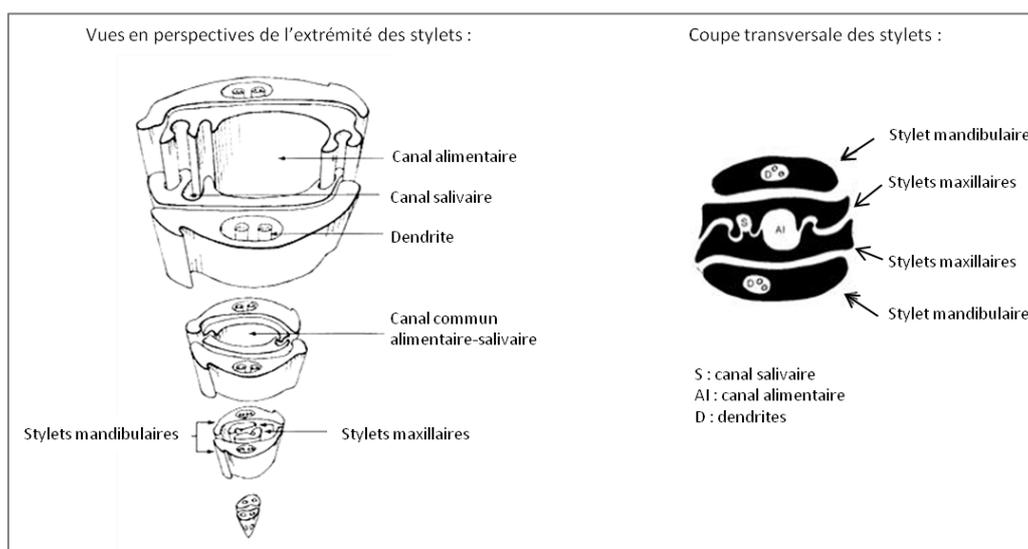


Figure 20 : Organisation des pièces buccales d'un puceron (d'après Leclant, 1982).

La transmission des polérovirus est qualifiée de circulante et non multipliante (Figure 21). Elle est hautement spécifique puisque chaque espèce virale est préférentiellement transmise par une espèce de puceron (Herrbach, 1999). Le virus est acquis lorsque le puceron s'alimente dans le phloème d'une plante infectée. Les particules virales ingérées vont être confrontées au niveau intestinal à la barrière épithéliale qui va être le premier lieu de discrimination des espèces vectrices et non vectrices. Cette barrière est cependant peu discriminante car de nombreux virus non transmis se retrouvent dans l'hémolymphe des pucerons. Au niveau de l'intestin, le lieu d'acquisition du virus est variable : il se fait au niveau de l'intestin moyen pour le PLRV (Garret *et al.*, 1993) et le TuYV (Reinbold *et al.*, 2001), et de l'intestin postérieur pour le BYDV et le CYDV (Gildow, 1999). Le CABYV est un cas particulier puisqu'il peut être acquis au niveau des deux sites (Reinbold *et al.*, 2003). Le mécanisme de transcytose au niveau des cellules intestinales commence au niveau de la membrane apicale par la formation de vésicules à clathrine (Figure 22) et fait probablement appel à la présence de récepteurs encore non identifiés (*cf* paragraphe B.3.c). Les vésicules vont ensuite fusionner pour former des endosomes contenant plusieurs particules virales. Des vésicules tubulaires, bourgeonnant des endosomes et proches de la membrane plasmique basale, ont été observées dans des cellules de *M. persicae* porteuses du TuYV et pourraient donc être responsables de la libération des virions dans l'hémolymphe (Reinbold *et al.*, 2001).

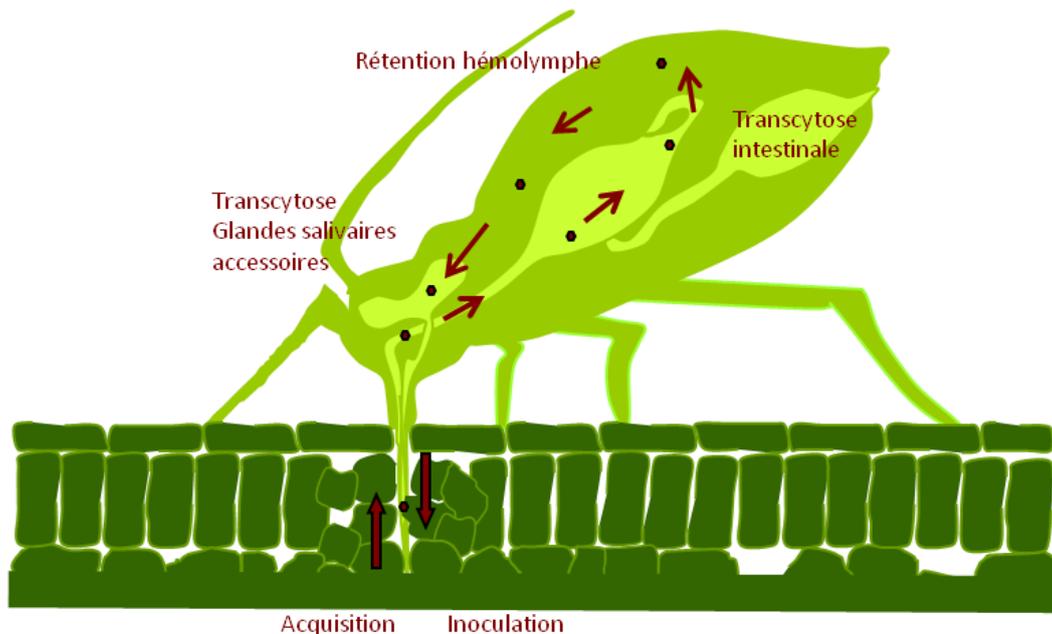


Figure 21 : Représentation schématique du mécanisme de la transmission circulante des virus par puceron. Les hexagones représentent des particules virales cheminant dans le corps du puceron (selon un trajet schématisé par les flèches).

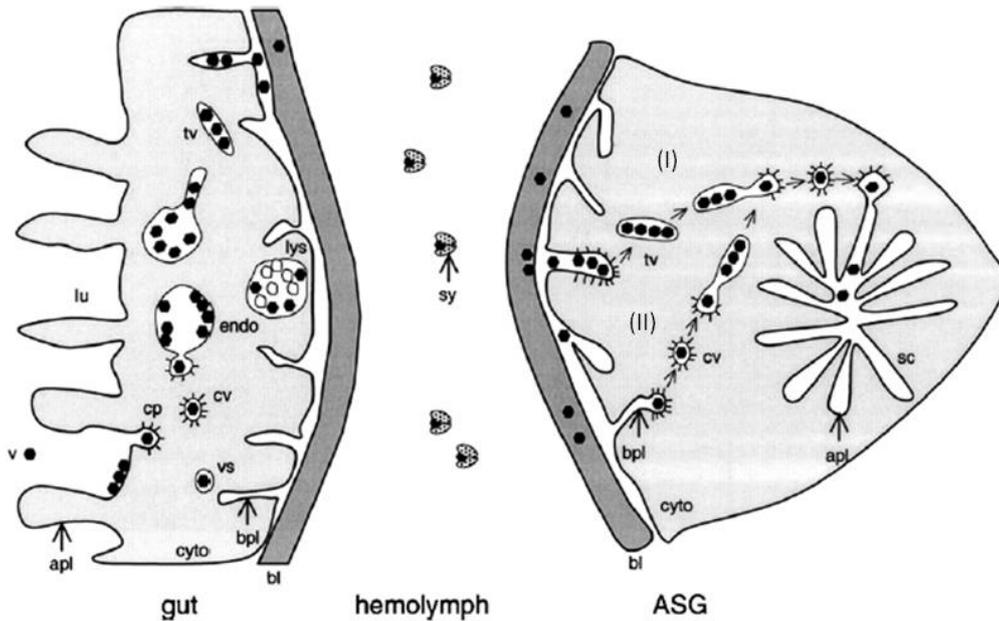


Figure 22 : Modèle pour le transport des polérovirus à travers les cellules intestinales et les cellules des glandes salivaires accessoires (GSA) (Brault *et al.*, 2007). Les virions présents dans la lumière intestinale sont internalisés grâce à des puits à clathrine (cp). Dans le cytoplasme, les virions sont localisés dans des vésicules à clathrine (cv), des vésicules lisses (vs), des vésicules tubulaires (tv), des endosomes (endo) et des lysosomes (lys). Les virions sont ensuite libérés dans l'hémolymphe après fusion des vésicules tubulaires avec la membrane plasmique basale (bpl) puis passage à travers la lamelle basale (bl). Une fois dans l'hémolymphe, les virions sont probablement protégés par la symbionine (sy) et atteignent les cellules des GSA. Ils traversent alors la lamelle basale (bl) qui entoure la cellule et sont ensuite internalisés à partir de la membrane basale grâce à des vésicules à clathrine et à des vésicules tubulaires (tv). Le mécanisme précis permettant aux virions d'atteindre la membrane plasmique apicale (apl) n'étant pas élucidé deux voies sont présentées sur ce modèle (I et II). Une fois la membrane plasmique apicale des cellules des GSA atteinte, les vésicules fusionnent avec celle-ci ce qui permet la libération des virions dans le canal salivaire (sc).

Les virions, une fois dans l'hémolymphe, s'associeraient à une protéine d'origine endo-symbiotique : la symbionine. Cette interaction démontrée *in vitro* (van den Heuvel *et al.*, 1997) n'a cependant pas été confirmée *in vivo*. Cette protéine chaperone est supposée protéger les virions des mécanismes de défense du puceron mais un certain nombre d'études récentes remettent en question le rôle de cette protéine dans la transmission des virus de la famille des *Luteoviridae* (Bouvaine *et al.*, 2011). Les virions atteignent ensuite les glandes salivaires accessoires (GSA) et sont confrontés à deux barrières qui vont jouer un rôle au niveau de la spécificité de vection : la lamelle basale entourant les cellules des glandes salivaires et la membrane plasmique basale. Il a en effet été démontré que certains virus peuvent se trouver bloqués au niveau de l'une ou l'autre de ces barrières ce qui aboutit à une absence de transmission (Peiffer *et al.*, 1997). Les mécanismes d'endo- et d'exocytose qui se déroulent au niveau des cellules des GSA sont similaires à ceux observés au niveau des cellules de l'épithélium intestinal mais se déroulent dans un sens inverse. Les particules virales ayant traversé la cellule et atteint le pôle apical peuvent être libérées dans le canal salivaire puis inoculées à une nouvelle plante au cours d'une prise alimentaire. Le temps de latence (temps écoulé entre l'ingestion et l'inoculation) nécessaire pour ce type de transmission est de l'ordre de 24 h (Tableau 11). Bien que

le virus ne se multiplie pas dans l'insecte vecteur, le pouvoir virulifère des pucerons est conservé pendant plusieurs semaines, voire toute la vie du puceron, mais les virions ne sont jamais transmis aux générations suivantes.

| Caractéristiques de la transmission | Type de transmission | | | |
|-------------------------------------|----------------------|------------------|------------------------|--------------------------|
| | Non persistante | Semi-persistante | Persistante-circulante | Persistante-Répliquative |
| Temps d'acquisition | Secondes-minutes | Minutes-heures | Heures | Heures |
| Temps de rétention | Minutes-Heures | Heures-Jours | Jours à vie | Jours à vie |
| Passage transtadial | Non | Non | Non | Oui |
| Virus dans l'hémolymphe | Non | Non | Oui | Oui |
| Durée de latence | Aucune | Aucune | Heures | Jours à semaines |
| Réplication | Non | Non | Non | Oui |
| Exemple | CMV | CaMV | CABYV | LNyV |

Tableau 11 : Caractéristiques des différents types de transmission de virus par Hémiptères.

B.3.b. Le rôle des protéines de structure dans la transmission

De nombreuses expériences de mutagenèse dirigée, combinées à des expériences de transmissibilité de ces mutants et de localisation dans le puceron ont été réalisées dans différents laboratoires afin de mieux appréhender le rôle des protéines de structure des polérovirus dans leur transmission par puceron. Ainsi, Gildow *et al.* (2000) ont montré que seule la protéine CP était nécessaire au passage de la barrière intestinale. Cependant, si la protéine RT n'est pas strictement essentielle à cette transcytose, elle améliore toutefois l'efficacité du mécanisme (Chay *et al.*, 1996; Reinbold *et al.*, 2001). La protéine RT est par ailleurs essentielle au maintien du virus dans l'hémolymphe (probablement grâce à son interaction avec la symbionine) et indispensable au passage de la barrière des GSA (van den Heuvel *et al.*, 1997). Ces études ont également montré le rôle essentiel de certains acides aminés de la protéine RT au niveau du passage des cellules des GSA (Brault *et al.*, 2000). Enfin en 2005, grâce à l'utilisation de virus recombinants entre le CABYV et le TuYV, qui présentent un tropisme cellulaire différent et une spécificité vectrice différente, Brault *et al.* ont montré que la protéine RT contrôle ces deux spécificités. Le rôle dans la spécificité vectrice du

domaine N-terminal de la protéine RT du SbDV a également été démontré (Gildow *et al.*, 2000; Terauchi *et al.*, 2003).

Ces études de mutagenèse dirigée ont permis de mieux comprendre le rôle des protéines de structure dans la transmission mais elles n'ont pas permis d'établir de séquences consensus strictement nécessaires à la reconnaissance du virus par les récepteurs du puceron, ce qui faciliterait leur identification.

B.3.c. À la recherche des récepteurs...

Le transport des virions au travers les cellules de l'insecte fait probablement intervenir des récepteurs aphidiens qui font l'objet de recherches depuis plusieurs années déjà, mais n'ont jamais été identifiés jusqu'à maintenant. En 2001, une première étude a permis de mettre en évidence plusieurs protéines aphidiennes capables d'interagir *in vitro* avec la protéine de coque du BYDV. En effet, Li *et al.* (2001) ont identifié deux protéines de 35 et 50 kDa, extraites de têtes de pucerons (*Sitobion avenae*) vecteurs du BYDV. Ils ont montré que ces protéines étaient absentes des extraits de têtes de pucerons non vecteurs (*Rhopalosiphum maidis*). Aucune identification de ces protéines n'a cependant été obtenue par manque d'information sur le génome du puceron. Au laboratoire, j'ai également participé à l'identification des récepteurs du TuYV chez *M. persicae* en recherchant les interactions *in vitro* entre les protéines du puceron et les particules du TuYV. Ce travail a permis d'identifier trois protéines candidates (Seddas *et al.*, 2004) : la protéine RACK1 (Receptor for Activated Kinase C), la protéine GAPDH3 (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase 3) et l'actine. Cependant, de par leur localisation cellulaire, ces protéines ne sont probablement pas les récepteurs recherchés, mais elles pourraient néanmoins participer à l'internalisation du virus dans les cellules du puceron. Enfin, plus récemment, une étude couplant des analyses de génétique et de protéomique sur différents génotypes de *Schizaphis graminum* vecteurs et non vecteurs du CYDV-RPV, a permis d'identifier des candidats supplémentaires comme une luciférase et une cyclophiline (Yang *et al.*, 2008). De par leurs fonctions, ces protéines pourraient être impliquées dans le trafic intracellulaire des vésicules contenant les virus, mais là encore, aucune validation fonctionnelle chez le puceron n'a été réalisée. La mise au point d'un outil de validation fonctionnelle chez le puceron apparaît indispensable pour avancer dans l'identification de ces récepteurs.

B.3.d. Les interactions polérovirus-puceron : une relation mutualiste ?

Le jaunissement des plantes infectées est un facteur qui favorise l'installation des pucerons, mouches blanches et autres vecteurs, sur la plante hôte (Dixon, 1985; Kennedy *et al.*, 1961; Mound, 1962) et on peut donc facilement comprendre que les plantes infectées par les virus de la famille des *Luteoviridae*, responsables de jaunisses, puissent attirer les pucerons. La présence du virus dans la plante entraîne également des perturbations métaboliques qui vont affecter la reproduction du puceron et sa physiologie avec des conséquences sur la transmission des virus (Fereres & Moreno, 2009; Herrbach, 1999). Ces modifications favorisent l'apparition de formes ailées, et donc facilite la propagation du virus. Ce même phénomène a par exemple été observé pour *S. avenae* et *Rhopalosiphon padi* s'alimentant sur de l'avoine, de l'orge ou du blé infecté par le BYDV (Fereres *et al.*, 1989; Gildow, 1983; Miller & Coon, 1964; Montllor & Gildow, 1986). Plus récemment, d'autres études ont montré que la modification du métabolisme secondaire de la plante hôte, induite par l'infection virale, affecte également le comportement du puceron vecteur (Eigenbrode *et al.*, 2002b; Jimenez-Martinez, 2004; Mauck *et al.*, 2010; Medina-Ortega *et al.*, 2009; Stafford *et al.*, 2011; Werner *et al.*, 2009). C'est notamment le cas des plants de pomme de terre infectés par le PLRV qui, d'une part, induisent un meilleur développement et une fécondité accrue de *M. persicae* (Castle & Berger, 1993; Castle *et al.*, 1998; 2002b) et, d'autre part, émettent des composés volatiles qui attirent préférentiellement les pucerons aptères (Eigenbrode *et al.*, 2002a). Ce phénomène va favoriser l'installation de ces pucerons sur la plante et ainsi leur acquisition du virus en vue de sa dissémination (Bosque-Perez & Eigenbrode, 2011).

Les modifications physiologiques des pucerons pourraient être attribuées à une composition différente de la sève des plantes infectées dont les teneurs en acides aminés (Fife, 1961; Lowe & Strong, 1962; Matthews, 1981; Selman *et al.*, 1961) ou en composés azotés (Power, 1992) seraient modifiées (Auclair, 1963; Kunkel, 1977). Il a en effet été signalé que la teneur en carbohydrates est modifiée dans le blé infecté par le BYDV (Fereres *et al.*, 1990) rendant les plantes plus attractives pour les insectes vecteurs (Harrisson, 1999).

Enfin, les travaux très récents d'Ingwell *et al.* (2012) montrent que les modifications comportementale et alimentaire du puceron décrites précédemment pourraient être directement induites par le virus. En effet, les pucerons ayant acquis le virus sur une plante infectée, ou sur un milieu artificiel, sont préférentiellement attirés vers les plantes saines alors qu'à l'inverse les pucerons non-virulifères migreront plus facilement vers une plante infectée. Ces expériences éliminent l'effet indirect qu'aurait pu avoir la plante infectée sur le comportement du puceron et démontrent, pour la première fois, un effet direct du virus sur son vecteur. Ces travaux laissent ainsi supposer que l'acquisition du virus par le puceron puisse entraîner des régulations géniques chez le

vecteur. L'étude transcriptomique ciblant les cellules de l'intestin d'*A. pisum* ayant acquis le PEMV n'a cependant pas permis de mettre en évidence une telle perturbation (Brault *et al.*, 2010a), mais comme seulement 20 % des gènes du puceron ont été analysés dans cette étude, il est envisageable qu'une régulation transcriptomique ait lieu chez les pucerons virulifères.

CHAPITRE 1 : Identification de partenaires phloémiens du CABYV potentiellement impliqués dans le cycle du virus

A. Introduction

Les résultats récents obtenus au laboratoire suggèrent que les particules du CABYV se lient à des protéines de sève de concombre qui pourraient jouer un rôle dans la transmission du CABYV par les pucerons (Bencharki *et al.*, 2010a). Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre d'introduction bibliographique, les protéines de l'hôte sont essentielles à l'accomplissement du cycle viral et il ne fait aucun doute que des facteurs cellulaires interagissent avec les particules et les protéines virales afin de promouvoir la multiplication du CABYV dans sa plante hôte. Le criblage de banque d'ADNc par la technique du YDH a été très largement utilisée ces dernières années pour identifier les partenaires cellulaires phloémiens des virus et elle a notamment permis d'identifier un facteur de l'hôte essentiel pour le mécanisme de défense anti-virale du TuYV, un autre polérovirus (Pazhouhandeh *et al.*, 2006). C'est donc cette approche que j'ai développée pour rechercher les partenaires du CABYV impliqués dans le cycle viral en criblant une banque d'ADNc spécifique des cellules du phloème d'*A. thaliana*. Cette banque a été obtenue auprès de Rosalia Deeken (Würzburg, Allemagne) (Ivashikina *et al.*, 2003).

B. Identification de 4 partenaires phloémiens des protéines du CABYV potentiellement impliqués dans le cycle du virus

B.1. Sous-clonage de la banque d'ADNc de cellules compagnes d'*A. thaliana*

La banque de cellules compagnes d'*A. thaliana* fournie par Rosalia Deeken (Ivashikina *et al.*, 2003) ayant été obtenue dans le plasmide pTriPLEX2, j'ai dans un premier temps sous-cloné cette banque dans un vecteur compatible avec les expériences de YDH : le pGADT7-Sfi (*cf* Matériel et méthodes, page 143). Le titre de la nouvelle banque a été estimé à $3,3 \cdot 10^{10}$ clones/mL et le profil électrophorétique de 48 clones indépendants provenant de cette banque a été analysé et a révélé la présence d'une forte proportion de clones non recombinants (62 %). Les 38 % de clones restants présentent des inserts de taille allant de 300 pb à 1500 pb ce qui correspond à la taille des inserts de la banque d'origine. Aucune sélection de clones comportant des fragments de faible taille ne s'est donc opérée lors du sous-clonage de la banque.

B.2. Identification de 4 gènes candidats par criblages d'une banque d'ADNc d'*A. thaliana* avec les protéines codées par les ORF3 et 5 du CABYV

Trois constructions couvrant les ORF3 et 5 ont été utilisées pour réaliser les différents criblages de la banque d'ADNc (Figure 23, A). Elles correspondent aux séquences codant pour les protéines de structure du CABYV (protéines CP et RT*), ou pour un domaine non-structural (domaine RT_{C-ter}) couvrant la partie C-terminale de l'ORF5. Dans la construction correspondant à la RT*, le codon stop de l'ORF3 a été éliminé par mutagenèse dirigée. Ces constructions ont été obtenues dans le vecteur pGBKT7.

L'expression des protéines virales dans les levures a ensuite été confirmée par western blot en utilisant un anticorps dirigé contre l'étiquette Myc présente à l'extrémité N-terminale des protéines de fusion exprimées à partir du pGBKT7 (Figure 23, B). Les constructions pGBKT7-RT_{C-ter} (piste b), pGBKT7-RT* (pistes c et d) et pGBK-CP (piste e), génèrent 3 protéines majoritaires d'un poids moléculaire apparent d'environ 40, 80 et 35 kDa respectivement, ce qui correspond approximativement aux poids moléculaires (PM) attendus des protéines virales fusionnées à l'étiquette Myc (Figure 23, C).

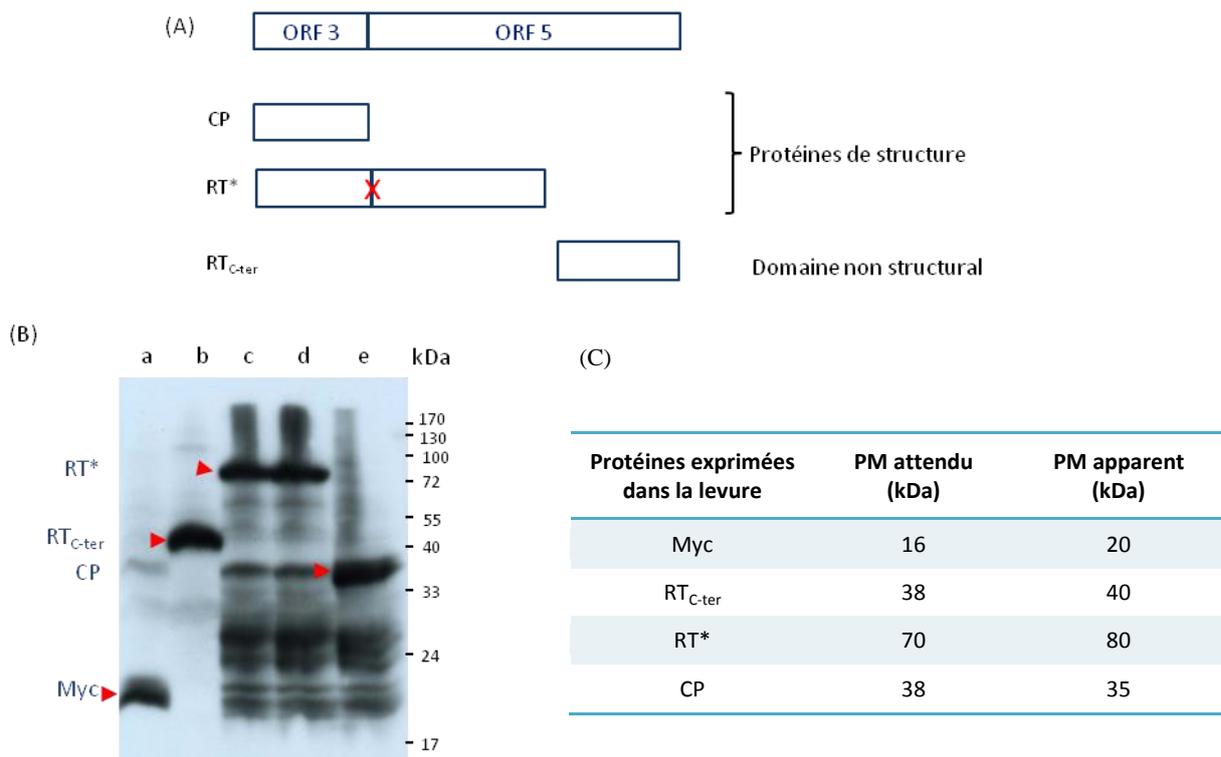


Figure 23 : Analyse par western blot de l'expression dans les levures des protéines codées par les ORF3 et ORF5 du CABYV, utilisées pour cribler la banque d'ADNc de cellules compagnes d'*A. thaliana*. (A) Représentation schématique des séquences protéiques du CABYV clonées dans le vecteur pGBKT7. La croix rouge symbolise la mutation du codon stop de l'ORF3 introduite dans la construction RT*. (B) Détection par western blot des protéines de fusion du CABYV à partir d'extraits totaux de levures transformées avec les constructions RT_{C-ter} (piste b), RT* (pistes c-d), CP (piste e) ou le plasmide vide (Ø)(piste a). La membrane a été incubée avec un anticorps dirigé contre l'étiquette Myc présente en N-ter des protéines exprimées dans le pGBKT7. (C) Tableau synthétique des poids moléculaires (PM) attendus et apparents des différentes protéines.

Avant de poursuivre la présentation des résultats, je souhaiterais faire un bref rappel du principe du test d'interaction protéine-protéine par la technique du double hybride dans la levure (Figure 24). Dans ce test, deux protéines candidates, chacune fusionnée à un domaine d'un facteur de transcription (domaine de liaison à l'ADN ou d'activation de la transcription), permettent la reconstitution d'un facteur de transcription fonctionnel (facteur de transcription Gal4) si elles interagissent. Le facteur de transcription permet alors de transcrire des gènes rapporteurs placés sous le contrôle du promoteur du facteur de transcription Gal4.

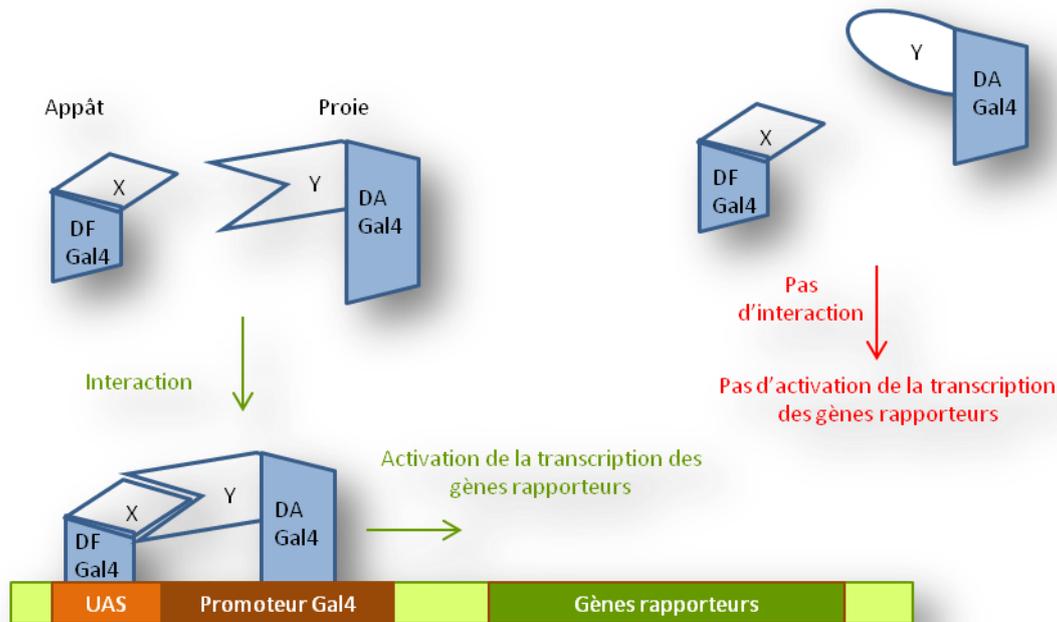


Figure 24 : Principe du test d'interaction entre deux protéines par la technique du double hybride dans la levure. La protéine X est fusionnée au domaine de fixation à l'ADN (DF) du facteur de transcription Gal4, et est appelée protéine « appât ». La protéine Y, fusionnée au domaine d'activation (DA) du même facteur de transcription, est appelée protéine « proie ». Lorsque les deux protéines interagissent, elles reconstituent un facteur de transcription fonctionnel, capable d'activer la transcription des gènes rapporteurs. Dans le cas contraire (pas d'interaction), il n'y a pas activation de la transcription. UAS : Upstream activating sequence.

Les gènes rapporteurs utilisés dans cette étude sont *Ade2* et *His3* qui permettent après expression de combler l'auxotrophie des levures. Pour s'assurer que les protéines de fusion qui vont servir d'appât pour le criblage de la banque n'activent pas la transcription des gènes rapporteurs, la capacité des levures transformées avec les plasmides pGBKT7 recombinants, à se développer sur milieux déficients en adénine et/ou histidine est tout d'abord analysée. Les résultats présentés dans le Tableau 12 montrent que les levures exprimant les protéines CP et RT* ne sont pas capables de se développer sur les milieux sélectifs déficients en histidine et tryptophane (SD/-HW) ou déficients en adénine, histidine et tryptophane (SD/-AHW). A l'inverse, les levures exprimant le domaine RT_{C-ter} sont capables de se développer sur le milieu SD/-HW (cette protéine virale active donc la

transcription du gène *His3*) mais, ne se développent pas sur le milieu plus sélectif dépourvu d'adénine. Par conséquent, le criblage de la banque avec cette construction a pu être réalisé en utilisant le milieu de sélection déficient en adénine, histidine, tryptophane, et leucine (SD/-AHWL) alors que pour le criblage de la banque avec les deux autres constructions un milieu sans histidine, tryptophane et leucine (SD/-HWL) a été utilisé.

Tableau 12 : Analyse de l'activation de la transcription des gènes rapporteurs *Ade2* et *His3* par les protéines virales fusionnées au domaine de fixation à l'ADN du facteur de transcription Gal4 dans la souche de levure AH109. Les levures exprimant les différentes protéines virales sont cultivées sur des milieux de sélection dépourvus de tryptophane (-W) et de leucine (-WL), ou d'histidine et de tryptophane (-HW), ou d'adénine, d'histidine et de tryptophane (-AHW).

(+) : Croissance des levures; (-) : Absence de croissance des levures.

| Milieux de sélection des levures | CP | RT* | RT _{C-ter} |
|----------------------------------|----|-----|---------------------|
| - W | + | + | + |
| - WL | - | - | - |
| - HW | - | - | + |
| - AHW | - | - | - |

Le criblage a consisté à transformer la souche de levure exprimant une des protéines virales avec la banque d'ADNc. Dans le cas du criblage avec la CP et la RT*, les transformants ont été sélectionnés dans un premier temps sur un milieu dépourvu en tryptophane, leucine et histidine (SD/-HWL) puis repiqués sur un milieu plus sélectif dépourvu également d'adénine (SD/-AHWL) pour confirmer l'interaction sur un milieu de culture plus stringente. Pour le RT_{C-ter}, le mélange de transformation a été directement étalé sur le milieu SD/-AHWL.

Le criblage de la banque avec le domaine RT_{C-ter} du CABYV a permis de cribler 3,5.10⁶ clones ce qui correspond à 2,2.10⁵ clones comportant des inserts positionnés dans le bon cadre de lecture. En effet, seuls 38 % des clones de la banque possèdent un insert et parmi ceux-ci 1/6 sont théoriquement dans le bon cadre de lecture. Ce nombre de clones réellement criblés représente cependant une bonne couverture du génome d'*Arabidopsis* (approximativement 10 fois le nombre de gènes). Ce criblage a conduit à la mise en évidence de quatre partenaires potentiels (Tableau 13) : la profiline 3 (AT5G56600), la protéine « *response to low sulfur 3* » (AT3G49570), la glycosyl-hydrolase DIN10 (AT5G20250) et une protéine « Heat shock » Hsp20-like (AT2G29500).

Tableau 13 : Protéines candidates identifiées au cours des criblages de la banque d'ADNc de cellules compagnes d'*A. thaliana*.

(+) : interaction
(-) : pas d'interaction

| Protéine d' <i>A. thaliana</i> | Protéine virale | CP | RT* | RT _{C-ter} |
|--------------------------------------|-----------------|----|-----|---------------------|
| Hsp20-like (AT2G29500 ^a) | | - | + | + |
| Response to Low Sulfur 3 (AT3G49570) | | - | - | + |
| Profilin 3 (AT5G56600) | | - | - | + |
| Glycosyl hydrolase Din10 (AT5G20250) | | - | - | + |

^a : entre parenthèses numéro d'accension

Le clone codant pour la profiline 3 a été isolé une seule fois et contient la totalité de la séquence codante du gène telle que décrite par Huang *et al.* (1996). La traduction de cette séquence conduit cependant à la synthèse d'une protéine possédant 2 acides aminés mutés et 5 acides aminés supplémentaires en position N-terminale, qui proviennent de la traduction de 15 nucléotides de la séquence 5'UTR (Figure 25). Cependant, selon Fan *et al.* (2012), ces acides aminés pourraient faire partie de la séquence protéique de la profiline 3 (voir paragraphe D.2 de ce chapitre). Les clones codants pour les protéines LSU3 et Hsp20-like ont été isolés respectivement 4 et 2 fois. Ils correspondent aux séquences codantes complètes des gènes avec en N-terminal, respectivement 81 et 102 nucléotides provenant de la séquence 5'UTR de ces gènes. Enfin, le clone correspondant à la glycosyl-hydrolase DIN10, a été isolé 1 seule fois et code pour les 96 acides aminés C-terminaux de la protéine (sur une séquence totale de 844 acides aminés).

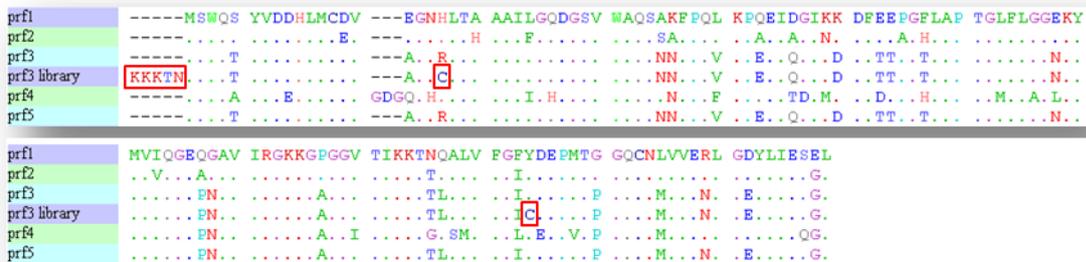


Figure 25 : Alignement des 5 séquences protéiques d'*A. thaliana* codant pour des profilines (PRF1 à PRF5) et du clone isolé de la banque d'ADNc de cellules compagnes (« prf3 library »). Dans la séquence « prf3 library », les acides aminés additionnels en N-ter ou mutés par rapport à la séquence originale de PRF3 sont encadrés en rouge. Les 5 séquences codant pour des profilines présentent 61 à 91 % de similarité.

La spécificité de ces interactions a été analysée en étudiant la capacité des protéines candidates à interagir avec les différents appâts viraux. A l'exception de la protéine Hsp20-like qui peut se lier non seulement à la partie C-ter de la protéine RT mais aussi à la RT*, les autres protéines candidates n'interagissent qu'avec le domaine RT_{C-ter} (Tableau 13).

De manière surprenante, les criblages de la banque d'ADNc de cellules compagnes avec les constructions CP et RT* n'ont pas permis d'identifier de gènes candidats. L'absence d'identification de candidats après le criblage de la banque d'ADNc avec la protéine CP pourrait provenir d'une auto-association de la protéine dans la levure. Pour tester cette hypothèse, j'ai analysé la capacité de la protéine CP à s'auto-associer dans la levure et à interagir avec la protéine RT*. Ces séquences ont préalablement été clonées dans le vecteur pGADT7. J'ai ainsi pu mettre en évidence une interaction CP-CP et CP-RT* dans la levure (Figure 26).

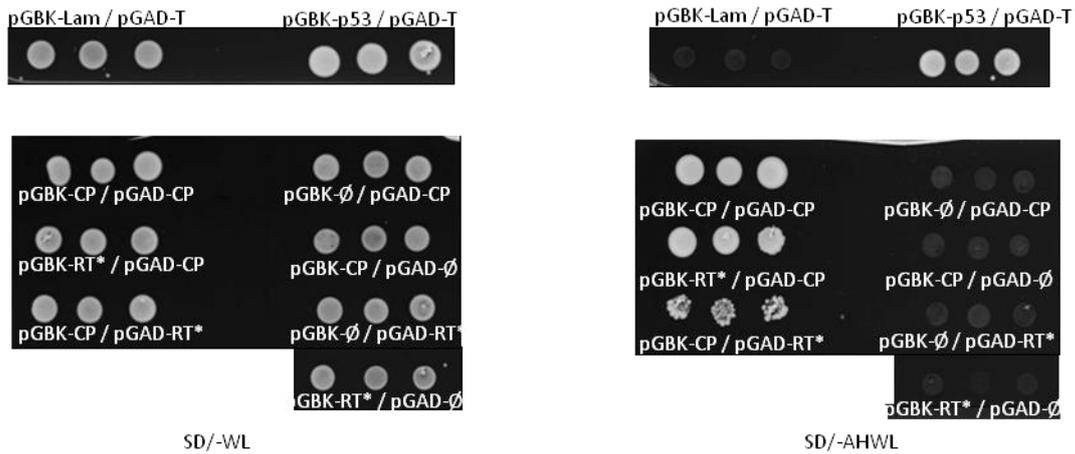


Figure 26 : Tests d'interactions par double hybride dans la levure entre les protéines CP et RT* du CABYV. Les séquences des protéines CP et RT* ont été introduites dans le pGBKT7 et le pGADT7. Les levures co-transformées ont été cultivées sur les milieux de sélection SD/-WL et SD/-AHWL pour tester l'interaction entre les deux protéines exprimées. L'absence d'auto-activation de la transcription par ces protéines virales a été vérifiée en co-transformant les levures avec le second vecteur vide (\emptyset). Les levures exprimant les protéines Lamine C humaine et l'antigène T servent de témoin négatif d'interaction, et les levures exprimant la protéine murine p53 et l'antigène T servent de témoin positif d'interaction.

Afin d'identifier une construction dérivée de la protéine CP incapable de s'auto-associer dans la levure, j'ai obtenu dans le pGBKT7 et le pGADT7 4 nouvelles constructions (Figure 27 et Figure 28) : dans les deux premières constructions, le tryptophane (chaîne latérale avec un noyau aromatique) à la position 163 (W163) a été muté en arginine (chaîne latérale basique, W163R) ou en tyrosine (chaîne latérale avec un noyau aromatique, W163Y). Ce tryptophane W163 est l'équivalent du tryptophane 166 sur la séquence du TuYV (W166) qui serait impliqué dans les interactions entre les différentes sous-unités de la capsid (Brault *et al.*, 2003). Une construction représentant la totalité du domaine S (*cf* Introduction bibliographique, page 52) a également été obtenue et une autre correspondant à la protéine CP dépourvue de l'épitope 10 a également été construite. Les épitopes 5 et 10 décrits par Torrance *et al.* (Torrance, 1992) sont fortement immunogènes et exposés à la surface de la capsid du PLRV.

Les tests d'auto-association de ces différentes protéines mutantes ou tronquées n'ont pas permis de mettre en évidence d'interaction (Figure 29) confirmant pour le CABYV, le rôle crucial du tryptophane en position 163 dans les interactions entre les sous-unités de la protéine CP. Les résultats montrent également que la délétion de la partie N- ou C-ter de la protéine CP inhibe toute interaction. La banque d'ADNc de CC a donc été criblée avec la construction CP_{W163Y}, qui est la séquence la plus proche de la séquence d'origine ne permettant pas l'auto-association de la protéine. De manière surprenante, aucun des deux criblages effectués avec cette construction n'a permis d'identifier de candidats. La recherche d'interactants avec les autres constructions n'a pas été poursuivie.



Figure 27 : Alignement des séquences protéiques de la protéine CP du CABYV et du TuYV. Positionnement, par homologies de séquences, des domaines R et S sur la protéine CP du CABYV. Le tryptophane (W) potentiellement impliqué dans les interactions entre les différentes sous-unités de la capsid du TuYV est également indiqué (Brault *et al.*, 2003). Les épitopes 5 et 10 (Ep) localisés en surface des virions décrits par Torrance *et al.* (1992) chez le *Potato leafroll virus* puis par homologies de séquences chez le TuYV sont positionnés par homologies de séquences, sur la séquence de la protéine CP du CABYV.

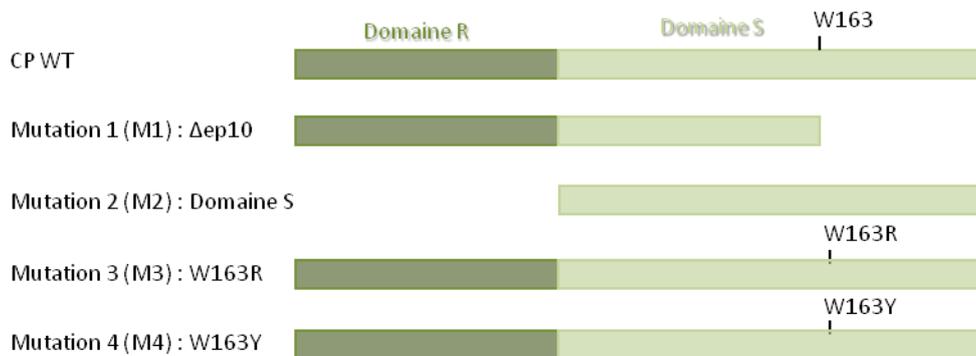


Figure 28 : Représentation schématique des constructions obtenues à partir de la protéine CP du CABYV, clonées dans le pGBKT7 et le pGADT7 afin d'analyser leur auto-association dans la levure.

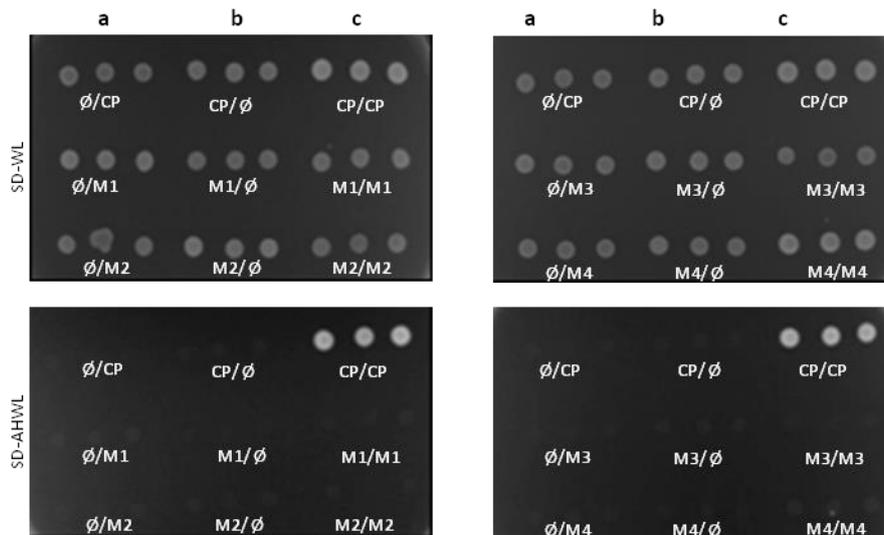


Figure 29 : Test d'auto-association dans la souche de levure Y2HGold des constructions obtenues à partir de la CP du CABYV. Chaque construction (M1 à M4 et CP non mutée), clonée dans le pGADT7 ou le pGBKT7 est introduite dans la levure avec l'autre vecteur vide (\emptyset) (a) et b) ou l'autre vecteur contenant la même construction (c). Les levures transformées sont repiquées sur les milieux sélectifs SD/-WL et SD/-AHWL. Le milieu SD/-AHWL ne permet la croissance des levures que dans le cas d'une interaction entre les deux protéines exprimées dans la levure.

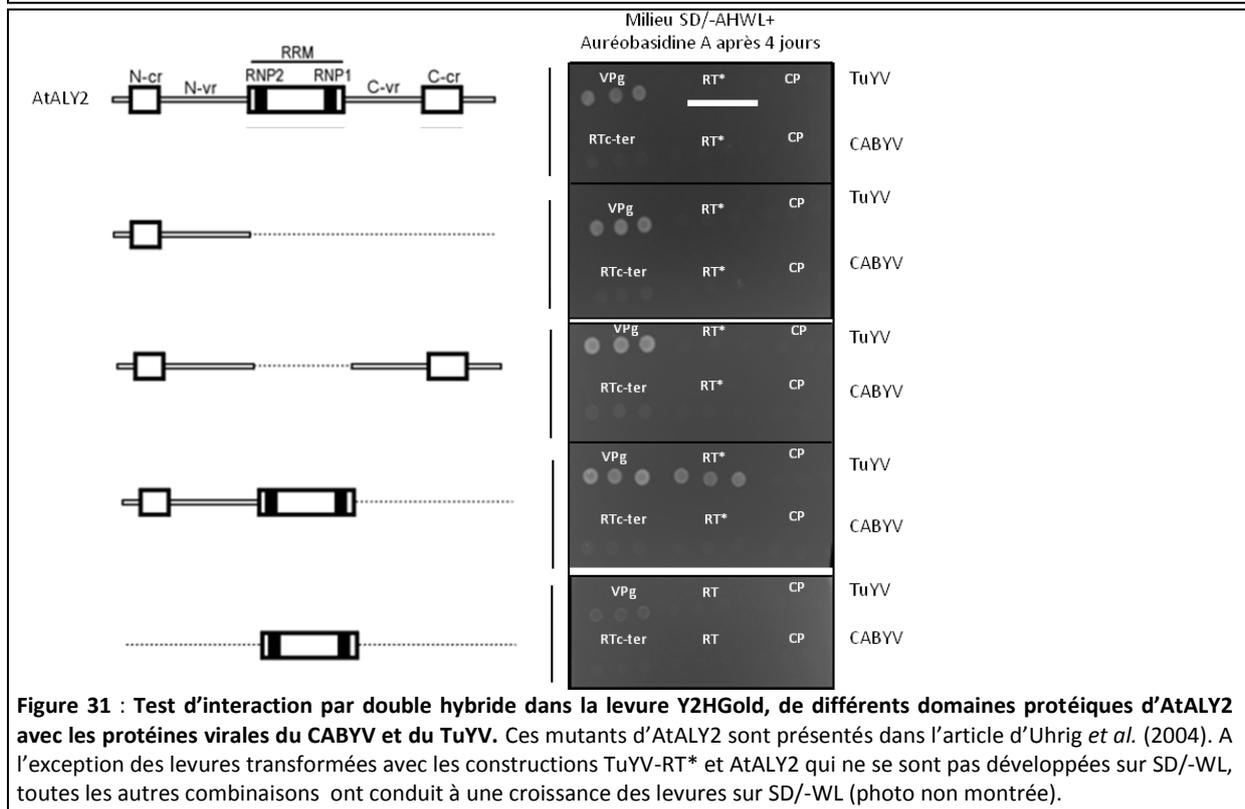
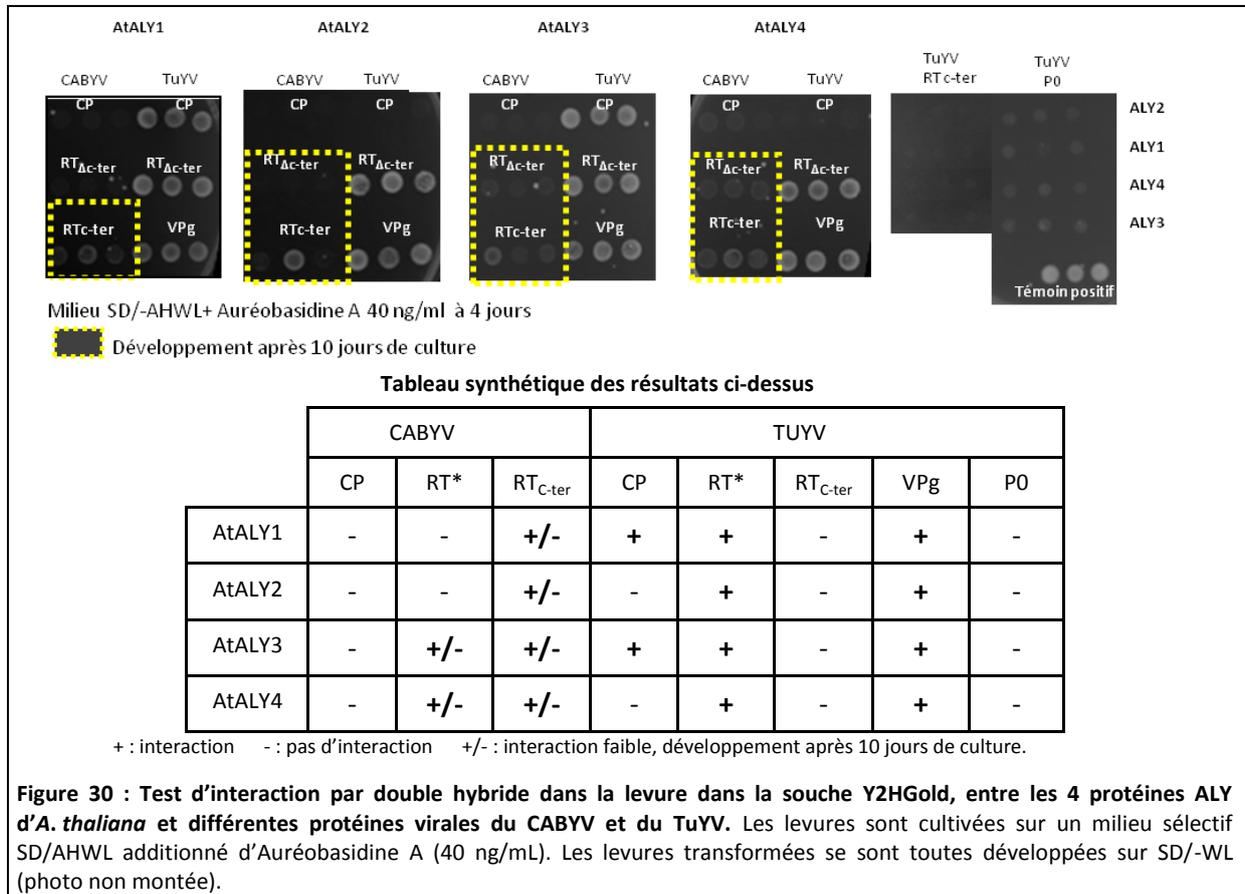
C. Identification de partenaires supplémentaires des protéines de structure du CABYV : les protéines ALY

Des banques d'ADNc de pucerons entiers, de têtes, de glandes salivaires et d'intestins sont disponibles au laboratoire. Le criblage de ces banques, par le système du YDH, avec des appâts viraux du TuYV a permis à un post-doctorant (Baptiste Monsion) d'identifier 3 gènes candidats dont une protéine ALY (gi : 100165216). La protéine ALY, qui fait partie du complexe THO, est un co-activateur transcriptionnel et intervient dans l'épissage des ARN pré-messagers et dans leur export nucléaire. Il a été montré que les protéines ALY d'*A. thaliana* interagissent *in vitro* et *in vivo* avec la protéine P19 du TBSV pour modifier sa fonction de suppresseur de *gene silencing* (Canto *et al.*, 2006; Uhrig *et al.*, 2004). Nous avons donc jugé intéressant d'analyser par la technique du YDH, la capacité des protéines ALY d'*A. thaliana* d'interagir avec différentes protéines du TuYV et du CABYV. Pour le TuYV, en plus des protéines codées par les ORF3 et ORF5, les protéines VPg et P0 ont été incluses dans l'analyse. Les résultats des tests d'interaction sont résumés dans la Figure 30 :

- AtALY1 et AtALY3 ont un comportement similaire vis-à-vis des protéines virales puisque ces protéines interagissent avec les protéines CP, RT* et VPg du TuYV et avec le domaine RT_{C-ter} du CABYV. On note une interaction supplémentaire d'AtALY3 avec la protéine RT* du CABYV. Toutes les interactions des protéines ALY avec les protéines du CABYV semblent plus faibles que pour le TuYV car les levures ne se développent qu'après 10 jours de culture alors que pour les interactions protéines du TuYV/protéines ALY, on observe une croissance des levures après 4 jours.
- AtALY2 et AtALY4 se comportent également d'une manière similaire vis-à-vis des protéines virales puisque ces protéines interagissent avec les protéines VPg et RT* du TuYV mais également avec les protéines RT_{C-ter} du CABYV. On observe une interaction supplémentaire d'AtALY4 avec la protéine RT* du CABYV. De même que pour AtALY1 et AtALY3, les interactions d'AtALY2 et AtALY4 avec les protéines du CABYV semblent plus faibles.

Une analyse plus poussée a été conduite avec la protéine AtALY2 qui interagit avec les protéines RT* et VPg du TuYV, et avec le domaine RT_{C-ter} du CABYV. La protéine AtALY2 comporte plusieurs domaines (Figure 31) (*cf* paragraphe D.5 de ce chapitre) dont un domaine de liaison à l'ARN (RRM pour « RNA recognition motif »), deux domaines conservés aux extrémités N- et C-terminales (N-cr et C-cr) et deux domaines variables également aux extrémités N- et C-terminales (N-vr et C-vr). J'ai analysé par la technique du YDH la capacité de ces différents domaines à interagir avec les protéines virales. La Figure 31 montre que les domaines N-cr et N-vr et RRM d'AtALY2 semblent impliqués dans l'interaction avec la protéine RT* du TuYV et que les domaines N-cr et N-vr sont impliqués dans l'interaction avec la protéine VPg du TuYV puisque lorsque ces domaines sont absents, l'interaction

avec la protéine VPg disparaît (Figure 31). Aucune interaction des protéines virales n'a été mise en évidence avec le domaine RRM impliqué dans l'interaction avec la protéine P19 du TBSV et dans la relocalisation des protéines ALY du noyau vers le cytoplasme (Canto *et al.*, 2006)(cf paragraphe D.5).



D. Cartes d'identité des gènes candidats

D.1. La protéine Hsp20-like (Heat shock protein 20)

La protéine « Hsp20-like » (AT2G29500), préalablement appelée AtHsp17.6B-CI, appartient à la famille des « Small Heat shock protein » (sHsp), qui sont des protéines de 16 à 42 kDa, ubiquistes chez les eucaryotes et les procaryotes et produites en conditions de stress. Cette famille de protéines est particulièrement diversifiée chez les plantes contrairement à d'autres organismes puisque l'on dénombre 19 familles de sHsps. Ces protéines sont répertoriées en différentes groupes selon leur localisation subcellulaire et leurs homologues de séquences (Tableau 14). Chez arabidopsis, 19 ORFs codant pour des sHsps ont été identifiées (Scharf *et al.*, 2001). Les sHsps appartenant à la même classe ont de grandes similarités de séquence, alors que des sHsps de classes différentes présentent de faibles similarités de séquences.

| Groupes | Localisation subcellulaire |
|-----------------------|----------------------------|
| CI à CVII (7 classes) | Cytoplasme et noyau |
| MI et MII (2 classes) | Mitochondrie |
| Po (1 classe) | Péroxisomes |
| P (1 classe) | Plastides |
| RE (1 classe) | Réticulum endoplasmique |

Tableau 14 : Classification des protéines sHsps selon leur localisation subcellulaire (Scharf *et al.*, 2001; Siddique *et al.*, 2008).

Les protéines sHsps présentent un domaine α -cristallin » (ACD) de 90 nucléotides environ à l'extrémité C-terminale, qui constitue le domaine « Heat shock » (de Jong *et al.*, 1998). Elles agissent plus efficacement sous forme d'oligomères mais leurs activités de chaperonnes peut également s'effectuer sous forme non-oligomérique grâce au domaine N-terminal. Le domaine N-terminal est plus divergent entre les classes et serait nécessaire pour l'homo-oligomérisation avec le domaine C-terminal. Le domaine ACD est impliqué dans le contact entre les sous-unités et dans le maintien de la structure quaternaire du complexe oligomérique dont le poids moléculaire peut atteindre 350 kDa. L'expression des sHsps est induite en conditions de stress, comme un stress thermique, osmotique, oxydatif, les rayonnements UV, la sécheresse, le froid et pour certaines d'entre elles pendant les étapes du développement. Le mécanisme d'action des sHsps diffère de celui des HSP de taille plus importante. Contrairement aux HSPs, les sHsps sont ATP indépendantes et leurs rôles seraient d'éviter l'agrégation irréversible des protéines en interagissant avec les protéines non-structurées. La restructuration nécessaire au fonctionnement des protéines est ensuite réalisée par les protéines chaperonnes HSP70, HSP40 et HSP101 de façon ATP dépendante. Ces sHsps participent également à

la maintenance de l'intégrité des membranes en conditions de stress (pour revues : Baniwal *et al.*, 2004; Nakamoto & Vigh, 2007; Sun *et al.*, 2002).

Les sHsp peuvent éventuellement être induites en conditions de stress biotiques et plusieurs exemples de la bibliographie montrent qu'elles peuvent jouer un rôle dans le cycle de plusieurs virus à ARN. En effet, il a été montré que plusieurs HSPs, dont des sHsps, sont sur-exprimées suite à l'infection par des virus à ARN (Whitham *et al.*, 2003). L'infection précoce par deux tobamovirus (le TCVV, *Turnip vein-clearing virus* et l'ORMV, *Oilseed rape mosaic virus*) conduit à l'induction de l'expression des protéines chaperonnes HSP101, HSP83, HSP70 et des sHsp23.6, 17.4CI, 17.7CII. A un temps plus tardif, l'expression de ces gènes est également induite pour tous les autres virus testés (PVX, CMV et TuMV). Ces résultats pourraient refléter une réponse commune de la plante à l'infection virale, ou bien correspondre à une stratégie du virus visant à faciliter l'infection. La seconde hypothèse est confortée par le fait que la protéine HSP101 est capable d'interagir avec la séquence leader Ω du TMV favorisant ainsi, dans la levure, la traduction des ARN messagers possédant cette séquence (Wells *et al.*, 1998).

Plusieurs études ont montré l'implication des HSPs dans l'infection virale en mettant en évidence des interactions entre des protéines virales et des protéines HSPs (*cf* Introduction bibliographique). Je citerai par exemple l'interaction entre la protéine CP du PVY, impliquée dans le mouvement de cellule à cellule et à longue distance des potyvirus, et une protéine DnaJ-like de tabac (homologue d'une HSP40) (Hofius *et al.*, 2007). L'expression d'un mutant négatif dominant de cette DnaJ conduit à une plus grande résistance de la plante face au virus, probablement à cause d'une déficience du mouvement du virus. Un autre cas intéressant est celui du BYV qui code lui-même pour une protéine homologue à une HSP70. Cette protéine adressée aux PDs, est nécessaire au mouvement de cellule à cellule et pour l'assemblage des virions (Alzhanova *et al.*, 2001; Medina *et al.*, 1999; Peremyslov *et al.*, 1999). Ces exemples suggèrent fortement l'implication des protéines chaperonnes HSP70 et HSP40 dans les mécanismes de l'infection virale et il est maintenant largement accepté que les protéines MP des virus pourraient exploiter ces facteurs de la plante pour adopter une conformation leur permettant de passer au travers les PDs.

Dans la littérature on trouve également un exemple de protéine impliquée dans la résistance au virus et qui présente des similarités de séquences avec les protéines sHsps. Il s'agit de la protéine RTM2, qui possède un domaine α -cristallin en N-terminal (Whitham *et al.*, 2000). *Rtm2* est l'un des trois gènes impliqués dans la résistance au mouvement à longue distance de plusieurs potyvirus (Mahajan *et al.*, 1998; Whitham *et al.*, 1999). Contrairement aux protéines sHsps, l'expression de RTM2 n'est pas induite après un stress thermique et ne confère pas de résistance à la chaleur (Whitham *et al.*, 2000). Hormis ce domaine α -cristallin, RTM2 n'a pas d'autres homologies avec les protéines sHsps. Cependant, le fait que les gènes *rtm1* et *rtm2* soient restreints au phloème (Chisholm *et al.*, 2001)

fait d'eux des candidats intéressants dans le cadre d'études portant sur la restriction des virus au phloème.

Le seul exemple d'effet négatif d'une protéine HSP sur l'infection virale est trouvé dans le domaine animal où la surexpression de la protéine HSP70 conduit à une réduction de l'accumulation du virus A de l'Influenza. A l'inverse, l'inhibition de l'expression de la protéine HSP70 conduit à une augmentation de la charge virale (Li *et al.*, 2011).

Plusieurs sHsps ont déjà été identifiées comme des partenaires des polérovirus. En effet, 31 clones codant pour une HSP17.6CII, 6 clones codant pour une HSP17.7CII, 6 clones codant pour une HSP17.6CCI et 2 clones codant pour une HSP17.6BC1 ont été identifiés par Céline Sorin, post-doctorante à l'IBMP (Strasbourg), lors du criblage de la banque de CC d'*A. thaliana* avec la protéine PO du TuYV. L'implication des sHsps dans le cycle des polérovirus a alors fait l'objet d'une partie de la thèse de Julia De Cillia (IBMP, Strasbourg) et ont permis d'obtenir les résultats suivants :

- 8 sHsps nucléaires et cytoplasmiques (sur les 9 testées) interagissent plus ou moins fortement avec les protéines PO du TuYV et du CABYV,
- Aucune différence d'accumulation du TuYV n'a été observée dans un mutant surexprimant la protéine sHsp17.7CII par rapport à la plante de référence Col-0 (seul mutant de surexpression disponible). En raison de problèmes techniques l'accumulation du CABYV dans le mutant d'*Arabidopsis*, n'avait pas pu être analysée,
- L'expression des protéines sHsp17.7CII suite à l'infection virale a été analysée. Aucune dérégulation suite à l'infection d'*Arabidopsis* par le TuYV ou le CABYV n'a été observée. Néanmoins nous ne pouvons pas éliminer l'hypothèse que la modification spécifique de l'expression du gène soit limitée aux cellules du phloème.

En résumé, l'implication des sHsps dans le cycle des polérovirus reste encore très hypothétique et la forte redondance des gènes codant pour ces protéines dans *Arabidopsis* rend difficile le travail de validation fonctionnelle.

Quel pourrait être le rôle d'une interaction entre une protéine sHsp et un suppresseur de *gene silencing* ? L'hypothèse émise par Julia De Cillia suggère que la protéine sHsp assisterait la protéine virale dans son transport d'une cellule à l'autre pour supprimer le *gene silencing* dans la cellule voisine. Ce mouvement serait inefficace dans les cellules non phloémienne, expliquant ainsi la restriction au phloème des polérovirus.

Il se peut également que les interactions entre protéines virales et sHsps n'aient aucun sens biologique. Les protéines sHsps feraient alors partie du grand nombre de protéines qualifiées de « faux positifs » car responsables d'interactions non-spécifiques liées à leur surexpression dans la

levure. De plus, les protéines HSPs, sont impliquées dans le repliement des protéines mal structurées et pourraient interagir avec les protéines de fusion surexprimées dans la levure qui n'auraient pas la même conformation et les mêmes modifications post-traductionnelles que dans leur environnement naturel.

Le travail de validation fonctionnelle de ces protéines n'a donc pas été poursuivi pendant ma thèse.

D.2. Profiline 3

Les profilines appartiennent à la grande famille des protéines qui s'associent à l'actine (les « actin-binding protein », ABPs) et qui jouent un rôle majeur dans le contrôle de l'organisation du cytosquelette d'actine. Ces protéines se trouvent au carrefour entre les signaux extracellulaires et le réarrangement du cytosquelette (Jimenez-Lopez *et al.*, 2012). Les profilines sont présentes chez les eucaryotes, les invertébrés et les vertébrés ; des séquences homologues à des profilines de mammifères ont même été retrouvées dans des séquences codant pour des protéines virales (Blasco *et al.*, 1991). Les plantes, mono- et dicotylédones, peuvent exprimer jusqu'à 10 profilines différentes (Soellick *et al.*, 2000) séparées en deux classes (I et II) en fonction de leur expression : la première regroupe des profilines exprimées de façon constitutive et ubiquiste, alors que dans la seconde, les protéines sont seulement exprimées dans les tissus reproducteurs (Kandasamy *et al.*, 2002). La diversité de l'expression de ces profilines et le nombre d'isoformes chez les plantes supérieures semble corrélérer avec la grande diversité des protéines actines observée dans ce règne. Ces protéines de faible poids moléculaire (environ 15 kDa) contrôlent la polymérisation de l'actine chez les eucaryotes (Avisar *et al.*, 2008), en favorisant ou inhibant sa polymérisation en fonction du ratio profiline/actine-G (actine globulaire) (Schluter *et al.*, 1997) et en fonction de ses interactions avec d'autres ABPs (Boutant *et al.*, 2009). La profiline est un élément clé de la communication entre les membranes et le cytosquelette qui conduit au réarrangement de ce dernier. Ce processus est assuré par l'interaction des profilines avec les phosphatidylinositides (PIP2) et des protéines riches en L-proline. Des différences d'affinités entre des profilines de différentes classes et les ligands ont été observées chez le maïs (Kovar *et al.*, 2000). Les profilines végétatives (classe I) présentent une plus grande affinité pour des séquences riches en poly-L-proline et ont une action plus importante sur le cytosquelette d'actine que celles spécifiques du pollen. En revanche, ces dernières inhibent plus fortement l'hydrolyse des PIP2 par les phospholipases C (Kovar *et al.*, 2000).

Chez *A. thaliana*, 5 gènes codant pour des profilines ont été identifiés par Christensen *et al.* (1996) et Huang *et al.* (1996). Ces protéines sont désignées selon les auteurs comme PRF ou PFN et portent une numérotation différente (Tableau 15). Ces protéines présentent entre elles un fort pourcentage de similarité (73 à 91%) (Tableau 16). Chez *Arabidopsis*, les protéines PRF1, PRF2 et PRF3

appartiennent à la classe I et sont exprimées constitutivement et plus fortement dans les tissus végétatifs, alors que les PRF4 et PRF5 (classe II) ne sont exprimées que dans les grains de pollen (Christensen *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1996; Jeong *et al.*, 2006; Kandasamy *et al.*, 2002; Ramachandran *et al.*, 2000). Il est intéressant de signaler que l'expression des gènes *prf1*, *prf2* et *prf3* (mais pas *prf5*) est régulée par des séquences introniques grâce à un mécanisme encore inexpliqué (Jeong *et al.*, 2006). D'après les travaux de Fan *et al.* (2012), la profiline 3 pourrait être impliquée dans la germination et le développement des plantules. Cependant, ces observations expérimentales ont été obtenues en considérant une extension de 36 acides aminés en position N-terminale qui correspond à la traduction de la séquence 5'UTR décrite par Huang *et al.* (1996). Le choix des auteurs (Fan *et al.*) d'inclure cette séquence dans la séquence codante n'est pas argumenté dans l'article, ce qui laisse subsister un doute quant à l'expression réelle de cette séquence dans la plante et à l'implication de cette forme allongée de la profiline 3 dans la germination et dans l'organisation du cytosquelette d'actine.

| Protéine | Numéro du gène | Désignation de la protéine par Huang <i>et al.</i> 1996, Kandasamy <i>et al.</i> 2002 et Jeong <i>et al.</i> 2006 | Désignation de la protéine par Christensen <i>et al.</i> 1996 et Ramachandran <i>et al.</i> 2000 |
|-------------|----------------|---|--|
| Profiline 1 | AT2G19760 | PRF1 | PFN1 |
| Profiline 2 | AT4G29350 | PRF2 | PFN2 |
| Profiline 3 | AT5G56600 | PRF3 | |
| Profiline 4 | AT4G29340 | PRF4 | PFN3 |
| Profiline 5 | AT2G19770 | PRF5 | PFN4 |

Tableau 15 : Nomenclature des 5 profilines d'*A. thaliana* selon les différents auteurs.

| | PRF1 | PRF2 | PRF3 | PRF4 | PRF5 |
|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| PRF1 | 100 % | | | | |
| PRF2 | 88 % | 100 % | | | |
| PRF3 | 81 % | 79 % | 100 % | | |
| PRF4 | 75 % | 73 % | 74 % | 100 % | |
| PRF5 | 77 % | 74 % | 76 % | 91 % | 100 % |

Tableau 16 : Pourcentage de similarité entre les séquences protéiques des profilines d'*A. thaliana*.

D.3. Protéine Low Sulfur 3 (LSU3)

La protéine Low sulfur 3 (AT3G49570) possède 3 homologues chez *A. thaliana* (LSU1, LSU2, et LSU4). Les gènes codant pour ces quatre protéines sont organisés en tandem dans le génome (*Isu1* et *Isu3* étant localisés respectivement aux positions AT3G49580 et AT3G49570 et *Isu2* et *Isu4* aux positions AT5G24660 et AT5G24655). Les séquences protéiques codées par ces gènes présentent de très fortes similarités (Tableau 17). Très peu de données sont disponibles dans la littérature sur ces gènes, et en particulier sur *Isu3* qui était annoté encore récemment comme gène de fonction inconnue (<http://www.arabidopsis.org>).

La localisation de la protéine LSU3 peut être prédite à partir de la base de données SUBA (suba2.plantenergy.uwa.edu.au). Cette protéine se retrouverait au niveau du noyau, des plastides et dans la matrice extracellulaire, tout comme les protéines LSU1 et LSU2. La localisation de la protéine LSU4 est quant à elle prédite au niveau du noyau, de la matrice extra-cellulaire et dans le cytoplasme. Les gènes codant pour les protéines Low Sulfur sont induits lorsque les plantes sont cultivées dans un milieu déficient en soufre et les protéines pourraient être impliquées dans le métabolisme du soufre. Les composés soufrés, et en particulier les glucosinolates (hétérosides soufrés issus du métabolisme secondaire du soufre chez les plantes de l'ordre des Brassicales, comme le chou ou le radis), jouent un rôle important dans les réponses de la plante aux stress biotiques. Les glucosinolates représentent un moyen de défense contre les insectes. Ils sont métabolisés par une enzyme myrosinase qui clive le groupement glucose du glucosinolate et conduit à la libération d'une molécule qui est rapidement transformée en thiocyanate, isothiocyanate ou en nitrile. Ces composés, qui peuvent être toxiques pour les insectes, sont impliqués dans les réactions de défense de la plante face à certains pathogènes. De plus, il est intéressant de signaler que nous avons identifié au laboratoire une protéine associée aux myrosinases (Myrosinase associated protein, MAP) qui se retrouve de manière reproductible dans les purifications virales du CABYV et du TuYV préparées à partir d'*Arabidopsis Col-0* (Véronique Brault, communication personnelle). La protéine MAP identifiée favoriserait l'hydrolyse des glucosinolates en nitriles plutôt qu'en isothiocyanates qui sont des composés moins toxiques pour les insectes. L'ensemble de ces éléments nous conduit à proposer que les gènes codant pour les protéines LSU, de par leur implication dans le métabolisme du soufre, dont celui des glucosinolates, représentent des candidats intéressants pour des virus transmis par pucerons.

Tableau 17 : Pourcentage de similarités entre les séquences des protéines « Low sulfur » d'*A. thaliana*.

| | LSU1 | LSU2 | LSU3 | LSU4 |
|------|-------|-------|-------|-------|
| LSU1 | 100 % | | | |
| LSU2 | 64 % | 100 % | | |
| LSU3 | 74 % | 77 % | 100 % | |
| LSU4 | 59 % | 89 % | 73 % | 100 % |

D.4. La glycosyl-hydrolase DIN10

Le gène AT5G20250 identifié lors du criblage de la banque de CC d'*A. thaliana* code pour une protéine appartenant à une des familles des glycosyl-hydrolases (classification EC3.2.1.). D'après la base de données CAZy (Carbohydrate-Active Enzymes database, <http://www.cazy.org/Glycoside-Hydrolases.html>), il y aurait 130 familles de glycosyl hydrolases, et celle identifiée appartient à la famille 36. Ces protéines ont des activités α -galactosidase (EC 3.2.1.22), α -N-acetylgalactosaminidase (EC 3.2.1.49), stachyose synthase (EC 2.4.1.67) et raffinose synthase (EC 2.4.1.82).

La protéine identifiée est également appelée « protéine DIN10 » pour « Dark inducible 10 ». Ces glycosyl-hydrolases impliquées dans le métabolisme du galactose sont responsables de l'hydrolyse du pont glycosidique reliant soit deux carbohydrates, soit un carbohydrate et un résidu d'un autre type. Ces enzymes interviennent par exemple dans le métabolisme des polysaccharides de la paroi cellulaire mais aussi dans la maturation des N-glycanes.

D.5. Les protéines ALY

Le nombre de gènes codant pour des protéines ALY est variable selon l'organisme considéré : on rapporte 1 seul gène chez le puceron et l'Homme, 2 chez la souris et la drosophile. Dans le règne végétal, Uhrig *et al.* (2004) mentionnent l'existence de 4 gènes chez *A. thaliana*, et d'au moins 3 ou 4 gènes homologues chez les Solanacées et chez de nombreuses monocotylédones. Ces données montrent qu'il y a eu une expansion de la famille des gènes *Aly* chez les plantes, ce qui peut leur procurer une plus grande diversité d'expression, de localisation et de fonction. Les analyses phylogénétiques des 4 protéines ALY d'*Arabidopsis* ont révélé une très grande conservation des séquences entre AtALY1 et AtALY2 (56 % de similarité) et entre AtALY3 et AtALY4 (72 % de similarité) (Tableau 18). Les protéines ALY d'*A. thaliana* possèdent également des similarités de séquence avec les protéines ALY de *N. benthamiana* (de 52 à 60 % d'identité) (Uhrig *et al.*, 2004) et avec la protéine ALY d'*Acyrtosiphon pisum* (34 à 37 % de similarité) (Tableau 18).

Les protéines ALY sont de petites protéines de 30 kDa environ, dont la structure est très conservée. Elles possèdent deux petits motifs aux extrémités N- et C-terminales qui flanquent chacun une région contenant des motifs répétés « Arg-Gly-Gly » (RGG). Le domaine central de ces protéines est le plus conservé dans la séquence des protéines ALY. Il contient un domaine de liaison à l'ARN qui comprend 2 sous domaines très conservés (RNP1 et RNP2) (Figure 31).

| | AtALY1 | AtALY2 | AtALY3 | AtALY4 | ApALY |
|--------|--------|--------|--------|--------|-------|
| AtALY1 | 100 % | | | | |
| AtALY2 | 56 % | 100 % | | | |
| AtALY3 | 42 % | 38 % | 100 % | | |
| AtALY4 | 44 % | 42 % | 72 % | 100 % | |
| ApALY | 37 % | 36 % | 35 % | 34 % | 100 % |

Tableau 18: Pourcentage de similarité entre les séquences protéiques des protéines ALY d'*A. thaliana* et la protéine ALY d'*Acyrtosiphon pisum*, calculé avec le logiciel ClustalW2.

ALY est une protéine multifonctionnelle qui est très étudiée chez la drosophile ou chez les mammifères. Dans ces organismes, les protéines ALY sont impliquées dans le transport des ARN du noyau vers le cytoplasme. Ces protéines représentent un constituant du complexe d'épissage des ARN pré-messagers (Le Hir *et al.*, 2000a; Le Hir *et al.*, 2000b; Stutz *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2000). Après l'épissage, la protéine ALY interagit avec le facteur d'export nucléaire TAP afin d'initier le transport des ARN messagers vers le cytoplasme. ALY est également un co-activateur de la transcription et interagit avec un très grand nombre de protéines appartenant aux complexes de transcription (Bruhn *et al.*, 1997; Virbasius *et al.*, 1999). Les protéines ALY pourraient jouer le rôle de protéines chaperonnes et faciliter l'homo- et l'hétérodimérisation des autres protéines du complexe. Chez les plantes, le rôle des protéines ALY n'est pas connu et seule une interaction entre les protéines AtALY3 ou AtALY4 (nommées respectivement DIP1 et DIP2 par les auteurs) et le domaine de liaison à l'ADN de la poly(ADP-ribose) polymérase a été mentionnée par Storozhenko *et al.* (2001).

Chez les eucaryotes supérieurs, la protéine ALY est localisée dans le noyau, et chez les plantes, les protéines ALY (5 des 6 protéines ALY d'arabidopsis et de tabac) sont également retrouvées dans le nucléole (Uhrig *et al.*, 2004). Les protéines ALY d'arabidopsis ont des localisations qui diffèrent légèrement entre elles (Tableau 19), ce qui suggère des différences de fonctions entre ces protéines. Les nucléoles des plantes et des animaux diffèrent dans leur organisation structurale, et il a été suggéré que chez les plantes, les différentes étapes biochimiques nécessaires à la maturation des ARNr et des ribosomes, se fassent dans des couches concentriques du nucléole autour des sites de la transcription (Brown & Shaw, 1998). La région externe, où se concentre la majorité des protéines ALY, correspond à la zone granulaire où les ribosomes s'assemblent et d'où ils sont exportés vers le cytoplasme. Comme une telle organisation du nucléole n'a pas été décrite chez les animaux, les protéines ALY de plante pourraient assurer des fonctions différentes de celles des animaux.

| Protéines ALY d' <i>A. thaliana</i> | Localisation subcellulaire | Références |
|-------------------------------------|---|---|
| ALY1 | Nucléole Quelques ponctuations dans le nucléoplasme | Uhrig <i>et al.</i> , 2004 |
| ALY2 | Noyau (granulations) (Absente du nucléole, comme les protéines ALY humaine et de souris) | Uhrig <i>et al.</i> , 2004, Rodrigues <i>et al.</i> , 2001; Zhou <i>et al.</i> , 2000 |
| ALY3 | Nucléole (périphérie), nucléoplasme | Uhrig <i>et al.</i> , 2004 |
| ALY4 | Nucléole Quelques ponctuations dans le nucléoplasme | Uhrig <i>et al.</i> , 2004 |

Tableau 19 : Localisations subcellulaires des protéines ALY d'*A. thaliana*.

L'implication des protéines ALY dans l'infection virale a déjà été montrée chez les animaux, chez qui les protéines ALY ou les protéines associées sont la cible des protéines virales. C'est le cas de la nucléoprotéine du virus A de l'Influenza qui interagit avec la protéine UAP56, une protéine hélicase à « DEAD-box », qui elle-même se lie à la protéine ALY pour stimuler l'activité de l'ARN polymérase virale (Momose *et al.*, 2001). D'autre part, la protéine ICP27 du virus de l'herpès de type 1 et la protéine EB2 du virus Epstein-Barr interagissent directement avec la protéine ALY (Chen *et al.*, 2002; Hiriart *et al.*, 2003). Ces virus animaux, qui se répliquent dans le noyau, utilisent probablement les protéines ALY pour exporter l'ARN viral vers le cytoplasme. Chez les virus de plante, l'implication de ces protéines a également été suggérée dans le cas du TBSV (Uhrig *et al.* en 2004). La protéine P19 de ce virus (protéine suppresseur de *gene silencing*, également impliquée dans le mouvement à courte ou longue distance du virus selon les hôtes, et dans l'apparition des symptômes) serait responsable de la relocalisation des protéines AtALY2 et AtALY4 du noyau vers le cytoplasme. Canto *et al.* (2006) ont également montré que les protéines ALY qui restent dans le noyau (AtALY1, AtALY3, NbALY615 et NbALY1693) interfèrent avec les activités de suppression de l'ARN interférence contrôlées par la protéine P19 en bloquant la protéine P19 dans ce compartiment cellulaire. Une interaction physique entre les protéines ALY et la protéine P19 a notamment été observée par BiFC dans le noyau. Le domaine central (RRM) des protéines ALY impliqué dans l'interaction avec la protéine P19 est par ailleurs impliqué dans la relocalisation cytoplasmique des protéines ALY. Les protéines ALY pourraient donc être impliquées dans le mécanisme général de lutte contre les virus de plante par ARN interférence. On peut également imaginer que les interactions des protéines ALY avec les protéines virales puissent influencer l'export des ARN messagers de l'hôte et ainsi réguler (positivement ou négativement) l'expression des gènes de l'hôte. Ce mécanisme de régulation pourrait correspondre au mécanisme d'extinction (*shut-off*) de la transcription des gènes

de l'hôte faisant suite à l'infection virale qui est bien connu dans le cas des virus animaux (Weidman *et al.*, 2003) mais moins étudié dans le cas des virus végétaux (Maule *et al.*, 2002).

E. Etude du comportement du CABYV dans des mutants d'*Arabidopsis* affectés dans l'expression des protéines candidates (DIN10, Profilines, LSU3 et ALY)

Afin d'analyser le rôle des différentes protéines candidates dans le cycle viral du CABYV, nous avons analysé l'accumulation du virus dans des mutants KO d'*A. thaliana* (Tableau 20) qui ne présentent aucun phénotype visible. Pour certains mutants, l'effet de l'inhibition de l'expression de la protéine candidate a également été testée vis-à-vis de l'infection d'un autre polérovirus, le TuYV.

E.1. Caractérisation des mutants KO d'*A. thaliana* touchés dans les gènes candidats

Après avoir extrait l'ADN génomique des plantes mutantes ainsi que des plantes sauvages Col-0, j'ai utilisé différents couples d'amorces (*cf* Matériel et méthodes) afin de confirmer l'insertion de l'ADN-T dans le génome des plantes. Le site d'insertion des ADN-T pour chacun des mutants est précisé dans le Tableau 20. Des oligonucléotides ont été conçus de manière à analyser également l'homozygotie de l'insertion.

Pour le gène ***Isu3***, je me suis procurée un mutant (SALK) dont l'insertion de l'ADN-T est localisée dans la séquence codante du gène. La caractérisation de ce mutant par PCR a confirmé la présence de l'ADN-T (amplification d'un fragment de 400 pb environ chevauchant l'ADN-T et le gène) (Figure 32) mais a montré également la présence d'un fragment d'ADN de 345 pb correspondant au génotype sauvage (Figure 32, encart « Mutant *Isu3* » PCR A). Le séquençage de ce fragment a bien confirmé qu'il s'agissait du gène *Isu3* et non pas d'un gène homologue, démontrant ainsi l'hétérozygotie des mutants pour cette insertion. Une nouvelle sélection des plantes est en cours, afin de pouvoir étudier l'implication du gène *Isu3* dans le cycle du CABYV.

Pour le mutant touché dans le gène codant pour la glycosyl-hydrolase **DIN10**, l'insertion de l'ADN-T au niveau de la région 5' non codante du gène n'a pu être vérifiée par PCR. Néanmoins, chez ce mutant l'absence d'amplification par PCR d'un fragment de type sauvage dans cette région (fragment de 1000 pb amplifié dans Col-0) (Figure 32 – Encart « Mutant *Din10* ») suggère la présence de l'ADN-T dans le gène codant pour la protéine Din10.

| | Gènes candidats | Site d'insertion de l'ADN-T | Fond génétique | Nombre de lignées disponibles | Source |
|-------|-----------------|-----------------------------|----------------|-------------------------------|----------------|
| LSU3 | AT3G49570 | Exon | Col-0 | 1 | NASC |
| DIN10 | AT5G20250 | 5'UTR | Col-0 | 1 | NASC |
| PRF1 | AT2G19760 | Exon I | Col-0 | 2 | B. Favery |
| PRF2 | AT4G29350 | Promoteur | Ws | 2 | B. Favery |
| PRF3 | AT5G56600 | Exon I | Col-0 | 2 | B. Favery |
| PRF4 | AT4G29340 | promoteur | Col-0 | 2 | B. Favery |
| PRF5 | AT2G19770 | Intron 2 | Ws | 2 | B. Favery |
| ALY1 | At5G59950 | Exon 5 | Col-0 | 4 | S. Mac Farlane |
| ALY2 | AT5G02530 | 5'UTR | Col-0 | 2 | S. Mac Farlane |
| ALY3 | AT1G66260 | Exon 2 | Col-0 | 2 | S. Mac Farlane |
| ALY4 | AT5G37720 | Nd ^a | Col-0 | 4 | S. Mac Farlane |

^a : L'inhibition de l'expression du gène *Aly4* est induite par ARN interférence grâce à l'insertion dans le génome d'arabidopsis, à une position non déterminée (Nd), d'une séquence antisens du gène à éteindre.

Tableau 20 : Caractérisation des mutants d'*A. thaliana* touchés dans l'expression des gènes candidats (ou leurs homologues) identifiés lors des criblages de la banque d'ADNc de cellules compagnes d'*A. thaliana* ou d'ADNc de puceron (*A. pisum*).

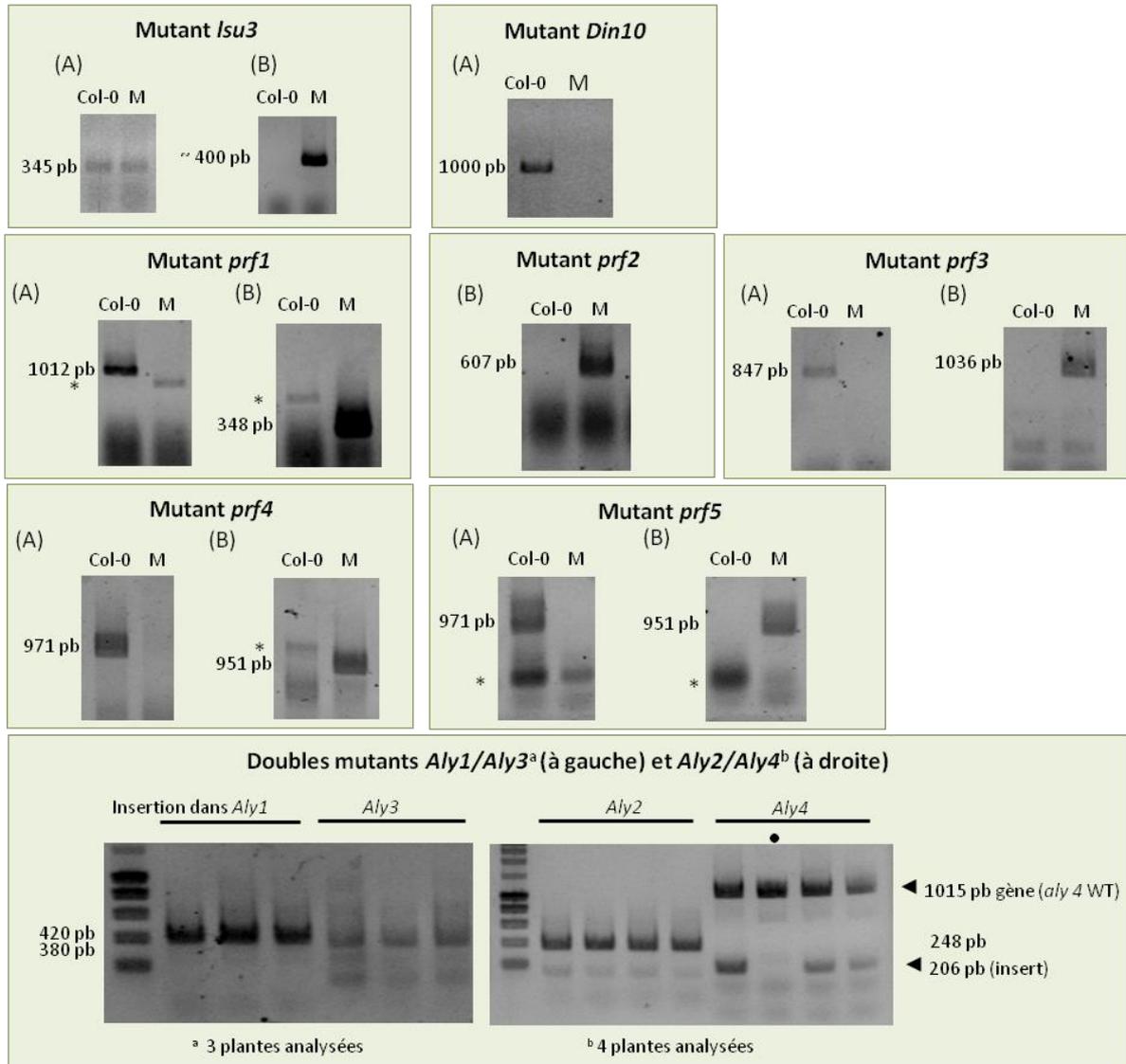


Figure 32 : Caractérisation par PCR des mutants d'arabidopsis touchés dans les différents gènes candidats. La PCR (A) amplifie un fragment du gène dans la plante mutante (M) et dans la plante de référence Col-0, et la PCR (B) amplifie un fragment chevauchant l'ADN-T et le gène candidat dans la plante mutante. La taille, en paires de bases (pb), des fragments attendus est signalée. * : produit PCR aspécifique.

Pour les doubles mutants touchés dans les gènes *aly*, seule l'insertion de l'ADN-T à l'endroit attendu est montrée sur cette figure. Pour le gène *Aly4*, l'extinction du gène est faite par ARN interférence grâce à l'insertion dans le génome d'une séquence de 206 pb en antisens du gène, couvrant l'extrémité 3' de l'exon 1 et l'extrémité 5' de l'exon 2 (le fragment de 1015 pb amplifié correspond un fragment du gène *Aly4* qui contient la séquence intronique).

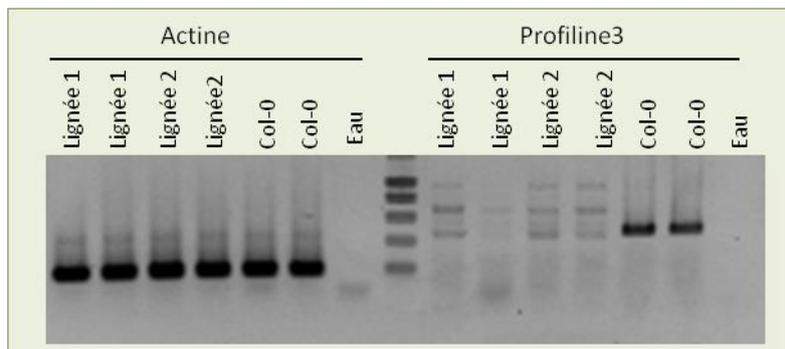


Figure 33 : Analyse de l'accumulation des ARNm du gène *prf3* par RT-PCR dans les deux lignées mutantes. A droite l'amplification d'un fragment de gène codant pour l'actine montre que les ARNm sont de qualité et de quantité identiques pour tous les échantillons analysés.

Les mutants d'arabidopsis touchés dans les gènes codant pour les **profilines** ont été obtenus *via* Bruno Favery (INRA de Sophia Antipolis) à partir des différentes collections disponibles (Versailles, GABI et SALK) (Tableau 20). Les mutants touchés dans les gènes *prf2* et *prf5* ont été obtenus à partir de l'écotype Ws (Wassilewskija) alors que les autres ont été obtenus à partir de l'écotype Col-0. Ces mutants ont été sélectionnés par PCR et analyse génétique dans le laboratoire de Bruno Favery. L'insertion de l'ADN-T dans le gène ciblé et l'homozygotie de deux lignées ont été vérifiées par PCR grâce à des amorces spécifiques. Les résultats obtenus pour les deux lignées de chaque mutant étant identiques, la Figure 32 (encarts « Mutant *prf* ») ne montre les résultats que pour une des deux lignées. De plus, l'inhibition de la synthèse de l'ARNm codant pour la protéine PRF3 (protéine candidate identifiée en criblant la banque d'ADNc de CC) dans les deux lignées mutantes a été confirmée par RT-PCR (Figure 33).

Les mutants d'arabidopsis affectés dans l'expression des protéines ALY ont été obtenus par l'intermédiaire de Stuart Mac Farlane (SCRI, Dundee). Après avoir confirmé l'insertion des ADN-T dans les différents gènes *Aly*, des doubles mutants *Aly1-3* et *Aly2-4* ont été obtenus au laboratoire et caractérisés (Figure 32 – encart « Doubles mutants *aly* »). Pour le double mutant *ALY1/ALY3*, dans les 3 plantes analysées, j'ai pu amplifier un fragment de 420 pb chevauchant le gène *Aly1* et l'ADN-T, et un fragment de 380 pb chevauchant le gène *Aly3* et le second ADN-T. Pour les doubles mutants *ALY2/ALY4*, dans les 4 plantes analysées j'ai pu amplifier un fragment de 248 pb chevauchant le gène *Aly2* et l'ADN-T. L'expression du gène *Aly4* est réduite par ARN interférence, suite à l'introduction dans le génome d'une séquence (206 pb) en antisens du gène *Aly4*, couvrant l'extrémité 3' de l'exon 1 et l'extrémité 5' de l'exon 2 (séquence de l'intron non incluse). Pour confirmer la présence de cette séquence antisens dans le génome des doubles mutants, un couple de primers s'hybridant sur les exons 1 et 2 a été utilisé et un fragment de la taille attendue (206 pb) a été amplifié (sauf dans la plante n°2, piste marquée d'un rond noir, qui ne semble donc pas avoir intégré la séquence). On note par ailleurs une amplification d'un fragment de 1015 pb dans toutes les plantes analysées, qui correspond à l'amplification du gène *Aly4* (qui possède la séquence intronique). Afin de contrôler l'homozygotie des doubles mutants, l'absence d'amplification de type WT pour chaque gène muté a été vérifiée par PCR (résultats non montrés).

E.2. Accumulation du CABYV dans les mutants KO d'*A. thaliana* et transmission par puceron à partir des plantes mutantes infectées

E.2.a. Glycosyl-hydrolase DIN10

Afin d'analyser le rôle potentiel de la protéine DIN10 dans le cycle viral du CABYV, les plantes affectées dans l'expression du gène *Din10* ont été inoculées avec le CABYV en utilisant des pucerons virulifères. L'accumulation du virus a été analysée par un test ELISA 15 à 17 jours post-inoculation (une infection par le CABYV n'induit pas de symptômes sur arabidopsis). Comme le montre le Tableau 21, une variation grande variation dans l'accumulation du CABYV dans les plantes Col-0 a été observée (écart-type assez important) ; celle-ci pourrait provenir d'une répartition inégale du virus dans les tissus. Les résultats présentés dans le Tableau 21 (A), ne montrent aucune différence significative du taux d'infection ou de l'accumulation virale du CABYV entre le mutant DIN10 et la plante de référence Col-0. Les plantes infectées ont servi de sources virales pour des tests de transmission du CABYV par puceron. Aucune différence dans l'efficacité de transmission du virus n'est observée entre les deux sources virales mais les plantes tests qui ont reçu les pucerons provenant des plantes DIN10 semblent montrer une accumulation inférieure du virus (Tableau 21 (B)). Cette différence d'accumulation est néanmoins modérée et cette expérience devra être répétée afin de confirmer ce résultat.

Vu le très grand nombre de gènes codants pour des glycosyl-hydrolases, et donc la possibilité d'une redondance fonctionnelle, il est fort possible que l'inhibition de l'expression du gène *Din10* soit compensée par l'expression d'une autre glycosyl-hydrolase. L'étude plus poussée de ce gène candidat n'a pas été poursuivie pendant ma thèse.

E.2.b. Profilines

Le rôle potentiel des profilines dans le cycle du CABYV a été appréhendé en inoculant par puceron deux lignées pour chacun des gènes touchés (*prf1*, *prf2*, *prf3*, *prf4* et *prf5*). Chaque lignée correspond à deux transformants homozygotes du même événement d'insertion de l'ADN-T. L'accumulation du virus a été suivie par un test ELISA dans les mutants 15 à 17 jours après inoculation par pucerons (Tableau 22, expérience 1). Aucune différence significative du taux d'infection ou de l'accumulation du CABYV n'a été observée dans les plantes mutantes comparées aux plantes de référence Col-0. Cependant, une accumulation légèrement plus importante du virus est observée dans une des deux lignées touchées dans le gène *prf2* (Tableau 22 – Exp. 1) et le virus semble s'accumuler moins bien dans les deux lignées touchées dans le gène *prf3* (Tableau 22, Exp. 1).

Tableau 21 : (A) Accumulation du CABYV dans le mutant d'arabidopsis touché dans le gène *Din10*. Le nombre de plantes infectées sur le nombre de plantes inoculées (taux d'infection) est présenté et le pourcentage de plantes infectées est précisé entre parenthèses. Pour les plantes infectées, la moyenne des DO à 405 nm et l'écart-type ont également été calculés (DO±EC). TS : Témoin sain Col-0.

B) Test de transmission par puceron du CABYV à partir de plantes mutantes *DIN10* ou de plantes références Col-0 infectées. Après une acquisition de 48 h sur les plantes infectées, les pucerons ont été transférés vers des arabidopsis Col-0 à raison de 10 pucerons/plante. Le nombre de plantes infectées sur le nombre de plantes inoculées (taux d'infection) est présenté. Le pourcentage de plantes infectées est précisé entre parenthèses. Pour les plantes infectées, la moyenne des DO à 405 nm et l'écart-type ont également été calculés (DO±EC).

Dans chacune de ces expériences, le test de Kruskal-Wallis (R-commander) compare l'accumulation du virus dans les plantes infectées Col-0 et mutantes.

(A)

| Plantes inoculées | Taux d'infection - DO±EC | | | |
|---------------------|--------------------------|----------------------|--------------|-----------------------|
| | Expérience 1 | | Expérience 2 | |
| Mutant <i>DIN10</i> | 7/8 (87 %) | 1.04±0.28 P=0,533 | 8/10 (80 %) | 0.81±0.26 P= 0.064 |
| Col-0 | 6/7 (86 %) | 1.01±0.24 | 9/10 (90 %) | 1.16±0.34 |
| TS | 0/3 (0 %) | 0.27±0.01 | 0/3 (0 %) | 0.15±0.01 |

(B)

| Plante source | Taux de transmission | DO±EC |
|---------------------|----------------------|--------------------------------------|
| Mutant <i>DIN10</i> | 4/6 (67 %) | 1.00±0.26 P = 0.043 |
| Col-0 | 5/6 (44 %) | 1.24±0.39 |
| TS | 0/3 | 0.30±0.001 |

Tableau 22 :

Expériences 1 à 5 : Accumulation du CABYV dans les mutants d'arabidopsis touchés dans les gènes codant pour les profilines après une inoculation du virus par pucerons (acquisition de 48 h). Le stade des plantes inoculées et le nombre de pucerons par plante utilisés pour l'inoculation varient selon les différentes expériences et sont précisés dans chaque tableau. (Deux lignées par mutants ont été analysées, notées (1) ou (2))

Expérience 6 : Accumulation du CABYV dans le mutant d'arabidopsis touché dans le gène *prf3* après agro-inoculation du virus avec deux concentrations d'agrobactéries (DO_{600 nm} de 0,25 ou de 0,5).

Pour chaque expérience le nombre de plantes infectées sur le nombre de plantes inoculées (taux d'infection) est présenté et le pourcentage de plantes infectées est précisé entre parenthèses. Pour les plantes infectées, la moyenne des DO à 405 nm et l'écart-type ont également été calculés (DO±EC). TS : Témoin sain Col-0.

Dans chacune de ces expériences le test de Kruskal-Wallis (R-commander) compare l'accumulation du virus dans les plantes infectées Col-0 et mutantes.

| Expérience 1 | | |
|------------------------------------|------------------|------------------------|
| > 6 feuilles 10 puc./pl. | | |
| | Taux d'infection | DO±EC |
| PRF1 (1) | 9/9 (100) | 1.27±0.69 P = 0.958 |
| PRF1 (2) | 10/10 (100) | 1.26±0.72 P = 0.625 |
| PRF2 (1) | 8/10 (80) | 1.09±0.6 P = 0.728 |
| PRF2 (2) | 10/10 (100) | 1.53±0.95 P = 0.056 |
| PRF3 (1) | 8/10 (80) | 0.53±0.19 P = 0.179 |
| PRF3 (2) | 10/10 (100) | 0.50±0.27 P = 0.083 |
| PRF4 (1) | 6/10 (60) | 0.85±0.46 P = 0.317 |
| PRF4 (2) | 10/10 (100) | 0.69±0.44 P = 0.186 |
| PRF5 (1) | 9/9 (100) | 1.07±0.80 P = 0.749 |
| PRF5 (2) | 9/10 (90) | 0.99±0.74 P = 0.908 |
| Col-0 | 9/10 (90) | 1.09±0.7 |
| TS Col-0 | 0/3 | 0.11±0.01 |

| Expérience 2 | | |
|------------------------------------|------------------|------------------------|
| > 6 feuilles 10 puc./pl. | | |
| | Taux d'infection | DO±EC |
| PRF3 (1) | 15/15 (100) | 0.65±0.19 P = 0.623 |
| Col-0 | 17/17 (100) | 0.63±0.29 |
| TS Col-0 | 0/3 | 0.12±0.01 |

Tableau 22 (Suite)

| Expérience 3 | > 6 feuilles 10 puc./pl. | | > 6 feuilles 5 puc./pl. | | < 6 feuilles 5 puc./pl. | |
|--------------|-----------------------------|--------------------------------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|--------------------------------------|
| | Taux d'infection | DO±EC | Taux d'infection | DO±EC | Taux d'infection | DO±EC |
| PRF3 (1) | 10/10 (100) | 1.62±0.57 P = 0.007 | 5/10 (50) | 1.13±0.58 P = 0.624 | 3/7 (43) | 1.78±0.86 P = 0.121 |
| PRF3 (2) | 8/10 (80) | 1.18±0.46 P = 0.417 | 3/10 (30) | 0.81±0.46 P = 0.157 | 0/7 (0) | 0.12±0.01 P = 0.004 |
| Col-0 | 7/8 (87) | 0.93±0.26 | 4/8 (50) | 1.27±0.16 | 6/7 (86) | 0.75±0.46 |
| TS Col-0 | 0/3 | 0.11±0.01 | | | | |

| Expérience 4 | < 6 feuilles 5 puc./pl. | |
|--------------|-------------------------|--------------------------------------|
| | Taux d'infection | DO±EC |
| PRF3 (1) | 17/20 (85) | 0.58±0.16 P = 0.013 |
| PRF3 (2) | 17/19 (89) | 0.67±0.25 P = 0.170 |
| Col-0 | 19/20 (95) | 0.78±0.28 |
| TS Col-0 | 0/3 (0) | 0.18± 0.01 |

| Expérience 5 | Taux d'infection | DO±EC |
|--------------|------------------|--|
| | PRF2 (2) | 5/15 |
| Ws | 4/15 | 1.11 ± 0.20 P = 0.019 |
| Col-0 | 6/15 | 0.59 ± 0.18 |
| TS PRF2 (2) | 0/2 | 0.11 ± 0.01 |
| TS Ws | 0/1 | 0.12 |
| TS Col-0 | 0/2 | 0.12 ± 0.01 |

Remarque : P value = 1 en comparant Ws et mutant *Prf2*

| Expérience 6 | DO agrobactéries : 0,25 | | DO agrobactéries : 0,5 | |
|--------------|-------------------------|--------------------------------------|------------------------|------------------------|
| | Taux d'infection | DO±EC | Taux d'infection | DO±EC |
| PRF3 (1) | 5/12 (42) | 1.25±0.12 P = 0.014 | 4/12 (33) | 0.87±0.07 P = 0.858 |
| PRF3 (2) | 5/12 (42) | 0.91±0.11 P = 0.462 | 4/12 (33) | 0.69±0.31 P = 0.858 |
| Col0 | 4/12 (33) | 0.86±0.06 | 3/12 (25) | 0.78±0.27 |
| TS PRF3 (1) | 0/3 | 0.1 ± 0.03 | | |
| TS PRF3 (2) | 0/3 | 0.1 ± 0.03 | | |

Les mutants touchés dans les gènes *prf2* et *prf5* possédant le fond génétique de l'écotype Ws, l'accumulation du CABYV a été analysée dans cet écotype et comparée à l'accumulation du virus dans la référence Col-0. Comme le montre les résultats de l'expérience 5, le CABYV s'accumule significativement plus dans les plantes Ws que dans les plantes Col-0. Lorsque l'écotype Ws est pris comme référence, aucune différence d'accumulation du CABYV n'est observée dans le mutant affecté dans l'expression du gène *prf2*.

Afin de poursuivre l'analyse de l'effet de l'inhibition de l'expression de la PRF3, plusieurs expériences ont été réalisées en faisant varier le stade d'inoculation des plantes, la charge virale pour l'inoculation (variation du nombre de pucerons par plante) ou le mode d'inoculation (utilisation d'agrobactéries). Cependant, bien que des différences significatives d'accumulation du virus dans les mutants par rapport aux plantes sauvages aient parfois été observées, comme dans les expériences 3, 4 et 6, elles n'ont jamais pu être reproduites, probablement en raison de l'accumulation très irrégulière du virus dans les plantes. On ne peut cependant pas exclure non plus, une redondance fonctionnelle des différentes profilines, et donc une complémentation de la fonction de PRF3 par les autres profilines dans les mutants KO étudiés. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait inhiber l'expression des profilines dont les fonctions sont potentiellement redondantes, comme les PRF1, PRF2 et PRF3 (les 3 profilines végétatives d'*Arabidopsis*), en faisant des doubles ou triples mutants par croisement. Ces différentes expériences ne permettent donc pas de conclure quant à l'implication de la PRF3 dans le cycle du CABYV et elles montrent la complexité du travail de validation fonctionnelle.

E.2.c. Les protéines ALY

Afin d'analyser le rôle de ces protéines ALY dans le cycle viral, des mutants d'insertion affectant les gènes *aly1*, *aly2* et *aly3*, ainsi qu'un mutant « RNAi » ciblant le gène *aly4*, ont été obtenus auprès de Stuart Mac Farlane (SCRI, Dundee) (Tableau 20). Comme nous avons montré par la technique du YDH, que les protéines ALY interagissent plus fortement avec les protéines du TuYV qu'avec celles du CABYV, nous avons donc suivi l'accumulation du TuYV dans les mutants d'*Arabidopsis*. Les résultats obtenus n'ont pas permis de constater de différences majeures d'accumulation du TuYV dans ces plantes mutantes par rapport aux *Arabidopsis* Col-0. Seule une légère diminution de l'accumulation du TuYV est observée dans la lignée 1 touchée dans le gène *aly2* (ALY2 (1)) par rapport à Col-0 (Tableau 23, A).

Les travaux de Canto *et al.* (2006) suggérant une redondance fonctionnelle entre les gènes *Aly1* et *Aly3*, et entre les gènes *Aly2* et *Aly4* (cf paragraphe D.5 de ce chapitre) nous avons donc poursuivi ce travail de validation fonctionnelle sur des *Arabidopsis* doubles mutants « *Aly1-Aly3* » et « *Aly2-Aly4* »

obtenus au laboratoire (appelés respectivement mutants ALY1/ALY3 et ALY2/ALY4). Quinze jours après inoculation par pucerons virulifères, l'accumulation du TuYV dans les doubles mutants ALY a été analysée par un test ELISA. Les premiers résultats obtenus (Tableau 23 – volet B) montrent que le TuYV s'accumule significativement plus dans le mutant ALY1/ALY3 que dans les plantes Col-0, bien que l'augmentation soit modérée. Aucune différence d'accumulation n'est observée dans le double mutant ALY2/ALY4 par rapport aux plantes Col-0. Ces derniers résultats ne confirment donc pas l'accumulation légèrement réduite du CABYV observée dans le simple mutant ALY2. Ces expériences reproduites afin de confirmer les résultats.

Tableau 23 : Accumulation du TuYV dans les mutants d'arabidopsis touchés dans les gènes *Aly* : (A) Simples mutants, deux lignées homozygotes par gène candidat ont été inoculées, (B) Doubles mutants.

Le nombre de plantes infectées sur le nombre de plantes inoculées (taux d'infection) est présenté et le pourcentage de plantes infectées est précisé entre parenthèses. Pour les plantes infectées, la moyenne des DO à 405 nm et l'écart-type ont également été calculés (DO±EC). TS : Témoin sain Col-0.

Le test de Kruskal-Wallis (R-commander) compare l'accumulation du virus dans les plantes infectées Col-0 et mutantes.

| (A) | | | (B) | | |
|--------------------------|-------------|--------------------------------------|------------------|--------------|--------------------------------------|
| Simples mutants | | | Doubles mutants | | |
| Taux d'infection - DO±EC | | | Taux d'infection | DO±EC | |
| ALY1 (1) | 8/10 (80) | 1.10±0.23 P=0.203 | ALY1/ALY 3 | 13/15 (87 %) | 1.28±0.31 P = 0.004 |
| ALY1 (2) | 6/8 (75) | 1.01±0.12 P=0.475 | ALY2/ALY4 | 15/15 (100%) | 1.04±0.21 P = 0.152 |
| ALY2 (1) | 7/9 (78) | 0.70±0.17 P = 0.018 | Col-0 | 9/15 (60 %) | 0.93±0.15 |
| ALY2 (2) | 5/9 (56) | 0.69±0.25 P = 0.222 | TS Col-0 | 0/3 (0%) | 0.1±0.001 |
| ALY3 (1) | 7/7 (100) | 0.99±0.30 P = 0.522 | | | |
| ALY3 (2) | 8/9 (89) | 0.82±0.22 P = 0.298 | | | |
| ALY4 (1) | 23/23 (100) | 0.82±0.22 P = 0.135 | | | |
| ALY4 (2) | 14/14 (100) | 0.94±0.31 P = 0.823 | | | |
| Col-0 | 30/30 (100) | 0.97±0.26 | | | |
| TS Col-0 | 0/6 (0) | 0.10±0.003 | | | |

F. Etude de l'interaction Profiline 3 – RT_{C-ter} *in planta*

La profiline 3 est le candidat qui a été identifié par le criblage de la banque d'ADNc de CC avec la partie C-terminale de la protéine RT. De plus, le suivi de l'accumulation du CABYV dans les mutants d'*Arabidopsis* affectés dans la synthèse de cette protéine suggère qu'elle pourrait jouer un rôle dans le cycle viral. Nous avons donc poursuivi le travail de validation fonctionnelle de ce candidat en analysant sa localisation sub-cellulaire et en recherchant *in planta* une interaction avec la protéine virale (domaine RT_{C-ter} du CABYV). Les protéines virale et cellulaire ont été fusionnées à des fluorochromes (RFP ou EGFP) en utilisant la technologie Gateway®.

Les protéines ont ensuite été inoculées à des plants de *N. benthamiana*, seules ou en mélange. Comme le montre la Figure 344, volet A, 48 h après l'inoculation on observe les protéines EGFP:PRF3 et RFP:RT_{C-ter} au niveau du cytoplasme et du noyau. La superposition des images montrent que ces deux protéines colocalisent au niveau du noyau (la colocalisation se traduit par une coloration jaune). La stabilité des deux protéines de fusion dans *N. benthamiana* a été confirmée par western blot (Figure 34, volet B). L'interaction entre ces deux protéines qui colocalisent dans le noyau n'a malheureusement pas pu être confirmée *in vivo* par une expérience de FLIM (Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy) (Figure 35). Avant de pouvoir conclure sur l'implication de la protéine PRF3, ces études d'interactions *in planta* devront être répétées sur un plus grand nombre de cellules et en inversant le sens des fusions des protéines EGFP et RFP.

Ces résultats confirment cependant la localisation nucléaire des profilines qui a déjà été observée à plusieurs reprises chez d'autres espèces végétales (Baluska *et al.*, 2001; Hess & Valenta, 1997; Vidali & Hepler, 1997) et animales (Mayboroda *et al.*, 1997), mais aussi chez l'algue verte (Holzinger *et al.*, 2000). Ils montrent également une localisation nucléaire du domaine RT_{C-ter} qui sera discutée plus en détail dans le chapitre 2.

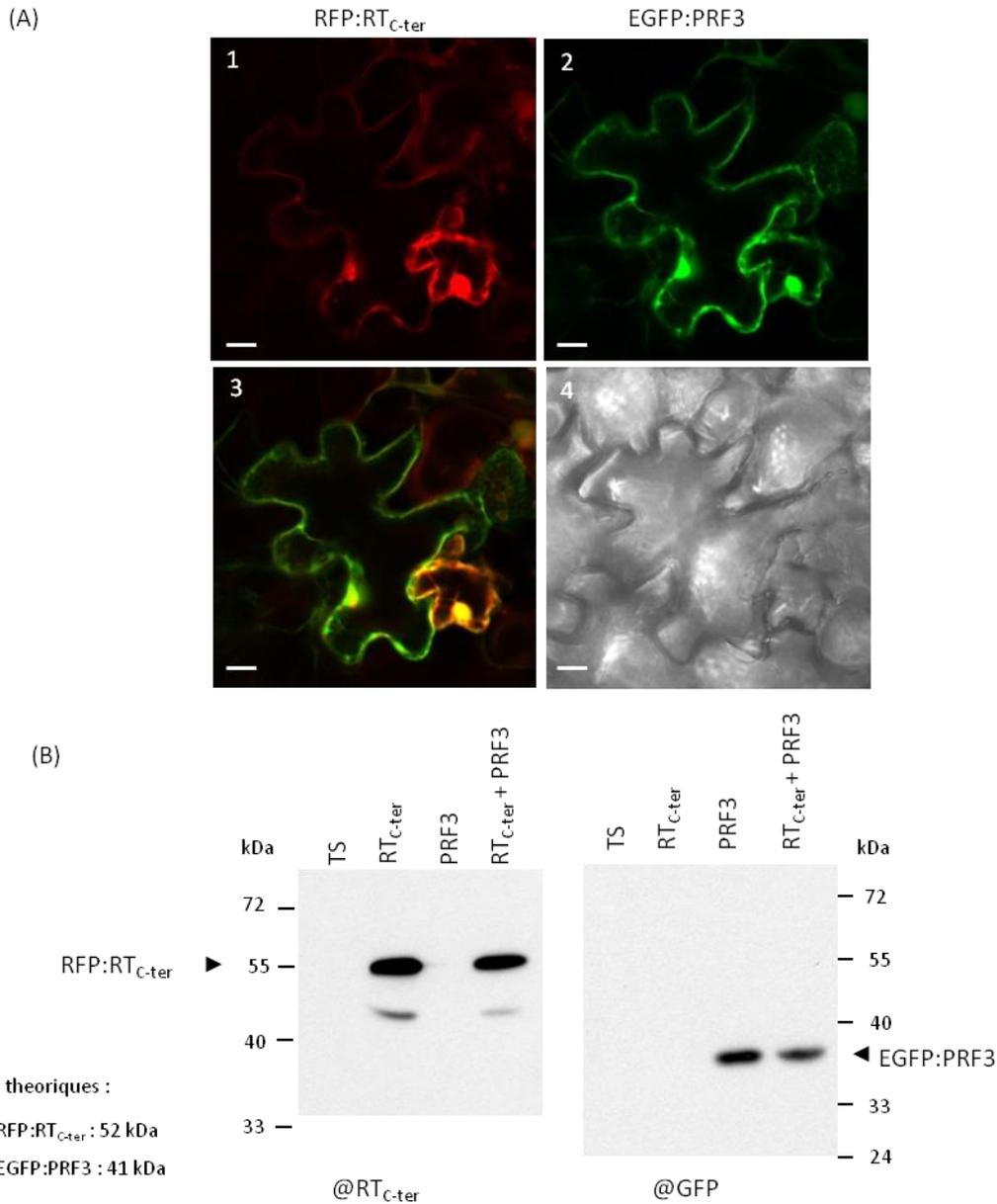


Figure 34 : (A) Localisation *in planta* des protéines RFP:RT_{C-ter} et EGFP:PRF3, hors contexte viral, 48 h après agro-inoculation de *N. benthamiana* (images 1 et 2). L'encart 3 correspond à la superposition des deux fluorescences et la coloration jaune représente une co-localisation des deux protéines. (4) Observation par microscopie DIC (Differential Interference Contrast) de la cellule. (B) Analyse par western blot de l'expression des protéines RFP:RT_{C-ter} et EGFP:PRF3 dans les feuilles agro-inoculées ayant servi aux observations présentées en (A). Les anticorps utilisés sont dirigés contre le domaine C-ter de la RT (@RT_{C-ter}) ou contre la protéine EGFP (@GFP). La barre représente 10 μm.

| | EGFP:PRF3 | EGFP:PRF3 + RFP:RT _{C-ter} | EGFP:PRF3 + RFP:RT _{C-ter} |
|--|----------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Moyenne durée de vie de la EGFP:PRF3 sur 5 noyaux ± écart-type | 2.73 ns ± 0.04 | 2.72 ns ± 0.02 | 2.65 ns ± 0.05 |
| % de FRET | | 1.75 % | 2.36 % |

Figure 35 : Etude de l'interaction par FLIM entre la protéine EGFP:PRF3 et la protéine RFP:RT_{C-ter} 48 h post-inoculation de *N. benthamiana*. Le pourcentage de FRET a été calculé en utilisant la formule % FRET = $1 - (\tau_{DA} / \tau_D)$ où τ_{DA} est la durée de vie en nano-secondes (ns) de la protéine GFP:PRF3 en présence de la protéine RFP:RT_{C-ter} (l'accepteur) et τ_D le temps de vie de la EGFP:PRF3 (le donneur).

G. Etude du désordre dans la séquence de la protéine RT du CABYV

Un point qui nous a particulièrement intrigué à l'issue des criblages de la banque d'ADNc de CC avec les différents appâts viraux, est le fait que tous les partenaires identifiés interagissent avec le domaine C-terminal de la protéine RT. Ce domaine semble donc avoir de nombreux partenaires cellulaires ce qui est une des caractéristiques des protéines désordonnées. En effet, les protéines désordonnées n'ont pas de structure tridimensionnelle en l'absence de ligand, et sont généralement au cœur des réseaux d'interactions (Dunker *et al.*, 2005; Haynes *et al.*, 2006). J'ai donc analysé le désordre de la protéine RT grâce aux programmes IUPred et PONDR. Les deux programmes donnent des résultats similaires et seuls les résultats obtenus avec le logiciel IUPred sont présentés dans la Figure 36. Ils montrent que la protéine RT du CABYV possède plusieurs domaines désordonnés : un premier d'environ 65 acides aminés localisé en N-terminal de la séquence de la protéine CP (domaine riche en arginines) et un deuxième d'environ 140 acides aminés qui se trouve dans la partie N-terminale du domaine C-terminal de la protéine RT. Il est intéressant de signaler que ces domaines désordonnés sont retrouvés à la même position dans les séquences des protéines RT de différents polérovirus, et même de lutéovirus (Figure 36). Ceci suggère que ces domaines pourraient avoir des fonctions conservées au sein de la famille des *Luteoviridae*, bien que la séquence du domaine C-terminal de la protéine RT soit peu conservée entre les virus de cette famille (Guilley *et al.*, 1994). Le désordre structural présent dans le domaine C-terminal de la protéine RT pourrait donc être responsable des interactions plus nombreuses mises en évidence par le système du YDH avec le domaine RT_{C-ter} comparées à celles obtenues avec les autres appâts viraux. Néanmoins, la présence d'un domaine désordonné à l'extrémité N-terminal de la protéine CP ne semble pas lui conférer la capacité d'interagir avec de nombreux partenaires cellulaires, puisque qu'aucun candidat n'a été identifié pour la CP du CABYV.

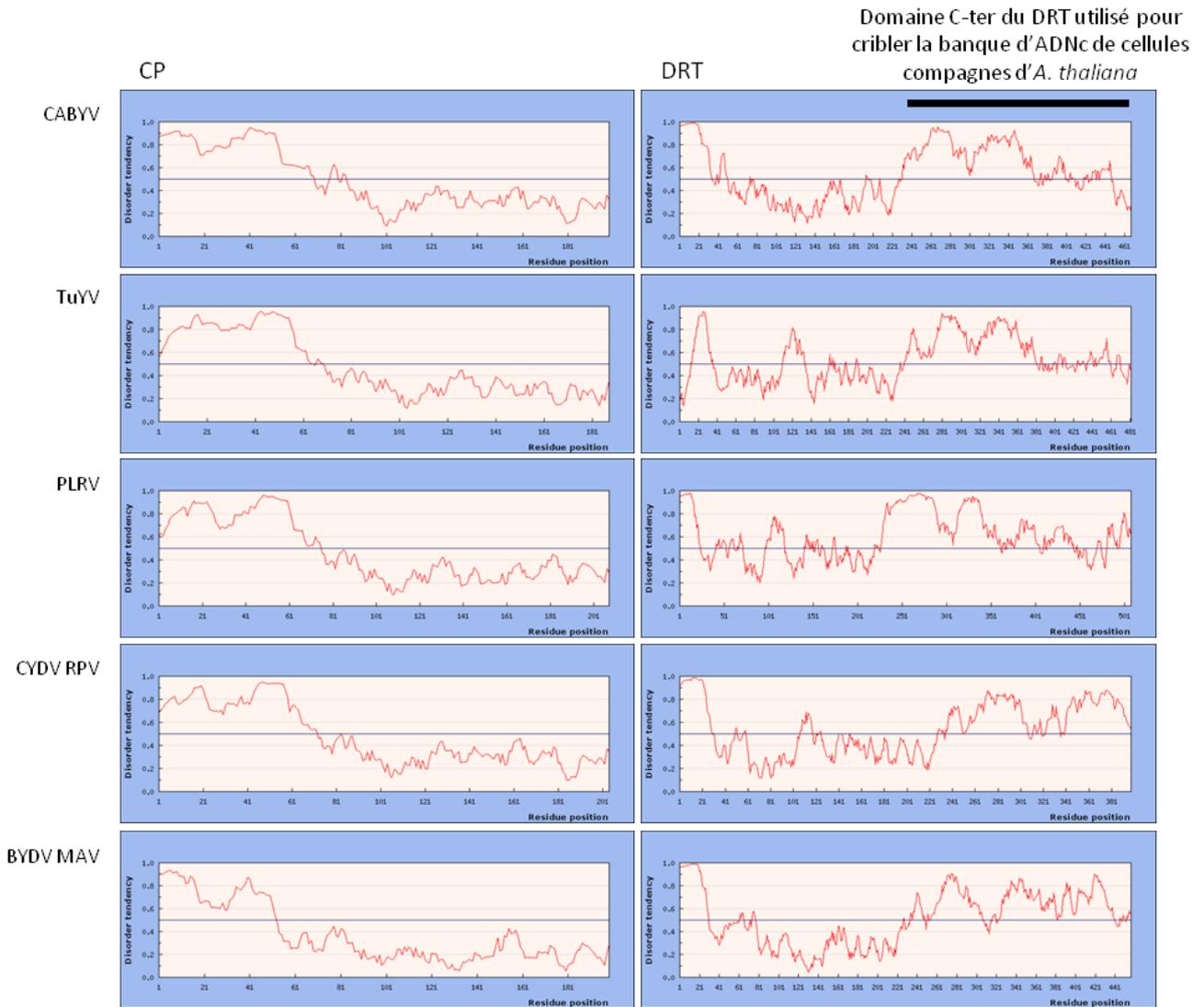


Figure 36 : Prédictions de domaines intrinsèquement désordonnés (programme lupred) dans les séquences des protéines de structure CP (Coat Protein) et du domaine de *readthrough* (DRT) de différents virus de la famille des *Luteoviridae*. Les numéros d'accèsion des séquences utilisées pour les analyses sont GI:124021704 pour le TuYV, GI:293612873 pour le CABYV, GI:18656761 pour le PLRV GI:145424151 pour le CYDV RPV, GI:75681 (CP) et GI:77307 (DRT) pour le BYDV MAV. L'axe des abscisses représente la position des résidus sur la séquence de la protéine CP (graphiques de gauche) et du DRT (graphiques de droite); l'axe des ordonnées représente la tendance au désordre.

H. Discussion et perspectives

Le criblage de banque d'ADNc par la technique du double hybride dans la levure : un outil puissant pour la recherche de partenaires cellulaires ?

Le premier objectif de cette thèse a consisté à identifier les partenaires phloémiens du CABYV en criblant une banque d'ADNc de CC d'*A. thaliana* par la technique du YDH, en utilisant comme appât des séquences de la CP et de la RT du CABYV. Les différents criblages réalisés nous ont permis d'identifier quatre gènes candidats (*prf3*, *lsu3*, *din10*, *hsp20-like*) qui interagissent tous avec le domaine C-terminal de la protéine RT ainsi qu'avec la protéine RT* pour la protéine Hsp20-like. A ces gènes candidats, s'ajoutent la famille de protéines ALY d'arabidopsis, initialement identifiées en criblant une banque d'ADNc de puceron avec la protéine CP du TuYV, dont les membres (ALY1, ALY2, ALY3 et ALY4) sont des partenaires potentiels des protéines du CABYV. Les efforts réalisés pour identifier des partenaires de la protéine CP du CABYV n'ont pas abouti et aucun partenaire de cette protéine n'a été identifié. Ceci pourrait provenir d'un problème de conformation de la protéine CP dû à la fusion avec le domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription GAL4, ou bien encore à l'absence de modifications post-traductionnelles qui pourraient être nécessaires aux interactions avec les protéines de l'hôte. Enfin, on ne peut pas exclure que les ADNc codant pour les partenaires potentiels de la protéine CP ne soient pas présents dans la banque d'ADNc de CC. Le travail réalisé a cependant permis de confirmer l'implication du résidu W₁₆₃ dans les interactions entre les différentes sous-unités de la protéine CP du CABYV.

En résumé, malgré le nombre important de doubles transformants obtenus pour chacun des criblages (de 6.10^5 à $6,7.10^6$), seuls quatre gènes candidats ont été identifiés. Ce faible nombre pourrait s'expliquer par la forte proportion de clones vides (62%) dans la banque criblée mais il correspond néanmoins au nombre de gènes candidats généralement identifiés lors du criblage de banques d'ADNc : 1 à 12 gènes candidats identifiés par Dunoyer *et al.* (2004), Inaba *et al.* (2011), Park *et al.* (2009) ou Zhu *et al.* (2005), lors du criblage de banques d'ADNc de pois, d'arabidopsis, de tabac ou de riz avec les protéines VPg du PSbMV, 2b du CMV, CP du PVX ou P2 du RDV.

Comme on a pu le voir dans le chapitre d'introduction bibliographique de cette thèse, le criblage de banques d'ADNc avec des protéines virales est une approche qui a largement été utilisée pour identifier des partenaires viraux. Cette approche présente l'avantage de pouvoir tester un très grand nombre d'interactions simultanément, à un faible coût, et permet de s'affranchir de la faible expression des protéines. Néanmoins cette approche présente certaines limites qu'il est important de rappeler. Tout d'abord, elle peut générer des « faux positifs » qui correspondent à des

interactions qui n'ont aucune réalité biologique, ou au contraire des « faux négatifs » qui correspondent à l'absence d'interaction entre deux protéines partenaires. Ces « faux positifs » ou « faux négatifs » s'expliquent par le fait que les protéines de fusion peuvent présenter des défauts de repliement qui induisent, ou au contraire masquent, des interactions. Les protéines fusionnées peuvent également être toxiques pour la levure, rendant ainsi impossible toute évaluation d'interaction dans cet organisme. Dans la levure, les modifications post-traductionnelles, et en particulier les glycosylations, sont différentes de celles qui sont synthétisées *in planta* et ces différences peuvent être responsables des cas de « faux positifs » ou de « faux négatifs ». Les interactions avec des protéines membranaires ne peuvent pas non plus être mises en évidence avec le système utilisé dans cette étude. Un système modifié, comme le « Split Ubiquitin », permettrait quant à lui l'identification d'interactions se produisant au niveau des membranes ou du cytoplasme, et non dans le noyau comme c'est le cas avec le système classique utilisé dans cette étude. Enfin, le dernier aspect de cette approche qui peut biaiser les résultats, est le fait que les protéines sont sorties de leur contexte biologique, en termes de niveau d'expression et de compartimentation cellulaire. Je reviendrai sur ce dernier point au cours de la discussion (*cf* page 101). Les limites de cette approche rendent indispensables la confirmation des interactions identifiées par d'autres techniques telles que le pull-down, l'immuno-précipitation, le BiFC, ou le FLIM, et surtout, exigent la validation fonctionnelle de ces interactions avant de pouvoir, avec certitude, assigner une fonction de ces protéines dans le cycle viral. L'analyse, par RT-PCR quantitative, de l'expression des ARNm des gènes candidats suite à l'infection virale, peut également apporter des informations quant à leur implication dans le cycle viral. Cette analyse, qui n'a pas été réalisée au cours de cette thèse, devra être programmée dans l'avenir. Cette technique a permis de confirmer l'implication de protéines candidates issues de criblages de banques d'ADNc, comme par exemple la protéine NbPCIP1 qui interagit avec la protéine CP du PVX et qui est surexprimée lors de l'infection virale (Park *et al.*, 2009). C'est également le cas de la protéine TARF qui interagit avec la RdRp du TMV et qui est surexprimée suite à l'infection virale (Yamaji *et al.*, 2010a).

Rôles potentiels dans le cycle des polérovirus, des gènes candidats identifiés au cours des criblages de la banque d'ADNc de CC d'*A. thaliana*

L'utilisation de mutants KO d'arabidopsis touchés dans les différents gènes candidats⁴ n'a pas permis de confirmer de manière définitive l'implication de ces gènes dans le cycle du CABYV (ou du TuYV pour les protéines ALYs). Etant donné la grande variabilité d'accumulation du CABYV dans les

⁴ A l'exception du gène *Hsp20-like*, puisque je vous le rappelle, l'implication de cette famille de protéines dans le cycle des polérovirus a fait l'objet d'une partie de thèse (*cf* paragraphe D.1 de ce chapitre)

plantes, il a été très difficile d'obtenir des résultats reproductibles et facilement exploitables. Cette grande variabilité pourrait éventuellement provenir d'une distribution inégale du virus dans la plante et/ou d'un inoculum inégal transmis par les pucerons. De plus, l'appartenance de tous les gènes candidats à des familles multigéniques, complique encore plus ce travail de validation fonctionnelle. Une alternative pour la validation de gènes appartenant à des familles multigéniques, serait d'étudier l'effet sur l'accumulation du virus de la surexpression des gènes candidats. Cette approche a été utilisée par Ishihara *et al.* (2008) pour montrer l'implication du gène *Eds5* dans le cycle du CMV. Elle a également été développée par nos collaborateurs de l'IBMP (Strasbourg) afin d'étudier l'implication du gène codant pour la sHsp17.7CII dans l'accumulation du TuYV et du CABYV. L'inoculation de ces plantes avec ces deux virus n'a cependant pas permis de montrer l'effet de la protéine sHsp17.7CII sur l'accumulation des virus. Il pourrait donc être intéressant d'évaluer si la surexpression des autres protéines candidates peut influencer l'accumulation du CABYV dans les plantes.

La non-reproductibilité des résultats de l'infectivité du CABYV dans des mutants touchés dans le gène codant pour la **profiline 3** ne nous permet pas de conclure quant à un rôle définitif de cette protéine dans le cycle du CABYV. Néanmoins, je souhaiterais présenter ci-dessous le rôle que pourrait potentiellement jouer la profiline dans le cycle du CABYV. L'implication des profilines dans le contrôle de la polymérisation du cytosquelette d'actine (Avisar *et al.*, 2008), et donc dans l'ouverture des PDs, pourrait suggérer l'implication de cette protéine dans le mouvement du virus. Cependant, il faut signaler que le rôle de la profiline dans la régulation de la polymérisation de l'actine est réversible et dépend du ratio profiline/actine G : quand celui-ci est élevé, la polymérisation de l'actine est inhibée, alors que quand la proportion de profiline est faible, la polymérisation de l'actine est favorisée. De plus, l'expression du gène *prf3* semble fluctuer au cours du développement de la plante (Fan *et al.*, 2012). Ces observations pourraient expliquer les difficultés à confirmer la fonction de la protéine PRF3 dans le cycle du CABYV.

Deux mutants d'arabidopsis surexprimant ce gène candidat viennent d'être obtenus par Fan *et al.* (2012). Les mutants diffèrent par la séquence exprimée : un mutant exprime une protéine qui possède une extension de 36 acides aminés en N-terminal. Ce mutant a un phénotype marqué puisque la longueur des racines et de l'hypocotyle est clairement affectée. L'autre mutant d'arabidopsis synthétise la séquence de la PRF3 telle que je l'ai considérée dans cette étude. Ce mutant ne présente aucun phénotype. L'accumulation du CABYV pourrait donc être analysée dans ces mutants surexpresseurs de la protéine PRF3.

La protéine **LSU3** est une protéine dont le niveau d'expression est régulé par le soufre et qui pourrait donc être impliquée dans le métabolisme de cet élément. Cette protéine était encore considérée de fonction inconnue il y a quelques mois encore dans les bases de données. Le métabolisme du soufre

est impliqué notamment dans la production des glucosinolates qui sont des composés qui, après hydrolyses par des myrosinases, génèrent des dérivés qui peuvent être toxiques pour les pucerons. Cette voie métabolique est particulièrement intéressante dans le cas des virus transmis par puceron. Il faut signaler qu'au laboratoire nous avons identifié une protéine associée aux myrosinases qui co-purifie avec les particules virales du CABYV et du TuYV dans arabidopsis. De plus, les analyses transcriptomiques réalisées par Sophie Chapuis à l'IBMP de Strasbourg (communication personnelle, thèse en cours) montrent que l'expression de plusieurs gènes de la voie des glucosinolates est augmentée suite à l'infection par le TuYV. Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère que le métabolisme du soufre pourrait être impliqué dans le cycle des polérovirus. Les études pour valider la fonction de la protéine LSU3 dans le cycle viral seront poursuivies par l'analyse de l'accumulation du CABYV dans les mutants KO homozygotes en cours d'obtention.

L'implication de la protéine **DIN10** dans le cycle du CABYV n'a pas pu être confirmée par l'utilisation d'un mutant KO. Néanmoins, vu le très grand nombre de protéines appartenant à la famille des glycosyl-hydrolases, une redondance fonctionnelle est tout à fait envisageable. L'implication de ces enzymes dans le cycle des polérovirus avait déjà été suggérée auparavant. En effet, parmi les protéines de *M. perfoliata* qui co-purifient avec les particules virales du CABYV ou du TuYV, on trouve une protéine de 90 kDa (nommée P90) (Revollon *et al.*, 2010) qui présente des similarités de séquences avec une alpha-glucosidase de *Solanum tuberosum* (77% de similarité) et avec une alpha-xylosidase d'*A. thaliana* (68%), deux enzymes appartenant à la famille des glycosyl-hydrolases. De plus, il a été montré que l'activité alpha-glucosidase est stimulée dans les plants de *M. perfoliata* infectés par le TuYV ou le CABYV (Munsch, 2004), et que l'activité beta-xylosidase est perturbée après infection d'*A. thaliana* par le TuYV (stimulation ou répression de l'activité selon l'accession d'arabidopsis) (Munsch, 2004). Les mêmes auteurs ont montré que l'utilisation d'inhibiteurs de glucosidases sur *M. perfoliata* n'a pas d'effet sur l'accumulation du virus ou sur sa transmissibilité par puceron. L'étude de cette famille de gènes dans le cycle des polérovirus a fait l'objet d'une partie de la thèse de Sébastien Révollon (Revollon, 2010). L'utilisation d'un mutant KO d'arabidopsis (Bx11) touché dans une beta-xylosidase orthologue de la protéine P90, n'a pas permis de montrer l'implication de cette protéine dans la capacité du CABYV et du TuYV à infecter les plantes. Concernant la transmission des virus par puceron à partir de ces plantes infectées, aucun effet n'a été observé sur la transmission du TuYV, alors que le CABYV est moins bien transmis à partir des mutants d'*A. thaliana* ne produisant pas cette beta-xylosidase. Les données actuelles ne permettent pas de préciser le rôle que pourrait jouer cette beta-xylosidase dans le mécanisme de la transmission du CABYV. Dans sa thèse, Sébastien Revollon suggérait que, dans le mutant KO, l'inhibition de l'expression de cette protéine très fortement exprimée en situation de viroses pourrait diminuer de

manière significative le contenu en protéine des tubes criblés et donc affecter l'efficacité de la transmission du virus. En effet, Bencharki *et al.* (2010a) ont montré que les protéines dans la sève stimulent la transmission du CABYV. Des études supplémentaires sont cependant nécessaires pour confirmer cette hypothèse et proposer un rôle de cette beta-xylosidase dans la transmission du CABYV par puceron. Pour confirmer le rôle des glycosyl-hydrolases dans le cycle des polérovirus il faudra notamment répéter les tests de transmission du CABYV à partir du mutant KO infecté.

La protéine **ALY** de *M. persicae* a été identifiée en criblant une banque d'ADNc total du puceron avec la protéine CP du TuYV. Les séquences des protéines ALYs d'*Arabidopsis* possèdent de 34 à 37 % de similarité avec celle d'*A. pisum*. Ces protéines nucléaires sont impliquées dans l'épissage des ARN messagers mais le TuYV ne se multipliant pas dans le corps de l'insecte vecteur (aucune trace d'ARN (-) n'a pu être détectée par RT-PCR, Véronique Brault, communication personnelle), il est difficile de concevoir que la protéine ALY puisse intervenir au niveau des ARN viraux dans le vecteur. Il est cependant possible que l'interaction mise en évidence entre la protéine CP du TuYV et la protéine ALY de *M. persicae*, soit la trace d'une répllication ancestrale du virus dans l'insecte. Une autre hypothèse que nous avons explorée, est que l'interaction entre les protéines virales et la protéine ALY du puceron reflèterait une interaction entre les protéines virales et les protéines ALY de la plante. Les résultats préliminaires obtenus concernant l'accumulation du TuYV dans les doubles mutants ALY1/ALY3 sont encourageants puisqu'ils suggèrent que les gènes *Aly1* et *Aly3* d'*Arabidopsis* pourraient agir en limitant l'accumulation virale ; le virus s'accumule en effet plus dans les plantes mutantes ALY1/ALY3 par rapport aux plantes de référence Col-0. L'implication des gènes codant pour les protéines ALY dans le mécanisme de *gene silencing* a été démontrée pour le TBSV (Canto *et al.*, 2006; Uhrig *et al.*, 2004) mais des expériences supplémentaires seront nécessaires pour analyser si ces protéines jouent un rôle similaire dans le cycle du TuYV. L'analyse de l'expression de ces gènes suite à l'infection virale pourra être analysée par RT-PCR quantitative. La localisation subcellulaire des protéines ALY pourra également être étudiée par microscopie confocale en présence du TuYV et l'interaction *in planta* entre les protéines ALY et les protéines CP, RT* et VPg du TuYV pourra être analysée par FLIM.

L'identification de réseaux d'interactions cellulaires au cœur du vivant : réalité ou utopie ?

L'approche que nous avons choisie pour rechercher les partenaires phloémiens du CABYV repose sur une stratégie très utilisée qui consiste à rechercher à partir d'une protéine (dans notre cas, une protéine virale) les autres protéines associées afin de reconstituer un réseau d'interactions. De façon générale, l'étude cartographique de protéomes entiers (*E. coli*, Homme, levure, drosophile, souris...) a permis une bonne description du vivant et a montré que la complexité des interactions entre protéines donnent lieu à des réseaux multiples interconnectés. Le centre de ces réseaux est occupé par un noyau de protéines qui ne représente que 10 % du contenu protéique total de la cellule ; chacune des protéines des réseaux est en interaction avec une centaine de partenaires, entraînant un enchevêtrement des différents réseaux (Albert, 2005; Barabasi & Oltvai, 2004; Bork *et al.*, 2004). Pour contrôler (réguler) ces réseaux et limiter le nombre de combinaisons possibles entre les protéines, la cellule a adopté plusieurs stratégies telles que (i) l'inhibition croisée des différentes voies grâce aux protéines régulatrices, (ii) la micro-compartmentation grâce aux protéines d'échafaudage qui concentrent en un site toutes les molécules impliquées dans une voie de signalisation et favorise ainsi leurs interactions, et (iii) les compartimentations spatiale et temporelle. Ces compartimentations spatiale et temporelle ne sont pas prises en compte dans l'approche qui consiste à étudier les interactions protéine-protéine par la technique du YDH, ce qui a pour conséquence la mise en évidence d'interactions qui n'auraient jamais lieu en contexte naturel. Ces interactions font donc partie des « faux positifs » induits par cette technique.

J'ajouterai que nous considérons souvent la cellule comme une machine parfaitement huilée, dans laquelle les événements cellulaires sont prédéfinis par son environnement (la cellule adjacente ou les conditions climatiques extérieures par exemple). Cependant, le vivant n'est probablement pas si prévisible, et le désordre thermique qui règne dans la cellule induit probablement des événements aléatoires d'association et de dissociation entre les protéines, sans conséquence notable sur le fonctionnement cellulaire. De plus, en l'absence de protéines stabilisatrices, le manque de spécificité des protéines pour leurs partenaires cellulaires entraîne une sorte de compétition entre les protéines (et/ou séquence d'acides nucléiques) qui accentue la part du hasard dans les phénomènes d'association et de dissociation. C'est très probablement cette part aléatoire de la machinerie cellulaire qui lui confère une grande plasticité et permet au vivant de s'adapter aux environnements changeants et on comprend facilement que l'identification des réseaux d'interactions cellulaires relève peut-être d'une utopie. Comment les protéines au cœur de ces réseaux, peuvent-elles avoir autant de partenaires ? Et comment la conformation des protéines peut-elle se concilier avec autant d'interactions diverses ? Je pense que la réponse à ces questions est peut-être dans l'existence de protéines désordonnées, sans structure fixe et capables de s'adapter à de multiples partenaires.

Le désordre des séquences protéiques indispensable à une cellule bien ordonnée ?

La notion de désordre dans les séquences protéiques est assez récente (1997) et a mis fin au paradigme « 1 séquence = 1 structure » ; dans ce concept nouveau, les protéines peuvent être non structurées tout en étant fonctionnelles. Les protéines désordonnées ne possèdent pas de structure tridimensionnelle stable, ce qui leur confère une plasticité importante à l'origine de leur importance dans les phénomènes biologiques (signalisation cellulaire, régulation...). Ces protéines, ou certains de leurs domaines, diffèrent des protéines structurées par leur composition enrichie en acides aminés possédant des résidus polaires et chargés, par leur faible hydrophobicité, la faible complexité de leur séquence et leur grande flexibilité. Plusieurs algorithmes ont été développés pour prédire le désordre intrinsèque d'une séquence en acides aminés (Bourhis *et al.*, 2007; Ferron *et al.*, 2006). Les analyses bio-informatiques qui utilisent ces « prédictors » montrent un pourcentage élevé de séquences protéiques désordonnées chez tous les organismes. Les génomes eucaryotes coderaient pour plus de protéines désordonnées que les génomes procaryotes, dont les protéines désordonnées représentent entre 52 et 67% des protéines totales (Dunker *et al.*, 2000; Tompa *et al.*, 2006). A ce jour, les données de prédiction de désordre dans des protéines virales restent rares, bien que leurs séquences semblent contenir une forte proportion de domaines désordonnés comparés aux bactéries ou aux eucaryotes par exemple (Chen *et al.*, 2006). Il ne fait aucun doute qu'à l'avenir, la base de données Disprot qui répertorie les protéines désordonnées s'enrichira de séquences virales.

Les analyses de prédictions de domaines désordonnés dans les protéines CP et RT de différents polérovirus ont permis de mettre en évidence deux domaines majeurs désordonnés, dont l'un est situé dans la partie N-terminale de la protéine CP et l'autre couvre le domaine C-terminal de la protéine RT des polérovirus. Une des caractéristiques expérimentales des protéines désordonnées est leur migration aberrante sur gel SDS-PAGE (Receveur-Brechot *et al.*, 2006). Ainsi, à part l'existence d'éventuelles modifications post-traductionnelles, la présence de ces domaines désordonnés dans la séquence de la protéine RT pourrait expliquer la migration aberrante de la protéine sur gel de polyacrylamide (migration autour de 95 kDa au lieu des 74 kDa prédit).

La conservation de ces domaines désordonnés entre les différents polérovirus et lutéovirus suggère un ou des rôle(s) conservé(s) de ces domaines. Le domaine N-terminal de la protéine CP est impliqué dans les interactions avec l'ARN viral (*cf* introduction bibliographique page 52) (Brault *et al.*, 2003) et le rôle précis du domaine C-terminal de la protéine RT (domaine non structural absent dans les particules virales) fera l'objet du chapitre 2 de cette thèse où nous avons montré son rôle dans le mouvement systémique du CABYV.

CHAPITRE 2 : Rôle des différentes formes de la protéine RT dans le mouvement du CABYV – Action en *trans* du domaine C-terminal sur la particule virale

A - Introduction

Dans le chapitre 1 de ce manuscrit nous avons montré que le domaine C-terminal de la protéine RT du CABYV pourrait avoir de multiples partenaires cellulaires. Cependant, le rôle de ce domaine et des différentes formes de la protéine RT du CABYV dans le cycle viral n'est pas bien connu. Il a donc fait l'objet d'une étude présentée dans ce chapitre et qui montre son rôle essentiel dans le mouvement du CABYV.

Comme cela a été décrit dans l'introduction bibliographique (paragraphe A.3.a), les virus utilisent plusieurs stratégies pour se déplacer dans la plante. Le mouvement du virus peut avoir lieu sous forme de complexes viraux nucléoprotéiques ou sous forme de particules virales. Je ne reviendrai pas sur ces points et je vais consacrer l'introduction de ce deuxième chapitre, à un état des connaissances sur le mouvement des polérovirus qui sont restreints aux cellules du phloème, puis à un bilan des connaissances sur les fonctions connues de la protéine RT des polérovirus.

A.1. Le mouvement des polérovirus *via* le phloème

A.1.a. Le phloème

Les polérovirus ont la particularité d'accomplir toutes les étapes de leur cycle (décapsidation, réplication, traduction, encapsidation et mouvement dans la plante) uniquement dans les cellules du phloème. Les cellules phloémiennes sont de petite taille, elles ne représentent que 0,4 % du volume total d'une feuille (Sjolund, 1997) et sont de 3 types (Figure 37) : les cellules compagnes (CC), les tubes criblés (TC), et les cellules du parenchyme phloémien (PP). Lors du développement du phloème et de la maturation des TC, ces derniers perdent les plus gros organites de la cellule (noyau, vacuole, Golgi, ribosomes). Le réticulum endoplasmique de ces cellules est également réorganisé et permet la connexion entre les TC et les CC grâce au desmotubule présent dans les PDs reliant ces deux types de cellules (*cf* introduction bibliographique, paragraphe A.3.a.i pour plus de détails sur la structure des PDs). Les PDs reliant les TC et les CC ont la particularité d'être ramifiés, avec plusieurs canaux du côté des CC qui fusionnent en un seul du côté des TC (Figure 37-B et Figure 38). Ces pores ont un diamètre moyen de 33 nm, mais leur ouverture est occupée par le desmotubule. Les CC assurent par ces canaux le chargement du phloème en assimilats et en protéines destinés aux différents organes de la plante et qui vont cheminer *via* les TC. Les cellules du PP ont quant à elles un rôle dans le stockage, le

chargement et la maturation de composés métaboliques variés. Ces cellules renferment également le système « myrosinase-glucosinolate » connu pour être impliqué dans les réactions de défense de la plante contre les insectes herbivores.

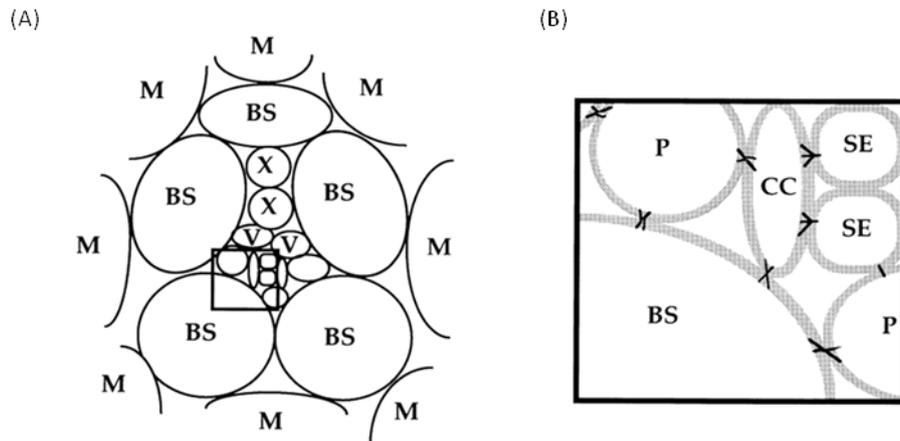


Figure 37 : (A) Représentation schématique de l'organisation du système vasculaire chez les plantes. Les cellules du mésophylle (M) et de la gaine périvasculaire (BS : Bundle sheath) entourent une veine mineure comprenant le xylème (X), les cellules du parenchyme vasculaires (V), les cellules compagnes (CC) et les tubes criblés (SE : Sieve element). (B) Grossissement du cadre en (A) Les cellules du parenchyme phloémien (P), les cellules compagnes et les tubes criblés sont reliées par des plasmodesmes (lignes noires). Les plasmodesmes reliant les cellules compagnes et les tubes criblés ont la particularité d'être ramifiés. (Source : Seron & Haenni, 1996).

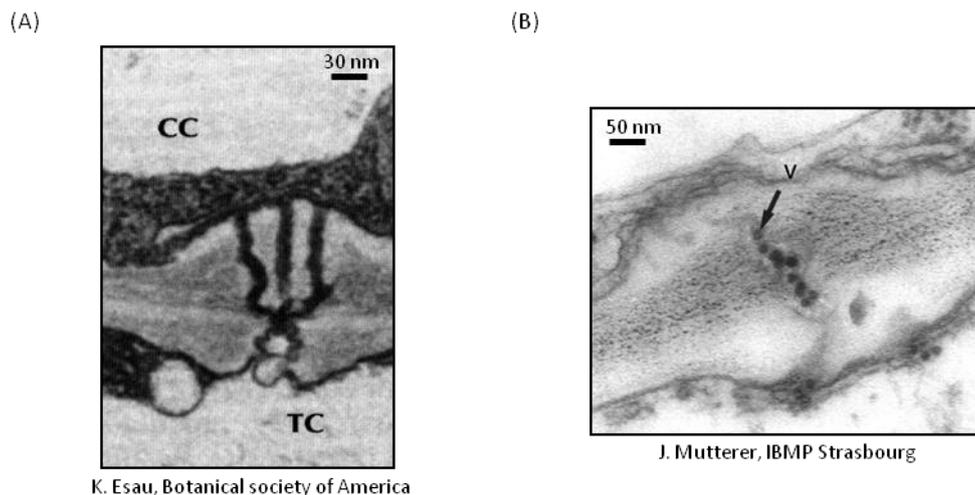


Figure 38 : Observations par MET (A) d'un plasmodesme branché entre une cellule compagne (CC) et un tube criblé (TC) et (B) de particules virales (v) du TuYV dans un plasmodesme connectant une cellule compagne et un tube criblé.

A.1.b. Le mouvement des polérovirus

Les virus appartenant à la famille des *Luteoviridae* étant inoculés directement dans le phloème, ils sont un modèle pour l'étude du mouvement systémique des virus. La restriction de ces virus au phloème est assez peu répandue chez les phytovirus. En effet, elle concerne les virus appartenant à la famille des *Luteoviridae*, à l'exception du PEMV, et quelques virus du genre *Begomovirus*, *Closterovirus* ou *Nanovirus*. Les raisons de la restriction au phloème des virus ne sont pas encore connues mais elle pourrait reposer sur des mécanismes de *gene silencing* et sur une absence de protéine de mouvement fonctionnelle dans les autres types cellulaires.

Plusieurs éléments sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle les polérovirus se déplaceraient dans la plante sous forme de virions. Tout d'abord, d'après Ziegler *et al.* (1996) la protéine CP est indispensable au mouvement du virus à longue distance. D'autre part, des virions ont été observés au niveau de PDs connectant les TC aux CC ou aux cellules du PP (Figure 38 - B) (Mutterer *et al.*, 1999). Les virions ont également été observés dans la sève des plantes infectées par le CABYV (Boissinot *et al.*, en préparation). Trois protéines virales sont connues pour être impliquées dans le mouvement des polérovirus : il s'agit de la protéine CP (*cf* ci-dessus), de la protéine P4 (*cf* introduction bibliographique paragraphes B.2) et de la protéine RT. Aucune interaction entre la protéine P4 et les protéines CP ou RT n'a pu être mise en évidence au laboratoire par la technique du YDH ce qui suggère que la protéine P4 agirait de manière indépendante de celle des protéines de structure (Caren Rodriguez, communication personnelle).

Les expériences de Brault *et al.* (1995) et de Mutterer *et al.* (1999) ont montré le rôle stimulateur de la protéine RT du TuYV sur le mouvement de ce virus. En effet, un virus mutant dépourvu de protéine RT reste confiné dans des cellules isolées le long des TC et ne parvient pas à envahir de nouvelles cellules. L'absence de protéine RT ne bloque pas le passage du virus entre les CC et les TC mais inhibe le mouvement du virus de cellule à cellule. Les études de localisations cellulaires par expression transitoire réalisées sur la protéine RT du PLRV (Haupt *et al.*, 2005b; Nurkiyanova *et al.*, 2000) n'ont pas permis de montrer son adressage aux PDs ce qui laisse supposer un autre site d'action de la protéine. Récemment, Peter *et al.* (2008) ont montré que l'incorporation de la protéine RT dans la particule virale n'est pas indispensable au mouvement à longue distance du virus dans les tissus en développement. La protéine RT pourrait agir en *trans* sur les virions dépourvus de protéine RT pour assurer le mouvement systémique du virus (Peter *et al.*, 2009). L'incorporation de la protéine RT servirait au virus pour envahir les tissus phloémiens au niveau des feuilles matures (feuilles dans lesquelles la transition « source-puits » a été effectuée). La protéine RT libre (non incorporée), et en particulier son domaine C-terminal, semble jouer un rôle majeur dans le mouvement du PLRV au

travers les cellules de la gaine périvasculaire, et cette protéine semble impliquée dans la restriction du PLRV au phloème (Peter *et al.*, 2009). Il faut cependant signaler que ce rôle de la protéine RT dans la restriction au phloème a été montré pour le PLRV chez une espèce particulière de plante (*Solanum Sarrachoides*) et seulement après la taille des plantes qui modifie de manière drastique les flux de sève.

La protéine P4, quant à elle, semble avoir un rôle hôte spécifique puisqu'en son absence, les virus semblent capables d'infecter certains de leur hôtes (Lee *et al.*, 2002; Ziegler-Graff *et al.*, 1996). Cette protéine a une localisation préférentielle au niveau des PDs branchés reliant les tubes criblés et les cellules du phloème lorsqu'elle est exprimée à partir de plantes transgéniques transformées avec un clone complet du PLRV. Cette préférence pour les PDs branchés disparaît cependant lorsque la protéine P4 est exprimée seule dans des plantes transgéniques. La protéine reste cependant localisée au niveau des autres PDs ainsi qu'autour du noyau (Schmitz *et al.*, 1997). La protéine P4 est probablement dirigée vers les PDs branchés grâce à l'action d'une protéine virale ou d'une protéine de l'hôte surexprimée au moment de l'infection. Le fait que cette protéine ne soit pas essentielle pour assurer le mouvement des polérovirus chez tous leurs hôtes suggère qu'en son absence, une protéine cellulaire pourrait assurer sa fonction.

Chez les *Luteoviridae*, en particulier chez les polérovirus, deux types de mouvement semblent donc « cohabiter » : un mouvement à longue distance *via* les TC, sous formes de virions qui cheminent via les PDs (probablement avec l'assistance de la protéine P4 chez certains hôtes) et un mouvement de cellule à cellule, sous formes de virions ou de complexes RNPs grâce à l'action de la protéine RT. Néanmoins, l'existence de complexes RNPs n'a à ce jour pas pu être mise en évidence au laboratoire (communication personnelle, thèse en cours de Clémence Hipper).

A.2. Etat de l'art sur le rôle de la protéine RT dans le cycle viral et dans la transmission par puceron

Sur la Figure 39, je vous rappelle l'organisation de la protéine RT des polérovirus telle qu'elle vous a été présentée dans l'introduction bibliographique (*cf* paragraphe B.2).

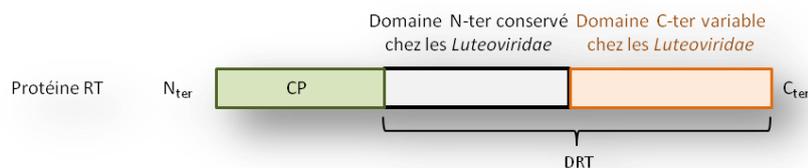


Figure 39 : Organisation des domaines constituant la protéine RT des virus appartenant à la famille des *Luteoviridae*. La séquence de la protéine CP en N-terminal est fusionnée au domaine de *readthrough* (DRT). Le DRT est constitué d'un domaine variable à l'extrémité C-terminale et d'un domaine conservé en N-terminale.

Les fonctions connues de la protéine RT des polérovirus sont synthétisées dans le Tableau 24.

L'étude de la protéine RT s'est avérée délicate pour plusieurs raisons : la première est que les mutations ponctuelles affectant cette protéine et introduite dans des mutants du TuYV ont tendance à réverter (Brault *et al.*, 2000; 1995). De plus, les délétions ou mutations touchant le domaine conservé du DRT affectent l'incorporation de la protéine RT dans les virions (TuYV : Bruyere *et al.*, 1997 ; PLRV : Peter *et al.*, 2008). Malgré ces difficultés, il a été montré que le DRT est indispensable à la transmission par puceron (Brault *et al.*, 1995; Chay *et al.*, 1996). Ce rôle dans la transmission pourrait provenir de l'interaction entre le domaine conservé du DRT et une protéine chaperonne produite par les endosymbiontes (*Buchnera aphidicola*), la symbionine, et qui présente de fortes similarités de séquence avec la protéine GroEL d'*E. coli*. Cette protéine aurait la capacité de stabiliser la particule virale dans la cavité de l'insecte (Filichkin *et al.*, 1997; van den Heuvel *et al.*, 1997). Cependant, une étude récente (Bouvaine *et al.*, 2011) a remis en question cette hypothèse puisque la protéine GroEL de *B. aphidicola* n'a pas été détectée par western blot dans l'hémolymphe de plusieurs espèces de pucerons. Le DRT pourrait être responsable de la reconnaissance des virions au niveau des cellules des glandes salivaires accessoires. En effet, il a été montré que des mutants viraux, chez lesquels la séquence du DRT a été supprimée, sont internalisés dans l'hémolymphe mais sont incapables de franchir les cellules des glandes salivaires (Brault *et al.*, 1995; Reinbold *et al.*, 2001). Le domaine conservé du DRT est également impliqué dans la spécificité de transmission des polérovirus et détermine le tropisme cellulaire de ces virus au niveau du tube digestif (Brault *et al.*, 2005).

Dans la plante, il a été montré pour le TuYV que le domaine C-terminal de la protéine RT n'est pas strictement nécessaire à l'infection virale mais qu'il intervient cependant dans l'accumulation du virus dans les plantes (Bruyere *et al.*, 1997). Ce domaine serait également impliqué dans la symptomatologie du TuYV chez *N. clevelandii* (Bruyere *et al.*, 1997) et du PLRV chez *S. sarrachoides* (Peter *et al.*, 2009). Le domaine conservé du DRT serait quant à lui impliqué dans le mouvement systémique des polérovirus, puisque l'infection des plants de *N. clevelandii* par des mutants de délétion du TuYV ne possédant pas ce domaine, montre un nombre réduit de cellules infectées (Mutterer *et al.*, 1999).

Des études de localisation subcellulaire de la protéine RT du PLRV ont été réalisées à partir d'un clone complet du PLRV dans lequel la protéine RT est fusionnée à la protéine GFP. La protéine RT a ainsi été mise en évidence au niveau du cytoplasme et parfois dans des granules et dans des corps très fluorescents associés au nucléole (Nurkiyanova *et al.*, 2000). Le virus ainsi marqué à la GFP reste transmissible par puceron mais perd sa capacité de mouvement. Haupt *et al.* (2005a) ont confirmé la localisation nucléolaire de la protéine GFP:RT exprimée de façon transitoire dans des *N. benthamiana*. Cependant, en condition d'infection, la protéine est localisée uniquement dans le nucléoplasme.

Il faut également préciser que la protéine RT se présente sous plusieurs formes. Tout d'abord, une forme complète, d'un poids moléculaire théorique d'environ 74 kDa, détectée par western blot dans des broyats totaux de plantes infectées ; et une forme tronquée d'environ 55 kDa, dépourvue de l'extrémité C-terminale du domaine de *readthrough* (notée RT*), détectée par western blot dans des extraits de virus purifiés mais jamais à partir de broyats totaux de plantes infectées. Le domaine C-terminal de la protéine RT (environ 22kDa) n'a jamais été mis en évidence dans des broyats de plantes infectées (résultats non montrés). Cette forme tronquée de la protéine RT a quelques fois été considérée comme un artéfact du protocole de purification bien que sa présence ait été clairement mise en évidence dans des protoplastes infectés par le BYDV (Filichkin *et al.*, 1994). Comme nous le verrons par la suite, nos travaux ont permis de montrer que les deux formes de la protéine RT pouvaient être détectées dans de la sève prélevée à partir de plantes infectées (Boissinot *et al.*, en préparation).

Avec l'ensemble de ces données il est évident que la protéine RT joue un rôle majeur dans le cycle des polérovirus, notamment au niveau de la transmission par puceron, du mouvement dans la plante et de la restriction tissulaire. Cependant, la compréhension des mécanismes moléculaires conduisant à ces différentes fonctions n'est pas clairement établie. Le rôle respectif des deux formes de la protéine RT (RT entière et RT*) dans le cycle infectieux reste par ailleurs encore mal compris. Afin d'apporter des précisions sur les rôles respectifs des différentes formes de la protéine RT dans le cycle du CABYV, nous avons suivi le comportement infectieux de mutants du CABYV n'exprimant que la forme tronquée ou que la forme complète de cette protéine.

Tableau 24 : Principales données sur les fonctions assurées par la protéine RT des polérovirus.

| Expériences | Résultats | (Références) |
|---|---|---|
| Inoculation de protoplastes de <i>C. quinoa</i> avec un mutant du TuYV ne possédant plus le DRT | Le mutant se réplique et forme des particules virales. Le DRT n'est pas indispensable à la réplication du virus ni à la formation des particules virales. | (Reutenauer <i>et al.</i> , 1993) |
| Agroinoculation de <i>N. clevelandii</i> avec un mutant du TuYV ne possédant plus le DRT | Le mutant est infectieux mais s'accumule moins bien dans les feuilles inoculées et systémiques. Le mutant n'est pas transmis par puceron. Le DRT jouerait un rôle dans l'accumulation du virus, dans le mouvement systémique du virus et dans la transmission par puceron. | (Brault <i>et al.</i> , 1995) (Bruyere <i>et al.</i> , 1997) |
| Inoculation de <i>C. quinoa</i> avec un mutant du CABYV possédant le DRT du TuYV | Faible accumulation de l'ARN viral. La protéine RT hétérologue pourrait perturber l'assemblage de la particule virale et rendre l'ARN plus sensible à l'action des RNases. | (Prufer <i>et al.</i> , 1995) |
| Expression des ORF situées en 3' de l'ARN viral du TuYV à partir du vecteur viral dérivé du BmNPV, dans des cellules de <i>Bombyx mori</i> ou dans des larves de <i>B. mori</i> . | L'expression de la protéine P3-P5 seule ne permet pas la formation de particules virales. L'expression de la P3 permet la formation de particules qui peuvent encapsider l'ARN subgénomique ainsi que d'autres ARN cellulaires. | (Tian <i>et al.</i> , 1995) |
| Inoculation de protoplastes de <i>C. quinoa</i> et agro-inoculation de <i>N. clevelandii</i> avec des mutants du TuYV touchés dans le domaine N-ter du DRT | Très faible accumulation des virus. Les mutants n'induisent pas de symptômes et ne sont pas transmis par puceron. Domaine N-ter du DRT impliqué dans l'incorporation de la protéine RT dans la particule virale. | (Bruyere <i>et al.</i> , 1997) |
| Inoculation de protoplastes de <i>C. quinoa</i> et agro-inoculation de <i>N. clevelandii</i> avec un mutant du TuYV touché dans le domaine C-ter du DRT | Accumulation du virus légèrement plus faible. Présence de symptômes sur les plantes. Les mutants sont transmissibles par puceron. | |
| Agro-inoculation de <i>N. clevelandii</i> avec des mutants du TuYV touchés dans le DRT | Diminution importante du nombre de sites d'infection dans les feuilles systémiques. Le DRT interviendrait dans le mouvement du virus pour augmenter le nombre de points d'infection. | (Mutterer <i>et al.</i> , 1999) |
| Localisation subcellulaire de la RT:GFP exprimée à partir d'un clone complet du PLRV inoculé à des protoplastes de <i>N. benthamiana</i> | Localisation de la RT:GFP dans le cytoplasme, parfois dans des granules et dans des corps très fluorescents associés au nucléole. Virus transmis par puceron mais perd sa capacité à bouger. | (Nurkiyanova <i>et al.</i> , 2000) |
| Localisation dans le corps du puceron, par MET, de mutants du TuYV touchés dans le DRT. | Les virions dépourvus de protéine RT* parviennent à traverser la barrière de l'épithélium intestinal mais avec une faible efficacité. Les particules virales des virus mutants ne sont jamais détectées dans les glandes salivaires même après micro-injection dans le corps de l'insecte. Le DRT est indispensable au franchissement des barrières épithéliales au niveau des glandes salivaires, et de l'intestin pour un passage efficace. | (Reinbold <i>et al.</i> , 2001) |
| Localisation de la RT:GFP après inoculation de <i>N. benthamiana</i> non transgéniques ou exprimant le PLRV | Localisation nucléolaire de la RT:GFP lorsqu'elle est exprimée seule et localisation dans le nucléoplasme en présence du PLRV. | (Haupt <i>et al.</i> , 2005b) |
| Agro-inoculation de mutants du PLRV touchés dans le DRT (4 hôtes testés) | Mutants affectés dans leur morphologie (pas d'incorporation de la protéine RT dans les virions), leur accumulation et mouvement dans la plante. Ces mutants ne sont plus transmis par puceron. Le DRT interviendrait dans l'accumulation et le mouvement dans la plante du PLRV. Le rôle de la protéine RT dans la restriction au phloème pourrait être hôte spécifique. | (Peter <i>et al.</i> , 2008) |
| Agro-inoculation de mutants du PLRV touchés dans le DRT | Mutants affectés dans la synthèse et/ou l'incorporation de la protéine RT. Diminution du nombre de sites d'infection pour certains mutants. Modification des symptômes. L'absence du domaine C-ter de la RT rend le PLRV transmissible mécaniquement. La RT agirait en trans sur le mouvement du virus. Le domaine C-ter de la RT est indispensable au mouvement du virus dans les tissus matures. Il interviendrait dans la restriction du virus au phloème et permettrait le mouvement du virus à travers les cellules de la gaine périvasculaire. | (Peter <i>et al.</i> , 2009) |

B - Résultats : étude du rôle du domaine C-terminal de la protéine RT du CABYV dans le cycle viral

Dans le chapitre 1, nous avons observé que le domaine C-terminal de la protéine RT du CABYV possédait de nombreux partenaires cellulaires ce qui nous a amené à étudier son rôle dans le cycle viral. Pour mener cette étude, nous avons décidé de suivre dans les plantes le cycle infectieux de mutants ne produisant que la protéine RT complète ou que la RT*. Pour ce faire, une série de mutants portant des mutations dans le site potentiel de clivage (ou PCS pour « putative cleavage site ») de la protéine RT ont été obtenus. Parallèlement, un mutant portant une délétion couvrant la partie C-terminale de la protéine RT a également été créé. L'étude de l'accumulation de ces mutants dans les plantes ainsi que de la composition de leurs particules virales a montré que ce domaine est essentiel pour le mouvement à longue distance du CABYV. Les résultats obtenus suggèrent également que le clivage de la protéine RT est affecté par la structure secondaire de la protéine RT à proximité du site de clivage. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication en préparation qui sera soumise à la revue *Journal of Virology*. Des résultats complétant cette étude, et non inclus dans cet article, sont présentés dans ce chapitre. Ils seront suivis d'une discussion qui reprend en partie la discussion de l'article en préparation.

B.1. Both structural and non-structural forms of the RT protein of CABYV are essential for efficient systemic infection of plants. S. Boissinot, M. Erdinger, B. Monsion, V. Ziegler-Graff and V. Brault. *Submitted to Journal of virology*, Dec. 2012.

Article en préparation (cf page suivante)

Both structural and non-structural forms of the readthrough protein of *Cucurbit aphid borne yellows virus* are essential for efficient systemic infection of plants

^{1,2}S. Boissinot, ^{1,2}M. Erdinger, ^{1,2,3}B. Monsion, ³V. Ziegler-Graff and ^{1,2}V. Brault#

¹INRA, UMR 1131 SVQV, 28 rue de Herrlisheim, F-68021 Colmar, France

²Université de Strasbourg, 4 rue Blaise Pascal, F-67081 Strasbourg, France

³CNRS, IBMP, UPR 2357, 12 rue du Général Zimmer, F-67084 Strasbourg, France

#veronique.brault@colmar.inra.fr

Abstract

Cucurbit aphid borne yellows virus (CABYV) is a polerovirus (*Luteoviridae* family) whose capsid is composed of the major coat protein and a minor component referred to as the readthrough (RT) protein. Two forms of the RT protein were reported: a full-length protein of 74 kDa detected in infected plants and a truncated form of about 55 kDa (RT*) incorporated into virions. Both forms were detected in CABYV-infected plants. To better understand the specific roles of both proteins in the viral life cycle, we generated a polerovirus mutant able to synthesize only the RT* protein and to incorporate it into the particle. This mutant was unable to move over long distances demonstrating that the RT* protein alone is not sufficient for efficient CABYV transport. Among a collection of CABYV mutants bearing point mutations in the central domain of the RT protein, we obtained a mutant impaired in correct processing of the RT protein and therefore producing only the full-length RT protein. This mutant showed very weak systemic infection. These data infer that both RT proteins are required for a productive movement of CABYV. Virus transport was nevertheless possible in the absence of any RT protein, suggesting an RT-independent movement. Based on these results, we propose a model for long distance CABYV transport in which the complete RT protein, or its C-terminal part, acts *in trans* on wild-type virions to promote their efficient long-distance transport. Moreover, we showed that RT protein processing is affected by the secondary structure around the cleavage site.

Materiel and methods

Generation of CABYV mutants

All point mutants were created by PCR mutagenesis using pCA-WT as template (Prüfer *et al.*, 1995). The mutagenic primers were designed to substitute successively a series of two to three amino acids by two or three alanines around the putative cleavage site of the RT protein (Figure 40). The PCR products bordered by the *EagI* and *Sall* restriction sites were further introduced into the pCA-WT plasmid digested by the same enzymes giving nine constructs referred to as pCA-PCS (Putative Cleavage Site). Another mutant (PCS3+) was obtained which contains a tryptophan in addition to three alanine substitutions. Vectors for agroinfection were made by replacing the *AgeI-Sall* fragment of pBin35SCA-WT with the mutated *AgeI-Sall* fragment from the pCA-PCS constructs. All PCS constructs presented on Figure 40 were obtained following this procedure except PCS4 which was constructed using the QuickChange Lightning Site-Directed Mutagenesis Kit [Agilent Technologies] to introduce directly the mutations in pBin35SCA-WT following manufacturer instructions. In order to obtain CABYV-RT Δ C_{ter}, two unique restriction sites were first introduced into pCA-WT. *NheI* was placed right after the CP-stop codon and *MluI* (nt 5481) 25 nucleotides upstream the RT protein stop codon. The resulting plasmid was referred to as pCA-NM3. To produce CABYV-RT Δ C_{ter}, pCA-WT was used as a template to amplify the N-terminal domain of ORF5 from nt 4098 to 4890 (nucleotide positions referred to accession NC 003688) with primers containing *NheI* and *MluI* restriction sites. The resulting PCR product, cleaved with *NheI* and *MluI*, was introduced in pCA-NM3 digested with the same enzymes. The vectors for agroinfection were made as described above for the PCS mutants, leading to CABYV-NM3 and CABYV-RT Δ C_{ter} (Figure 40). All the PCR-amplified fragments were further sequenced to confirm that no additional mutations were added during the PCR reaction. The binary plasmids bearing the CABYV mutated sequences were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1 for agroinfection (Prüfer *et al.*, 1995).

Plant inoculation, virus detection by ELISA and virus purification

A. tumefaciens harboring the mutant constructs was grown to an optical density of 0.5 at 600 nm and agroinfiltrated to *Montia perfoliata* (Prüfer *et al.*, 1995). Infected plants were identified 2 to 4 weeks post-inoculation by double-antibody sandwich (DAS) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Clark & Adams, 1977) with a rabbit polyclonal antiserum raised against CABYV (SEDIAG, France). Virions were purified from agro-infected or agro-infiltrated leaves as described previously (Van den Heuvel *et al.*, 1991).

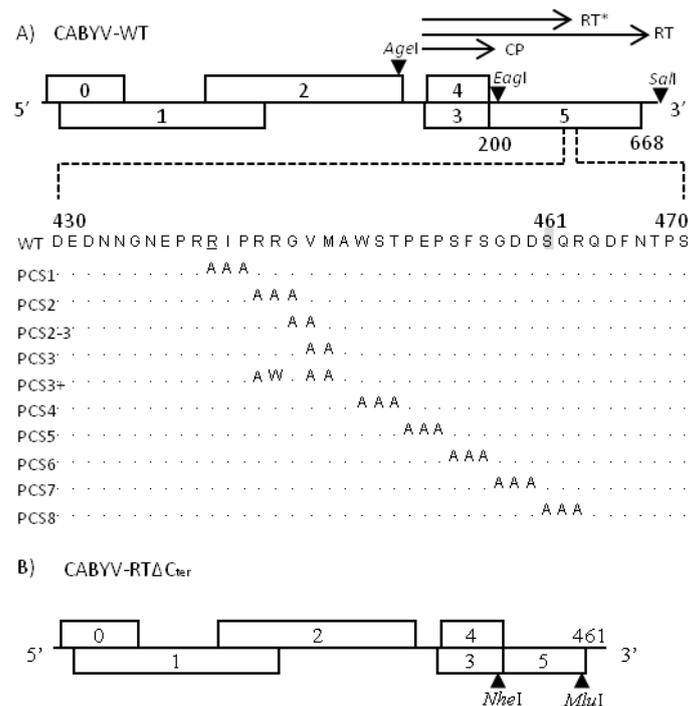


Figure 40: Schematic representation of CABYV mutants. A) Genetic organization of CABYV RNA with the position of the encoded structural proteins (CP and RT*) and the full-length RT protein (RT) (arrows). The wild-type amino acid sequence (amino acid 430 to 470) of the region on the CABYV RT protein targeted by alanine scanning is shown below with the corresponding changes of the ten PCS mutants. The underlined R represents the C-terminal amino acid identified by mass spectrometry on the CABYV-RT* protein (Revollon *et al.*, 2010). The grey-shaded serine is considered as the putative C-terminal amino acid on RT*. B) Generation of CABYV-RTΔC_{ter} deletion mutant. *NheI* and *MluI* restriction sites originally introduced in CABYV-NM3 to obtain CABYV-RTΔC_{ter} mutant are positioned. Position of important amino acids on the RT protein sequence is indicated.

Western-blotting and analysis of viral progeny RNA

Viral proteins present in total extracts of infected plants, in sap collected from infected cucumbers (Bencharki *et al.*, 2010b) or in purified virions, were detected by Western-blot using a CABYV polyclonal antiserum (Lecoq *et al.*, 1992) or a CABYV-RT-C_{ter} specific antiserum (Brault *et al.*, 2005). Detection of viral proteins was performed with the Lumi-Light Western-Blotting Substrate (Roche). The stability of the mutations in viral progeny following agroinfection was examined in two infected plants per construct, by amplifying a DNA fragment spanning the mutation site by reverse transcription-PCR. Reverse transcription was primed using an oligonucleotide complementary to CABYV nt 4987 to 5004, and a PCR fragment was synthesized with the same primer and an oligonucleotide corresponding to nt 4653 to 4670. The PCR products were further sequenced. To analyze CABYV-NM3 viral progeny, reverse transcription was primed with two oligonucleotides, one downstream the *NheI* restriction site from nt 4780 to 4800, and the second downstream the *MluI* restriction site from nt 5653 to 5670. PCR products spanning the CABYV sequence from nt 3822 to 4800 and from 4891 to 5670 were sequenced.

Mass spectrometry

Mass spectrometry was conducted at the proteomic facility hosted at the Institute of Molecular and Cellular Biology of Strasbourg (France). Samples were prepared as described in Hamrita *et al.* (2011). MALDI-TOF-MS and Nano LC-MS-MS analyses were performed following the procedure given in Bencharki *et al.* (1).

Introduction

Cucurbit aphid borne yellows virus (CABYV) is a member of the *Polerovirus* genus in the *Luteoviridae* family (Guilley *et al.*, 1994). Poleroviruses are strictly transmitted by aphids in a circulative and non-propagative manner (Brault *et al.*, 2010b). Polerovirus movement in the plant is limited to phloem tissues: cell-to-cell movement is restrained to vascular parenchyma cells, companion cells and the enucleated sieve elements whereas long distance movement follows the sieve elements. Because polerovirus particles were detected in plasmodesmata connecting phloem cells (Esau & Hoefert, 1972; Mutterer *et al.*, 1999; Shepardson *et al.*, 1980), virions are supposed to be the moving viral device. Polerovirus isometric particles of about 25 nm of diameter contain two structural proteins: the major coat protein (CP) encoded by ORF3 and a minor component, also referred to as the readthrough (RT) protein, which is synthesized after ribosomes bypass the ORF3 stop codon during translation. The RT protein is incorporated into the capsid by its CP moiety, with the RT domain protruding from the virion surface (Brault *et al.*, 1995; Cheng *et al.*, 1994). Whereas the full-length RT protein of 74 kDa is readily detected in infected plants, a C-terminal truncated version of the protein of about 55 kDa, thereafter referred to as RT*, is incorporated into virions (Brault *et al.*, 1995; Filichkin *et al.*, 1994; Jolly & Mayo, 1994; Wang *et al.*, 1995). The RT* protein was observed in crude extracts of plants and protoplasts infected with *Barley yellow dwarf virus* (*Luteovirus* genus, *Luteoviridae* family) suggesting that cleavage of the RT protein is not due to fortuitous degradation but reflects a conserved, presumably biologically significant processing event (Filichkin *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1995). The identification of viral proteins or viral domains involved in polerovirus movement has been the subject of numerous studies. Poleroviruses encode a movement protein (P4) that in spite of cellular and biochemical characteristics of movement proteins (Hofius *et al.*, 2001; Schmitz *et al.*, 1997; Sokolova *et al.*, 1997; Tacke *et al.*, 1991; Tacke *et al.*, 1993) cannot support virus movement outside phloem cells. Interestingly, this protein was shown to be host-dependent, suggesting the existence of a P4-independent transport of poleroviruses in some plants (Lee *et al.*, 2002; Ziegler-Graff *et al.*, 1996). The CP that is essential for particle formation is also required for virus movement (Ziegler-Graff *et al.*, 1996). Conversely, the RT* protein that is crucial for aphid

transmission, was found dispensable for BYDV and *Turnip yellows virus* (TuYV) transport (Brault *et al.*, 1995; Chay *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1995). However, the ability of virions deprived of RT* proteins to invade the plant was greatly impaired (Brault *et al.*, 1995; Chay *et al.*, 1996; Peter *et al.*, 2009) and the number of infection foci along sieve elements was also greatly reduced (Mutterer *et al.*, 1999). Besides the involvement of the RT* protein in viral movement, implication of the non-structural C-terminal domain of the RT protein in virus accumulation in plants was also shown using TuYV-deletion mutants (Bruyère *et al.*, 1997). Plant infection of RT-engineered mutants of TuYV and *Potato leafroll virus* (PLRV, *Polerovirus* genus) suggests that the complete RT protein cannot fully act *in trans* on the transport of virions deprived of RT* proteins (Bruyère *et al.*, 1997; Peter *et al.*, 2008). To add to the complexity in the function of the polerovirus RT protein in virus movement, recent data suggested that the RT protein of PLRV could act *in trans* on virions to retain virus particles in the phloem where they are available for aphids sampling (Peter *et al.*, 2009). Beside its role in aphid transmission, virus movement and phloem limitation, the RT protein is also involved in aphid endosymbiont interactions, virus transport through aphid's gut cells and intestinal tropism (Brault *et al.*, 2000; Brault *et al.*, 2005; Brault *et al.*, 1995; Bruyère *et al.*, 1997; Peter *et al.*, 2009; Peter *et al.*, 2008; Reinbold *et al.*, 2001; van den Heuvel *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1995). The major difficulty to study precisely the involvement of both RT proteins (full-length and truncated forms) in polerovirus dissemination throughout the plant is linked to the inability to obtain a polerovirus mutant able to synthesize and incorporate the RT* protein into virions without producing the full-length RT protein. Indeed, all attempts to delete the C-terminal half of the RT protein led to the inhibition of its synthesis or its anchoring into the particles (Bruyère *et al.*, 1997; Peter *et al.*, 2008). These failures arose from the requirement of internal nucleotide RT sequences necessary for the readthrough translation mechanism and for the RT* protein incorporation into virions (Brown *et al.*, 1996; Bruyère *et al.*, 1997).

CABYV, a polerovirus infecting cucurbits (Lecoq *et al.*, 1992), was used in this study to unravel the role of the two RT proteins (full-length and truncated versions) in viral long distance transport. By analysing virus movement of a set of CABYV mutants modified either by deletion or point mutations in the RT sequence, we could show that the RT protein cleavage is affected by the protein conformation around the cleavage site and that the C-terminal part of the RT protein is essential for CABYV systemic movement. Based on these results, we propose a model showing the requirement of both RT proteins for virus export to sieve elements.

Results

The RT* protein of CABYV is present in sap collected from infected cucumbers

The complete RT protein of poleroviruses (74 kDa theoretical MW) was previously detected in total protein extracts prepared from infected plants. On the other hand, the truncated version of the protein (RT*) that represents the only form incorporated into virions (Brault *et al.*, 1995; Jolly & Mayo, 1994) was so far only reported in BYDV-infected plant extracts (Filichkin *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1995). RT* proteins lack about 22 kDa at the C-terminal domain of the RT protein. Absence of detection of the RT* protein in polerovirus-infected plants may originate from a lack of sensitivity of the antibodies used for its detection, or from a rapid degradation of the protein in its unassembled form. We took advantage of the ability of CABYV to infect cucumber plants, from which sap can be easily collected, to investigate the presence of the RT* protein in sieve elements. While the complete CABYV-RT protein of apparent MW of 95 kDa was present in infected *C. sativus* and *M. perfoliata*, no RT* protein could be detected in total plant extracts (Figure 41-A). Conversely, a band of about 55 kDa was specifically observed in sap collected from infected cucumber plants (Figure 41-B) and could very likely correspond to the RT* protein. Contrarily to the complete RT protein that was easily and reproducibly detected in sap samples from infected plants, the 55 kDa product was not always detected. Similarly, the observation by transmission electron microscopy of virions in sap samples collected from infected *C. sativus* was not possible to reproduce repeatedly (Figure 41-C). This suggests that virions are not evenly distributed in the sap. In conclusion, the presence of virions in sieve elements correlates with the detection of the RT* protein.

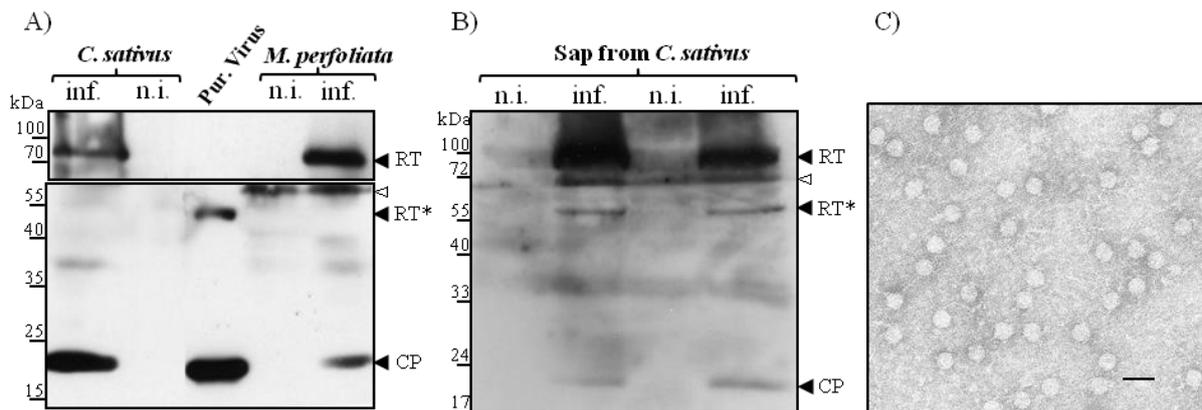


Figure 41: Detection of CABYV proteins and virions in infected *C. sativus* and *M. perfoliata*. A) Immunodetection by Western-blot of CABYV proteins in extracts prepared from infected *C. sativus* or *M. perfoliata* or from purified virus. A CABYV polyclonal antiserum was used to detect the major coat protein (CP) and the truncated form of the RT protein (RT*) (lower panel) whereas a CABYV-RT_{C_{ter}} specific antiserum detected only the complete RT protein (upper panel); B) Immunodetection by Western-blot of CABYV proteins in sap extract collected from infected *C. sativus*. The antisera mentioned above were mixed for the detection of the viral proteins. Positions of the molecular markers (in kDa) are indicated on the left. The white triangle on the Western-blot (ca 60 kDa) indicates a cross reaction of the antibodies with a plant protein. inf.: infected plant; n.i.: non-infected plant; Pur. Virus: Purified virus. C) Observation by transmission electron microscopy of virus-like particles from sap collected from infected cucumber plants. The grids were coated with a CABYV-polyclonal antiserum before addition of sap extract. The bar corresponds to 50 nm.

Infectivity of CABYV-mutants affected in the RT protein

To address the biological functions of the CABYV RT-derived proteins (complete and truncated) in the virus cycle, we engineered virus mutants able to generate either the complete RT protein or the RT* protein. In order to obtain virus mutants affected in RT protein processing, point mutations were introduced around the putative cleavage site in the RT protein sequence located approximately in the middle of the RT protein. The arginine at position 440 in the CABYV-RT is the C-terminal amino acid of the RT* protein identified by mass spectrometry (Revollon *et al.*, 2010) suggesting that the RT protein cleavage must occur at any close position downstream of it. Starting from this position, downstream amino acid pairs or triplets were sequentially changed into two or three alanines along a 24 amino acid stretch, leading to eight CABYV mutants, referred thereafter as PCS 1-8 mutant for “Potential Cleavage Site” mutant (Figure 40-A). To design a virus mutant able to synthesize solely a truncated RT protein similar to that incorporated into viral particles, the serine at position 461 was tentatively assigned as the last amino acid of the RT* protein. Therefore, 205 amino acids of the C-terminal part of the RT protein sequence was deleted from CABYV-NM3, a full-length clone containing two unique restriction sites, *NheI* and *MluI*, respectively downstream and upstream of the ORF3 and ORF5 stop codons (Figure 40-B). Note that due to the cloning strategy, this mutant referred to as CABYV-RT Δ C_{ter} displays altered amino acids: two around the ORF3 stop codon and three amino acids at the C-terminus of the protein (Figure 42, supplementary data). Full-length viral cDNAs, containing the mutated or deleted RT sequences, were moved into a binary vector for agroinoculation of *M. perfoliata*.

Four weeks post-inoculation, the ability of the mutants to move systemically was tested by ELISA on newly-developed non-inoculated leaves. It should be pointed out that CABYV accumulation in infected plants, measured by ELISA, is reproducibly subjected to high variations between plants as revealed by the high standard deviation values observed with the wild-type virus (Tableau 25). This may reflect heterogeneous partitioning of CABYV in infected plants. All twelve mutants were able to invade non-inoculated tissue, except CABYV-RT Δ C_{ter} which was never detected by ELISA in young non-infiltrated leaves of *M. perfoliata* (Tableau 25), nor by RT-PCR performed on RNA extracted from non-inoculated leaves (data not shown). However, CABYV-RT Δ C_{ter} was readily detectable by ELISA in agroinfiltrated leaves (Tableau 25), and in plant protoplasts inoculated with *in vitro*-synthesized mutant transcripts (data not shown). Although CABYV-NM3 that generated CABYV-RT Δ C_{ter} accumulated in *M. perfoliata* less than the wild-type virus, the percentage of infected plants was high (87%), suggesting that the amino acid modifications introduced into CABYV-NM3 (Figure 42, sup. data) and present in CABYV-RT Δ C_{ter}, did not affect whether or not the virus can infect plants but rather reduced virus titre (Tableau 25). The deficiency of this mutant to reach systemic leaves was not restricted to *M. perfoliata* as no accumulation of CABYV-RT Δ C_{ter} was recorded in non-inoculated

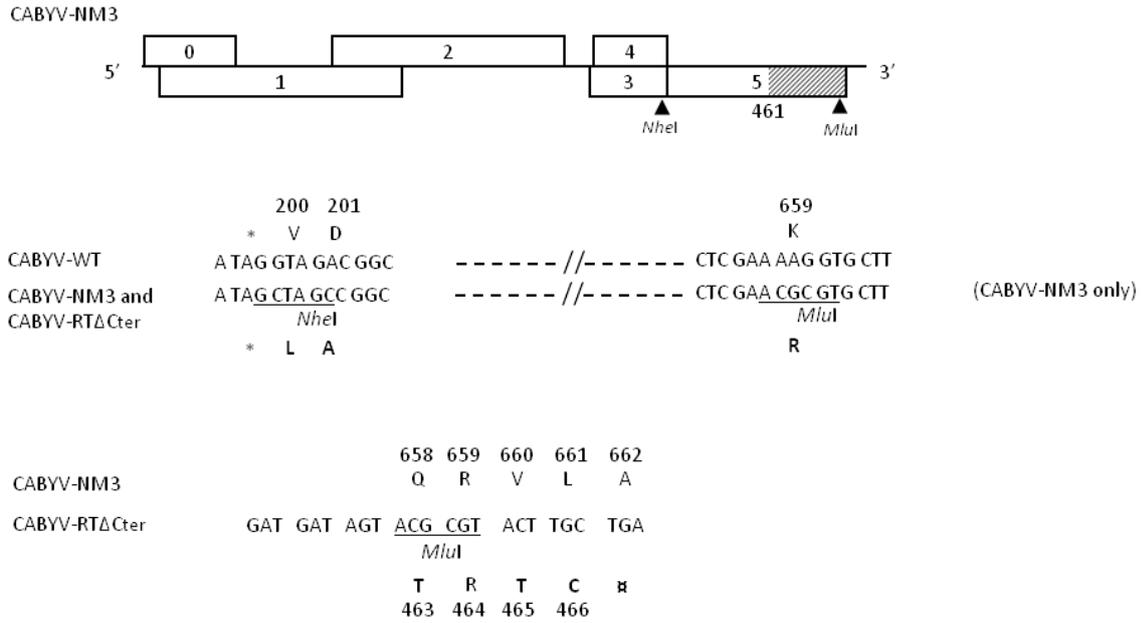


Figure 42: Schematic representation of CABYV-NM3 used to obtain CABYV-RTΔC_{ter}. The unique *NheI* and *MluI* restriction sites introduced in CABYV-NM3 are indicated and the position of the deletion of the RT protein sequence (cross-hatched lines) in CABYV-RTΔC_{ter} is shown. Nucleotide modifications introduced in CABYV-NM3 and CABYV-RTΔC_{ter} genomes are shown together with the corresponding amino acid changes. *: ORF3 stop codon; ♂: ORF5 stop codon. Amino acids are indicated by single code letters, those in bold are mutated. The numbers refer to amino acid positions on the RT protein sequence.

Tableau 25 : Virus accumulation in *M. perfoliata* agroinoculated with CABYV mutants

| Virus | Non-inoculated leaves ^a | | Inoculated leaves ^a | |
|---------------------------|--------------------------------------|--------------------|--------------------------------|-------------|
| | Nb of inf. plants/total ^b | ELISA ^c | Nb of inf. plants/total | ELISA |
| PCS1 | 2/35 (6%) | 0.23 ± 0.13 | 10/10 | 1.09 ± 0.15 |
| PCS2 | 19/25 (76%) | 1.18 ± 0.64 | / | |
| PCS2-3 | 6/12 (50%) | 0.99 ± 0.37 | / | |
| PCS3 | 17/32 (53%) | 1.78 ± 0.55 | / | |
| PCS3+ | 2/28 (7%) | 0.30 ± 0.01 | 10/10 | 0.93 ± 0.18 |
| PCS4 | 21/25 (84%) | 1.75 ± 0.93 | / | |
| PCS5 | 22/25 (88%) | 1.19 ± 0.67 | / | |
| PCS6 | 23/25 (92%) | 1.60 ± 0.85 | / | |
| PCS7 | 18/25 (72%) | 0.85 ± 0.39 | / | |
| PCS8 | 19/25 (76%) | 1.11 ± 0.63 | / | |
| CABYV-RTΔC _{ter} | 0/23 (0%) | 0.15 ± 0.04 | 10/10 | 1.08 ± 0.23 |
| CABYV-NM3 | 20/23 (87%) | 0.65 ± 0.21 | 10/10 | 1.08 ± 0.21 |
| CABYV-WT | 67/84 (80%) | 1.31 ± 0.67 | 10/10 | 1.06 ± 0.23 |
| Non-inoc. | 0/11 (0%) | 0.12 ± 0.02 | 0/3 | 0.12 ± 0.00 |

^aNon-inoculated and inoculated leaves were tested by ELISA 4 or 1 week post-inoculation respectively.

^bNumber of *M. perfoliata* plants infected/number of plants agroinoculated. In brackets, the percentage of infected plants.

^cMean absorbance ± standard error of infected plants at 405 nm after substrate incubation.

leaves of *Arabidopsis thaliana* or *C. sativus*, two additional hosts of CABYV (Tableau 26, sup. data). In order to analyse if the deletion introduced in CABYV-RT Δ C_{ter} affected virus loading in sieve tubes or unloading from these cells, presence of CABYV-RT Δ C_{ter} was assayed in non-viruliferous aphids fed for 48h on systemic leaves of agroinoculated *C. sativus*. Because CABYV-RT Δ C_{ter} virions possess CP and RT* proteins required for efficient virus acquisition in the hemolymph (30), longstanding feeding of aphids in sieve tubes is supposed to concentrate virions in the insect's body. Presence of the viral RNA in the aphids was assayed by RT-PCR. Whereas CABYV-NM3 was detected in aphids fed on non-inoculated leaves of plants infected with CABYV-NM3, no signal was observed in the RNA samples prepared from aphids fed on plants inoculated with CABYV-RT Δ C_{ter}. This result suggests that virus loading from nucleated cells to sieve elements is perturbed when the complete RT protein is not produced in infected cells (Figure 43, sup. data).

Tableau 26: Virus accumulation in *C. sativus* or in *A. thaliana* agroinoculated with CABYV mutants.

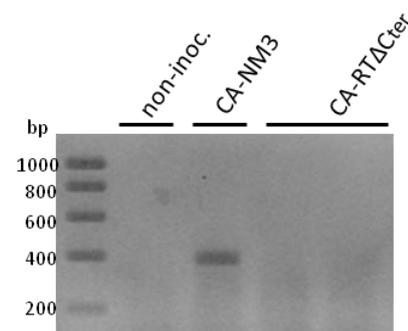
| Virus | <i>C. sativus</i> | | <i>A. thaliana</i> | |
|------------------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------|-----------|
| | Nb inf. plants/total | ELISA | Nb inf. plants/total | ELISA |
| CABYV-WT | 8/8 (100%) ^a | 0.86±0.43 ^b | 7/12 (58%) | 1.48±0.41 |
| CABYV-NM3 | 7/8 (87.5%) | 0.52±0.18 | 4/12 (33%) | 1.20±0.40 |
| CABYV-RT Δ C _{ter} | 0/8 (0%) | 0.15±0.01 | 0/10 (0%) | 0.11±0.00 |
| Non-inoc. ^c | 0/3 (0%) | 0.14±0.01 | 0/3 (0%) | 0.14±0.02 |

^aNewly developed leaves were tested by ELISA 2 weeks post-inoculation with an antiserum raised against CABYV. Number of plants infected out of total number of plants tested. In brackets, the percentage of infected plants.

^bMean absorbance ± standard error of infected plants at 405 nm after substrate incubation.

^cNon-Inoc.: Non-inoculated plants.

Figure 43: Assessment of the presence of CABYV-RT Δ C_{ter} in sieve elements of *C. sativus* by RT-PCR. 30 aphids fed on systemic leaves of *C. sativus* agroinoculated with CABYV-NM3 (one batch) or CABYV-RT Δ C_{ter} (two batches of aphids collected from different plants) were pooled before total RNA extraction. RT-PCR was designed to amplify a 386 pb fragment in the CP sequence. Non-inoc.: aphids fed on non-inoculated *C. sativus*.



In addition to CABYV-RT Δ C_{ter}, two point mutants, PCS1 and PCS3+, were greatly impaired in their infectivity and accumulated significantly less than the wild-type virus in systemic leaves (pvalues calculated after Kruskal-Wallis analysis: 1.0e-12, 1.6e-2 and 1.6e-2 for CABYV-RT Δ C_{ter}, PCS1 and PCS3+ respectively, Tableau 25). However, the virus level within the infiltrated areas of the leaf was not different from the wild-type virus, as determined by ELISA, indicating that virus multiplication

was not affected for any of these two mutants (Tableau 25). All other PCS mutants accumulated in plants at levels not significantly different from the wild-type virus (Tableau 25).

As RNA genome viruses are subject to relatively high mutation rates during replication, we investigated the stability of the point mutations introduced in the PCS mutants. Total RNA was extracted from systemic leaves of infected plants and cDNA spanning the mutation site (from nt 4652 to 4958) was amplified by RT-PCR and further sequenced. All modifications introduced into the RT sequence were conserved in the viral progeny of the corresponding PCS mutants. In the case of PCS1, the viral progeny showed a synonymous mutation at nucleotide 4767 in one of the two plants analyzed. A non-synonymous mutation also appeared at position 4663 in the viral progeny of PCS5 in one of the two plants analyzed. This modification, that changed the cysteine residue at position 386 on the RT sequence into a serine (66 amino acids before the first mutation introduced in PCS5), had no obvious effect on the infectivity of PCS5 because it was readily detected in non-inoculated leaves of *M. perfoliata*.

Accumulation of the mutated RT proteins *in planta*

The effect of the mutations introduced in the RT protein sequence on its accumulation was investigated by Western-blot analysis on protein extracts prepared from plants inoculated with the different RT-mutants. Both CP and full-length RT proteins (95 kDa apparent MW) were detected in systemic leaves of plants infected with all PCS mutants, except for PCS1, PCS3+ and CABYV-RT Δ C_{ter} (Figure 44-A). No viral (CP or RT proteins) was detected in non-inoculated leaves, what is in accordance with the low or the absence (in the case of CABYV-RT Δ C_{ter}) of virus accumulation in systemic tissue (Tableau 25). Detection of the CP and RT proteins was further investigated by analyzing the protein content of leaves inoculated with PCS1, PCS3+ and CABYV-RT Δ C_{ter}. Whereas the major CP was readily detected in leaves agro-inoculated with the three mutants, the complete RT protein (apparent MW 95 kDa) was only observed in plants infiltrated with PCS3+, although at a lower level than with the wild-type virus (Figure 44-B). Surprisingly, no RT protein was detected in leaves inoculated with PCS1 suggesting that the mutations introduced in the RT protein sequence may have affected either the readthrough translation mechanism or the stability of the mutated RT protein (Figure 44-B). Similarly, no protein was observed in *C. quinoa* protoplasts infected with PCS1-*in vitro* synthesized transcripts (data not shown). The C-terminally deleted RT protein in CABYV-RT Δ C_{ter} (52 kDa theoretical MW) migrated with an apparent MW of about 57 kDa, slightly above the electrophoretic mobility of the RT* protein incorporated into wild-type virus particles (Figure 44-C and data not shown). Taken together, these results suggest that most mutations introduced in the potential cleavage site of the RT protein (7 mutants out of 10) did not affect the RT protein synthesis, nor the viral infectious cycle. Conversely, PCS1 and CABYV-RT Δ C_{ter} producing respectively no RT

protein or only a C-terminal deleted version were impaired in their ability to move systemically in infected plants. Finally, the long-distance movement of PCS3+ that expresses lower levels of the RT protein was also impacted.

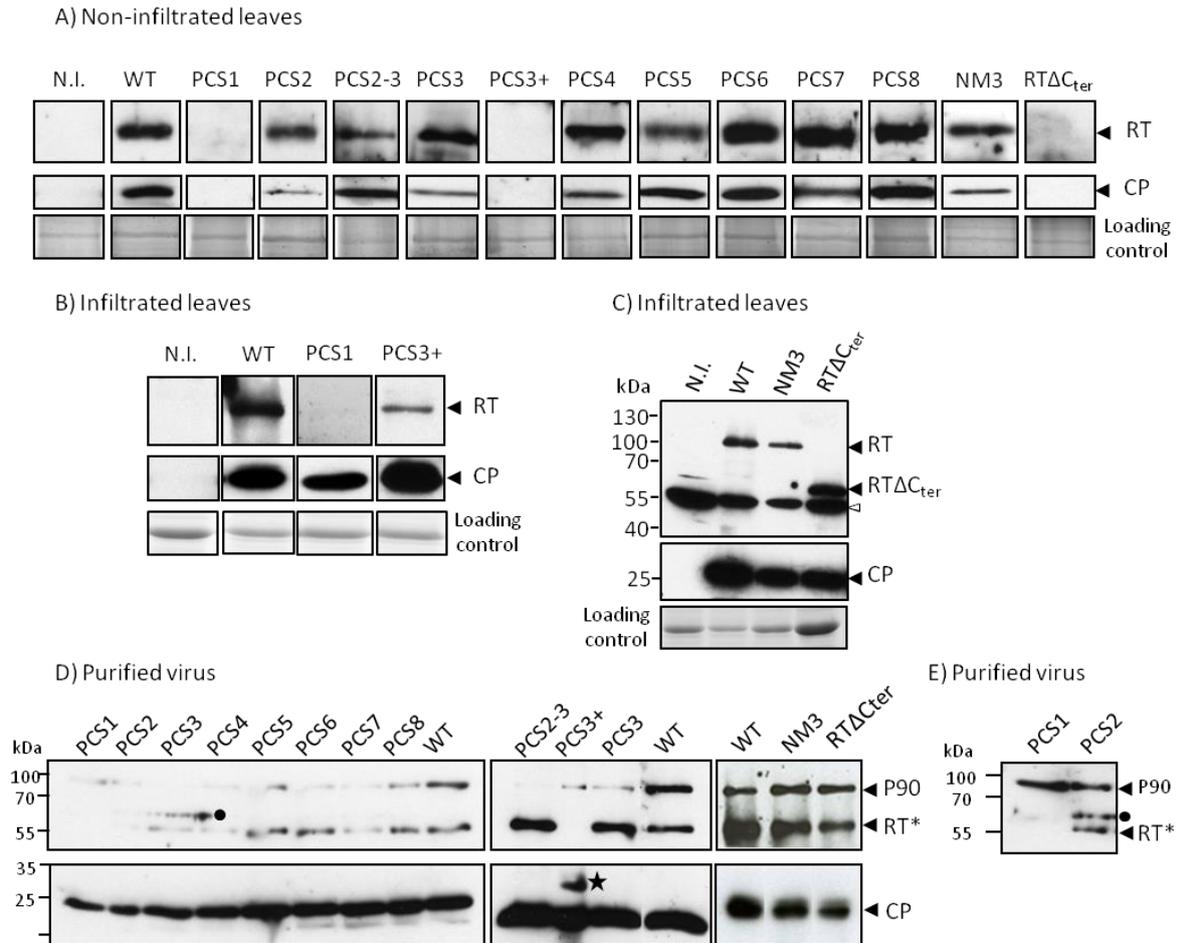


Figure 44: Synthesis of the RT protein by CABYV mutants and incorporation of the RT* into purified virions. A) Western-blot analysis on proteins extracted from non-infiltrated leaves of *M. perfoliata* inoculated with PCS mutants. This analysis was performed on several plants for each mutant but only one sample per mutant is presented in the figure. The middle panel was incubated with an antiserum directed against CABYV virions whereas antibodies directed against the C-terminal part of CABYV-RT protein were used for the upper panel. B) Western-blot analysis of proteins extracted from infiltrated leaves of *M. perfoliata* inoculated with WT, PCS1 or PCS3+ mutants. Immunodetection was done as in (A). C) Western-blot analysis on proteins extracted from infiltrated leaves of *M. perfoliata* inoculated with CABYV-RT Δ C_{ter}. The antisera mentioned previously were mixed for the detection of the viral proteins. Bottom panels of A, B and C are stained with Coomassie blue. Positions of the molecular markers (in kDa) are indicated on the left in (C). WT: wild-type virus; N.I.: non-inoculated plant; white triangle (ca. 53 kDa) indicates a cross reaction of the antibodies with a plant protein. D) Protein composition of CABYV mutant particles. Western-blot analysis of capsid proteins in CABYV mutant particles prepared from agroinfected *M. perfoliata*. E) Longer exposure time of the blot presented in (D) for PCS1 and PCS2 samples. Immunodetections were performed using antibodies directed against CABYV-virions. Black circles indicate cross reactions of the antibodies with a plant protein observed in all virus preparations but sometimes after a longer exposure of the blot; black star: viral protein of 30 kDa present in PCS3+ purified particles; WT: wild-type virus. NM3: CABYV-NM3; RT Δ C_{ter}: CABYV-RT Δ C_{ter}.

Cleavage of the RT protein and incorporation of the RT* protein into virions

The ability of the mutated RT proteins to be correctly processed and incorporated into viral particles was further addressed by analyzing protein composition of purified virus particles prepared from infected plants. We assumed that if the RT* protein was properly released or expressed from the virus mutants it would be incorporated into virions. The purified virus mutants were prepared from systemic leaves of *M. perfoliata* infected with the different viruses, or from agro-inoculated leaves for PCS1, PCS3+ and CABYV-RT Δ C_{ter} whose accumulation in systemic leaves was non-existent or too low to permit purification of virions. The major CP (ca. 24 kDa) was detected in all virus preparations (Figure 44-D) and the RT* protein of apparent MW of 55 kDa was present in the particles of mutants PCS2-3, PCS3, PCS4, PCS5, PCS6, PCS7, PCS8 (Figure 44-D). Detection of a band of 55 kDa in CABYV-RT Δ C_{ter} particles suggested that the 57 kDa RT protein produced by this mutant *in planta* still contains the RT protein cleavage site and is further processed. After a longer exposure of the blot, the RT* protein was also observed in PCS2 virus particles (Figure 44-E). Unsurprisingly, no RT* protein was anchored into PCS1 particles, as no complete RT protein was detected in plants infected with this mutant. Interestingly, despite the synthesis of the complete RT protein in PCS3+ infected plants (Figure 44-B), no band of 55 kDa was detected in the virions, even after a prolonged exposure of the blot (Figure 44-D). Using the antibodies directed against CABYV, an additional smaller band of about 30 kDa was reproducibly detected in the purified particles of PCS3+ (Figure 44-D). It should be mentioned that although PCS1 and PCS3+ particles had different protein compositions compared to the wild-type virus, they both produced virions indistinguishable from the CABYV wild-type by transmission electron microscopy (Figure 45, sup. data). This confirms that virion structure is independent of the presence of the RT* protein as previously reported for other members of the *Luteoviridae* family (Filichkin *et al.*, 1994; Reutenauer *et al.*, 1993).

A high molecular weight protein (ca. 90 kDa) was also present in all purified virus samples, sometimes visible only after a longer exposure of the blot. This protein, referred to as P90, is recognized by virus-targeted antibodies and was previously identified as a plant protein by mass spectrometry (Revollon *et al.*, 2010). Identification of this protein was moreover confirmed by its strong interaction with anti-P90 specific antibodies (Figure 46-A, sup. data). However, to definitively discard the presence of the RT protein in the purified PCS mutant virions, the blot was incubated with antibodies directed against the C-terminal part of the protein. No molecular weight-protein of 95 kDa (apparent MW of the full RT protein) was detectable in the purified virus extracts of any PCS mutants confirming that no unprocessed RT proteins are incorporated into virus particles (Figure 46-B, sup. data).

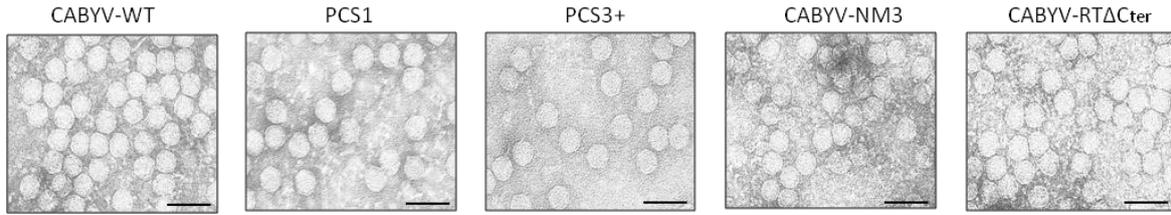


Figure 45: Negatively stained viral particles of CABYV-WT, PCS1, PCS3+, CABYV-NM3 and CABYV-RTΔC_{ter} observed by transmission electron microscopy (TEM). A CABYV polyclonal antiserum was used to capture virus particles on the grids before TEM. Bars correspond to 50 nm.

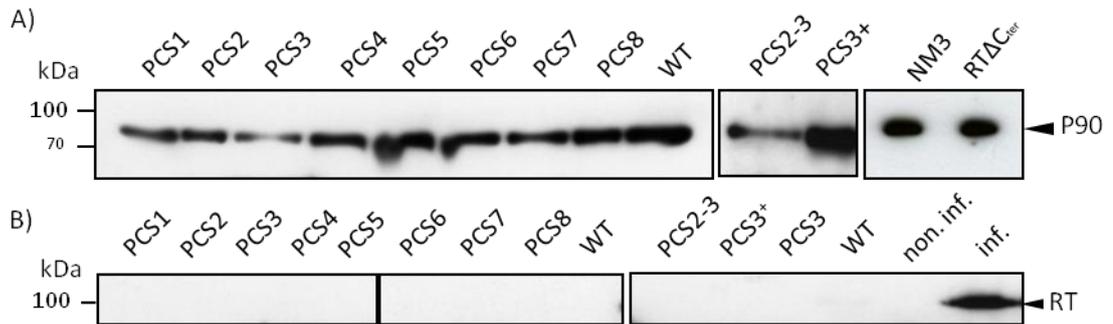


Figure 46: Western-blot analysis of protein contents of purified mutant viruses. A) Immunodetection using antibodies directed against the P90 protein, a plant protein of 90 kDa reproducibly present in virus purified preparations prepared from infected *M. perfoliata*. B) Immunodetection using antibodies directed against the C-terminal part of CABYV-RT protein. Positions of molecular markers (in kDa) are indicated on the left. WT: wild-type virus; non.inf.: non-infected plant tissue; inf.: infected plant extract.

```

1  MNTVAARNQN  AGRRRRRNQR  PARRDRVVVV  NPIGGPPRGR  RQRNRRRPN
51  RGGRARRGSP  GETFVFSKDN  LTGSSTGSIT  FGPSLSESPA  FSSGILKAYH
101 EYKIIMVQLE  FISEASSTSS  GSISYELDPH  CKLSSLQSTI  NKFGITKSGL
151 RRWTAKQING  MEWHDATEDQ  FKILYKNGS  SSVAGSFRIT  IKCQVQNPK*
201 VDGSSPPPPS  PSPTPPPPPP  PQQPQPCAQ  RFWGYEGNPQ  NKILTAENSR
251 NIDSRPLNFV  QMYKWEDEKW  DKVNLQAGYS  RNDRRCMETY  LTIPADKGF
301 HVYLEADGEF  VKHIGDELD  GSWLGNIAVD  VSQRGWNVGN  YKGCKITNYQ
351 SNTVFVAGHP  DATMNGKSF  TARAVEVDWF  ASFELECDDE  EGSWAIYPPP
401 IQKDSSYNYT  VSYGNYTEKY  CEWGAISVSI  DEDNNGNEPR  RIPRRGVMAW
451 STPEPSFSGD  DSQRQDFNTP  SLEERGS DAL  ESEEKKEEDN  LLDLEENIP
501 DVDDDLWKG  ISRASEAGTA  EDDRASTSSR  LRGNLKPKGL  PKPQPTRTIT
551 EFNPGPDLE  VWRPDLAPGY  SKADVAAATV  LAGGSVHEGR  DMLERREAKV
601 MDSRKKWGIL  SSTSSLTSGA  LKKLSAQSEK  LATLTTGERV  QYQRLKNSMG
651 STVAAEYLEK  VLADKTS
    
```

Figure 47: MALDI-TOF analysis of the structural viral protein of 30 kDa detected in PCS3+ virus particles. Peptides identified by MALDI-TOF by peptide mass fingerprint are shown in black on the CABYV-WT RT protein sequence. The CP stop codon is indicated by an asterisk and the last amino acid identified on the truncated wild-type RT protein of CABYV is underlined. The tryptic peptide (256-264) that could not be confirmed by NanoLC-MS/MS is italicized in black.

```

                R   I   P
                4825 4833
CABYV-WT      AGA ATA CCA

PCS1          GCA GCA GCA
                A   A   A
    
```

Figure 48: Nucleotide changes (in bold) introduced in the CABYV genome to obtain the PCS1 mutant. Numbers referred to as nucleotide position on CABYV genome. The amino acids targeted in the PCS1 mutant are indicated.

In order to further characterize the 30 kDa viral protein present in PCS3+ particles, this protein was excised from a gel loaded with proteins extracted from PCS3+ virions. Mass spectrometry analysis of this protein identified peptides matching the CP sequence up to the stop codon at position 200 and covering 46.7% of the CP sequence (Figure 47, sup. data). Based on its apparent MW (about 30 kDa), this CP-fusion protein was however supposed to extend beyond the CP stop codon (CP is 24 kDa). Although a peptide exhibiting a mass of 1155.55 Da that could correspond to the position 256-264 on the RT sequence was detected by mass spectrometry, its intensity was too low to be confirmed by nanoLC-MS/MS (Figure 47, sup. data). Failure to detect any peptide downstream the CP stop codon may originate from the proline-rich sequence adjacent to the CP stop codon which is known to impede tryptic cleavage (Wilmarth *et al.*, 2004). Additional enzymes (Chymotrypsin and Asp-N) were used to digest the protein but mass spectrometry analysis of the released products did not provide more information on the protein. Therefore we cannot conclude whether the 30 kDa protein present in PCS3+ purified particles is a post-translational modification of the CP protein or a shorter version of the RT protein. However, because no 55 kDa RT* protein could be detected, we can assert that the correct processing of the RT protein is affected by the mutation introduced in PCS3+.

Discussion

Poleroviruses are astonishing viruses whose tissue localization is perfectly adapted to their mode of dispersion. They are acquired from infected plants and transmitted to new plants during the phloem-feeding phase of aphids. Phloem restriction of poleroviruses is therefore perfectly tailored to virus transmission by the insect. A key step in polerovirus dissemination *in planta* is virus loading from the replication sites (companion cells and phloem parenchyma cells) into sieve elements to gather virions at sites of aphid's sampling. Virus loading into sieve elements also represents the way for viruses to reach systemic tissues. In addition to its major role in virus transmission, the RT protein of poleroviruses is also supposed to control virus loading into the phloem (Mutterer *et al.*, 1999). Two forms of the RT protein are expressed in plants: a full-length protein of 74 kDa and a C-terminal truncated version of 55 kDa (RT*), this latter protein being the only species incorporated into the virion (Brault *et al.*, 1995; Filichkin *et al.*, 1994; Jolly & Mayo, 1994; Wang *et al.*, 1995). To address the function of each RT protein in CABYV cycle, we monitored virus accumulation *in planta* of mutants producing either only the full-length RT protein or just the truncated form. A series of CABYV mutants affected in the RT protein potential cleavage site (amino acids 440-463 on the RT sequence) was generated. Synthesis of the RT protein in infected plants, cleavage and incorporation of the RT* protein into virions, were addressed. Taken together, our results showed that eight out of the ten alanine substitutions engineered virus mutants (PCS2, PCS2-3, PCS3, PCS4, PCS5, PCS6, PCS7 and

PCS8) were not affected in the synthesis or the processing of the RT protein, demonstrating that none of those amino acids is essential for cleavage. In the case of PCS1 mutant, no RT protein was detected in plant-infected extracts, and we suspect that the 5 nucleotide change introduced in the RT sequence of PCS1 (Figure 48, sup. data) may have hit the sequence required for the translational readthrough mechanism (Brown *et al.*, 1996; Bruyère *et al.*, 1997). Such a sequence affecting the readthrough mechanism and positioned several hundred nucleotides downstream of the ORF3 stop codon at the junction between the conserved and the variable domains of RT proteins was previously reported for TuYV and BYDV (Brown *et al.*, 1996; Bruyère *et al.*, 1997; Guilley *et al.*, 1994). An alternative hypothesis to the absence of RT proteins in PCS1-infected plants could be protein instability due to the mutation.

A particularly interesting case was PCS3+ mutant as it produces a mutated RT protein that can be detected in infected plants but is likely improperly processed. The RT* protein was indeed never detected in PCS3+ particles, although another CP-containing product of about 30 kDa, was assembled reproducibly into virions. This protein could represent an RT-processed product released after cleavage at an incorrect site exposed on the PCS3+ mutated RT protein. It is noteworthy that the mutation introduced in PCS3+ spans the alanine substitutions introduced in PCS2, PCS2-3 and PCS3 (amino acids 443-447). Taken individually, these substitutions did not modify RT protein processing, suggesting that the effect observed with PCS3+ may be related to the introduction of a bulky aromatic tryptophan at position 444. Compared to this latter modification, the alanine inserted at the same position on the RT sequence of PCS2 is likely to impose a strong structural constraint to the RT protein conformation that may mask or change the cleavage site. These considerations lead us to propose a RT protein mode of cleavage controlled by the structural context around the cleavage site. Implication of the local secondary structure of the cleavage site, and not just the sequence *per se*, has been suggested to play a role in viral protein processing (Clark & Adams, 1977; Garcia *et al.*, 1992; Nair & Savithri, 2010). According to our experiments, the *bona fide* cleavage site of the RT protein cannot be set with confidence but is definitively positioned in a sequence close to amino acids 440-444 of the RT protein. The PCS3+ mutant moved inefficiently to systemic tissues, showing that the complete RT protein produced by the PCS3+ mutant cannot fulfill entirely long-distance movement of this mutant that does not incorporate the RT* protein. However, because the RT protein produced by PCS3+ contains a 4 amino acid change, we cannot completely eliminate the hypothesis that the mutation *per se* is deleterious for its function. Previous data showed that the PLRV-RT protein was able, but only to some extent, to act *in trans* on the movement of viral particles without RT* proteins (Peter *et al.*, 2009), whereas no such *in trans* action of the complete RT protein was reported for TuYV (Bruyère *et al.*, 1997). Finally, the poor capacity of the PCS1 mutant whose particles contain only the CP to invade non-inoculated leaves supports the hypothesis that inefficient

virus movement, independent of the RT protein, can take place for viruses devoid of RT* protein (Mutterer *et al.*, 1999). This result is also in accordance with the inefficient ability of CABYV mutants in which ORF5 sequence was deleted to invade systemic leaves (our unpublished results).

A second valuable CABYV mutant we generated was CABYV-RT Δ C_{ter} which produces a C-terminally deleted RT protein that is correctly incorporated into virions (Figure 44-D). This mutant represents to our knowledge the first report of an engineered member of the *Luteoviridae* family synthesizing solely an RT-truncated protein and packaging it into the particles. Although CABYV-RT Δ C_{ter} produces virus particles displaying apparently similar physical and biological properties as the wild-type virus (shape, size, virions protein composition; see Figure 45, sup. data), this mutant was unable to reach upper leaves. This shows unambiguously that viruses producing only the RT* protein and incorporating it into the particles are deficient in long distance movement. Whether the C-terminal domain of the RT protein is acting *in trans* as an individual protein after RT protein cleavage or as part of the complete RT protein cannot be determined from these experiments. Attempts to detect the free C-terminal part of the RT protein in CABYV-infected plants remained so far unsuccessful (our unpublished results), suggesting either a lack of sensitivity of the antibodies used for detection or a rapid degradation of the viral product. The strict requirement of the C-terminal domain of the CABYV RT protein for long distance movement can be compared to the inability of PEMV-1 (*Luteoviridae*) that misses the C-terminal part of the RT protein to move systemically in the absence of the PEMV-2, an umbravirus (12, 13).

Taken together the results presented in this study sustain the hypothesis that both forms of the RT protein are required for efficient long-distance movement of CABYV. In this respect, direct or indirect interactions between these two proteins could be envisaged. Evidence for interactions between PLRV RT* proteins has recently been provided by Chavez *et al.* (Chavez *et al.*, 2012b). Based on the assumption that such interactions could also take place for CABYV, we propose a hypothetical model for systemic transport of this virus that could eventually be extended to all members in the *Luteoviridae* family (Figure 49). The C-terminal part of the RT protein of CABYV (Figure 50, sup. data), like that of other viruses in the *Luteoviridae* family (data not shown), is predicted to be highly disordered using the disorder prediction algorithms PONDR (Peng *et al.*, 2006) and IUPred (Dosztanyi *et al.*, 2005). We therefore presume that the RT protein may adopt different conformations in plant cells and that only part of the RT protein population is cleaved and incorporated into the particles. Whether RT protein cleavage occurs before or after its incorporation into the particles is still unknown. Incomplete cleavage of the RT proteins would leave some free RT proteins able to act *in trans* on virions. The free RT protein could bridge the gap between the viral particles and some cellular elements governing virus transport into sieve tubes (e.g. plasmodesmata or microtubules) (Figure 49). Once loaded into the sieve tubes, virions bearing RT* proteins could be acquired by

aphids. How the complete RT protein enters the sieve tubes and whether it is thereafter acquired by aphids and involved in aphid transmission, as suggested for BYDV (Wang *et al.*, 1995), remains an open question. In conclusion, an essential role of the full-length RT protein *in planta* is to foster efficient movement of virions bearing RT* proteins. In parallel to this efficient systemic transport of wild-type CABYV virions in the sieve tubes, virus particles lacking the RT* proteins could follow an alternative route independent of the RT protein.

In the future, several additional aspects of polerovirus transport will have to be addressed like the identification of the protease (viral or cellular) responsible for the RT protein cleavage and the regulation of the RT processing. Indeed, this process gives rise to the right proportion of RT* versus RT proteins, two essential viral determinants governing crucial steps in polerovirus propagation i.e. movement within plants via the phloem and between plants via vector transmission.

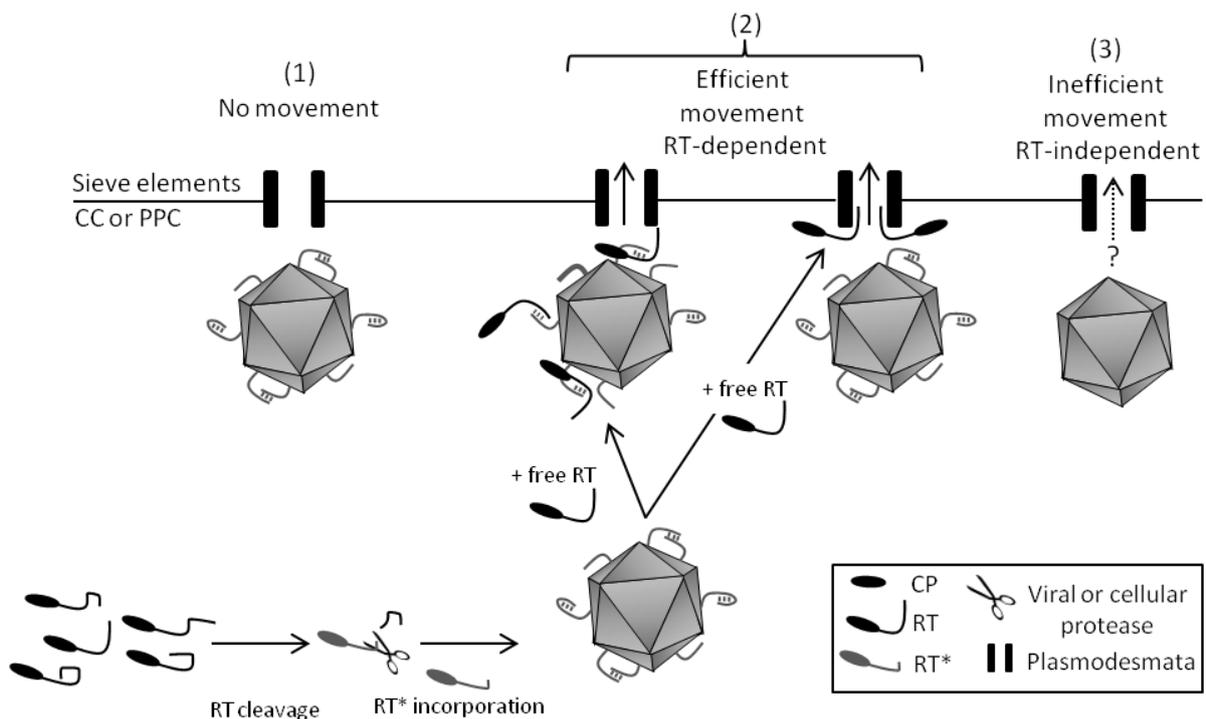


Figure 49: Hypothetical model for the role of the different forms of the RT protein in CABYV movement. Because of the intrinsic disorder of the C-terminal part of the RT protein, the pool of RT proteins may adopt different conformations in infected cells. A fraction of them could be processed to give RT* proteins and further incorporated into virions. In the case of CABYV, these virions decorated with the RT* protein cannot move systemically without the assistance of the complete RT protein (1). The free RT protein could bind the RT* proteins on the surface of virions, or could act *in trans* on components involved in virus transport like plasmodesmata or microtubules to promote efficient virus transport into sieve elements (on the figure only plasmodesmata are presented). Virions devoid of RT* proteins could follow another transport pathway independent of the RT protein leading to an inefficient systemic transport (3). CC: companion cells; PPC: phloem parenchyma cells.

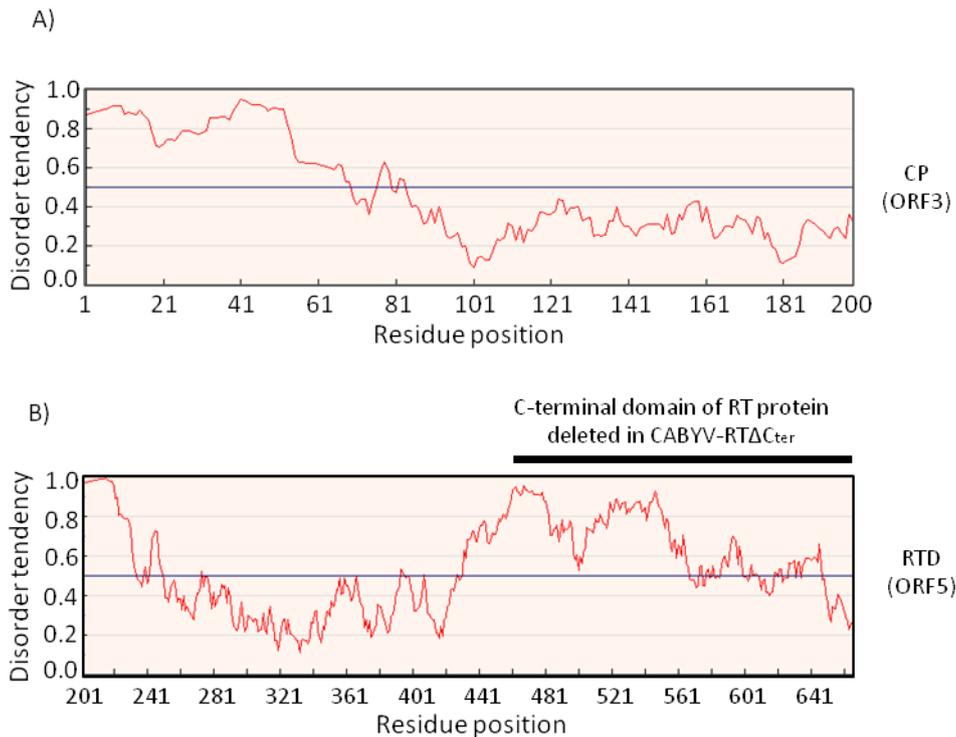


Figure 50: Prediction of disordered domains of CABYV ORF3 (A) and ORF5 (B) encoded proteins using PONDR and IUPred programs. Position of the deletion in the RT protein introduced in CABYV- Δ RTC_{ter} is indicated by a solid line. The amino acid positions in the RT protein sequence are indicated. RTD: readthrough domain.

References

1. **Bencharki, B., S. Boissinot, S. Revillon, V. Ziegler-Graff, M. Erdinger, L. Wiss, S. Dinant, D. Renard, M. Beuve, C. Lemaitre-Guillier, and V. Brault.** 2010. Phloem protein partners of Cucurbit aphid borne yellows virus: possible involvement of phloem proteins in virus transmission by aphids. *Mol Plant-Microbe Interact* **23**:799-810.
2. **Brault, V., J. Mutterer, D. Scheidecker, M. T. Simonis, E. Herrbach, K. Richards, and V. Ziegler-Graff.** 2000. Effects of point mutations in the readthrough domain of the beet western yellows virus minor capsid protein on virus accumulation in planta and on transmission by aphids. *J. Virol.* **74**:1140-1148.
3. **Brault, V., S. Perigon, C. Reinbold, M. Erdinger, D. Scheidecker, E. Herrbach, K. Richards, and V. Ziegler-Graff.** 2005. The polerovirus minor capsid protein determines vector specificity and intestinal tropism in the aphid. *J. Virol.* **79**:9685-9693.
4. **Brault, V., M. Uzest, B. Monsion, E. Jacquot, and S. Blanc.** 2010. Aphids as transport devices for plant viruses. *Comptes rendus biologies* **333**:524-538.
5. **Brault, V., J. F. van den Heuvel, M. Verbeek, V. Ziegler-Graff, A. Reutenauer, E. Herrbach, J. C. Garaud, H. Guilley, K. Richards, and G. Jonard.** 1995. Aphid transmission of beet western yellows luteovirus requires the minor capsid read-through protein P74. *EMBO J.* **14**:650-659.
6. **Brown, C. M., S. P. Dinesh-Kumar, and W. A. Miller.** 1996. Local and distant sequences are required for efficient readthrough of the barley yellow dwarf virus PAV coat protein gene stop codon. *J. Virol.* **70**:5884-5892.
7. **Bruyère, A., V. Brault, V. Ziegler-Graff, M. T. Simonis, J. F. Van den Heuvel, K. Richards, H. Guilley, G. Jonard, and E. Herrbach.** 1997. Effects of mutations in the beet western yellows virus readthrough protein on its expression and packaging and on virus accumulation, symptoms, and aphid transmission. *Virology* **230**:323-334.

8. **Chavez, J. D., M. Cilia, C. R. Weisbrod, H. J. Ju, J. K. Eng, S. M. Gray, and J. E. Bruce.** 2012. Cross-linking measurements of the Potato leafroll virus reveal protein interaction topologies required for virion stability, aphid transmission, and virus-plant interactions. *Journal of proteome research* **11**:2968-2981.
9. **Chay, C. A., U. B. Gunasinge, S. P. Dinesh-Kumar, W. A. Miller, and S. M. Gray.** 1996. Aphid transmission and systemic plant infection determinants of barley yellow dwarf luteovirus-PAV are contained in the coat protein readthrough domain and 17-kDa protein, respectively. *Virology* **219**:57-65.
10. **Cheng, S. L., L. L. Domier, and C. J. D'Arcy.** 1994. Detection of the readthrough protein of barley yellow dwarf virus. *Virology* **202**:1003-1006.
11. **Clark, M. F., and A. N. Adams.** 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **34**:475-483.
12. **Demler, S. A., and G. A. de Zoeten.** 1991. The nucleotide sequence and luteovirus-like nature of RNA 1 of an aphid non-transmissible strain of pea enation mosaic virus. *J. Gen. Virol.* **72**:1819-1834.
13. **de Zoeten, G. A., and J. S. Skaf.** 2001. Pea enation mosaic and the vagaries of a plant virus. *Adv. Virus Res.* **57**:323-350.
14. **Dosztanyi, Z., V. Csizmok, P. Tompa, and I. Simon.** 2005. IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics* **21**:3433-3434.
15. **Esau, K., and L. L. Hoefert.** 1972. Development of infection with beet western yellows luteovirus in the sugarbeet. *Virology* **48**: 724-738.
16. **Filichkin, S. A., R. M. Lister, P. F. McGrath, and M. J. Young.** 1994. In vivo expression and mutational analysis of the barley yellow dwarf virus readthrough gene. *Virology* **205**:290-299.
17. **Garcia, J. A., M. T. Martin, M. T. Cervera, and J. L. Riechmann.** 1992. Proteolytic processing of the plum pox potyvirus polyprotein by the Nla protease at a novel cleavage site. *Virology* **188**:697-703.
18. **Guilley, H., C. Wipf-Scheibel, K. Richards, H. Lecoq, and G. Jonard.** 1994. Nucleotide sequence of cucurbit aphid-borne yellows luteovirus. *Virology* **202**:1012-1017.
19. **Hamrita, B., H. B. Nasr, P. Hammann, L. Kuhn, C. L. Guillier, A. Chaieb, H. Khairi, and K. Chahed.** 2011. An elongation factor-like protein (EF-Tu) elicits a humoral response in infiltrating ductal breast carcinomas: an immunoproteomics investigation. *Clin Biochem* **44**:1097-1104.
20. **Hofius, D., K. Herbers, M. Melzer, A. Omid, E. Tacke, S. Wolf, and U. Sonnewald.** 2001. Evidence for expression level-dependent modulation of carbohydrate status and viral resistance by the potato leafroll virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant J* **28**:529-543.
21. **Jolly, C. A., and M. A. Mayo.** 1994. Changes in the amino acid sequence of the coat protein readthrough domain of potato leafroll luteovirus affect the formation of an epitope and aphid transmission. *Virology* **201**:182-185.
22. **Lecoq, H., D. Bourdin, C. Wipf-Scheibel, M. Bon, H. Lot, O. Lemaire, and E. Herrbach.** 1992. A new yellowing disease of cucurbits caused by a luteovirus, cucurbit aphid-borne yellows virus. *Plant Pathology* **41**:749-761.
23. **Lee, L., P. Palukaitis, and S. M. Gray.** 2002. Host-dependent requirement for the Potato leafroll virus 17-kda protein in virus movement. *Mol Plant Microbe Interact* **15**:1086-1094.
24. **Mutterer, J. D., C. Stussi-Garaud, P. Michler, K. E. Richards, G. Jonard, and V. Ziegler-Graff.** 1999. Role of the beet western yellows virus readthrough protein in virus movement in *Nicotiana clevelandii*. *J. Gen. Virol.* **80**:2771-2778.
25. **Nair, S., and H. S. Savithri.** 2010. Processing of SeMV polyproteins revisited. *Virology* **396**:106-117.
26. **Peng, K., P. Radivojac, S. Vucetic, A. K. Dunker, and Z. Obradovic.** 2006. Length-dependent prediction of protein intrinsic disorder. *BMC bioinformatics* **7**:208.
27. **Peter, K. A., F. Gildow, P. Palukaitis, and S. M. Gray.** 2009. The C terminus of the polerovirus p5 readthrough domain limits virus infection to the phloem. *J. Virol.* **83**:5419-5429.
28. **Peter, K. A., D. Liang, P. Palukaitis, and S. M. Gray.** 2008. Small deletions in the potato leafroll virus readthrough protein affect particle morphology, aphid transmission, virus movement and accumulation. *J. Gen. Virol.* **89**:2037-2045.

29. **Prüfer, D., C. Wipf-Scheibel, K. Richards, H. Guilley, H. Lecoq, and G. Jonard.** 1995. Synthesis of a full-length infectious cDNA clone of cucurbit aphid-borne yellows virus and its use in gene exchange experiments with structural proteins from other luteoviruses. *Virology* **214**:150-158.
30. **Reinbold, C., F. E. Gildow, E. Herrbach, V. Ziegler-Graff, M. C. Goncalves, J. F. van Den Heuvel, and V. Brault.** 2001. Studies on the role of the minor capsid protein in transport of Beet western yellows virus through *Myzus persicae*. *J. Gen. Virol.* **82**:1995-2007.
31. **Reutenauer, A., V. Ziegler-Graff, H. Lot, D. Scheidecker, H. Guilley, K. Richards, and G. Jonard.** 1993. Identification of beet western yellows luteovirus genes implicated in viral replication and particle morphogenesis. *Virology* **195**:692-699.
32. **Revollon, S., J. M. Strub, A. C. Fitchette, L. Wiss, V. Gomord, A. Van Dorsseleer, and V. Brault.** 2010. A reinvestigation provides no evidence for sugar residues on structural proteins of poleroviruses and argues against a role for glycosylation of virus structural proteins in aphid transmission. *Virology* **402**:303-314.
33. **Schmitz, J., C. Stussi-Garaud, E. Tacke, D. Pruffer, W. Rohde, and O. Rohfritsch.** 1997. In situ localization of the putative movement protein (pr17) from potato leafroll luteovirus (PLRV) in infected and transgenic potato plants. *Virology* **235**:311-322.
34. **Shepardson, S., K. Esau, and R. McCrum.** 1980. Ultrastructure of potato leaf phloem infected with potato leafroll virus. *Virology* **105**: 379-392.
35. **Sokolova, M., D. Pruffer, E. Tacke, and W. Rohde.** 1997. The potato leafroll virus 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C. *FEBS letters* **400**:201-205.
36. **Tacke, E., D. Pruffer, J. Schmitz, and W. Rohde.** 1991. The potato leafroll luteovirus 17K protein is a single-stranded nucleic acid-binding protein. *J. Gen. Virol.* **72**:2035-2038.
37. **Tacke, E., J. Schmitz, D. Pruffer, and W. Rohde.** 1993. Mutational analysis of the nucleic acid-binding 17 kDa phosphoprotein of potato leafroll luteovirus identifies an amphipathic alpha-helix as the domain for protein/protein interactions. *Virology* **197**:274-282.
38. **van den Heuvel, J. F., T. M. Boerma, and D. Peters.** 1991. Transmission of potato leafroll virus from plants and artificial diets by *Myzus persicae*. *Phytopathology* **81**:150-154.
39. **van den Heuvel, J. F., A. Bruyere, S. A. Hogenhout, V. Ziegler-Graff, V. Brault, M. Verbeek, F. van der Wilk, and K. Richards.** 1997. The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to Buchnera GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *J. Virol.* **71**:7258-7265.
40. **Wang, J. Y., C. Chay, F. E. Gildow, and S. M. Gray.** 1995. Readthrough protein associated with virions of barley yellow dwarf luteovirus and its potential role in regulating the efficiency of aphid transmission. *Virology* **206**:954-962.
41. **Wilmarth, P. A., M. A. Riviere, D. L. Rustvold, J. D. Lauten, T. E. Madden, and L. L. David.** 2004. Two-dimensional liquid chromatography study of the human whole saliva proteome. *Journal of proteome research* **3**:1017-1023.
42. **Ziegler-Graff, V., V. Brault, J. D. Mutterer, M.-T. Simonis, E. Herrbach, H. Guilley, K. E. Richards, and G. Jonard.** 1996. The coat protein of beet western yellows luteovirus is essential for systemic infection but the viral gene products P29 and P19 are dispensable for systemic infection and aphid transmission. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **9**:501-510.

Acknowledgments: We are thankful to Olivier Lemaire (INRA Colmar) for providing us the antibodies directed against the P90 protein, to Catherine Reinbold (INRA Colmar) for the transmission electron microscopy pictures, to Danièle Scheidecker (CNRS-IBMP Strasbourg) for protoplasts isolation and to Allen Miller for critical reading of the manuscript.

B.2. Etude de la transmission du CABYV-RT_{ΔC-ter} et suspicion d'un ARN (-) encapsidé dans les virions du CABYV

Comme cela a été montré dans les travaux présentés dans l'article ci-dessus, le mutant CABYV-RT_{ΔC-ter} forme des particules virales dont la composition est identique à celle du virus sauvage. Les virions du CABYV-RT_{ΔC-ter} sont également similaires à ceux du CABYV sauvage lorsqu'ils sont observés en microscopie électronique. Nous avons donc analysé la capacité de ce mutant à être transmis par puceron. Ce mutant n'étant pas systémique, nous avons dû adapter le protocole de transmission. Brièvement, les pucerons se sont alimentés pendant 48 h sur un milieu artificiel contenant le virus purifié puis ont été transférés pendant 3 jours sur des disques foliaires de *M. perfoliata* (1 cm de diamètre) maintenus en survie sur une solution d'agarose 1 %. La présence du virus dans les disques foliaires a ensuite été recherchée par RT-PCR (Figure 51-A), en utilisant des oligonucléotides permettant la détection du brin (-) de l'ARN viral, afin d'éviter la détection de l'ARN génomique présent dans les virions excrétés avec le miellat. Les résultats préliminaires montrent la présence du CABYV WT et du CABYV-RT_{ΔC-ter} dans les disques foliaires ce qui suggère que le CABYV RT_{ΔC-ter} serait transmissible par puceron. Nous avons réalisé (*a posteriori*) un contrôle supplémentaire afin de vérifier que les oligonucléotides utilisés ne reconnaissent pas l'ARN (+) viral. Pour ce faire, deux RT-PCR (Figure 51-B) ont été réalisées sur de l'ARN viral extrait de virus purifié, afin de détecter le brin (-) (RT1) ou le brin (+) (RT2). Contre toute attente, dans les deux conditions, nous avons pu détecter un fragment de la taille attendue à partir des ARN extraits des virions. Ce fragment pouvait donc correspondre à la présence d'un brin d'ARN (-) dans les particules virales ou à une reconnaissance aspécifique du brin viral (+) par les oligonucléotides (Figure 51- B,C). D'autres couples d'oligonucléotides amplifiant des régions différentes du génome ont donc été utilisés et tous ont permis la détection d'un signal qui pourrait correspondre à l'ARN (-). Cette observation très surprenante remet en question les résultats portant sur l'étude de la transmissibilité du CABYV-RT_{ΔC-ter} par puceron puisque le signal détecté par RT-PCR dans les disques foliaires pourraient correspondre à l'ARN (-) éventuellement présent dans les particules virales excrétées avec le miellat. Des expériences complémentaires, comme la recherche de l'ARN (-) par northern blot seront nécessaires pour confirmer ce résultat. Si la présence du brin viral ARN (-) dans les virions est confirmée, des questions sur le rôle de cet ARN dans la mise en place de l'infection et plus particulièrement dans l'initiation du mécanisme du *gene silencing* pourront être abordées.

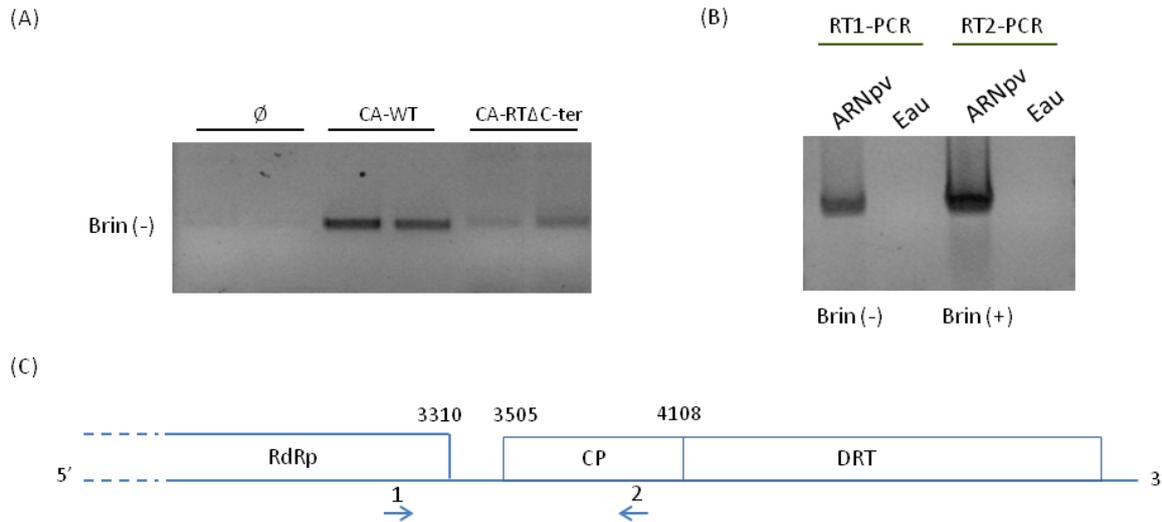


Figure 51 : (A) Test de transmission du CABYV-RT Δ C-ter sur disques foliaires. Après une période d'acquisition de 48 h sur une solution de virus purifié à 100 ng/ μ l, les pucerons ont été transférés sur des disques foliaires de *M. perfoliata* maintenu en survie sur de l'agarose 1%. La présence de la forme répliquative du virus (ARN (-)) dans les disques foliaires, a été recherchée par RT-PCR 3 jours après transmission. (B) Détection par RT-PCR d'un ARN (-) dans les ARNs extraits des particules virales (ARNpv) du CABYV. Les oligonucléotides 1 et 2 utilisés respectivement pour les transcriptions inverses 1 et 2 (RT1 permet la détection du brin (-) et RT2 la détection du brin (+)) sont positionnés sur l'extrémité 3' du génome du CABYV. Ces deux oligonucléotides ont été utilisés pour la réaction de PCR (C). Les nombres indiquent les positions nucléotidiques sur le génome du CABYV du codon d'initiation de la protéine CP (Coat protein) et des codons stop de la RdRp (RNA polymérase RNA dépendante) et de la protéine CP.

B.3. Sous quelle forme le domaine C-ter de la protéine RT intervient-il dans le mouvement systémique du CABYV ?

Les résultats présentés dans l'article montrent l'action en *trans* du domaine RT $_{C-ter}$ du CABYV sur les particules virales possédant la protéine RT*, afin de favoriser le mouvement systémique du virus. Bien que le domaine RT $_{C-ter}$ n'ait jamais été détecté sous forme libre dans la plante, une des questions qui reste posée est de savoir si la protéine RT entière est responsable de ce phénomène ou si seul le domaine C-terminal sous sa forme libre (RT $_{C-ter}$ environ 22 kDa) possède une telle action. Pour tenter de répondre à cette question j'ai obtenu des arabidopsis transgéniques qui expriment de façon constitutive soit la protéine RT du CABYV, soit le domaine C-terminal de cette protéine. L'étude de l'accumulation du CABYV-RT Δ C-ter dans ces plantes devrait nous permettre de voir si la protéine RT ou le domaine C-terminal de la protéine sont capables de compléter la déficience de mouvement de ce virus.

L'insertion des transgènes dans les plantes transgéniques a été contrôlée par PCR sur la génération F2 (Figure 52). L'expression des protéines n'a pour l'instant pas pu être mise en évidence par western blot ou par test ELISA (résultats non montrés). Après auto-fécondation de ces plantes, les descendants seront inoculés avec le mutant CABYV-RT Δ C-ter, et l'accumulation du virus dans les feuilles non inoculées sera évaluée par un test ELISA et par RT-PCR.

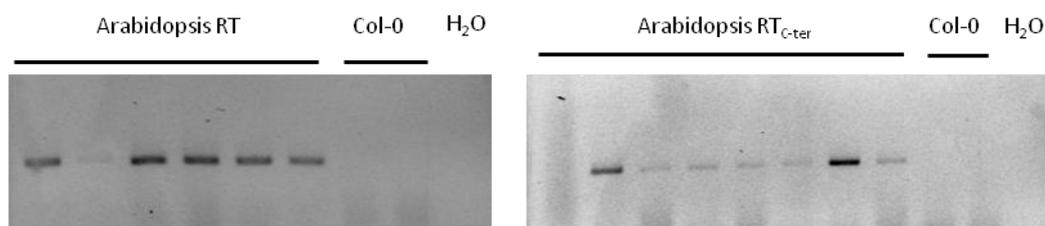


Figure 52 : Caractérisation des arabidopsis exprimant la RT complète du CABYV ou le domaine RT_{C-ter}. Détection d'une séquence de l'insert par PCR dans 6 plantes transformées avec la séquence de la RT complète (à gauche) et dans 8 plantes transformées avec le domaine RT_{C-ter} (à droite). Pour chacune de ces expériences 2 plantes de référence Col-0 ont servi de témoin.

B.4. Localisation subcellulaire des différentes formes de la protéine RT du CABYV

L'implication de la protéine RT et en particulier de son extrémité C-terminale dans le mouvement du virus suggère que cette protéine pourrait être associée à des éléments du cytosquelette ou bien encore aux PDs. Hormis la localisation nucléaire et cytoplasmique du domaine C-terminal de la protéine RT du CABYV décrite dans le chapitre 1 (paragraphe F), aucune information n'est disponible quant à la localisation dans la cellule des protéines RT complète et tronquée (RT*) du CABYV. Par conséquent, j'ai entrepris de les localiser dans *N. benthamiana* après fusion de la protéine EGFP à leur extrémité N-terminale. Les résultats préliminaires obtenus (Figure 53-A), montrent une localisation cytoplasmique et nucléolaire pour les deux protéines. Un western blot réalisé à partir d'extraits protéiques des feuilles agro-infiltrées (Figure 53 - B), confirme que les deux protéines sont correctement exprimées dans les cellules de *N. benthamiana*. Pour l'instant, les observations réalisées ne nous permettent pas de relier la localisation des protéines RT aux éléments du cytosquelette et donc au mouvement du virus. Les localisations sub-cellulaires devront être reproduites avec les protéines RT fusionnées à la protéine EGFP à leur extrémité C-terminale.

La localisation nucléolaire des protéines RT et RT* est en accord avec les observations de Cillia (2011), qui a montré que la protéine CP du CABYV contient une séquence d'adressage au nucléole. Les protéines RT et RT* étant des protéines de fusion avec la protéine CP, il n'est pas surprenant d'observer une localisation nucléolaire. Ces résultats confirment également les observations de Haupt *et al.* (2005b) qui montrent une localisation cytoplasmique et nucléolaire de la protéine RT du PLRV. Cependant, la localisation de la protéine RT du PLRV étant modifiée en présence du virus (protéine localisée dans le nucléoplasme et pas dans le nucléole) (Haupt *et al.*, 2005b; Nurkiyanova *et al.*, 2000), il sera également intéressant d'analyser la localisation des protéines RT du CABYV en contexte de virose en agro-infiltrant les protéines RT fluorescentes avec le CABYV.

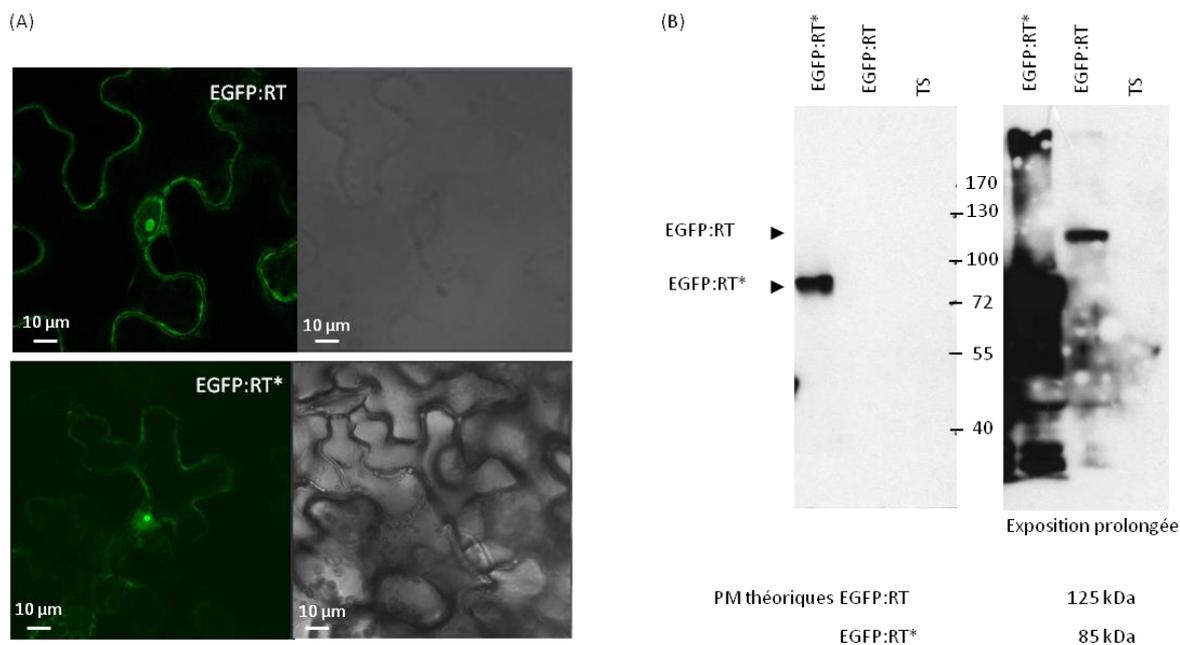


Figure 53 : (A) Localisation subcellulaire de la protéine GFP:RT et de la protéine EGFP:RT* dans *N. benthamiana* (48h post-inoculation) par microscopie à fluorescence. Les photos de droite observées par microscopie DIC représente le champ observé. (B) Analyse par western de l'expression des protéines EGFP:RT et EGFP:RT_{ΔC-ter} dans les feuilles de *N. benthamiana* infiltrées avec les constructions permettant l'expression de la GFP:RT* et GFP:RT. Révélation avec un anticorps dirigé contre la protéine EGFP.

B.5. Analyse du clivage de la protéine RT du CABYV

B.5.a. Effet du virus sur le clivage de la protéine EGFP:RT du CABYV

Les travaux présentés dans cet article en préparation montrent que les deux formes de la protéine RT sont indispensables pour le mouvement efficace à longue distance du CABYV. La forme complète (ou son extrémité C-terminale) agirait *en trans* sur le mouvement de la particule virale possédant la RT*. La présence de la protéine RT* dans les virions, favoriserait quant à elle, le mouvement systémique du virus et est indispensable à sa transmission par puceron.

Le clivage du domaine C-terminal de la protéine RT, et plus exactement son contrôle, semble donc une étape essentielle du cycle du CABYV puisque celui-ci doit générer la bonne proportion de protéines tronquées par rapport aux protéines entières. La première question est de savoir si le clivage est dû à une protéase virale ou cellulaire ? Pour cela, la construction EGFP:RT a été agro-infiltrée dans des feuilles de *N. benthamiana* en présence, ou non, du virus mutant CABYV-RT_{ΔC-ter}. Le CABYV WT n'a pas été utilisé afin de faciliter la détection des différentes formes de la protéine RT. Les produits de clivage de la protéine EGFP:RT ont été recherchés par western blot en utilisant un anticorps dirigé contre la protéine GFP (Figure 54). La présence du virus dans les feuilles agro-infiltrées a été mise en évidence par western blot dès 72 h après inoculation (western blot non montré). Cinq jours après agro-infiltration, la protéine EGFP:RT (PM théorique de 125 kDa) est détectée dans les feuilles agro-infiltrées avec cette construction mais d'une manière surprenante,

elle n'est plus détectée dans les 4 extraits de plantes (même avec une exposition plus longue du film) inoculées avec le CABYV-RT Δ C-ter (Figure 54), mais aucun produit pouvant correspondre au clivage de la protéine n'est également visible. Les résultats présentés sur cette figure ont été reproduits au cours de deux expériences indépendantes. Afin de vérifier la stabilité de la protéine RT* fusionnée à la EGFP dans *N. benthamiana*, nous avons infiltré la construction EGFP:RT* (PM d'environ 85 kDa). Malgré la présence d'un signal aspécifique aux alentours de 70 kDa, la protéine EGFP:RT* est facilement détectée dans les échantillons agro-infiltrés ce qui confirme la stabilité de la protéine 4 jours après l'infiltration Figure 54. L'absence de détection de protéines de RT dans les extraits infiltrés avec les constructions EGFP:RT, P19 et CABYV-RT Δ C-ter serait donc probablement due à une absence d'expression de la protéine EGFP:RT en présence du virus. Ce phénomène encore inexpliqué devra être analysé plus en détail. Nous testerons la capacité d'expression de la EGFP:RT en présence de P19 mais aussi d'un autre plasmide contrôle exprimant seulement la protéine RFP pour voir si l'introduction simultanée de 3 plasmides dans une même cellule entraîne une compétition et réduit la traduction des protéines.

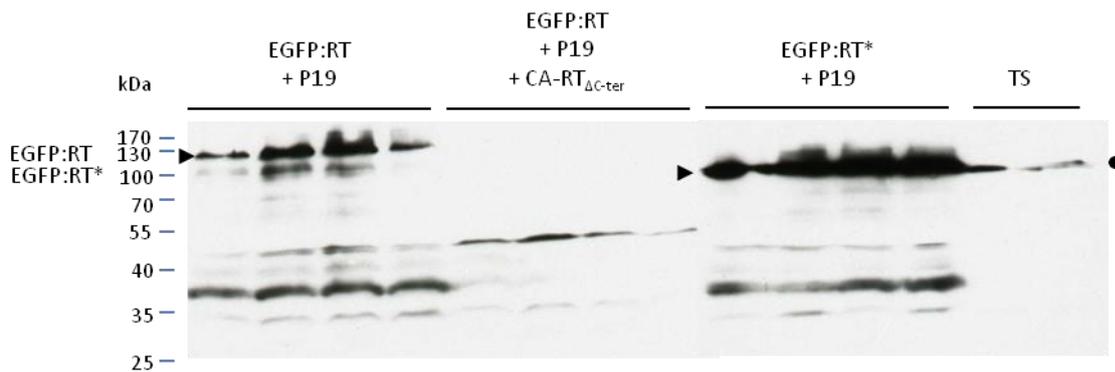


Figure 54 : Analyse par western blot (anticorps @GFP) du clivage de la protéine EGFP:RT en présence du CABYV-RT Δ C-ter, 5 jours après agro-infiltration dans des feuilles de *N. benthamiana*. Le cercle noir indique une réaction aspécifique de l'anticorps juste en dessous du niveau de migration de la protéine EGFP:RT*.

B.5.b. Cinétique d'apparition des différentes formes de la protéine RT dans des protoplastes de *Chenopodium quinoa*

Parallèlement à ces travaux, la cinétique d'apparition de la forme tronquée de la protéine RT a également été étudiée. Comme la protéine RT* n'a jamais été observée dans des broyats totaux de plantes infectées, nous avons recherché son apparition à différents temps dans des protoplastes de *C. quinoa* inoculés avec des transcrits infectieux du CABYV. Sachant que cette forme de la protéine RT est présente dans les particules virales, nous avons également observé la présence des virions dans les protoplastes.

Comme le montre la Figure 55-A et B, les protéines CP et RT sont détectées dès 24 h après l'inoculation, alors qu'une protéine dont le PM est proche de celui de la RT* (~60 kDa) est détectée

dans les extraits de protoplastes infectés 48 h post-inoculation. De nombreux produits de dégradation de la protéine RT sont présents dans les extraits protéiques à partir de 48 h post-inoculation lorsque l'on utilise des anticorps dirigés contre la protéine CP du CABYV. A l'inverse aucun produit de dégradation n'est reconnu par les anticorps dirigés contre le domaine C-ter de la protéine RT. Ceci semble montrer que la protéine RT du CABYV est soumise à des dégradations ou clivages qui affectent principalement la partie C-terminale de la protéine RT. Il est ainsi difficile de s'assurer de la nature de la protéine d'environ 60 kDa qui pourrait correspondre à la RT* mais qui pourrait tout autant être un produit de dégradation de la protéine RT.

Dans les broyats de protoplastes préparés en conditions non dénaturantes, des virions ont pu être observés par MET (Figure 55-B) dans les protoplastes dès 24 h post-inoculation. A ce temps donné, les virions sont peu nombreux dans les extraits de protoplastes infectés mais leur quantité augmente ensuite au cours du temps. Ceci confirme que la protéine RT*, incorporée dans les virions, pourrait potentiellement être détectée dans ces extraits de protoplastes infectés.

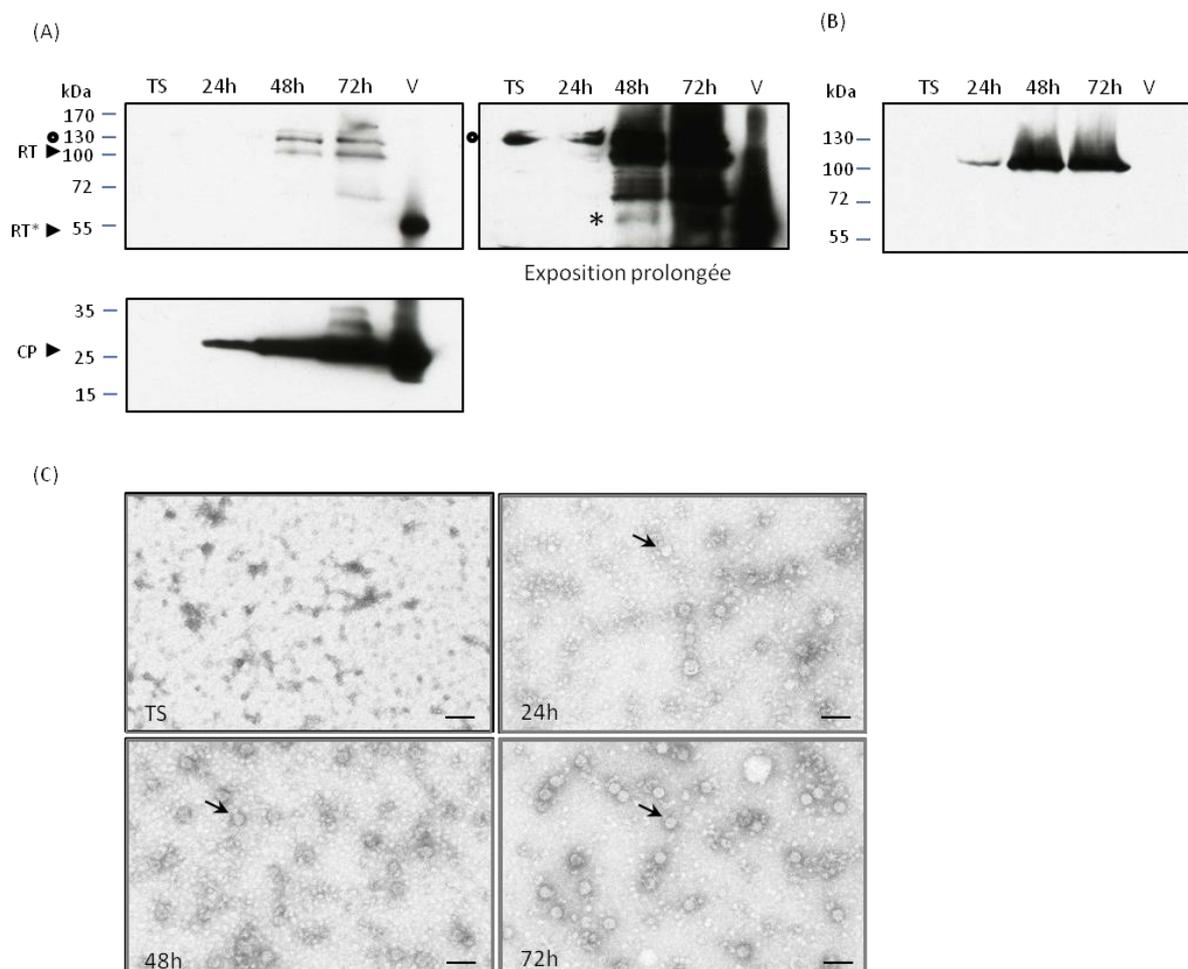


Figure 55 : (A) et (B) Recherche par western blot des protéines de structure du CABYV dans des protoplastes de *C. quinoa*, 24, 48 et 72h post-inoculation, avec (A) un anticorps dirigé contre la protéine CP du CABYV ou (B) un anticorps dirigé contre le domaine C-ter de la protéine RT du CABYV. Le cercle noir signale une réaction aspécifique de l'anticorps et l'astérisque désigne une protéine dont le PM apparent est similaire à celui de la RT*. (C) : Observation par MET de particules virales du CABYV dans des protoplastes de *C. quinoa*, 24, 48 et 72h post inoculation. Sur chaque cliché (sauf témoin sain, TS) une particule virale est désignée par une flèche noire. La barre représente 50 nm.

C - Discussion

Les deux formes de la protéine RT du CABYV sont indispensables au mouvement efficace à longue distance du virus

Les polérovirus sont parfaitement adaptés à leur mode de transmission par puceron puisqu'ils sont restreints aux cellules du phloème de la plante hôte, et notamment aux TC dans lesquels le puceron vecteur s'alimente. Une étape importante du cycle des polérovirus est donc son passage dans les TC puisqu'il peut y être acquis par le puceron et être propagé aux parties distales de la plante. La protéine RT des polérovirus est une protéine multifonctionnelle qui assure des fonctions dans le mouvement du virus et dans sa transmission par puceron et Mutterer *et al.* (1999) avaient suggéré son implication dans le chargement du virus dans les TC.

Nous avons montré au cours de cette étude que la protéine RT existe sous deux formes : une forme complète (d'un poids moléculaire théorique d'environ 74 kDa) détectée par western blot dans des broyats totaux de plantes infectées et dans de la sève prélevée à partir de plantes infectées, et une forme tronquée (RT*, environ 55 kDa), dépourvue de l'extrémité C-terminale du domaine de *readthrough*. La protéine RT* est détectée par western blot dans des extraits de virus purifiés, dans de la sève prélevée à partir de plantes infectées mais jamais dans des broyats totaux de plantes infectées.

Afin d'analyser le rôle de chacune de ces formes de la protéine RT dans le cycle viral, nous avons suivi l'accumulation dans les plantes de mutants du CABYV n'exprimant que la version complète (RT) ou tronquée (RT*) de la protéine RT. Une série de mutants (PCS1 à PCS8) a été obtenue par mutagenèse dirigée de la région du site potentiel de clivage (PCS) de la protéine RT (entre les acides aminés 440 à 463). La synthèse de la protéine RT dans les plantes infectées, son incorporation dans les virions et son clivage ont été analysés. Les résultats obtenus ont permis de montrer que la synthèse et le clivage de la protéine RT ne sont pas affectés dans les mutants PCS2, PCS2-3, PCS3, PCS4, PCS5, PCS6, PCS7 et PCS8. Ces mutants s'accumulent bien dans la plante et les virions incorporent la protéine RT*. Les acides aminés mutés dans ces virus ne sont donc pas indispensables au clivage de la protéine. Le mutant PCS1 ne produit plus de protéine RT, probablement parce que la mutation introduite, localisée plusieurs centaines de nucléotides en aval du codon stop de la CP, a affecté le mécanisme de *readthrough*. L'implication dans le mécanisme de *readthrough* d'une séquence localisée à la jonction entre le domaine conservé et le domaine variable du DRT a déjà été montrée pour le TuYV et le BYDV (Brown *et al.*, 1996; Bruyere *et al.*, 1997; Guilley *et al.*, 1994) (*cf* introduction bibliographique paragraphe B.2). On ne peut cependant pas exclure que la protéine RT exprimée par le mutant PCS1 soit instable dans la cellule, ce qui expliquerait son absence de détection. Un des

mutants produit, le mutant PCS3+, est particulièrement intéressant puisqu'il est capable de synthétiser la protéine RT mutée, mais est incapable d'envahir les tissus systémiques de la plante. De plus, la protéine RT de ce mutant est maturée de façon anormale. En effet, la protéine RT* n'a jamais été détectée dans les virions, alors qu'une autre forme clivée de la protéine RT (protéine d'environ 30 kDa) est détectée de façon reproductible dans les virions de ce mutant. Cette protéine provient probablement du clivage incorrect de la protéine RT mutée. Les mutations introduites dans le virus PCS3+ couvre les acides aminés 443 à 447 qui sont également mutés dans les virus PCS2, PCS2-3 et PCS3. Prises séparément, les mutations introduites dans PCS2, PCS2-3 et PCS3, n'affectent pas le clivage de la protéine RT, ce qui suggère que l'effet observé dans le mutant PCS3+ pourrait provenir de l'introduction du tryptophane (un acide aminé à noyau aromatique) à la position 444. Cette mutation, contrairement à l'alanine introduite à la même position dans le mutant PCS2, pourrait avoir des conséquences importantes sur la structure de la protéine et masquer ou modifier le site de clivage. Ainsi, nous proposons que le clivage de la protéine RT soit dépendant de la structure de la protéine aux alentours du site de clivage. L'implication de structures secondaires dans le clivage de protéines virales a déjà été suggérée (Clark & Adams, 1977; Garcia *et al.*, 1992; Nair & Savithri, 2010). Ces travaux ne nous permettent pas de localiser précisément le site de clivage de la protéine RT mais le situe entre les acides aminés 440 et 444.

Le mutant PCS3+ n'étant pas capable d'envahir de façon efficace les tissus systémiques de la plante hôte, cela montre que la protéine RT n'est pas capable d'assister le mouvement des virions qui n'incorporent pas la RT*. On ne peut cependant pas exclure que les mutations introduites dans la protéine RT n'affecte pas les fonctions de la protéine. Des études précédentes avaient montré que la protéine RT du PLRV pouvait agir, dans certaines conditions, en *trans* sur le mouvement des particules virales dépourvues de la protéine RT* (Peter *et al.*, 2009) alors que ce n'était pas le cas pour la protéine RT du TuYV (Bruyere *et al.*, 1997). Enfin, la capacité du mutant PCS1 à se déplacer de façon inefficace à longue distance, conforte notre hypothèse de l'existence d'un second type de mouvement, indépendant de la protéine RT, pour les particules virales dépourvues de RT*. Ces résultats sont également confirmés par la capacité de mutants du CABYV dépourvus de protéine RT de se déplacer mais de manière inefficace à longue distance (résultats non publiés).

Un second mutant synthétisant uniquement la RT* (CABYV-RT_{ΔC-ter}) a été obtenu au laboratoire. A notre connaissance, il s'agit du seul cas dans la famille des *Luteoviridae* de virus mutant capable de synthétiser uniquement la protéine RT* et de l'incorporer dans la particule virale. Bien que ce mutant forme des particules virales de morphologie et de composition similaires à celles du virus sauvage, ce mutant est incapable d'envahir les tissus systémiques de son hôte. Ces résultats montrent qu'un virus synthétisant uniquement la protéine RT* et l'incorporant dans ses particules est incapable de se déplacer à longue distance. Le domaine C-terminal absent chez ce mutant agit

donc en *trans* sur ces particules virales pour promouvoir leur mouvement. Nos travaux ne nous permettent cependant pas de savoir s'il agit en tant que domaine de la protéine RT, ou seul, sous la forme d'un petit peptide. La partie C-terminale de la protéine RT n'a, à ce jour, jamais été mise en évidence dans des extraits protéiques de plantes infectés (résultats non montrés), ce qui suggère un manque de sensibilité des anticorps ou une rapide dégradation de ce peptide.

L'ensemble de ces résultats conforte l'hypothèse que les deux formes de la protéine RT sont essentielles pour le mouvement efficace à longue distance du CABYV. On peut imaginer que ces deux protéines (RT et RT*) interagissent entre elles pour être fonctionnelles. Des interactions entre les protéines RT* du PLRV ont été mise en évidence récemment (Chavez *et al.*, 2012a) et on peut supposer que de telles interactions existent chez le CABYV. A partir de ces observations, nous avons proposé un modèle pour le transport systémique des virus appartenant à la famille des *Luteoviridae* (Figure 49). Le domaine C-terminal de la protéine RT du CABYV, comme celui de plusieurs autres virus de la famille des *Luteoviridae* (Figure 36 et Figure 50), est prédit par deux algorithmes, comme étant désordonné. Par conséquent, dans ce modèle nous supposons que la protéine RT adopte plusieurs conformations dans la cellule et que seules certaines d'entre elles sont adaptées au clivage et à l'incorporation dans les virions (ce travail ne nous a pas permis d'établir si le clivage de la protéine se faisait avant ou après son incorporation dans la particule virale). Les protéines RT libres pourraient agir en *trans* sur les virions et faire le lien entre les particules virales et des partenaires cellulaires impliqués dans l'export des virions vers les tubes criblés (comme par exemple les plasmodesmes ou les microtubules) (Figure 49). Une fois déversés dans les TC, les virions incorporant la protéine RT* pourraient être transportés à longue distance et être acquis par les pucerons. Afin de valider ce modèle, l'accumulation du mutant CABYV-RT_{ΔC-ter} a été suivie dans des arabidopsis exprimant la protéine RT complète du CABYV. Les résultats préliminaires montrent la présence du mutant CABYV-RT_{ΔC-ter} (détection par RT-PCR) dans les feuilles systémiques des arabidopsis transgéniques (2 plantes sur 5 inoculées). Afin de valider notre modèle de manière définitive, ces expériences devront être reproduites sur un plus grand nombre de plantes. Le mécanisme qui permet à la protéine RT de se retrouver dans les tubes criblés reste inconnu. La présence de la protéine RT dans les TC soulève une question sur son implication potentielle dans la transmission du virus par puceron, une hypothèse qui avait été suggérée pour le BYDV (Wang *et al.*, 1995).

En conclusion, la protéine RT (complète) pourrait favoriser le mouvement à longue distance des virions qui incorporent la RT*. En parallèle, un second type de mouvement, indépendant de la protéine RT, pourrait s'opérer pour les particules dépourvues de la protéine RT*. A l'avenir, nous pourrions poursuivre la recherche de la protéase (virale ou cellulaire) qui est responsable du clivage de la protéine RT et nous nous intéresserons aux mécanismes qui régulent ce clivage. En effet, cette

régulation permet de contrôler la proportion de protéine clivée et de protéine complète, deux composants majeurs du mouvement et de la transmission des polérovirus.

Le domaine C-terminal de la protéine RT des polérovirus aurait-il un rôle dans la stimulation des mécanismes de défenses de la plante ?

Le domaine C-terminal de la protéine RT du CABYV est absent des particules virales or, nous l'avons vu dans le chapitre 1 de cette étude, il semble être la cible de plusieurs protéines de l'hôte. De plus, le domaine C-terminal de la protéine RT du TuYV semble également être la cible d'une protéase cellulaire impliquée dans les réactions de défense de la plante (Véronique Brault, communication personnelle, article en préparation). On peut donc se demander si le clivage du domaine RT_{C-ter} et l'incorporation de la protéine RT* dans les virions ne serait pas un moyen pour le virus d'échapper aux réactions de défense de la plante lorsque celui-ci est initialement déposé dans les cellules du phloème par le puceron. De cette manière, et jusqu'à ce que la protéine RT complète soit synthétisée (soit après les étapes de décapsidation du virus, de traduction de l'ARN génomique et de synthèse de l'ARNsg), le virus demeurerait « invisible » dans la cellule. Le domaine RT_{C-ter} pourrait alors être considéré comme un stimulateur des réactions de défense de la plante hôte, dont le virus masquerait l'existence le plus longtemps possible. Si tel est le cas, comme ce domaine n'est pas nécessaire à la transmission et qu'il pourrait être reconnu par la plante comme facteur étranger, on peut se demander pourquoi les polérovirus n'ont pas évolué en se débarrassant de ce domaine. Nos études apportent une réponse à cette question puisqu'elles montrent que ce domaine est nécessaire au virus pour infecter les plantes. Il est intéressant à ce sujet, de signaler le cas particulier du *Pea enation mosaic-RNA1*, membre de la famille des *Luteoviridae*, dont le génome ne possède pas la séquence C-terminale de la protéine RT. Ce virus, incapable de se mouvoir à longue distance, a besoin d'un autre virus, le PEMV-2 (umbravirus) pour lui apporter les fonctions de mouvement (de Zoeten & Skaf, 2001; Demler & de Zoeten, 1991).

Matériel et méthodes

A. Matériel

A.1. Les virus

A.1.a. Le *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV)

La souche du CABYV utilisée au laboratoire a été isolée par Hervé Lecoq en 1989 (Lecoq *et al.*, 1992b) sur un plant de melon infecté. Son génome a été séquencé par Guilley *et al.* (1994), ce qui a permis l'obtention du clone infectieux (Prufer *et al.*, 1995) utilisé dans les expérimentations.

A.1.b. Le *Turnip yellows virus* (TuYV)

Le TuYV, appelé précédemment BWYV FL1, a été isolé à partir de laitue infectée à l'INRA de Montfavet (Veidt *et al.*, 1988). Ce clone a servi à l'obtention du clone infectieux par Veidt *et al.* (1992) utilisé au laboratoire.

A.2. Souches bactériennes et milieux de culture

La souche d'*Escherichia coli* DH5 α a été utilisée pour l'amplification des plasmides de type pGBKT7, pGADT7 et vecteurs de type « Gateway ».

Génotype : F- Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *recA1 endA1 hsdR17* (rK-, mK+) *phoA supE44* λ -*thi-1 gyrA96 relA1*.

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* C58C1 utilisée contient un plasmide Ti « désarmé » dépourvu des gènes tumoraux de l'ADN-T et qui porte le gène de résistance à la gentamycine. Le plasmide Ti apporte en *trans* les gènes *vir* nécessaires au transfert, dans les cellules de plante, d'un brin d'ADN compris entre les séquences bordantes de l'ADN-T présent sur le plasmide binaire. Le chromosome bactérien possède le gène de résistance à la rifampicine.

Les souches bactériennes d'*E. coli* sont cultivées à 37°C dans un milieu LB pH 7.5 (bactotryptone 10 g/L, bacto-yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L). Les souches d'agrobactéries sont, quant à elles, cultivées à 28°C dans ce même milieu.

Le milieu MS (Murashige et Skoog, 1962) (Tableau 27) a également été utilisé pour remettre en suspension les agrobactéries recombinantes en vue de la transformation d'*A. thaliana* par la technique du « floral dip ».

| Composants | Quantité mg/L | Concentration (molaire) |
|--|--------------------------|------------------------------------|
| Micro-éléments | | |
| <i>Cobalt Chloride 6H₂O</i> | 0.025 | 0.11 μ M |
| <i>Cupric Sulfate·5H₂O</i> | 0.025 | 0.1 μ M |
| <i>Na 2 –EDTA</i> | 37.26 | 100 μ M |
| <i>Ferrous Sulfate·7H₂O</i> | 27.8 | 100 μ M |
| <i>Boric Acid</i> | 6.2 | 100 μ M |
| <i>Potassium Iodide</i> | 0.83 | 5 μ M |
| <i>Manganese Sulfate·H₂O</i> | 16.9 | 100 μ M |
| <i>Molybdic Acid, Sodium Salt, 2H₂O</i> | 0.25 | 1.03 μ M |
| <i>Zinc Sulfate·7H₂O</i> | 8.6 | 29.91 μ M |
| Macro-éléments | | |
| <i>Calcium Chloride, Anhydrous</i> | 332.2 | 2.99 mM |
| <i>Potassium Phosphate Monobasic</i> | 170 | 1.25 mM |
| <i>Potassium Nitrate</i> | 1900 | 18.79 mM |
| <i>Magnesium Sulfate</i> | 180.7 | 1.5 mM |
| <i>Ammonium Nitrate</i> | 1650 | 20.61 mM |
| Vitamines | | |
| <i>myo-Inositol</i> | 100 | 0.56 μ M |
| <i>Glycine</i> | 2 | 26.64 μ M |
| <i>Nicotinic Acid</i> | 0.5 | 4.06 μ M |
| <i>Pyridoxine HCl</i> | 0.5 | 2.43 μ M |
| <i>Thiamine</i> | 0.1 | 0.30 μ M |

Tableau 27: Composition du milieu Murashige et Skoog.

A.3. Souche de levures et milieux de culture

La souche de levure AH109 (Clontech) utilisée pour le criblage de la banque d'ADNc par la technique du double-hybride, dérive de la souche PJ69-2A de *Saccharomyces cerevisiae*. Ces levures ont été manipulées génétiquement pour qu'elles soient adaptées aux expériences de double hybride. Elles sont auxotrophes pour la leucine et le tryptophane. De plus, elles possèdent 4 gènes rapporteurs pour diminuer le nombre de faux-positifs : *His3*, *Ade2*, *lacZ* et *Mel1*. Ces gènes sont placés sous le contrôle de 3 promoteurs : GAL1_{UAS}/GAL1_{TATA}, pour le gène *His3*, GAL2_{UAS}/GAL2_{TATA} pour *Ade2* et MEL1_{UAS}/MEL1_{TATA} pour *LacZ* et *Mel1*. Dans notre système nous n'utiliserons que les deux gènes *Ade2* et *His3* qui codent pour des enzymes intervenant respectivement dans la synthèse de l'adénine et de l'histidine.

Génotype : MATa *trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δgal80Δ LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3 MEL1 GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ.*

La souche de levure Y2HGold (Clontech) a également été utilisée dans les tests d'interaction par la technique du double hybride. Elle diffère de la précédente par la présence du gène rapporteur *Aur1-C* à la place du gène *LacZ*. *Aur1-C* permet une sélection des levures sur un milieu enrichi en auréobasidine A.

Génotype : *MATa trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δgal80Δ LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3 MEL1 GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-Aur1-C Mel1*.

Ces levures sont cultivées soit dans un milieu complet « Yeast Extract Peptone Dextrose » (YPD) (extraits de levures 1 %, peptone 2 %, dextrose 2 %, pH6,5) pour des conditions optimales de croissance ; soit dans un milieu « Synthetic Dextrose » (SD), milieu synthétique qui peut être déficient en éléments nutritionnels vitaux pour la sélection des clones recombinants. Le milieu peut être supplémenté de l'antibiotique auréobasidine A pour les tests d'interaction dans la souche Y2H Gold. Les levures sont cultivées à 28°C sur agitation en milieu liquide, ou sur un milieu solide contenant 1.5 % d'agar.

A.4. Vecteurs de clonages et d'expression

A.4.a. pGBKT7

La séquence codant pour les protéines virales ayant servi d'appât dans les expériences de double-hybride, a été amplifiée à partir du clone complet du CABYV (pCA₀WT) (Prufer *et al.*, 1995) puis introduite dans le vecteur pGBKT7. Ce plasmide possède deux origines de réplication : OriE et Ori2μ, pour son amplification dans *E. coli* et dans *S. cerevisiae* respectivement. Ce plasmide permet l'expression d'une protéine de fusion entre la protéine d'intérêt et le domaine de fixation à l'ADN (DF) du facteur de transcription GAL4 qui correspond aux 147 premiers acides aminés de la protéine. Ce plasmide possède également l'épitope c-Myc permettant d'étiqueter les protéines de fusion, un gène de résistance à la kanamycine pour la sélection des clones transformés d'*E. Coli* et le gène de sélection nutritionnel *trp1* permettant la sélection des levures recombinantes sur un milieu déficient en tryptophane.

A.4.b. pGADT7-Sfi

Ce vecteur de type pGADT7 (Clontech) permet l'expression de protéines fusionnées au domaine d'activation du facteur de transcription GAL4 (DA) correspondant aux acides aminés 768 à 881 de la protéine. Ce plasmide possède deux origines de réplication (OriE et Ori2μ) pour leur amplification dans *E. coli* et dans *S. cerevisiae* respectivement, un gène de résistance à l'ampicilline

pour la sélection des clones recombinants chez *E. Coli* et le marqueur nutritionnel *leu2* pour la sélection des levures auxotrophes pour la leucine sur un milieu de culture dépourvu de cet acide aminé.

Le pGADT7-Sfi dérive du plasmide pGADT7, dans lequel 2 sites de restriction *SfiIA* et *SfiIB* ont été introduits entre les sites *NcoI* et *EcoRI*. Pour cela 2 oligomères complémentaires possédant les sites *EcoRI*, *SfiIA*, *SfiIB* et *NcoI* ont été phosphorylés à la T4 polynucléotide kinase, en présence d'ATP 10 mM et de BSA 250 µg/mL, pendant 30 min à 37°C. Après dénaturation des deux brins 5 min à 70°C, les oligomères s'apparient en abaissant progressivement la température à 55°C, puis à 37°C pendant plusieurs heures.

Après digestion enzymatique par les enzymes *EcoRI* et *NcoI* cet adaptateur est introduit par ligation dans le pGADT7.

A.4.c. pDONR™207

Ce vecteur possède une cassette de clonage de type Gateway®. Les séquences *AttP* sont présentes dans la cassette de clonage pour permettre la réaction de recombinaison BP. Le gène *ccdB* (dont le produit est toxique pour les souches de bactéries non mutées dans l'ADN gyrase) et le gène *Cm^R* permettant la résistance au chloramphénicol, sont également présents dans la cassette. Ce plasmide confère aux bactéries transformées la résistance à la kanamycine.

A.4.d. Vecteurs d'expression

Tous les vecteurs d'expression ci-dessous permettent d'utiliser la technologie Gateway®. Ce sont des vecteurs de destination, qui possèdent les séquences *AttR* permettant la réaction de recombinaison LR avec le vecteur donneur. La cassette de clonage qui contient le gène *ccdB* et le gène *Cm^R*, est placée sous le contrôle du promoteur et du terminateur 35S.

- Le pK7WGF2, pK7FWG2, pH7WGR2, pH7RWG2

Ces vecteurs binaires ont été utilisés pour l'expression transitoire de différentes protéines dans le but d'étudier leur localisation subcellulaire. Ils permettent des fusions en N- ou en C-terminal de la GFP (F) ou de la RFP (R) (Tableau 28) (Karimi *et al.*, 2002) :

| Vecteurs | Fusion |
|----------|---------------------|
| pK7WGF2 | en N-ter de la EGFP |
| pH7WGR2 | en N-ter de la RFP |
| pK7FWG2 | en C-ter de la EGFP |
| pH7RWG2 | en C-ter de la RFP |

Tableau 28 : Vecteurs utilisés pour la fusion des protéines avec les protéines EGFP et RFP.

Les clones recombinants d'*E. Coli* sont sélectionnés en présence de spectinomycine et ceux d'*A. tumefaciens* en présence de spectinomycine, gentamycine et rifampicine.

- Le pB2GW7

Le plasmide pB2GW7 (Karimi *et al.*, 2002) est un vecteur binaire qui permet une expression constitutive de la séquence clonée. Le gène *Bar* présent sur ce vecteur confère aux plantes transformées la résistance au glufosinate-ammonium (herbicide Basta®, d'où la lettre « B » dans le nom du vecteur).

Les clones recombinants d'*E. Coli* sont sélectionnés en présence de spectinomycine et ceux d'*A. tumefaciens* en présence de spectinomycine, gentamycine et rifampicine.

A.5. Le matériel végétal

Différentes espèces végétales ont été utilisées au cours de ces travaux (Tableau 29) :

| Plantes | Nom latin | Famille | Utilisation |
|-------------|--|----------------------|---|
| Claytonias | <i>Montia perfoliata</i> | <i>Portulacaceae</i> | - Suivi accumulation virale et test de transmission par puceron. - Purification virale. |
| Concombres | <i>Cucumis sativus</i> | <i>Cucurbitaceae</i> | - Suivi accumulation virale. - Collecte de sève et extraction de protéines. - Elevage du puceron <i>Aphis gossypii</i> . |
| Tabacs | <i>Nicotiana benthamiana</i> | <i>Solanaceae</i> | - Agro-infiltration pour expression transitoire de protéines de fusion. |
| Arabidopsis | <i>Columbia-0 (Col-0)</i> <i>Wassilewskija (Ws)</i> | <i>Brassicaceae</i> | - Suivi accumulation virale et test de transmission par puceron. - Transformation stable. |
| Arabidopsis | Mutants KO divers (cf Tableau 30) | <i>Brassicaceae</i> | - Suivi accumulation virale et test de transmission par puceron pour la validation fonctionnelle des gènes candidats. - Obtention de doubles mutants |
| Piments | <i>Capsicum annuum</i> | <i>Solanaceae</i> | - Elevage du puceron <i>Myzus persicae</i> . |

Tableau 29 : Espèces végétales utilisées au cours des différentes expériences.

Le travail de validation fonctionnelle des gènes candidats a été réalisé sur des mutants KO d'arabidopsis obtenus *via* le NASC (The European Arabidopsis Stock Centre) ou auprès de nos collaborateurs. Les différents mutants utilisés sont présentés dans le Tableau 30.

| Origine des lignées | | Versailles | GABI | SALK | |
|---------------------|--------------------|--------------|--------------|---------|--------------------|
| Nom du gène | Nom de la protéine | Lignées | T-DNA vector | Ecotype | Localisation T-DNA |
| AT5G20250 | DIN10 | SALK_035336c | pROK2 | Col-0 | Exon 2 |
| AT3G49570 | Low Sulfur 3 | GK207B03 | pAC161 | Col-0 | Exon |
| AT2G19760 | Profilin 1 | EIH47 | pGKB5 | Ws | Exon I |
| AT4G29350 | Profilin 2 | DEB141 | pGKB5 | Ws | Promoteur |
| AT5G56600 | Profilin 3 | GK055A02 | pAC161 | Col-0 | Exon I |
| AT4G29340 | Profilin 4 | GK043D04 | pAC161 | Col-0 | Promoteur |
| AT2G19770 | Profilin 5 | DUS22 | pGKB5 | Ws | intron 2 |
| AT5G59950 | ALY1 | SALK_034227 | pROK2 | Col-0 | Exon 5 |
| AT5G02530 | ALY2 | SALK_090401 | pROK2 | Col-0 | 5'UTR |
| AT1G66260 | ALY3 | SALK_063320 | pROK2 | Col-0 | Exon 2 |

Tableau 30 : Description des mutants d'arabidopsis utilisés pour le suivi de l'accumulation du virus et pour les tests de transmission du CABYV.

A.6. Les pucerons

Le puceron vert du pêcher, *Myzus persicae*, maintenu en élevage sur des plants de piments (*Capsicum annuum*) est utilisé pour les tests de transmission du CABYV et du TuYV.

Le puceron du melon, *Aphis gossypii*, maintenu en élevage sur des plants de concombres (*Cucumis sativus*), a également été utilisé dans les expériences de transmission du CABYV.

A.7. Les anticorps

Tableau 31 : Anticorps utilisés pour les expériences de western blot ou les tests ELISA.

| Anticorps | Origines |
|--|--|
| - Anti-CABYV (pour test ELISA) | Sérum commercial, Sediag, France |
| - Anti-TuYV (pour test ELISA) | Sérum commercial, Loewe, Allemagne |
| - Anti-CABYV (pour western blot) | Sérum polyclonal (Lecoq <i>et al.</i> , 1992b) |
| - Anti CABYV-RT _{C-ter} (pour western blot) | Sérum polyclonal « Clavier » (Brault <i>et al.</i> , 2005) |
| - Anti CABYV-CP (pour western blot) | Sérum polyclonal « AG23 » obtenu à partir d'un peptide de synthèse |
| - Anti-GFP | Sérum polyclonal |
| - Anti-RFP | Sérum polyclonal Ozyme |
| - Anti-c-myc | Sérum, monoclonal, commercial Clontech, France |
| - Anti-P90 | Sérum polyclonal (O. Lemaire, INRA Colmar) |
| - Goat anti rabbit-peroxydase | Sérum polyclonal Invitrogen |
| - Goat anti-mouse-peroxydase | Sérum polyclonal Bethyl |

A.8. Les oligonucléotides

Tableau 32 : Principaux oligonucléotides utilisés pour les différentes expérimentations.

| Nom | Gène | Séquence 5' ---> 3' | Descriptif |
|---------------|---------------------|---|--|
| CA106 | RT _{C-ter} | TTTGATCCAACCTTTTAGGAGGTTTT | Clonage RT _{C-ter} CABYV dans pGADT7 |
| CA107 | RT _{C-ter} | TATGAATTCCAAAGACAAGACTT | Clonage RT _{C-ter} CABYV dans pGADT7 |
| CPca4F | CP | AACATATGAATACGGTCGCGGCTAG | Clonage CP CABYV dans pGADT7 et pGBKT7 |
| CPcaStopR | CP | AAGGATCCCTATTTCCGGTTCTGGACC | Clonage CP CABYV dans pGADT7 et pGBKT7 |
| CART* | RT | TTTAGGATCCTCTTTGACTATCAT | Clonage RT* CABYV dans le pGADT7 |
| CPcaSF | CP | AACATATGGCTAGAAGAGGAAGCCCA | Clonage du domaine S de la CP du CABYV dans pGADT7 et pGBKT7 |
| W166R-For | CP | GGATGGAAAGGCATGATGCAACCGAAG | Mutation de l'acide aminé W166 de la CP du CABYV en R |
| W166R-Rev | CP | TGCATCATGCCTTTCCATCCCCTTGATC | Mutation de l'acide aminé W166 de la CP du CABYV en R |
| W166Y-Rev | CP | TGCATCATGATATCCATCCCCTTGATC | Mutation de l'acide aminé W166 de la CP du CABYV en Y |
| W166Y-For | CP | GGATGGAATATCATGATGCAACCGAAG | Mutation de l'acide aminé W166 de la CP du CABYV en Y |
| CPca486R | CP | TTGGATCCTCCATCCCCTTGATCTG | Clonage CP CABYV sans l'Epitope 10 dans pGADT7 et pGBKT7 |
| DRTV-CA | RT | ACTATCATCCCCTGAAAAGATGG | Analyse mutant CABYV-RTΔC-ter |
| ActinF | Actine | GCACCCTGTTCTTCTTACCG | Amplification d'un fragment d'un gène d'actine d'arabidopsis AT3G18780 |
| ActinR | Actine | AACCCTCGTAGATTGCACA | Amplification d'un fragment d'un gène d'actine d'arabidopsis AT3G18780 |
| Sfil-PRF3-For | AT5G56600 | AAAAAAGGCCATTACGGCCATTCGTGGCAGACTTACGTCGACGATCA | Clonage PRF3 complet dans pGADT7-Sfi |
| Sfil-PRF3-Rev | AT5G56600 | AAAAAGCCGAGGGCGGCTCAGAGCCCCGATTCAATCAGGACT | Clonage PRF3 complet dans pGADT7-Sfi |
| PRF3-GeneF | AT5G56600 | CGGAATTCTCGTGGCAGACTTACGT | Clonage gène complet PRF3 dans pGADT7 |
| PRF3-GeneR | AT5G56600 | CGGGATCCTCAGAGCCCCGATTCAAT | Clonage gène complet PRF3 dans pGADT7 |
| PRF3_3UTR | AT5G56600 | ATAGTAGCAGCTTAAGTTT | Caractérisation mutant arabidopsis pour le gène PRF3 |
| INCO | AT3G49570 | TTCAAGAGAGGAAGAAGAGAGACG | Caractérisation mutant Low sulfur 3, AT3G49570 |
| INCOFOR | AT3G49570 | ATGGGAAAAGGAGGAGG | Caractérisation mutant Low sulfur 3, AT3G49570 |
| DIN10 | AT5G20250 | AGTCTCCAATACACTGCACATC | Génotypage mutants arabidopsis pour protéine glycosyl hydrolase DIN10 |
| DIN_FOR | AT5G20250 | ATGACGATTAACCGCGGTT | Caractérisation mutant Glycosyl hydrolase (DIN10) |
| DIN_REV | AT5G20250 | TCATACTCAACTGGATCAGATG | Caractérisation mutant Glycosyl hydrolase (DIN10) |
| DINREV2 | AT5G20250 | TTAGGATATTCATAACAGATCCG | Caractérisation mutant Glycosyl hydrolase (DIN10) |
| DINFOR2 | AT5G20250 | TGGTAGACCAACTCGCGATTGT | Caractérisation mutant Glycosyl hydrolase (DIN10) |
| LbB1 | LB T-DNA pROK2 | GCGTGGACCGCTTGCTGCAAC | Left Border T-DNA du vecteur pROK2 |
| 3144 | RB T-DNA pAC161 | GTGGATTGATGTGATATCTCC | Hybridation sur le LB du T-DNA du pAC161. Pour caractérisation mutants arabidopsis |
| 8409 | LB T-DNA pAC161 | ATATTGACCATCATACTCATTGC | Hybridation sur le LB du T-DNA du pAC161. Pour caractérisation mutants arabidopsis |
| 2588 | pAC161 | CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACG | Caractérisation de SALK |
| 8760 | pAC161 | GGGCTACTGAATTGGTAGCTC | Caractérisation de SALK |
| LbB1.3 | LB T-DNA | ATTTTGGCCGATTTCCGGAAC | Caractérisation des SALK |
| ALY580 | ALY1 | TTAGTTTGTCTCCATATCTCCAGAATG | Caractérisation des SALK |
| ALY612 | T-DNA | GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT | Caractérisation des SALK |
| ALY611 | ALY1 | GAAACTCCAATGGTCTCCATGG | Caractérisation des SALK |
| ALY723 | ALY2 | CCATACAGGCAATGCGTGTGC | Caractérisation des SALK |
| ALY722 | ALY2 | CAAAGATGGAATTACGCACCGC | Caractérisation des SALK |

| Nom | Gène | Séquence 5' ---> 3' | Descriptif |
|--------|------|-------------------------------|--|
| ALY721 | ALY3 | TACTTCTCCTGGAGCTCTTTGC | Caractérisation des SALK |
| ALY720 | ALY3 | GTCACCTCCTGATCAAGGTTGG | Caractérisation des SALK |
| ALY577 | ALY2 | AAAACATGTCAGGTGGCTTAGATATGTC | Caractérisation des SALK |
| ALY753 | ALY2 | CTTAGTTCCAGTCTCGATAGACG | Caractérisation des SALK |
| ALY575 | ALY4 | AAAACATGCTGGAGCATTGAATATGACTC | Caractérisation des mutants Hairpin RNAi |
| ALY790 | ALY4 | CTCCTGACCCTACGGACAGGC | Caractérisation des mutants Hairpin RNAi |

B. Méthodes

B.1. Techniques de biologie moléculaire

B.1.a. Reverse Transcription

Les ARN totaux extraits des plantes sont dénaturés 2 min à 80°C puis hybridés 5 min à 42°C avec 10 pmol d'un oligonucléotide approprié en présence de tampon (Tris-HCl 50 mM pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM), de dNTPs 1 mM, de 10 unités d'inhibiteur de RNase (RNasine) et de DTT 10 mM. La réaction de transcription inverse se déroule pendant 1 h à 42°C avec 4 unités de la reverse transcriptase du MLV (Murine Leukemia Virus). Les ADNc obtenus sont utilisés pour réaliser une PCR.

B.1.b. Polymerase Chain Reaction (PCR)

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) permet l'amplification *in vitro* de fragments d'ADN de façon exponentielle par l'utilisation d'une ADN polymérase thermostable isolée de la bactérie *Thermophilus aquaticus* (Taq polymerase). Deux amorces oligonucléotidiques correspondant à des brins complémentaires sont allongées dans des sens opposés. Plusieurs cycles (25 à 30) sont effectués comportant chacun 3 étapes : (1) dénaturation des brins matrice à 94°C. (2) hybridation des amorces à la matrice à une température de 2°C inférieure à leur point de fusion (Température melting ou T_m) ; (3) enfin une élongation à 72°C est effectuée en présence de tampon 1X, MgCl₂ 15 mM, oligonucléotides 1 et 2 10 mM, Taq polymerase 5 u/μL.

Pour ajouter des sites de restriction aux extrémités des fragments d'ADN à cloner, les amorces utilisées comportent des extensions en 5' incluant le site de restriction non apparié à la matrice. Dans ce cas, la réaction de PCR se fait en deux étapes : les 25 cycles, à une température correspondant au T_m-2°C de la séquence complète des oligonucléotides, sont précédés de 3 cycles au T_m-2°C de la séquence de l'amorce complémentaire à l'ADN.

La PCR a été utilisée pour faire de la mutagenèse dirigée afin :

- de muter la séquence de la protéine CP utilisée dans les tests d'interaction par YDH,
- de muter la séquence du CABYV WT dans la région du site potentiel de clivage,
- d'introduire deux sites de restrictions (*NheI* et *MLuI*) dans la séquence du CABYV WT.

B.1.c. Digestion par des enzymes de restriction, purification et ligation des fragments d'ADN dans un vecteur de clonage

Les enzymes de restriction sont des endonucléases qui coupent spécifiquement l'ADN bicaténaire et génèrent des extrémités franches ou cohésives. Chaque enzyme présente une activité optimale dans ses propres conditions de température et de milieu. En général, la réaction d'hydrolyse se déroule à 37°C pendant 1 à 2 h. Les produits de digestion sont d'abord déprotéinisés avec les mélanges phénol/chloroforme-alcool isoamylique (25/24 :1) puis chloroforme/alcool isoamylique (24 :1) avant de subir une deuxième digestion enzymatique. Les fragments digérés sont ensuite séparés sur gel d'agarose 1.5 % TBE 0.5X (Tris-HCl 50mM pH 8.3, Borate 50 mM, EDTA 2 mM). Après coloration au bromure d'éthidium (100 µg/mL) les fragments d'ADN à purifier sont découpés sous UV et extraits du gel en utilisant le kit Qiagen « extraction purification gel » selon la procédure décrite par le fournisseur.

La ligation est ensuite assurée par la T4 DNA ligase du bactériophage T4 qui catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre les extrémités 3'OH libres et 5'P des molécules d'ADN en présence d'ATP. La réaction se fait à 16°C avec 1 unité d'enzyme dans un tampon (Tris-HCl 50 mM pH 7.6, MgCl₂ 10 mM, ATP 1 mM, DTT 1mM et PEG 5 %).

B.1.d. Préparation de bactéries compétentes et transformation des bactéries par électroporation

Un litre de milieu LB estensemencé avec 20 mL d'une pré-culture de 16°C à 37°C (*E. Coli*) et 28°C (*A. tumefaciens*) jusqu'à atteindre une DO_{600nm} de 0,5 à 0,6. La culture est refroidie pendant 45 min minimum dans la glace puis sédimentée à 4°C pendant 15 min à 5000 g. Quatre centrifugations dans les mêmes conditions permettent de remettre le culot bactérien successivement en suspension dans 1 L d'eau froide stérile, dans 20 mL de glycérol 10 % et enfin dans 2 à 3 mL de glycerol 10 %. Les bactéries sont finalement aliquotées, plongées dans l'azote liquide et congelées à -80°C.

L'ADN plasmidique est ajouté à 40 µL de bactéries compétentes décongelées dans la glace. Après 5 min d'incubation dans la glace, le mélange est soumis à une impulsion de 1,8 kV (25 µF et 200 Ω). Il est ensuite incubé 30 min à 37°C (*E. Coli*) ou 1 h à 28°C (*A. tumefaciens*) sous agitation lente avec 800 µL de LB pour régénérer la paroi bactérienne. Les bactéries sont finalement étalées sur milieu gélosé sélectif, additionné des antibiotiques appropriés.

B.1.e. Préparation d'ADN plasmidique bactérien par la technique de la lyse alcaline

Les colonies recombinantes sélectionnées sont mises en culture dans du milieu LB supplémenté d'antibiotique à 37°C pendant une nuit sous agitation. L'ADN plasmidique est alors extrait selon le principe de la lyse alcaline (Macherey Nalgen). En présence d'un détergent anionique (le Sodium Dodécyl Sulphate, SDS) et de soude, les cellules sont lysées et l'ADN chromosomique ainsi que les protéines sont dénaturés. Les protéines et l'ADN chromosomique complexés au SDS sont précipités en présence d'ions potassium. L'ADN plasmidique présent dans le surnageant peut alors être précipité en présence d'éthanol puis est soumis à un traitement par la RNaseA (1 mg/mL) pendant 1 h à 37°C.

Les plasmides peuvent également être purifiés avec le kit « Miniprep » Qiagen selon les recommandations du fabricant.

Les concentrations d'ADN plasmidique sont estimées après mesure de l'absorbance à 260 nm par spectrométrie.

B.1.f. Clonage avec la technologie Gateway® (Figure 56)

- *Amplification par PCR de la séquence à cloner*

La séquence que l'on souhaite cloner dans le vecteur Gateway est tout d'abord amplifiée par PCR afin d'introduire à ses extrémités 3' et 5' les sites de recombinaison (AttB).

- *Réaction BP*

150 ng de produit PCR sont mélangés à 200 ng de vecteur pDONR™ 207, puis le mélange de réaction, est additionné de clonase BP et du tampon nécessaire à la réaction de recombinaison. L'incubation se fait de 3 à 16 h à 25°C (obtention du vecteur d'entrée). L'échantillon est ensuite traité à la protéinase K (0,2 µg/µL) pendant 10 min à 37°C.

- *Transformation d'E. coli*

1 µL de la réaction BP est utilisé pour transformer *E. coli* (DH5α) par choc thermique.

- *Réaction LR*

Après avoir sélectionné un clone d'entrée (vérification par séquençage de la séquence introduite), 150 ng de ce plasmide sont ajoutés à 150 ng du vecteur de destination, dans le mix contenant la clonase LR et le tampon de réaction. La recombinaison s'effectue à 25°C pendant 3 h minimum ou pendant la nuit. Le vecteur d'expression ainsi obtenu est amplifié dans *E. coli* et/ou dans *A. tumefaciens*.

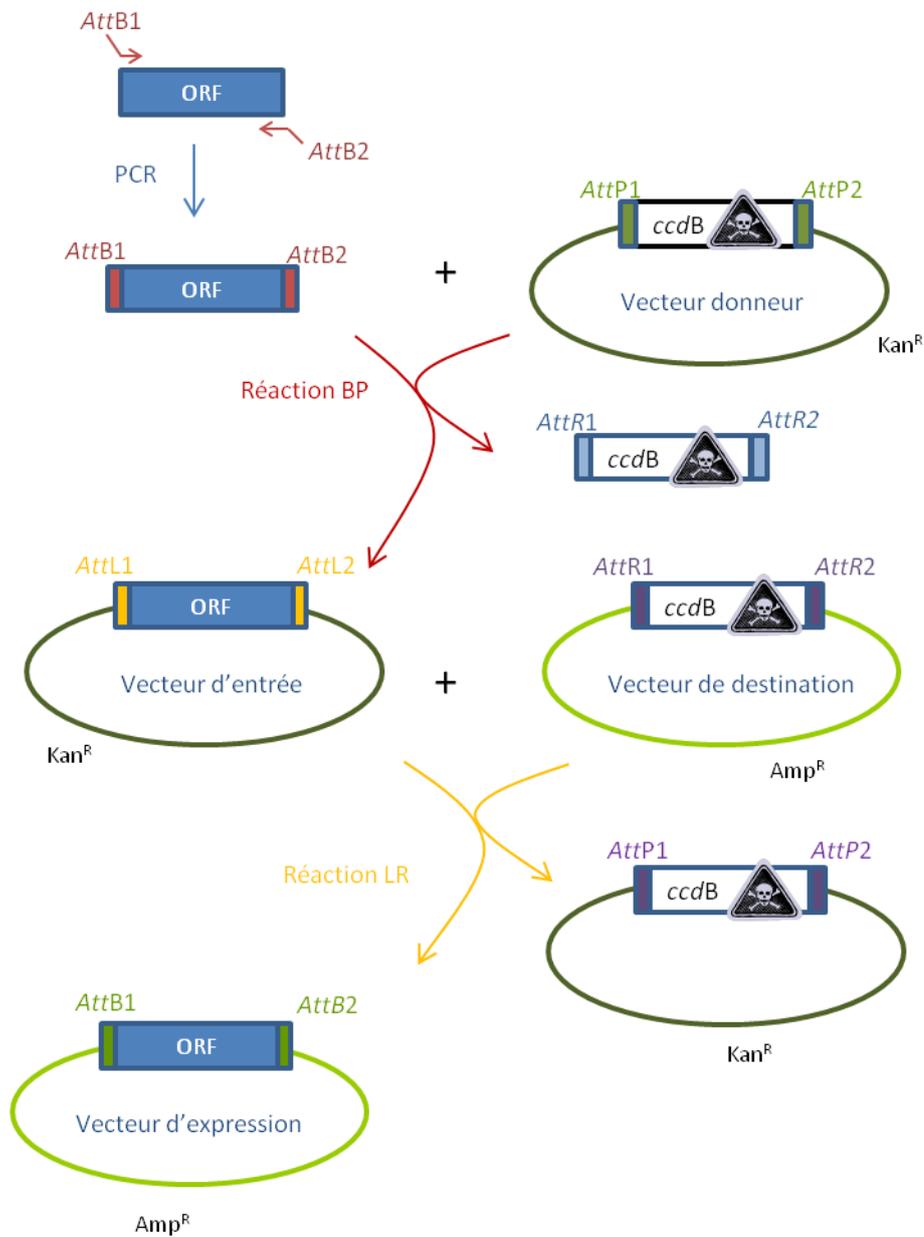


Figure 56 : Représentation schématique des étapes du clonage par la technologie Gateway®. Les sites de recombinaison sont introduits par PCR aux extrémités 5' et 3' de l'ORF à cloner dans le vecteur d'expression. Une première réaction de recombinaison (BP) permet l'introduction de cette séquence dans un vecteur donneur qui devient un vecteur d'entrée. Ce dernier est utilisé dans une réaction de recombinaison LR pour introduire l'ORF dans le vecteur de destination, appelé vecteur d'expression après recombinaison. *AttX* : sites de recombinaison; *ccdB* :gène toxique pour certaines souches de bactéries; *Kan^R* et *Amp^R* : gènes conférant la résistance à la kanamycine et à l'ampicilline respectivement.

B.1.g. Préparation d'ADN plasmidique de levure

Le culot d'une culture de levure à saturation est remis en suspension dans 250 µL de tampon de broyage (Tris-HCl 10 mM pH8, EDTA 1mM, NaCl 100 mM, Triton 2 %, SDS 1 %) additionné de quelques billes de verres (0,5 mm de diamètre), de 125 µL de phénol et de 125 µL de chloroforme. La suspension est vortexée vigoureusement pendant 3 min pour lyser les cellules et obtenir une émulsion. Après centrifugation, pour séparer la phase organique de la phase aqueuse qui contient les plasmides, cette phase est prélevée et l'ADN plasmidique est précipité par addition d'acétate d'ammonium (1/10 volume) et de 3 volumes d'éthanol 100 %. L'ADN plasmidique est sédimenté par centrifugation et lavé avec 1 mL d'éthanol 75 %. Finalement, l'ADN plasmidique est remis en suspension dans 40 µL d'eau.

B.1.h. Extraction d'ADN génomique d'arabidopsis au CTAB

Une à 2 feuilles par plante sont broyées dans l'azote liquide, puis la poudre est remise en suspension dans 300 µL de CTAB [CTAB 2 %, PVP 1 %, Tris 100 mM pH 8,0, EDTA 20 mM, NaCl 1,4 M]. Les cellules sont lysées en chauffant l'échantillon 10 min à 65°C puis l'échantillon est déprotéinisé par ajout d'un volume de chloroforme/alcool isoamylique (24 :1). Après centrifugation à 20 000 g pendant 5 min à température ambiante, la phase aqueuse contenant l'ADN est prélevée et additionnée d'un volume d'isopropanol. Après une incubation de 10 min à -20°C, l'ADN est sédimenté par une centrifugation de 5 min à 20 000 g et à 4°C. Le culot est lavé avec 1 mL d'éthanol 70 % puis remis en suspension dans 30 µL de Tris 10 mM pH 8,0. Deux µL de cette extraction sont utilisés pour réaliser, par une réaction PCR, le génotypage des mutants d'arabidopsis.

Remarque : Le kit « KAPA3G Plant PCR » de Biosystem a également été utilisé pour le génotypage des mutants d'arabidopsis. Aucune extraction d'ADN n'est nécessaire avec ce kit, la PCR est faite directement sur un échantillon brut de feuille en suivant les instructions du fournisseur.

B.1.i. Extraction d'ARN totaux

Les ARN totaux de plantes sont extraits à partir de 100 mg d'échantillons frais, broyés dans l'azote liquide. Les ARN totaux sont ensuite extraits avec le « RNeasy plant mini kit » de Qiagen en suivant les indications du fournisseur.

Les ARN viraux sont extraits des particules virales avec ce même kit.

B.2. Analyse et détection des protéines

B.2.a. Détection du virus par DAS-ELISA

Le test DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich-ELISA) est une technique immuno-enzymatique dans lequel l'antigène (le virus dans notre cas) est pris en sandwich entre deux couches d'anticorps (Clark & Adams, 1977).

Deux à trois semaines après inoculation des plantes, un échantillon de feuilles de 200 mg est broyé dans 1 mL de tampon de broyage (PBS 1x, Tween-20 0,05%, PVP 2%). 200 µL du surnageant sont déposés dans le puits d'une plaque de microtitration préalablement recouverts avec l'anticorps primaire dirigé contre le virus et dilué dans un tampon carbonate (15 mM NaCO₃, 35 mM NaHCO₃ pH 9,6). Après une nuit d'incubation à 4°C et trois lavages avec du PBS-Tween 0,05 % pour éliminer les protéines non retenues par l'anticorps, l'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline dirigé contre le virus, dilué dans un tampon [PBS 1x, Tween-20 0,05 %, PVP 2%, ovalbumine 0,2 %] est déposé dans les puits. Après 4 h d'incubation à 32°C et 3 trois lavages pour enlever l'excès d'anticorps, le complexe est révélé par l'ajout du substrat incolore, transformé en paranitrophénol, de couleur jaune lorsqu'il est hydrolysé par la phosphatase alcaline. La détection des virions dans chaque puits de la plaque est alors faite en mesurant la DO à 405 nm à différents temps après l'addition du substrat.

B.2.b. Extraction et solubilisation de protéines

- *Préparation des extraits protéiques de levures*

Une culture à saturation est centrifugée, puis les levures sont lavées avec 1 mL d'eau. Après une deuxième centrifugation, les levures sont lysées avec une solution [NaOH 1,85M, β-mercaptoéthanol 7,5 %]. Les protéines sont alors précipitées à 4°C par ajout d'acide trichloro acétique (TCA) 55 %. Les protéines sont ensuite sédimentées par centrifugation, puis remises en suspension dans du PBS [NaCl 150 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KCl 2,5 mM, pH7,4]. Après addition de tampon Laemmli 2X [Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 4 %, β-mercapto-éthanol 10 %, glycérol 20 %, bleu de bromophénol 0,1 %], les protéines dénaturées à 65°C pendant 15 min sont prêtes à être soumises à une électrophorèse SDS-PAGE.

- *Préparation des extraits protéiques de plantes ou de protoplastes*

L'extraction des protéines se fait soit à partir de protoplastes ou à partir de plantes infectées. Pour extraire les protéines des protoplastes, ces derniers sont culotés par centrifugation et repris dans

50 µL de tampon Laemmli 2X [Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 4 %, β-mercapto-éthanol 10 %, glycérol 20 %, bleu de bromophénol 0,1 %]. Pour les plantes, 200 mg de feuilles sont broyées dans 2 volumes du tampon Laemmli 2X. Les protéines solubilisées par chauffage 10 minutes à 95°C, peuvent être chargées directement sur le gel SDS-PAGE.

B.2.c. Séparation des protéines par électrophorèse SDS-PAGE en conditions dénaturantes

Les protéines solubilisées (préparées comme précédemment) sont séparées en fonction de leur poids moléculaire sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE). Le SDS se lie aux protéines et altère leur conformation spatiale. Sa charge négative importante rend celle des protéines négligeable. Il transforme les protéines en anions et permet leur migration vers l'anode (pôle +). Le gel utilisé est constitué de deux parties : un gel de concentration et un gel de séparation (Tableau 33). Le gel de concentration permet de concentrer toutes les protéines sur une bande très mince due à la création d'un front de migration composé des ions Cl⁻ et de la glycine. Le gel de séparation permet une séparation des protéines selon leurs poids moléculaires. La migration est réalisée à un ampérage constant de 20 mA dans du tampon de migration (Tableau 33).

| | |
|--|--|
| Composition des gels pour l'électrophorèse en conditions dénaturante (SDS-PAGE) | Gel de concentration (Stacking) |
| | Acrylamide 5 % SDS 0,1 % Tris HCl 120 mM pH 6,8 |
| | Gel de séparation (Resolving) |
| | Acrylamide 10 % SDS 0,1 % Tris HCl 37 mM pH 8,8 |
| Tampon de migration | Tris-HCl 25 mM pH 8,4 Glycine 200 mM SDS 0,1 % |

Tableau 33: Composition des gels et des tampons utilisés pour la réalisation d'électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).

B.2.d. Coloration des protéines sur gels de polyacrylamide

Les protéines séparées sur gel d'acrylamide sont soit colorées au bleu de Coomassie [acide acétique 10 %, isopropanol 25 %, bleu de Coomassie R250 0,5 %], soit au bleu colloïdal [SO₄(NH₄)₂ 17 %, acide acétique 0,5 %, méthanol 34 %, Serva blue G 0,1 %] lorsque des analyses de spectrométrie de masse sont nécessaires.

B.2.e. Immuno-détection des protéines sur membrane de nitrocellulose

Après séparation des protéines par électrophorèse, celles-ci sont transférées sur une membrane de nitrocellulose sous un courant électrique constant de 60 V pendant 2 h dans un tampon [Tris 25 mM pH8,3, glycine 192 mM, éthanol 20 %].

La révélation des protéines fixées sur la membrane se fait en utilisant un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt. Dans un premier temps, afin d'éviter la fixation aspécifique des anticorps primaires sur la membrane, celle-ci est saturée par des protéines de lait pendant 30 min dans une solution composée de PBS, de Tween 20 0,5 % et de lait en poudre 5 %. La membrane est incubée une nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire dilué dans ce même tampon. Le complexe antigène-anticorps est visualisé grâce à un anticorps secondaire couplé à la peroxydase (incubation de 4 h) (cf Tableau 31). Après chaque incubation, la membrane est lavée 3 fois, pendant 10 min, dans une solution PBS-Tween 20 0,5 %. La révélation se fait par ajout du substrat chimioluminescent ; la réaction enzymatique va permettre la formation d'un produit luminescent visualisé sur film photographique.

B.2.f. Identification des protéines par spectrométrie de masse

Les analyses de spectrométrie de masse ont été réalisées à la plateforme de l'Institut de Biologie moléculaire et Cellulaire de Strasbourg. Les échantillons ont été préparés selon la procédure décrite par Hamrita *et al.* (2011). Pour les analyses par Nano LC-MS-MS, le protocole décrit par Bencharki *et al.* (2010a) a été suivi.

B.3. Sous-clonage de la banque d'ADNc de cellules compagnes d'*A. thaliana* du plasmide pTriplEx2 dans le pGADT7-Sfi - Titration de la banque d'ADNc sous-clonée

La banque de cellules compagnes d'*A. thaliana* obtenue dans le plasmide pTriplEX2 (Ivashikina *et al.*, 2003), incompatible avec la technique du YDH, a été sous-clonée dans le plasmide pGADT7-Sfi. Ce plasmide dérive du pGADT7 après introduction de 2 sites de clonage *Sfi*IA et *Sfi*IB (cf Matériel et méthodes page 143). Pour ce sous-clonage, la banque a été digérée avec l'enzyme de restriction *Sfi*I pour libérer les ADNc. Puis, les ADNc ont été extraits à partir d'un gel d'agarose et purifiés sur colonne Qiagen®. Ces ADNc ont ensuite été introduits dans le pGADT7-Sfi après avoir déterminé les meilleures conditions de ligation. Cette nouvelle banque a été introduite par électroporation dans *E. Coli* et les bactéries recombinantes ont été sélectionnées sur milieu LB additionné d'ampicilline. L'ensemble des bactéries a ensuite été repris dans du milieu LB additionné

de 25 % de glycérol. La banque a été titrée à partir d'une série de dilutions réalisées dans du milieu LB (dilution à 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6} , et à 10^{-7}). Une fraction aliquote de la nouvelle banque a été conservée à -80°C .

B.4. Criblages de la banque d'ADNc par YDH

B.4.a. Transformation de levures par choc thermique

Environ 30 mL de YPD sontensemencés avec une pré-culture à saturation, et mis sous agitation à 28°C jusqu'à ce que la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ atteigne 0,5. Les levures sont sédimentées à 1 700 g, 3 min et remises en suspension dans 2 mL d'eau stérile. Les levures sont à nouveau sédimentées à 4500 g pendant 1 min, lavées une seconde fois dans les mêmes conditions, puis deux fois dans de l'acétate de lithium/Tris-EDTA (AcLi/TE) [0.1 M lithium acetate, 10 mM Tris-HCl pH 7,6 and 1 mM EDTA].

L'ADN plasmidique est ensuite ajouté aux levures (on peut transformer les levures avec deux plasmides en même temps), en présence d'ADN carrier (sperme de saumon, 0,1 mg/mL) et de PEG 3350 40% dans de l'AcLi/TE (PEG/AcLi/TE). La transformation des levures est réalisée par choc thermique à 42°C pendant 20 min. Les levures collectées par centrifugation sont remises en suspension dans l'eau et étalées sur milieu sélectif (milieu SD dépourvu de tryptophane et/ou de leucine).

B.4.b. Criblages de la banque d'ADNc par YDH

A partir d'une colonie fraîche de la souche AH109 exprimant la protéine virale, une pré-culture est lancée dans 40 mL de YPD. Lorsque la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ atteint une valeur comprise entre 1,5 et 2, la pré-culture est utilisée pour ensemencer 500 mL de YPD. La culture est réalisée sous agitation à 28°C jusqu'à ce que la $\text{DO}_{600\text{nm}}$ atteigne une valeur comprise entre 0,3 et 0,4. Les levures sont alors collectées par centrifugation et lavées dans de l'AcLi/TE. Les levures sont à nouveau centrifugées et reprises dans 5 mL d'AcLi/TE. Ces levures sont ensuite ajoutées au mélange de transformation contenant les plasmides de la banque et l'ADN carrier (sperme de saumon, 0,1 mg/mL). Après une incubation de 10 min à température ambiante, un mélange de PEG/AcLi/TE est ajouté pour fragiliser la paroi des levures. Le mélange de transformation est incubé 1 h à 30°C . Puis, pour augmenter l'efficacité de transformation, 10 % de DMSO sont ajoutés au milieu et les levures sont incubées à 42°C pendant 20 min (choc thermique) avant d'être incubées 3 min dans la glace. Les levures sont alors collectées par centrifugation et reprises dans 3 mL de YPD, avant d'être incubées 1 h à 30°C . Les levures sédimentées par centrifugation sont lavées dans 20 mL d'eau, puis reprises dans 20 mL de milieu sélectif (dépourvu en His/trp/Leu ou en Ade/His/trp/Leu) additionné de tétracycline afin

d'éviter les contaminations bactériennes. Après une nuit de sédimentation à 4°C, 10 mL de surnageant sont éliminés et le culot est remis en suspension dans les 10 mL restants. Le mélange de transformation est alors étalé sur milieu sélectif et les boîtes de culture sont incubées à 28°C pendant 5 jours ou plus en fonction du développement des colonies.

B.5. Purifications virales

Les purifications virales se font à partir de matériel végétal conservé à -80°C afin de préserver le virus et de faciliter le broyage des plantes selon la procédure décrite par van den Heuvel *et al.* (1991). 300 g de plantes sont broyées dans 600 mL de tampon de citrate de sodium 0,1 M pH6,0 contenant 0,5 % de macérozyme et 0,5 % de cellulase (afin de pouvoir atteindre les cellules du phloème), 0,5 % d'éthanol et 0,1 % d'acide thioglycolique. Le broyat est laissé sous agitation pendant 4 h à température ambiante. Un mélange volume à volume de chloroforme/butanol (450 mL) est ajouté et la suspension est homogénéisée pendant 10 min. Après 17 min de centrifugation à 10 000 rpm (rotor JA14 Beckman), la phase aqueuse est prélevée minutieusement et 0,5 % de Triton X-100 sont ajoutés. Après 30 minutes d'agitation, 8 % de PEG 6000 et 0,4 % de NaCl sont additionnés et le mélange est agité pendant 1 h à température ambiante puis laissé au repos toute la nuit également à température ambiante. Le virus est ensuite sédimenté par centrifugation pendant 22 min à 12000 rpm (rotor JA14 Beckman), 17°C, et les culots sont repris dans du tampon citrate contenant 5 % d'éthanol puis incubés sous agitation pendant 1 h. Après centrifugation (17 min, 9000 rpm rotor JA14 Beckman) le surnageant, qui contient les particules virales, est réparti sur plusieurs coussins de saccharose 30 % (dans tampon citrate, éthanol 0,5 %). Le virus est sédimenté 2 h 30 à 35000 rpm (rotor 50.2Ti Beckman) puis repris dans 200 µL de tampon citrate 0,5 % d'éthanol. La suspension virale est alors déposée sur un gradient de saccharose (20 à 60 %) qui est centrifugé 2h30 à 35000 rpm (Rotor SW41 Beckman). Des fractions de 500 µL sont récoltées à partir du gradient et les fractions dont le rapport $\frac{DO_{260\text{ nm}}}{DO_{280\text{ nm}}}$ est compris entre 1,5 et 1,7 sont conservées. La concentration virale est déterminée en utilisant la formule suivante : $c (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \frac{DO_{260\text{ nm}}}{\epsilon}$ avec ϵ = coefficient d'extinction molaire du virus, soit 8,5 pour le CABYV et 8,6 pour le TuYV. Les fractions peuvent être conservées à -80°C pendant plusieurs mois.

B.6. Inoculation de plantes et protoplastes

B.6.a. Transmission de virus par pucerons

Les pucerons acquièrent le virus pendant 48 h pour le CABYV (ou 24 h pour le TuYV) sur des plantes virulifères ou sur un milieu artificiel contenant le virus purifié (virus à 100 ng/μL pour le CABYV ou 50 ng/μL pour le TuYV dans le milieu MP148 (Bruyere *et al.*, 1997). Les pucerons sont ensuite transférés pendant 4 jours minimum sur les plantes à inoculer à l'aide d'un pinceau (10 pucerons par plante). Puis ils sont éliminés par traitement insecticide au Confidor® (matière active : imidaclopride ; insecticide systémique) ou Phosdrin® (matière active : mévinphos ; insecticide de contact).

B.6.b. Inoculation de plantes par les virus *via* les agrobactéries

Les agrobactéries contenant le clone complet du virus sont mises en culture pendant 18 h dans un milieu LB contenant les antibiotiques appropriés, du MES 10 mM, pH 5,6, et de l'acétosyringone 20 μM. Elles sont ensuite sédimentées par centrifugation (10 min, 4 500 g, 17°C) et remises en suspension dans un tampon contenant MgCl₂ 10 mM, MES 10 mM, acétosyringone 150 μM. La DO_{600 nm} est ajustée à 0,5 puis la suspension est laissée à température ambiante pendant 1 à 3 h. Les feuilles à inoculer sont alors blessées légèrement avec une aiguille, puis les bactéries sont inoculées aux plantes au niveau de la blessure et à l'aide d'une seringue.

B.6.c. Agro-inoculation de *N. benthamiana* pour expression transitoire de protéines marquées

Le protocole utilisé est le même que celui décrit ci-dessus, sauf que les DO de la suspension bactérienne utilisée peuvent varier de 0,25 à 0,5 selon les constructions.

B.6.d. Electroporation de protoplastes de *C. quinoa* avec des transcrits viraux

Des protoplastes de *C. quinoa* ont été électroporés avec des transcrits viraux correspondants aux CABYV-WT et -NM3, obtenus après transcription par la T7 ARN polymérase des plasmides pCA-NM3 et pCA-WT linéarisés par *SalI* selon le protocole décrit par Reutenauer *et al.* (1993). L'expression des protéines de structure a été analysée par western blot selon le protocole décrit dans le paragraphe B.2.e.

B.7. Microscopie

B.7.a. Localisation subcellulaire des protéines fluorescentes par microscopie confocale

Les disques foliaires des plantes agro-inoculées ont été montés entre lame et lamelle dans de l'eau. Les observations ont été réalisées à l'IBMP de Strasbourg avec le microscope confocal LSM700 de Zeiss possédant un objectif à eau C-apo-chromat (63x/1.2-W Korr). Les longueurs d'ondes utilisées pour l'excitation/émission sont 488 nm/505 à 545 nm pour la EGFP et 555 nm / 585 à 615 nm pour la RFP. Les images ont ensuite été traitées avec le logiciel Zen 2009 Light Edition (Zeiss).

B.7.b. Fluorescence Lifetime Microscopy (FLIM)

Lorsque deux fluorochromes sont très proches l'un de l'autre et que le spectre d'émission du premier (appelé donneur) chevauche le spectre d'excitation du second (appelé accepteur), de l'énergie peut être transférée par résonance du donneur vers l'accepteur, c'est le phénomène de *Förster resonance energy transfer* (FRET). La mesure du temps de vie de la fluorescence du fluorochrome donneur par FLIM permet de mesurer le taux de FRET. Les mesures par FLIM ont l'avantage d'être indépendantes du niveau d'intensité de la fluorescence et de la concentration locale en fluorochrome. Cette technique repose sur le principe selon lequel le temps passé par le fluorochrome donneur à l'état excité est plus court lorsqu'il y a transfert d'énergie par résonance à un fluorochrome voisin. En comparant les temps de vie du fluorochrome donneur couplé à la protéine A en absence et en présence de fluorochrome accepteur couplé à la protéine B on peut déterminer si une protéine A et une protéine B sont suffisamment proches pour permettre le FRET entre les fluorochromes auxquels elles sont couplées.

Dans les expériences de FRET, lorsque le donneur et le receveur sont co-exprimés, l'efficacité de FRET (E)(%) reflétant la distance entre les deux fluorochromes et donc l'interaction ou non entre les deux protéines, est calculée selon ce ratio $E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D}$ où τ_{DA} est le temps de vie (en ns) du donneur en présence d'accepteur, et τ_D est le temps de vie du donneur seul (en ns). Si le pourcentage est supérieur à 5 % alors on considère qu'il y a interaction entre les deux protéines.

Les expériences de FLIM ont été réalisées à l'IBMP de Strasbourg avec un microscope Eclipse Nikon TE200 connecté au système LIFA (Lambert Instruments Fluorescence Attachment). La durée de vie de la fluorescence a été mesurée avec le logiciel LiFLIM (version 1.2.8) sur des *N. benthamiana* agro-infiltrées. Le couple EGFP-RFP a été utilisé dans ce travail pour les expériences de FLIM.

B.7.c. Immunosorbent Electron Microscopy (ISEM)

Les particules virales présentes dans la sève de concombres infectés ou dans les protoplastes infectés ont été observées par ISEM selon le protocole suivant. Des grilles de formvar/carbone 300 mesh ont été recouvertes avec une solution d'anticorps (1 %) dirigés contre le CABYV (Sediag SAS), pendant 30 min. Puis les grilles ont été incubées avec un lysat de protoplastes dans un tampon sodium phosphate 0,1 M pH 7,0, et colorées négativement à l'acétate d'uranyl (2 %) pendant 10 minutes. Les observations ont été réalisées par microscopie électronique à transmission (80 kV).

B.8. Introduction d'une séquence virale dans le génome d'*A. thaliana* par la technique du « floral dip »

Les capacités de transfert de gènes d'*Agrobacterium* sont utilisées pour transformer *A. thaliana* de façon stable, par la technique du « floral dip » (Martinez-Trujillo *et al.*, 2004).

30 mL d'une culture d'agrobactéries à saturation sont utilisés pour ensemercer 300 mL de milieu LB additionné de spectinomycine (250 µg/mL), de rifampicine (100 µg/mL) et d'acétosyringone (20 µM). Lorsque la DO_{600nm} a atteint une valeur de 1,5, les bactéries sont reprises dans 300 mL de milieu MS 0,5X additionné d'acétosyringone (200 µM), de saccharose (5 %) et d'un adjuvant, le Silwet L-77 (250 mg/mL) favorisant le mouillage de la plante.

Les bourgeons floraux des plants sont ensuite plongés dans cette solution pour permettre l'introduction du transgène dans les cellules embryonnaires. Les plantes sont alors placées sous un dôme (pour favoriser une atmosphère humide), à l'abri de la lumière pendant 24 h. Les graines des plantes ainsi traitées sont récoltées 2 à 3 semaines plus tard. Après semis, les plantes transformées sont sélectionnées grâce à leur résistance à l'herbicide Basta® (300 mg/L).

B.9. Croisement de mutants d'arabidopsis pour l'obtention de doubles mutants

Les bourgeons floraux non matures (afin d'éviter l'auto-fécondation) de plants d'arabidopsis sont émasculés sous une loupe binoculaire (retrait des 6 étamines à l'aide de pinces fines). 24 h après, le pistil est fécondé en frottant doucement des bourgeons matures de la seconde plante, dite « mâle », possédant l'autre génotype. Une seconde pollinisation est réalisée 12 h plus tard et les graines des plantes sont récoltées 2 à 3 semaines plus tard.

Références bibliographiques

- Aaziz, R., Dinant, S. & Epel, B. L. (2001). Plasmodesmata and plant cytoskeleton. *Trends Plant Sci* **6**, 326-330.
- Abbink, T. E., Peart, J. R., Mos, T. N., Baulcombe, D. C., Bol, J. F. & Linthorst, H. J. (2002). Silencing of a gene encoding a protein component of the oxygen-evolving complex of photosystem II enhances virus replication in plants. *Virology* **295**, 307-319.
- Abbink, T. E. M., Tjernberg, P. A., Bol, J. F. & Linthorst, H. J. M. (1998). Tobacco Mosaic Virus Helicase Domain Induces Necrosis in N Gene-Carrying Tobacco in the Absence of Virus Replication. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**, 1242-1246.
- Abdul-Razzak, A., Guiraud, T., Peypelut, M., Walter, J., Houvenaghel, M. C., Candresse, T., O, L. E. G. & German-Retana, S. (2009). Involvement of the cylindrical inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against Lettuce mosaic potyvirus. *Mol Plant Pathol* **10**, 109-113.
- Ach, R. A., Durfee, T., Miller, A. B., Taranto, P., Hanley-Bowdoin, L., Zambryski, P. C. & Gruissem, W. (1997). RRB1 and RRB2 encode maize retinoblastoma-related proteins that interact with a plant D-type cyclin and geminivirus replication protein. *Mol Cell Biol* **17**, 5077-5086.
- Ala-Poikela, M., Goytia, E., Haikonen, T., Rajamaki, M. L. & Valkonen, J. P. (2011). Helper Component Proteinase of genus Potyvirus is an Interaction Partner of Translation Initiation Factors eIF(iso)4E and eIF4E that Contains a 4E Binding Motif. *J Virol*.
- Albar, L., Bangratz-Reyser, M., Hebrard, E., Ndjioudjop, M. N., Jones, M. & Ghesquiere, A. (2006). Mutations in the eIF(iso)4G translation initiation factor confer high resistance of rice to Rice yellow mottle virus. In *Plant J*, pp. 417-426. England.
- Albert, R. (2005). Scale-free networks in cell biology. *J Cell Sci* **118**, 4947-4957.
- Alzhanova, D. V., Napuli, A. J., Creamer, R. & Dolja, V. V. (2001). Cell-to-cell movement and assembly of a plant closterovirus: roles for the capsid proteins and Hsp70 homolog. *EMBO J* **20**, 6997-7007.
- Amari, K., Boutant, E., Hofmann, C., Schmitt-Keichinger, C., Fernandez-Calvino, L., Didier, P., Lerich, A., Mutterer, J., Thomas, C. L., Heinlein, M., Mely, Y., Maule, A. J. & Ritzenthaler, C. (2010). A family of plasmodesmal proteins with receptor-like properties for plant viral movement proteins. *PLoS Pathog* **6**.
- Asano, M., Satoh, R., Mochizuki, A., Tsuda, S., Yamanaka, T., Nishiguchi, M., Hirai, K., Meshi, T., Naito, S. & Ishikawa, M. (2005). Tobamovirus-resistant tobacco generated by RNA interference directed against host genes. *FEBS Lett* **579**, 4479-4484.
- Ashby, J., Boutant, E., Seemanpillai, M., Groner, A., Sambade, A., Ritzenthaler, C. & Heinlein, M. (2006). Tobacco mosaic virus movement protein functions as a structural microtubule-associated protein. *J Virol* **80**, 8329-8344.
- Ashoub, A., Rohde, W. & Pruffer, D. (1998). In planta transcription of a second subgenomic RNA increases the complexity of the subgroup 2 luteovirus genome. *Nucleic Acids Res* **26**, 420-426.
- Auclair, J. L. (1963). Aphid feeding and nutrition. *Annu Rev Entomol* **8**, 439-490.
- Avisar, D., Prokhnevsky, A. I. & Dolja, V. V. (2008). Class VIII myosins are required for plasmodesmal localization of a closterovirus Hsp70 homolog. *J Virol* **82**, 2836-2843.
- Bagewadi, B., Chen, S., Lal, S. K., Choudhury, N. R. & Mukherjee, S. K. (2004). PCNA interacts with Indian mung bean yellow mosaic virus rep and downregulates Rep activity. *J Virol* **78**, 11890-11903.
- Bahner, I., Lamb, J., Mayo, M. A. & Hay, R. T. (1990). Expression of the genome of potato leafroll virus: readthrough of the coat protein termination codon in vivo. *J Gen Virol* **71** (Pt 10), 2251-2256.
- Bak, A., Irons, S. L., Martinière, A., Blanc, S. & Drucker, M. (2012). Host cell processes to accomplish mechanical and non-circulative virus transmission. *Protoplasma* **249**, 529-539.
- Baluska, F., von Witsch, M., Peters, M., Hlavacka, A. & Volkmann, D. (2001). Mastoparan alters subcellular distribution of profilin and remodels F-actin cytoskeleton in cells of maize root apices. *Plant Cell Physiol* **42**, 912-922.
- Baniwal, S. K., Bharti, K., Chan, K. Y., Fauth, M., Ganguli, A., Kotak, S., Mishra, S. K., Nover, L., Port, M., Scharf, K. D., Tripp, J., Weber, C., Zielinski, D. & von Koskull-Doring, P. (2004). Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J Biosci* **29**, 471-487.
- Barabasi, A. L. & Oltvai, Z. N. (2004). Network biology: understanding the cell's functional organization. *Nat Rev Genet* **5**, 101-113.
- Barajas, D., Jiang, Y. & Nagy, P. D. (2009). A unique role for the host ESCRT proteins in replication of Tomato bushy stunt virus. *PLoS Pathog* **5**, e1000705.
- Barajas, D. & Nagy, P. D. (2010). Ubiquitination of tombusvirus p33 replication protein plays a role in virus replication and binding to the host Vps23p ESCRT protein. *Virology* **397**, 358-368.
- Beachy, R. N. & Heinlein, M. (2000). Role of P30 in replication and spread of TMV. *Traffic* **1**, 540-544.
- Beauchemin, C., Boutet, N. & Laliberte, J. F. (2007). Visualization of the interaction between the precursors of VPg, the viral protein linked to the genome of turnip mosaic virus, and the translation eukaryotic initiation factor iso 4E in Planta. *J Virol* **81**, 775-782.
- Beauchemin, C. & Laliberte, J. F. (2007). The poly(A) binding protein is internalized in virus-induced vesicles or redistributed to the nucleolus during turnip mosaic virus infection. *J Virol* **81**, 10905-10913.
- Bencharki, B., Boissinot, S., Revollon, S., Ziegler-Graff, V., Erdinger, M., Wiss, L., Dinant, S., Renard, D., Beuve, M., Lemaitre-Guillier, C. & Brault, V. (2010a). Phloem protein partners of Cucurbit aphid borne yellows virus: possible involvement of phloem proteins in virus transmission by aphids. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 799-810.

- Benitez-Alfonso, Y., Faulkner, C., Ritzenthaler, C. & Maule, A. J. (2010). Plasmodesmata: gateways to local and systemic virus infection. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 1403-1412.
- Beuve, M., Naibo, B., Foulgocq, L. & Lapierre, H. (1999). Irrigated hybrid maize crop yield losses due to Barley yellow dwarf virus-PAV luteovirus. *Crop sci* **39**, 1830-1834.
- Bilgin, D. D., Liu, Y., Schiff, M. & Dinesh-Kumar, S. P. (2003). P58(IPK), a plant ortholog of double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR inhibitor, functions in viral pathogenesis. *Dev Cell* **4**, 651-661.
- Bisaro, D. M. (2006). Silencing suppression by geminivirus proteins. *Virology* **344**, 158-168.
- Blackman, L. M., Boevink, P., Cruz, S. S., Palukaitis, P. & Oparka, K. J. (1998). The movement protein of cucumber mosaic virus traffics into sieve elements in minor veins of *Nicotiana glauca*. *Plant Cell* **10**, 525-538.
- Blackman, L. M., Harper, J. D. & Overall, R. L. (1999). Localization of a centrin-like protein to higher plant plasmodesmata. *Eur J Cell Biol* **78**, 297-304.
- Blanc, S., Schmidt, I., Vantard, M., Scholthof, H. B., Kuhl, G., Esperandieu, P., Cerutti, M. & Louis, C. (1996). The aphid transmission factor of cauliflower mosaic virus forms a stable complex with microtubules in both insect and plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 15158-15163.
- Blasco, R., Cole, N. B. & Moss, B. (1991). Sequence analysis, expression, and deletion of a vaccinia virus gene encoding a homolog of profilin, a eukaryotic actin-binding protein. *J Virol* **65**, 4598-4608.
- Boevink, P. & Oparka, K. J. (2005). Virus-host interactions during movement processes. *Plant Physiol* **138**, 1815-1821.
- Bork, P., Jensen, L. J., von Mering, C., Ramani, A. K., Lee, I. & Marcotte, E. M. (2004). Protein interaction networks from yeast to human. *Curr Opin Struct Biol* **14**, 292-299.
- Bortolamiol, D., Pazhouhandeh, M., Marocco, K., Genschik, P. & Ziegler-Graff, V. (2007). The Polerovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Curr Biol* **17**, 1615-1621.
- Bortolamiol, D., Pazhouhandeh, M. & Ziegler-Graff, V. (2008). Viral suppression of RNA silencing by destabilisation of ARGONAUTE 1. *Plant Signal Behav* **3**, 657-659.
- Bosque-Perez, N. A. & Eigenbrode, S. D. (2011). The influence of virus-induced changes in plants on aphid vectors: insights from luteovirus pathosystems. *Virus Res* **159**, 201-205.
- Bourhis, J. M., Canard, B. & Longhi, S. (2007). Predicting protein disorder and induced folding: from theoretical principles to practical applications. *Curr Protein Pept Sci* **8**, 135-149.
- Boutant, E., Fitterer, C., Ritzenthaler, C. & Heinlein, M. (2009). Interaction of the Tobacco mosaic virus movement protein with microtubules during the cell cycle in tobacco BY-2 cells. *Protoplasma* **237**, 3-12.
- Bouvaine, S., Boonham, N. & Douglas, A. E. (2011). Interactions between a luteovirus and the GroEL chaperonin protein of the symbiotic bacterium *Buchnera aphidicola* of aphids. *J Gen Virol*.
- Boyko, V., Ferralli, J., Ashby, J., Schellenbaum, P. & Heinlein, M. (2000a). Function of microtubules in intercellular transport of plant virus RNA. *Nat Cell Biol* **2**, 826-832.
- Boyko, V., Ferralli, J. & Heinlein, M. (2000b). Cell-to-cell movement of TMV RNA is temperature-dependent and corresponds to the association of movement protein with microtubules. *Plant J* **22**, 315-325.
- Boyko, V., Hu, Q., Seemanpillai, M., Ashby, J. & Heinlein, M. (2007). Validation of microtubule-associated Tobacco mosaic virus RNA movement and involvement of microtubule-aligned particle trafficking. *Plant J* **51**, 589-603.
- Brandner, K., Sambade, A., Boutant, E., Didier, P., Mely, Y., Ritzenthaler, C. & Heinlein, M. (2008). Tobacco mosaic virus movement protein interacts with green fluorescent protein-tagged microtubule end-binding protein 1. *Plant Physiol* **147**, 611-623.
- Brault, V., Bergdoll, M., Mutterer, J., Prasad, V., Pfeffer, S., Erdinger, M., Richards, K. E. & Ziegler-Graff, V. (2003). Effects of point mutations in the major capsid protein of beet western yellows virus on capsid formation, virus accumulation, and aphid transmission. *J Virol* **77**, 3247-3256.
- Brault, V., Herrbach, E. & Reinbold, C. (2007). Electron microscopy studies on luteovirus transmission by aphids. *Micron* **38**, 302-312.
- Brault, V., Mutterer, J., Scheidecker, D., Simonis, M. T., Herrbach, E., Richards, K. & Ziegler-Graff, V. (2000). Effects of point mutations in the readthrough domain of the beet western yellows virus minor capsid protein on virus accumulation in planta and on transmission by aphids. *J Virol* **74**, 1140-1148.
- Brault, V., Perigon, S., Reinbold, C., Erdinger, M., Scheidecker, D., Herrbach, E., Richards, K. & Ziegler-Graff, V. (2005). The polerovirus minor capsid protein determines vector specificity and intestinal tropism in the aphid. *J Virol* **79**, 9685-9693.
- Brault, V., Tanguy, S., Reinbold, C., Le Trionnaire, G., Arneodo, J., Jaubert-Possamai, S., Guernec, G. & Tagu, D. (2010a). Transcriptomic analysis of intestinal genes following acquisition of pea enation mosaic virus by the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *J Gen Virol* **91**, 802-808.
- Brault, V., Uzest, M., Monsion, B., Jacquot, E. & Blanc, S. (2010b). Aphids as transport devices for plant viruses. *Comptes rendus biologiques* **333**, 524-538.
- Brault, V., van den Heuvel, J. F., Verbeek, M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer, A., Herrbach, E., Garaud, J. C., Guilley, H., Richards, K. & Jonard, G. (1995). Aphid transmission of beet western yellows luteovirus requires the minor capsid read-through protein P74. *EMBO J* **14**, 650-659.
- Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W. X., Ji, L. H., Ding, S. W. & Baulcombe, D. C. (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J* **17**, 6739-6746.
- Brown, C. M., Dinesh-Kumar, S. P. & Miller, W. A. (1996). Local and distant sequences are required for efficient readthrough of the barley yellow dwarf virus PAV coat protein gene stop codon. *J Virol* **70**, 5884-5892.

- Brown, J. W. & Shaw, P. J. (1998).** Small nucleolar RNAs and pre-rRNA processing in plants. *Plant Cell* **10**, 649-657.
- Browning, K. S. (2004).** Plant translation initiation factors: it is not easy to be green. *Biochem Soc Trans* **32**, 589-591.
- Bruhn, L., Munnerlyn, A. & Grosschedl, R. (1997).** ALY, a context-dependent coactivator of LEF-1 and AML-1, is required for TCRalpha enhancer function. *Genes Dev* **11**, 640-653.
- Bruyere, A., Brault, V., Ziegler-Graff, V., Simonis, M. T., Van den Heuvel, J. F., Richards, K., Guilley, H., Jonard, G. & Herrbach, E. (1997).** Effects of mutations in the beet western yellows virus readthrough protein on its expression and packaging and on virus accumulation, symptoms, and aphid transmission. *Virology* **230**, 323-334.
- Bucher, G. L., Tarina, C., Heinlein, M., Di Serio, F., Meins, F., Jr. & Iglesias, V. A. (2001).** Local expression of enzymatically active class I beta-1, 3-glucanase enhances symptoms of TMV infection in tobacco. *Plant J* **28**, 361-369.
- Buchmann, R. C., Asad, S., Wolf, J. N., Mohannath, G. & Bisaro, D. M. (2009).** Geminivirus AL2 and L2 proteins suppress transcriptional gene silencing and cause genome-wide reductions in cytosine methylation. *J Virol* **83**, 5005-5013.
- Canetta, E., Kim, S. H., Kalinina, N. O., Shaw, J., Adya, A. K., Gillespie, T., Brown, J. W. & Taliansky, M. (2008).** A plant virus movement protein forms ringlike complexes with the major nucleolar protein, fibrillarin, in vitro. *J Mol Biol* **376**, 932-937.
- Canto, T., Uhrig, J. F., Swanson, M., Wright, K. M. & MacFarlane, S. A. (2006).** Translocation of Tomato bushy stunt virus P19 protein into the nucleus by ALY proteins compromises its silencing suppressor activity. *J Virol* **80**, 9064-9072.
- Caplan, J. L., Mamillapalli, P., Burch-Smith, T. M., Czymmek, K. & Dinesh-Kumar, S. P. (2008).** Chloroplastic protein NRIP1 mediates innate immune receptor recognition of a viral effector. *Cell* **132**, 449-462.
- Carette, J. E., Verver, J., Martens, J., van Kampen, T., Wellink, J. & van Kammen, A. (2002).** Characterization of plant proteins that interact with cowpea mosaic virus '60K' protein in the yeast two-hybrid system. *J Gen Virol* **83**, 885-893.
- Carvalho, M. F., Turgeon, R. & Lazarowitz, S. G. (2006).** The geminivirus nuclear shuttle protein NSP inhibits the activity of AtNSI, a vascular-expressed Arabidopsis acetyltransferase regulated with the sink-to-source transition. *Plant Physiol* **140**, 1317-1330.
- Castillo, A. G., Collinet, D., Deret, S., Kashoggi, A. & Bejarano, E. R. (2003).** Dual interaction of plant PCNA with geminivirus replication accessory protein (Ren) and viral replication protein (Rep). *Virology* **312**, 381-394.
- Castillo, A. G., Kong, L. J., Hanley-Bowdoin, L. & Bejarano, E. R. (2004).** Interaction between a geminivirus replication protein and the plant sumoylation system. *J Virol* **78**, 2758-2769.
- Castle, S. J. & Berger, P. H. (1993).** Rates of growth and increase of *Myzus persicae* on virus infected potatoes according to type of virus-vector relationship. *Entomol Exp et Applic* **69**, 51-60.
- Castle, S. J., Mowry, T. M. & Berger, P. H. (1998).** Differential settling by *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) on various virus-infected host plants. *Ann Entomol Soc Am* **91**, 661-667.
- Cavener, D. R. & Ray, S. C. (1991).** Eukaryotic start and stop translation sites. *Nucleic Acids Res* **19**, 3185-3192.
- Chavez, J. D., Cilia, M., Weisbrod, C. R., Ju, H. J., Eng, J. K., Gray, S. M. & Bruce, J. E. (2012b).** Cross-linking measurements of the Potato leafroll virus reveal protein interaction topologies required for virion stability, aphid transmission, and virus-plant interactions. *Journal of proteome research* **11**, 2968-2981.
- Chay, C. A., Gunasinge, U. B., Dinesh-Kumar, S. P., Miller, W. A. & Gray, S. M. (1996).** Aphid transmission and systemic plant infection determinants of barley yellow dwarf luteovirus-PAV are contained in the coat protein readthrough domain and 17-kDa protein, respectively. *Virology* **219**, 57-65.
- Chen, I. H., Sciabica, K. S. & Sandri-Goldin, R. M. (2002).** ICP27 interacts with the RNA export factor Aly/REF to direct herpes simplex virus type 1 intronless mRNAs to the TAP export pathway. *J Virol* **76**, 12877-12889.
- Chen, J. W., Romero, P., Uversky, V. N. & Dunker, A. K. (2006).** Conservation of intrinsic disorder in protein domains and families: I. A database of conserved predicted disordered regions. *J Proteome Res* **5**, 879-887.
- Chen, M. H. & Citovsky, V. (2003).** Systemic movement of a tobamovirus requires host cell pectin methylesterase. *Plant J* **35**, 386-392.
- Chen, M. H., Sheng, J., Hind, G., Handa, A. K. & Citovsky, V. (2000).** Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *EMBO journal* **19**, 913-920.
- Chen, M. H., Tian, G. W., Gafni, Y. & Citovsky, V. (2005).** Effects of calreticulin on viral cell-to-cell movement. *Plant Physiol* **138**, 1866-1876.
- Cheng, B., Jiang, J.-H. & Zhou, X.-P. (2007).** A TOM1 homologue is required for multiplication of *Tobacco mosaic virus* in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of Zhejiang University Science B* **8**, 256-259.
- Cheng, S. L., Domier, L. L. & D'Arcy, C. J. (1994).** Detection of the readthrough protein of barley yellow dwarf virus. *Virology* **202**, 1003-1006.
- Cheng, Y. Q., Liu, Z. M., Xu, J., Zhou, T., Wang, M., Chen, Y. T., Li, H. F. & Fan, Z. F. (2008).** HC-Pro protein of sugar cane mosaic virus interacts specifically with maize ferredoxin-5 in vitro and in planta. *J Gen Virol* **89**, 2046-2054.
- Chisholm, S. T., Parra, M. A., Anderberg, R. J. & Carrington, J. C. (2001).** Arabidopsis RTM1 and RTM2 genes function in phloem to restrict long-distance movement of tobacco etch virus. *Plant Physiol* **127**, 1667-1675.
- Chiu, M. H., Chen, I. H., Baulcombe, D. C. & Tsai, C. H. (2010).** The silencing suppressor P25 of Potato virus X interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Mol Plant Pathol* **11**, 641-649.
- Cho, S. Y., Cho, W. K., Sohn, S. H. & Kim, K. H. (2012).** Interaction of the host protein NbDnaJ with Potato virus X minus-strand stem-loop 1 RNA and capsid protein affects viral replication and movement. *Biochem Biophys Res Commun* **417**, 451-456.

- Christensen, H. E., Ramachandran, S., Tan, C. T., Surana, U., Dong, C. H. & Chua, N. H. (1996). Arabidopsis profilins are functionally similar to yeast profilins: identification of a vascular bundle-specific profilin and a pollen-specific profilin. *Plant J* **10**, 269-279.
- Clark, M. F. & Adams, A. N. (1977a). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *The Journal of general virology* **34**, 475-483.
- Commandeur, U. & Martin, R. (1993). Investigations into the molecular biology of potato leafroll luteovirus by means of agroinfection. *Phytopathology* **83**, 1426.
- De Cillia, J. (2011). Ploveroviruses: functional analyses of the P0 silencing suppressor and investigation of the phloem restricted tropism in transgenic plants. Starsbourg: Univerité de Strasbourg.
- de Jong, W. W., Caspers, G. J. & Leunissen, J. A. (1998). Genealogy of the alpha-crystallin--small heat-shock protein superfamily. *Int J Biol Macromol* **22**, 151-162.
- de Zoeten, G. A. & Skaf, J. S. (2001). Pea enation mosaic and the vagaries of a plant virus. *Advances in virus research* **57**, 323-350.
- Demler, S. A. & de Zoeten, G. A. (1991). The nucleotide sequence and luteovirus-like nature of RNA 1 of an aphid non-transmissible strain of pea enation mosaic virus. *The Journal of general virology* **72** (Pt 8), 1819-1834.
- Deom, C. M., Oliver, M. J. & Beachy, R. N. (1987). The 30-kilodalton gene product of tobacco mosaic virus potentiates virus movement. *Science* **237**, 389-394.
- Desvoyes, B., Faure-Rabasse, S., Chen, M. H., Park, J. W. & Scholthof, H. B. (2002). A novel plant homeodomain protein interacts in a functionally relevant manner with a virus movement protein. *Plant Physiol* **129**, 1521-1532.
- Dinesh-Kumar, S. P., Brault, V. & Miller, W. A. (1992). Precise mapping and in vitro translation of a trifunctional subgenomic RNA of barley yellow dwarf virus. *Virology* **187**, 711-722.
- Ding, B., Kwon, M. O. & Warnberg, L. (1996). Evidence that actin filaments are involved in controlling the permeability of plasmodesmata in tobacco mesophyll. *The Plant Journal* **10**, 157-164.
- Ding, B., Turgeon, R. & Parthasarathy, M. V. (1992). Substructure of freeze substituted plasmodesmata. *Protoplasma* **169**, 28-41.
- Ding, S. W., Li, W. X. & Symons, R. H. (1995). A novel naturally occurring hybrid gene encoded by a plant RNA virus facilitates long distance virus movement. *EMBO J* **14**, 5762-5772.
- Dixon, A. F. G. (1985). Aphid Ecology. *Blackie & Son Ltd, London*, p157.
- Dogimont, C., Bussemakers, A., Martin, J., Slama, S., Lecoq, H. & Pitrat, M. (1997). Two complementary recessive genes conferring resistance to Cucurbit Aphid Borne Yellows Luteovirus in an Indian melon line (*Cucumis melo* L.). Dordrecht, PAYS-BAS: Springer.
- Dogimont, C., Chovelon, V., Tual, S., Boissot, N., Rittener, V., Giovinazzo, N. & Bendahmane, A. (2008). Molecular diversity at the Vat/Pm-W resistance locus in melon. *Book chapter; Conference paper, Cucurbitaceae 2008 Proceedings of the IXth EUCARPIA meeting on genetics and breeding of cucurbitaceae, Avignon, France*, 219-230.
- Dogra, S. C., Eini, O., Rezaian, M. A. & Randles, J. W. (2009). A novel shaggy-like kinase interacts with the Tomato leaf curl virus pathogenicity determinant C4 protein. *Plant Mol Biol* **71**, 25-38.
- Dorokhov, Y. L., Makinen, K., Frolova, O. Y., Merits, A., Saarinen, J., Kalkkinen, N., Atabekov, J. G. & Saarma, M. (1999). A novel function for a ubiquitous plant enzyme pectin methylesterase: the host-cell receptor for the tobacco mosaic virus movement protein. *FEBS Lett* **461**, 223-228.
- Dosztanyi, Z., Csizmok, V., Tompa, P. & Simon, I. (2005). IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics* **21**, 3433-3434.
- Drucker, M., Froissart, R., Hebrard, E., Uzest, M., Ravallec, M., Esperandieu, P., Mani, J. C., Pugniere, M., Roquet, F., Fereres, A. & Blanc, S. (2002). Intracellular distribution of viral gene products regulates a complex mechanism of cauliflower mosaic virus acquisition by its aphid vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 2422-2427.
- Du, Y. Y., Wang, P. C., Chen, J. & Song, C. P. (2008). Comprehensive functional analysis of the catalase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *J Integr Plant Biol* **50**, 1318-1326.
- Du, Z., Xiao, D., Wu, J., Jia, D., Yuan, Z., Liu, Y., Hu, L., Han, Z., Wei, T., Lin, Q., Wu, Z. & Xie, L. (2011). p2 of Rice stripe virus (RSV) interacts with OsSGS3 and is a silencing suppressor. *Mol Plant Pathol*.
- Dufresne, P. J., Thivierge, K., Cotton, S., Beauchemin, C., Ide, C., Ubalijoro, E., Laliberte, J. F. & Fortin, M. G. (2008a). Heat shock 70 protein interaction with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase within virus-induced membrane vesicles. *Virology* **374**, 217-227.
- Dufresne, P. J., Ubalijoro, E., Fortin, M. G. & Laliberte, J. F. (2008b). Arabidopsis thaliana class II poly(A)-binding proteins are required for efficient multiplication of turnip mosaic virus. *J Gen Virol* **89**, 2339-2348.
- Dunker, A. K., Cortese, M. S., Romero, P., Iakoucheva, L. M. & Uversky, V. N. (2005). Flexible nets. The roles of intrinsic disorder in protein interaction networks. *FEBS J* **272**, 5129-5148.
- Dunker, A. K., Obradovic, Z., Romero, P., Garner, E. C. & Brown, C. J. (2000). Intrinsic protein disorder in complete genomes. *Genome Inform Ser Workshop Genome Inform* **11**, 161-171.
- Dunoyer, P., Thomas, C., Harrison, S., Revers, F. & Maule, A. (2004). A cysteine-rich plant protein potentiates Potyvirus movement through an interaction with the virus genome-linked protein VPg. *J Virol* **78**, 2301-2309.
- Edwards, M., Fetch, T., Schwarz, P. & Steffenson, B. (2001). Effect of Barley yellow dwarf virus infection on yield components of finger millet (*Eleusine coracana* L Gaertn). *Trop Pest Manag* **37**, 122-123.
- Egelkrou, E. M., Robertson, D. & Hanley-Bowdoin, L. (2001). Proliferating cell nuclear antigen transcription is repressed through an E2F consensus element and activated by geminivirus infection in mature leaves. *Plant Cell* **13**, 1437-1452.

- Eigenbrode, S. D., Hongjian Ding Shiel, P. & Berger, P. H. (2002a). Volatiles from potato plants infected with potato leafroll virus attract and arrest the virus vector, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Proc R Soc Lond B* **269**, 455-460.
- Eigenbrode, S. D., Hongjian Ding Shiel, P. & Berger, P. H. (2002b). Volatiles from potato plants infected with potato leafroll virus attract and arrest the virus vector, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Proc R Soc Lond B* **269**, 455-460.
- Elmayan, T., Adenot, X., Gissot, L., Lauresseguies, D., Gy, I. & Vaucheret, H. (2009). A neomorphic *sgs3* allele stabilizing miRNA cleavage products reveals that SGS3 acts as a homodimer. *FEBS J* **276**, 835-844.
- Epel, B. L. (1994). Plasmodesmata: composition, structure and trafficking. *Plant Mol Biol* **26**, 1343-1356.
- Erickson, F. L., Holzberg, S., Calderon-Urrea, A., Handley, V., Axtell, M., Corr, C. & Baker, B. (1999). The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defence response in tobacco. *Plant J* **18**, 67-75.
- Esau, K. & Hoefert, L. L. (1972). Development of infection with beet western yellows luteovirus in the sugarbeet. *Virology* **48**, 724-738.
- Fan, T., Zhai, H., Shi, W., Wang, J., Jia, H., Xiang, Y. & An, L. (2012). Overexpression of profilin 3 affects cell elongation and F-actin organization in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.*
- Fereres, A., Araya, J. E., Housley, T. L. & Foster, J. E. (1990). Carbohydrate composition of wheat infected with barley yellow dwarf virus. *J Plant Dis Prot* **97**, 600-608.
- Fereres, A., Lister, R. M., Araya, J. E. & Foster, J. E. (1989). Development and reproduction of the English grain aphid (Homoptera: Aleyrodidae) on wheat cultivars infected with barley yellow dwarf virus. *Environ Entomol* **18**, 388-393.
- Fereres, A. & Moreno, A. (2009). Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. *Virus Res* **141**, 158-168.
- Ferralli, J., Ashby, J., Fasler, M., Boyko, V. & Heinlein, M. (2006). Disruption of microtubule organization and centrosome function by expression of tobacco mosaic virus movement protein. *J Virol* **80**, 5807-5821.
- Ferron, F., Longhi, S., Canard, B. & Karlin, D. (2006). A practical overview of protein disorder prediction methods. *Proteins* **65**, 1-14.
- Fife, J. M. (1961). Changes in the concentration of amino acids in sugar beet plants induced by virus yellows. *J Am Soc Sugar Beet Technol* **11**, 327-333.
- Filichkin, S. A., Brumfield, S., Filichkin, T. P. & Young, M. J. (1997). In vitro interactions of the aphid endosymbiotic SymL chaperonin with barley yellow dwarf virus. *J Virol* **71**, 569-577.
- Filichkin, S. A., Lister, R. M., McGrath, P. F. & Young, M. J. (1994). In vivo expression and mutational analysis of the barley yellow dwarf virus readthrough gene. *Virology* **205**, 290-299.
- Florentino, L. H., Santos, A. A., Fontenelle, M. R., Pinheiro, G. L., Zerbini, F. M., Baracat-Pereira, M. C. & Fontes, E. P. (2006). A PERK-like receptor kinase interacts with the geminivirus nuclear shuttle protein and potentiates viral infection. *J Virol* **80**, 6648-6656.
- Fridborg, I., Grainger, J., Page, A., Coleman, M., Findlay, K. & Angell, S. (2003). TIP, a novel host factor linking callose degradation with the cell-to-cell movement of Potato virus X. *Mol Plant Microbe Interact* **16**, 132-140.
- Fujiwara, T., Giesman-Cookmeyer, D., Ding, B., Lommel, S. A. & Lucas, W. J. (1993). Cell-to-Cell Trafficking of Macromolecules through Plasmodesmata Potentiated by the Red Clover Necrotic Mosaic Virus Movement Protein. *Plant Cell* **5**, 1783-1794.
- Gallois, J. L., Charron, C., Sanchez, F., Pagny, G., Houvenaghel, M. C., Moretti, A., Ponz, F., Revers, F., Caranta, C. & German-Retana, S. (2010). Single amino acid changes in the turnip mosaic virus viral genome-linked protein (VPg) confer virulence towards *Arabidopsis thaliana* mutants knocked out for eukaryotic initiation factors eIF(iso)4E and eIF(iso)4G. *J Gen Virol* **91**, 288-293.
- Gao, L., Shen, W. T., Yan, P., Tuo, D. C., Li, X. Y. & Zhou, P. (2012). A set of host proteins interacting with papaya ringspot virus Nla-Pro protein identified in a yeast two-hybrid system. *Acta Virol* **56**, 25-30.
- Garcia, J. A., Martin, M. T., Cervera, M. T. & Riechmann, J. L. (1992). Proteolytic processing of the plum pox potyvirus polyprotein by the Nla protease at a novel cleavage site. *Virology* **188**, 697-703.
- Garret, A., Kerlan, C. & Thomas, D. (1993). The intestine is a site of passage for potato leafroll virus from the gut lumen into the haemocoel in the aphid vector, *Myzus persicae* Sulz. *Arch Virol* **131**, 377-392.
- German-Retana, S., Walter, J., Doublet, B., Roudet-Tavert, G., Nicaise, V., Lecampion, C., Houvenaghel, M. C., Robaglia, C., Michon, T. & Le Gall, O. (2008). Mutational analysis of plant cap-binding protein eIF4E reveals key amino acids involved in biochemical functions and potyvirus infection. *J Virol* **82**, 7601-7612.
- Gildow, F. E. (1983). Influence of barley yellow dwarf-infected oats and barley on morphology of aphid vectors. *Phytopathology* **73**, 1196-1199.
- Gildow, F. E. (1999). Luteovirus transmission and mechanisms regulating vector specificity. In H G Smith and H Barker (ed), *The Luteoviridae CAB International, Oxon, United Kingdom*, p. 88-113.
- Gildow, F. E., Reavy, B., Mayo, M. A., Duncan, G. H., Woodford, J. A., Lamb, J. W. & Hay, R. T. (2000). Aphid Acquisition and Cellular Transport of Potato leafroll virus-like Particles Lacking P5 Readthrough Protein. *Phytopathology* **90**, 1153-1161.
- Gill, D. J., Teo, H., Sun, J., Perisic, O., Veprintsev, D. B., Vallis, Y., Emr, S. D. & Williams, R. L. (2007). Structural studies of phosphoinositide 3-kinase-dependent traffic to multivesicular bodies. *Biochem Soc Symp*, 47-57.
- Gillespie, T., Boevink, P., Haupt, S., Roberts, A. G., Toth, R., Valentine, T., Chapman, S. & Oparka, K. J. (2002). Functional analysis of a DNA-shuffled movement protein reveals that microtubules are dispensable for the cell-to-cell movement of tobacco mosaic virus. *Plant Cell* **14**, 1207-1222.

- Glick, E., Zrachya, A., Levy, Y., Mett, A., Gidoni, D., Belausov, E., Citovsky, V. & Gafni, Y. (2008). Interaction with host SGS3 is required for suppression of RNA silencing by tomato yellow leaf curl virus V2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 157-161.
- Gonzalez, I., Martinez, L., Rakitina, D. V., Lewsey, M. G., Atencio, F. A., Llave, C., Kalinina, N. O., Carr, J. P., Palukaitis, P. & Canto, T. (2010). Cucumber mosaic virus 2b protein subcellular targets and interactions: their significance to RNA silencing suppressor activity. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 294-303.
- Goto, Y. & Asada, T. (2007). Excessive expression of the plant kinesin TBK5 converts cortical and perinuclear microtubules into a radial array emanating from a single focus. *Plant Cell Physiol* **48**, 753-761.
- Grzela, R., Strokovska, L., Andrieu, J. P., Dublet, B., Zagorski, W. & Chroboczek, J. (2006). Potyvirus terminal protein VPg, effector of host eukaryotic initiation factor eIF4E. *Biochimie* **88**, 887-896.
- Guilley, H., Wipf-Scheibel, C., Richards, K., Lecoq, H. & Jonard, G. (1994). Nucleotide sequence of cucurbit aphid-borne yellows luteovirus. *Virology* **202**, 1012-1017.
- Gutierrez, C. (1999). Geminivirus DNA replication. *Cell Mol Life Sci* **56**, 313-329.
- Hagiwara, Y., Komoda, K., Yamanaka, T., Tamai, A., Meshi, T., Funada, R., Tsuchiya, T., Naito, S. & Ishikawa, M. (2003). Subcellular localization of host and viral proteins associated with tobamovirus RNA replication. *EMBO J* **22**, 344-353.
- Hamera, S., Song, X., Su, L., Chen, X. & Fang, R. (2011). Cucumber Mosaic Virus suppressor 2b binds to AGO4-related small RNAs and impairs AGO4 activities. *Plant J*.
- Hamrita, B., Nasr, H. B., Hammann, P., Kuhn, L., Guillier, C. L., Chaieb, A., Khairi, H. & Chahed, K. (2011). An elongation factor-like protein (EF-Tu) elicits a humoral response in infiltrating ductal breast carcinomas: an immunoproteomics investigation. *Clin Biochem* **44**, 1097-1104.
- Hao, L., Wang, H., Sunter, G. & Bisaro, D. M. (2003). Geminivirus AL2 and L2 proteins interact with and inactivate SNF1 kinase. *Plant Cell* **15**, 1034-1048.
- Harries, P. A. & Nelson, R. S. (2008). Movement of Viruses in Plants. *Encyclopedia of Virology, 3rd Edition Elsevier Press*, 348-355.
- Harries, P. A., Park, J. W., Sasaki, N., Ballard, K. D., Maule, A. J. & Nelson, R. S. (2009). Differing requirements for actin and myosin by plant viruses for sustained intercellular movement. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17594-17599.
- Harries, P. A., Schoelz, J. E. & Nelson, R. S. (2010). Intracellular transport of viruses and their components: utilizing the cytoskeleton and membrane highways. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 1381-1393.
- Harrison, B. D. (1999). Steps in the development of luteovirology. *Luteoviridae*, 1-14.
- Haupt, S., Cowan, G., Ziegler, A., Roberts, A., Oparka, K. & Torrance, L. (2005a). Two Plant-Viral Movement Proteins Traffic in the Endocytic Recycling Pathway. *The plant cell* **17**, 164-181.
- Haupt, S., Stroganova, T., Ryabov, E., Kim, S. H., Fraser, G., Duncan, G., Mayo, M. A., Barker, H. & Taliansky, M. (2005b). Nucleolar localization of potato leafroll virus capsid proteins. *J Gen Virol* **86**, 2891-2896.
- Haynes, C., Oldfield, C. J., Ji, F., Klitgord, N., Cusick, M. E., Radivojac, P., Uversky, V. N., Vidal, M. & Iakoucheva, L. M. (2006). Intrinsic disorder is a common feature of hub proteins from four eukaryotic interactomes. *PLoS Comput Biol* **2**, e100.
- Hebrard, E., Pinel-Galzi, A. & Fargette, D. (2008). Virulence domain of the RYMV genome-linked viral protein VPg towards rice rymv1-2-mediated resistance. *Arch Virol* **153**, 1161-1164.
- Hebrard, E., Poulicard, N., Gerard, C., Traore, O., Albar, L., Fargette, D., Bessin, Y. & Vignols, F. (2010). Direct interaction between the Rice yellow mottle virus VPg and the central domain of the rice eIF(iso)4G1 factor correlates with rice susceptibility and RYMV virulence. *Mol Plant Microbe Interact*.
- Heinlein, M. (2002). Plasmodesmata: dynamic regulation and role in macromolecular cell-to-cell signaling. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 543-552.
- Heinlein, M., Epel, B. L., Padgett, H. S. & Beachy, R. N. (1995). Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton. *Science* **270**, 1983-1985.
- Heinlein, M., Padgett, H. S., Gens, J. S., Pickard, B. G., Casper, S. J., Epel, B. L. & Beachy, R. N. (1998). Changing patterns of localization of the tobacco mosaic virus movement protein and replicase to the endoplasmic reticulum and microtubules during infection. *Plant Cell* **10**, 1107-1120.
- Herrbach, E. (1999). Vector-virus interactions. In Smith HG and Baker H *The Luteoviridae CAB international, Oxon, United Kingdom*, p85-146.
- Hess, M. W. & Valenta, R. (1997). Profilin revealed in pollen nuclei: immunoelectron microscopy of high-pressure frozen *Ledebouria socialis* Roth (Hyacinthaceae). *Sex Plant Peprod* **10**, 283-287.
- Hiriart, E., Farjot, G., Gruffat, H., Nguyen, M. V., Sergeant, A. & Manet, E. (2003). A novel nuclear export signal and a REF interaction domain both promote mRNA export by the Epstein-Barr virus EB2 protein. *J Biol Chem* **278**, 335-342.
- Hjulsager, C. K., Olsen, B. S., Jensen, D. M., Cordea, M. I., Krath, B. N., Johansen, I. E. & Lund, O. S. (2006). Multiple determinants in the coding region of Pea seed-borne mosaic virus P3 are involved in virulence against sbm-2 resistance. *Virology* **355**, 52-61.
- Hodge, T. & Cope, M. J. (2000). A myosin family tree. *J Cell Sci* **113 Pt 19**, 3353-3354.
- Hofius, D., Herbers, K., Melzer, M., Omid, A., Tacke, E., Wolf, S. & Sonnewald, U. (2001). Evidence for expression level-dependent modulation of carbohydrate status and viral resistance by the potato leafroll virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant J* **28**, 529-543.

- Hofius, D., Maier, A. T., Dietrich, C., Jungkunz, I., Bornke, F., Maiss, E. & Sonnewald, U. (2007). Capsid protein-mediated recruitment of host DnaJ-like proteins is required for Potato virus Y infection in tobacco plants. *J Virol* **81**, 11870-11880.
- Hofmann, C., Niehl, A., Sambade, A., Steinmetz, A. & Heinlein, M. (2009). Inhibition of tobacco mosaic virus movement by expression of an actin-binding protein. *Plant Physiol* **149**, 1810-1823.
- Holmes, F. O. (1938). Inheritance of resistance to tobacco-mosaic disease in tobacco. *Phytopathology* **28**, 553-561.
- Holzinger, A., Valenta, R. & Lu"tz-Meindl, U. (2000). Profilin is localized in the nucleus-associated microtubule and actin system and is evenly distributed in the cytoplasm of the green alga *Micrasterias denticulata*. *Protoplasma* **212**, 197-205.
- Howell, G. J., Holloway, Z. G., Cobbold, C., Monaco, A. P. & Ponnambalam, S. (2006). Cell biology of membrane trafficking in human disease. In *Int Rev Cytol*, pp. 1-69. United States.
- Huang S Fau - McDowell, J. M., McDowell Jm Fau - Weise, M. J., Weise Mj Fau - Meagher, R. B. & RB, M. (1996). The Arabidopsis profilin gene family. Evidence for an ancient split between constitutive and pollen-specific profilin genes. *Plant Physiol* **111**, 115-126.
- Huang, S., McDowell, J. M., Weise, M. J. & Meagher, R. B. (1996). The Arabidopsis profilin gene family. Evidence for an ancient split between constitutive and pollen-specific profilin genes. *Plant Physiol* **111**, 115-126.
- Huang, Z., Andrianov, V. M., Han, Y. & Howell, S. H. (2001). Identification of arabidopsis proteins that interact with the cauliflower mosaic virus (CaMV) movement protein. *Plant Mol Biol* **47**, 663-675.
- Huh, S. U., Kim, M. J., Ham, B. K. & Paek, K. H. (2011). A zinc finger protein Tsip1 controls Cucumber mosaic virus infection by interacting with the replication complex on vacuolar membranes of the tobacco plant. *New Phytol*.
- Hurley, J. H. & Emr, S. D. (2006). The ESCRT complexes: structure and mechanism of a membrane-trafficking network. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **35**, 277-298.
- Hussain, S. S., Ali, M., Ahmad, M. & Siddique, K. H. (2011). Polyamines: natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnol Adv* **29**, 300-311.
- Hwang, J., Li, J., Liu, W. Y., An, S. J., Cho, H., Her, N. H., Yeom, I., Kim, D. & Kang, B. C. (2009). Double mutations in eIF4E and eIFiso4E confer recessive resistance to Chilli veinal mottle virus in pepper. *Mol Cells* **27**, 329-336.
- Inaba, J. I. D., Kim, B. M. D., Shimura, H. P. & Masuta, C. P. (2011). Virus-induced necrosis is a consequence of direct protein-protein interaction between a viral RNA silencing suppressor and a host catalase. *Plant Physiol*.
- Ingwell, L. L., Eigenbrode, S. D. & Bosque-Perez, N. A. (2012). Plant viruses alter insect behavior to enhance their spread. *Sci Rep* **2**, 578.
- Ishibashi, K., Masuda, K., Naito, S., Meshi, T. & Ishikawa, M. (2007). An inhibitor of viral RNA replication is encoded by a plant resistance gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 13833-13838.
- Ishibashi, K., Naito, S., Meshi, T. & Ishikawa, M. (2009). An inhibitory interaction between viral and cellular proteins underlies the resistance of tomato to nonadapted tobamoviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8778-8783.
- Ishihara, T., Sekine, K. T., Hase, S., Kanayama, Y., Seo, S., Ohashi, Y., Kusano, T., Shibata, D., Shah, J. & Takahashi, H. (2008). Overexpression of the Arabidopsis thaliana EDS5 gene enhances resistance to viruses. *Plant Biol* **10**, 451-461.
- Ishikawa, M., Obata, F., Kumagai, T. & Ohno, T. (1991). Isolation of mutants of Arabidopsis thaliana in which accumulation of tobacco mosaic virus coat protein is reduced to low levels. *Mol Gen Genet* **230**, 33-38.
- Ivashikina, N., Deeken, R., Ache, P., Kranz, E., Pommerrenig, B., Sauer, N. & Hedrich, R. (2003). Isolation of AtSUC2 promoter-GFP-marked companion cells for patch-clamp studies and expression profiling. *The Plant Journal* **36**, 931-945.
- Jaag, H. M., Kawchuk, L., Rohde, W., Fischer, R., Emans, N. & Pruffer, D. (2003). An unusual internal ribosomal entry site of inverted symmetry directs expression of a potato leafroll polerovirus replication-associated protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 8939-8944.
- Jamous, R. M., Boonrod, K., Fuellgrabe, M. W., Ali-Shtayeh, M. S., Krczal, G. & Wassenegger, M. (2011). The helper component-proteinase of the Zucchini yellow mosaic virus inhibits the Hua Enhancer 1 methyltransferase activity in vitro. *J Gen Virol* **92**, 2222-2226.
- Jeong, R. D., Chandra-Shekara, A. C., Kachroo, A., Klessig, D. F. & Kachroo, P. (2008). HRT-mediated hypersensitive response and resistance to Turnip crinkle virus in Arabidopsis does not require the function of TIP, the presumed guard protein. *Mol Plant Microbe Interact* **21**, 1316-1324.
- Jeong, Y. M., Mun, J. H., Lee, I., Woo, J. C., Hong, C. B. & Kim, S. G. (2006). Distinct roles of the first introns on the expression of Arabidopsis profilin gene family members. *Plant Physiol* **140**, 196-209.
- Ji, L. H. & Ding, S. W. (2001). The suppressor of transgene RNA silencing encoded by Cucumber mosaic virus interferes with salicylic acid-mediated virus resistance. *Mol Plant Microbe Interact* **14**, 715-724.
- Jiang, Y., Serviène, E., Gal, J., Panavas, T. & Nagy, P. D. (2006). Identification of essential host factors affecting tombusvirus RNA replication based on the yeast Tet promoters Hughes Collection. In *J Virol*, pp. 7394-7404. United States.
- Jimenez, I., Lopez, L., Alamillo, J. M., Valli, A. & Garcia, J. A. (2006). Identification of a plum pox virus CI-interacting protein from chloroplast that has a negative effect in virus infection. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 350-358.
- Jimenez-Lopez, J. C., Morales, S., Castro, A. J., Volkmann, D., Rodriguez-Garcia, M. I. & Alche Jde, D. (2012). Characterization of profilin polymorphism in pollen with a focus on multifunctionality. *PLoS One* **7**, e30878.
- Jimenez-Martinez, E. S. e. a. (2004). Volatile cues influence the response of *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: aphididae) responses to volatile cues from *Barley yellow-dwarf virus* infected wheat. *Environ Entomol* **33**.

- Jin, Y., Ma, D., Dong, J., Jin, J., Li, D., Deng, C. & Wang, T. (2007a). HC-Pro protein of Potato virus Y can interact with three Arabidopsis 20S proteasome subunits in planta. *J Virol* **81**, 12881-12888.
- Jin, Y., Ma, D., Dong, J., Li, D., Deng, C., Jin, J. & Wang, T. (2007b). The HC-pro protein of potato virus Y interacts with NtMinD of tobacco. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 1505-1511.
- Jolly, C. A. & Mayo, M. A. (1994). Changes in the amino acid sequence of the coat protein readthrough domain of potato leafroll luteovirus affect the formation of an epitope and aphid transmission. *Virology* **201**, 182-185.
- Jones, J. d. & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Kaido, M., Inoue, Y., Takeda, Y., Sugiyama, K., Takeda, A., Mori, M., Tamai, A., Meshi, T., Okuno, T. & Mise, K. (2007). Downregulation of the NbNACA1 gene encoding a movement-protein-interacting protein reduces cell-to-cell movement of Brome mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 671-681.
- Kandasamy, M. K., McKinney, E. C. & Meagher, R. B. (2002). Plant profilin isoforms are distinctly regulated in vegetative and reproductive tissues. *Cell Motil Cytoskeleton* **52**, 22-32.
- Kaplan, I. B., Lee, L., Ripoll, D. R., Palukaitis, P., Gildow, F. & Gray, S. M. (2007). Point mutations in the potato leafroll virus major capsid protein alter virion stability and aphid transmission. *J Gen Virol* **88**, 1821-1830.
- Karasev, A. V., Kashina, A. S., Gelfand, V. I. & Dolja, V. V. (1992). HSP70-related 65 kDa protein of beet yellows closterovirus is a microtubule-binding protein. *FEBS Lett* **304**, 12-14.
- Karimi, M., Inze, D. & Depicker, A. (2002). GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. In *Trends Plant Sci*, pp. 193-195. England.
- Karlson, D. T., Fujino, T., Kimura, S., Baba, K., Itoh, T. & Ashworth, E. N. (2003). Novel plasmodesmata association of dehydrin-like proteins in cold-acclimated Red-osier dogwood (*Cornus sericea*). *Tree Physiol* **23**, 759-767.
- Kawakami, S., Watanabe, Y. & Beachy, R. N. (2004). Tobacco mosaic virus infection spreads cell to cell as intact replication complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 6291-6296.
- Kennedy, J. S., Booth, C. O. & Kershaw, W. J. S. (1961). Host finding by aphids in the field. III. Visual attraction. *Ann Appl Biol* **49**, 1-21.
- Khan, M. A., Miyoshi, H., Gallie, D. R. & Goss, D. J. (2008). Potyvirus Genome-linked Protein, VPg, Directly Affects Wheat Germ in Vitro Translation: interactions with translation initiation factors eIF4F and eIFiso4F. *J Biol Chem* **283**, 1340-1349.
- Khan, M. A., Miyoshi, H., Ray, S., Natsuaki, T., Suehiro, N. & Goss, D. J. (2006). Interaction of genome-linked protein (VPg) of turnip mosaic virus with wheat germ translation initiation factors eIFiso4E and eIFiso4F. *J Biol Chem* **281**, 28002-28010.
- Khelifa, M., Journou, S., Krishnan, K., Gargani, D., Esperandieu, P., Blanc, S. & Drucker, M. (2007). Electron-lucent inclusion bodies are structures specialized for aphid transmission of cauliflower mosaic virus. *J Gen Virol* **88**, 2872-2880.
- Kim, M. J., Ham, B. K., Kim, H. R., Lee, I. J., Kim, Y. J., Ryu, K. H., Park, Y. I. & Paek, K. H. (2005). In vitro and in planta interaction evidence between *Nicotiana tabacum* thaumatin-like protein 1 (TLP1) and cucumber mosaic virus proteins. *Plant Mol Biol* **59**, 981-994.
- Kim MJ, H. S., Ham BK, Paek KH. (2008). A novel methyltransferase methylates Cucumber mosaic virus 1a protein and promotes systemic spread. *Journal of virology* **82**, 4823-4833.
- Kim, M. J., Kim, H. R. & Paek, K. H. (2006). Arabidopsis tonoplast proteins TIP1 and TIP2 interact with the cucumber mosaic virus 1a replication protein. *J Gen Virol* **87**, 3425-3431.
- Kim, S. H., Macfarlane, S., Kalinina, N. O., Rakitina, D. V., Ryabov, E. V., Gillespie, T., Haupt, S., Brown, J. W. & Taliansky, M. (2007a). Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 11115-11120.
- Kim, S. H., Ryabov, E. V., Kalinina, N. O., Rakitina, D. V., Gillespie, T., MacFarlane, S., Haupt, S., Brown, J. W. & Taliansky, M. (2007b). Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. *EMBO J* **26**, 2169-2179.
- Konagaya, K., Matsushita, Y., Kasahara, M. & Nyunoya, H. (2004). Members of 14-3-3 protein isoforms interacting with the resistance gene product N and the elicitor of Tobacco mosaic virus. *J Gen Plant Pathol* **70**, 221-231.
- Kong, L. J., Orozco, B. M., Roe, J. L., Nagar, S., Ou, S., Feiler, H. S., Durfee, T., Miller, A. B., Grisse, W., Robertson, D. & Hanley-Bowdoin, L. (2000). A geminivirus replication protein interacts with the retinoblastoma protein through a novel domain to determine symptoms and tissue specificity of infection in plants. *EMBO J* **19**, 3485-3495.
- Koudelka, K. J., Destito, G., Plummer, E. M., Trauger, S. A., Siuzdak, G. & Manchester, M. (2009). Endothelial targeting of cowpea mosaic virus (CPMV) via surface vimentin. *PLoS Pathog* **5**, e1000417.
- Kovar, D. R., Drobak, B. K. & Staiger, C. J. (2000). Maize Profilin Isoforms Are Functionally Distinct. *Plant Cell* **12**, 583-598.
- Kragler, F., Curin, M., Trutnyeva, K., Gansch, A. & Waigmann, E. (2003). MPB2C, a microtubule-associated plant protein binds to and interferes with cell-to-cell transport of tobacco mosaic virus movement protein. *Plant Physiol* **132**, 1870-1883.
- Kramer, S. R., Goregaoker, S. P. & Culver, J. N. (2011). Association of the Tobacco mosaic virus 126 kDa replication protein with a GDI protein affects host susceptibility. *Virology* **414**, 110-118.
- Krenz, B., Windeisen, V., Wege, C., Jeske, H. & Kleinow, T. (2010). A plastid-targeted heat shock cognate 70kDa protein interacts with the Abutilon mosaic virus movement protein. *Virology* **401**, 6-17.
- Kunkel, H. (1977). Membrane feeding systems in aphid research. In "Aphids as Virus Vectors" K F Harris and K Maramorosch, eds Academic Press, 311-338.

- Kushner, D. B., Lindenbach, B. D., Grdzlishvili, V. Z., Noueiry, A. O., Paul, S. M. & Ahlquist, P. (2003). Systematic, genome-wide identification of host genes affecting replication of a positive-strand RNA virus. In *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 15764-15769. United States.
- Lacatus, G. & Sunter, G. (2009). The Arabidopsis PEAPOD2 transcription factor interacts with geminivirus AL2 protein and the coat protein promoter. *Virology* **392**, 196-202.
- Laporte, C., Vetter, G., Loudes, A. M., Robinson, D. G., Hillmer, S., Stussi-Garaud, C. & Ritzenthaler, C. (2003). Involvement of the secretory pathway and the cytoskeleton in intracellular targeting and tubule assembly of Grapevine fanleaf virus movement protein in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell* **15**, 2058-2075.
- Lazarowitz, S. G., McGarry, R. C., Barron, Y. D. & Carvalho, M. F. (2004). Nuclear shuttling in plant cells. *Symp Soc Exp Biol*, 157-176.
- Le Gall, O., Aranda, M. A. & Caranta, C. (2011). Plant resistance to viruses mediated by translation initiation factors. In *Recent advances in plant virology Caister Academic Press*, 177-194.
- Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L. E. & Moore, M. J. (2000a). The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J* **19**, 6860-6869.
- Le Hir, H., Moore, M. J. & Maquat, L. E. (2000b). Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions. *Genes Dev* **14**, 1098-1108.
- Leclant, F. (1982). Les effets nuisibles des oucerons sur les cultures. In *Les pucerons des cultures, Ed ACTA, Paris*, p37-56.
- Lecoq, H., Bourdin, D., Wipf-Scheibel, C., Bon, M., Lot, H., Lemaire, O. & Herrbach, E. (1992). A new yellowing disease of cucurbits caused by a luteovirus, cucurbit aphid-borne yellows virus. *Plant Pathology* **41**, 749-761.
- Lee, L., Kaplan, I. B., Ripoll, D. R., Liang, D., Palukaitis, P. & Gray, S. M. (2005). A surface loop of the potato leafroll virus coat protein is involved in virion assembly, systemic movement, and aphid transmission. *J Virol* **79**, 1207-1214.
- Lee, L., Palukaitis, P. & Gray, S. M. (2002). Host-dependent requirement for the Potato leafroll virus 17-kDa protein in virus movement. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 1086-1094.
- Lee, Y. R. & Liu, B. (2004). Cytoskeletal motors in Arabidopsis. Sixty-one kinesins and seventeen myosins. *Plant Physiol* **136**, 3877-3883.
- Leiser, R. M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer, A., Herrbach, E., Lemaire, O., Guilley, H., Richards, K. & Jonard, G. (1992). Agroinfection as an alternative to insects for infecting plants with beet western yellows luteovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 9136-9140.
- Leisner, S. M. & Turgeon, R. (1993). Movement of virus and photoassimilate in the phloem: a comparative analysis. *Bioessays* **15**, 741-748.
- Leonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M. G. & Laliberte, J. F. (2000). Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *J Virol* **74**, 7730-7737.
- Lewis, J. D. & Lazarowitz, S. G. (2010). Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates endocytosis and virus movement protein cell-to-cell transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 2491-2496.
- Li, C., Cox-Foster, D., Gray, S. M. & Gildow, F. (2001). Vector specificity of barley yellow dwarf virus (BYDV) transmission: identification of potential cellular receptors binding BYDV-MAV in the aphid, *Sitobion avenae*. *Virology* **286**, 125-133.
- Li, G., Zhang, J., Tong, X., Liu, W. & Ye, X. (2011). Heat shock protein 70 inhibits the activity of Influenza A virus ribonucleoprotein and blocks the replication of virus in vitro and in vivo. *PLoS One* **6**, e16546.
- Li, Y., Wu, M. Y., Song, H. H., Hu, X. & Qiu, B. S. (2005). Identification of a tobacco protein interacting with tomato mosaic virus coat protein and facilitating long-distance movement of virus. *Arch Virol* **150**, 1993-2008.
- Lin, B. & Heaton, L. A. (2001). An Arabidopsis thaliana protein interacts with a movement protein of Turnip crinkle virus in yeast cells and in vitro. *J Gen Virol* **82**, 1245-1251.
- Lin, L., Luo, Z., Yan, F., Lu, Y., Zheng, H. & Chen, J. (2011). Interaction between potyvirus P3 and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RubisCO) of host plants. *Virus Genes* **43**, 90-92.
- Liu, J. Z., Blancaflor, E. B. & Nelson, R. S. (2005a). The tobacco mosaic virus 126-kilodalton protein, a constituent of the virus replication complex, alone or within the complex aligns with and traffics along microfilaments. *Plant Physiol* **138**, 1853-1865.
- Liu, K., Xia, Z., Zhang, Y., Wen, Y., Wang, D., Brandenburg, K., Harris, F. & Phoenix, D. A. (2005b). Interaction between the movement protein of barley yellow dwarf virus and the cell nuclear envelope: role of a putative amphiphilic alpha-helix at the N-terminus of the movement protein. *Biopolymers* **79**, 86-96.
- Lough, T. J., Emerson, S. J., Lucas, W. J. & Forster, R. L. (2001). Trans-complementation of long-distance movement of White clover mosaic virus triple gene block (TGB) mutants: phloem-associated movement of TGBp1. *Virology* **288**, 18-28.
- Lowe, S. & Strong, F. E. (1962). The unsuitability of some viruliferous plants as host for the green peach aphid, *Myzus persicae*. *J Econ Entomol* **56**, 307-309.
- Lu, L., Du, Z., Qin, M., Wang, P., Lan, H., Niu, X., Jia, D., Xie, L., Lin, Q. & Wu, Z. (2009). Pc4, a putative movement protein of Rice stripe virus, interacts with a type I DnaJ protein and a small Hsp of rice. *Virus Genes* **38**, 320-327.
- Lucas, W. J. (2006). Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* **344**, 169-184.
- Lucy, A. P., Guo, H. S., Li, W. X. & Ding, S. W. (2000). Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *EMBO J* **19**, 1672-1680.
- Luque, A., Sanz-Burgos, A. P., Ramirez-Parra, E., Castellano, M. M. & Gutierrez, C. (2002). Interaction of geminivirus Rep protein with replication factor C and its potential role during geminivirus DNA replication. *Virology* **302**, 83-94.

- Mahajan, S. K., Chisholm, S. T., Whitham, S. A. & Carrington, J. C. (1998).** Identification and characterization of a locus (RTM1) that restricts long-distance movement of tobacco etch virus in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **14**, 177-186.
- Maisonneuve, B., Chovelon, V. & Lot, H. (1991).** Inheritance of resistance to Beet western yellows virus in *Lactuca virosa* L. *HortScience* **26**, 1543-1545.
- Martinez-Trujillo, M., Limones-Briones, V., Cabrera-Ponce, J. L. & Herrera-Estrella, L. (2004).** Improving transformation efficiency of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. *Plant molecular biology reporter* **22**, 63-70.
- Martiniere, A., Gargani, D., Uzest, M., Lautredou, N., Blanc, S. & Drucker, M. (2009a).** A role for plant microtubules in the formation of transmission-specific inclusion bodies of Cauliflower mosaic virus. *Plant J*.
- Martiniere, A., Zancarini, A. & Drucker, M. (2009b).** Aphid transmission of cauliflower mosaic virus: the role of the host plant. *Plant Signal Behav* **4**, 548-550.
- Mas, P. & Beachy, R. N. (1999).** Replication of tobacco mosaic virus on endoplasmic reticulum and role of the cytoskeleton and virus movement protein in intracellular distribution of viral RNA. *J Cell Biol* **147**, 945-958.
- Mathioudakis, M. M., Veiga, R., Ghita, M., Tsikou, D., Medina, V., Canto, T., Makris, A. M. & Livieratos, I. C. (2011).** Pepino mosaic virus capsid protein interacts with a tomato heat shock protein cognate 70. *Virus Res*.
- Matsushita, Y., Deguchi, M., Youda, M., Nishiguchi, M. & Nyunoya, H. (2001).** The tomato mosaic tobamovirus movement protein interacts with a putative transcriptional coactivator KELP. *Mol Cells* **12**, 57-66.
- Matsushita, Y., Hanazawa, K., Yoshioka, K., Oguchi, T., Kawakami, S., Watanabe, Y., Nishiguchi, M. & Nyunoya, H. (2000).** In vitro phosphorylation of the movement protein of tomato mosaic tobamovirus by a cellular kinase. *J Gen Virol* **81**, 2095-2102.
- Matsushita, Y., Miyakawa, O., Deguchi, M., Nishiguchi, M. & Nyunoya, H. (2002).** Cloning of a tobacco cDNA coding for a putative transcriptional coactivator MBF1 that interacts with the tomato mosaic virus movement protein. *J Exp Bot* **53**, 1531-1532.
- Matthews, C. (1991).** Induction of disease. Environmental factors. In *Plant Virology San Diego, CA, USA: Academic press*, 460-464.
- Matthews, R. E. F. (1981).** "Plant Virology" 2nd Ed, Academic Press, New York.
- Mauck, K. E., De Moraes, C. M. & Mescher, M. C. (2010).** Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Maule, A., Leh, V. & Lederer, C. (2002).** The dialogue between viruses and hosts in compatible interactions. *Curr Opin Plant Biol* **5**, 279-284.
- Mayboroda, O., Schlüter, K. & Jockusch, B. M. (1997).** Differential colocalization of profilin with microfilaments in PtK2 cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **37**, 166-177.
- Mazier, M., Flamain, F., Nicolai, M., Sarnette, V. & Caranta, C. (2011).** Knock-down of both eIF4E1 and eIF4E2 genes confers broad-spectrum resistance against potyviruses in tomato. *PLoS One* **6**, e29595.
- McGarry, R. C., Barron, Y. D., Carvalho, M. F., Hill, J. E., Gold, D., Cheung, E., Kraus, W. L. & Lazarowitz, S. G. (2003).** A novel *Arabidopsis* acetyltransferase interacts with the geminivirus movement protein NSP. *Plant Cell* **15**, 1605-1618.
- McLean, B. G., Zupan, J. & Zambryski, P. C. (1995).** Tobacco mosaic virus movement protein associates with the cytoskeleton in tobacco cells. *Plant Cell* **7**, 2101-2114.
- Medina, V., Peremyslov, V. V., Hagiwara, Y. & Dolja, V. V. (1999).** Subcellular localization of the HSP70-homolog encoded by beet yellows closterovirus. *Virology* **260**, 173-181.
- Medina-Ortega, K. J., Bosque-Perez, N. A., Ngumbi, E., Jimenez-Martinez, E. S. & Eigenbrode, S. D. (2009).** *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) responses to volatile cues from Barley yellow dwarf virus-infected wheat. *Environ Entomol* **38**, 836-845.
- Meshi, T., Watanabe, Y., Saito, T., Sugimoto, A., Maeda, T. & Okada, Y. (1987).** Function of the 30 kd protein of tobacco mosaic virus: involvement in cell-to-cell movement and dispensability for replication. *EMBO J* **6**, 2557-2563.
- Michalak, M., Corbett, E. F., Mesaali, N., Nakamura, K. & Opas, M. (1999).** Calreticulin: one protein, one gene, many functions. *Biochem J* **344 Pt 2**, 281-292.
- Michalak, M., Milner, R. E., Burns, K. & Opas, M. (1992).** Calreticulin. *Biochem J* **285**, 681-680.
- Michon, T., Estevez, Y., Walter, J., German-Retana, S. & Le Gall, O. (2006).** The potyviral virus genome-linked protein VPg forms a ternary complex with the eukaryotic initiation factors eIF4E and eIF4G and reduces eIF4E affinity for a mRNA cap analogue. *FEBS J* **273**, 1312-1322.
- Miller, J. W. & Coon, B. F. (1964).** The effect of barley yellow dwarf on the biology of its vector the English grain aphid, *Macrosiphum granarium*. *J Econ Entomol* **57**:970-974.
- Miller, W. A., Dinesh-Kumar, S. P. & Paul, C. P. (1995).** Luteovirus gene expression. *Critical review in plant sciences* **14**, 179-211.
- Min, B. E., Martin, K., Wang, R., Tafelmeyer, P., Bridges, M. & Goodin, M. (2010).** A host-factor interaction and localization map for a plant-adapted rhabdovirus implicates cytoplasm-tethered transcription activators in cell-to-cell movement. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 1420-1432.
- Mine, A., Hyodo, K., Tajima, Y., Kusumanegara, K., Taniguchi, T., Kaido, M., Mise, K., Taniguchi, H. & Okuno, T. (2012).** Differential Roles of Hsp70 and Hsp90 in the Assembly of the Replicase Complex of a Positive-Strand RNA Plant Virus. *J Virol*.
- Miyoshi, H., Okade, H., Muto, S., Suehiro, N., Nakashima, H., Tomoo, K. & Natsuaki, T. (2008).** Turnip mosaic virus VPg interacts with *Arabidopsis thaliana* eIF(iso)4E and inhibits in vitro translation. *Biochimie* **90**, 1427-1434.

- Miyoshi, H., Suehiro, N., Tomoo, K., Muto, S., Takahashi, T., Tsukamoto, T., Ohmori, T. & Natsuaki, T. (2006). Binding analyses for the interaction between plant virus genome-linked protein (VPg) and plant translational initiation factors. *Biochimie* **88**, 329-340.
- Modena, N. A., Zelada, A. M., Conte, F. & Mentaberry, A. (2008). Phosphorylation of the TGBp1 movement protein of Potato virus X by a *Nicotiana tabacum* CK2-like activity. *Virus Res* **137**, 16-23.
- Modjtahedi, N., Volovitch, M., Sossountzov, L., Habricot, Y., Bonneville, J. M. & Yot, P. (1984). Cauliflower mosaic virus-induced viroplasms support viral DNA synthesis in a cell-free system. *Virology* **133**, 289-300.
- Momose, F., Basler, C. F., O'Neill, R. E., Iwamatsu, A., Palese, P. & Nagata, K. (2001). Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. *J Virol* **75**, 1899-1908.
- Montllor, C. B. & Gildow, F. E. (1986). Feeding responses of two grain aphids to barley yellow dwarf virus-infected oats. *Entomol Exp et Applic* **42**, 63-69.
- Morita, E., Sandrin, V., Chung, H. Y., Morham, S. G., Gygi, S. P., Rodesch, C. K. & Sundquist, W. I. (2007). Human ESCRT and ALIX proteins interact with proteins of the midbody and function in cytokinesis. *EMBO J* **26**, 4215-4227.
- Mound, L. A. (1962). Studies on the olfaction and colour sensitivity of *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae). *Entomol Exp et Applic* **5**, 99-104.
- Munsch, M. (2004). Contribution à l'étude de la dérégulation des glycosyls-hydrolases dans les interactions polérovirus/plantes. *Rapport de stage de DEA*.
- Murillo, I., Cavallarin, L. & San Segundo, B. (1997). The maize pathogenesis-related PRms protein localizes to plasmodesmata in maize radicles. *Plant Cell* **9**, 145-156.
- Mushegian, A. R. & Koonin, E. V. (1993). The proposed plant connexin is a protein kinase-like protein. *Plant Cell* **5**, 998-999.
- Mutterer, J. D., Stussi-Graud, C., Michler, P., Richards, K. E., Jonard, G. & Ziegler-Graff, V. (1999). Role of the beet western yellows virus readthrough protein in virus movement in *Nicotiana clevelandii*. *J Gen Virol* **80**, 2771-2778.
- Nair, S. & Savithri, H. S. (2010). Processing of SeMV polyproteins revisited. *Virology* **396**, 106-117.
- Nakamoto, H. & Vigh, L. (2007). The small heat shock proteins and their clients. *Cell Mol Life Sci* **64**, 294-306.
- Nass, P. H., Domier, L. L., Jakstys, B. P. & D'Arcy, C. J. (1998). In Situ Localization of Barley Yellow Dwarf Virus-PAV 17-kDa Protein and Nucleic Acids in Oats. *Phytopathology* **88**, 1031-1039.
- Netherton, C., Moffat, K., Brooks, E. & Wileman, T. (2007). A guide to viral inclusions, membrane rearrangements, factories, and viroplasm produced during virus replication. *Adv Virus Res* **70**, 101-182.
- Niehl, A. & Heinlein, M. (2011). Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma* **248**, 75-99.
- Nishikiori, M., Mori, M., Dohi, K., Okamura, H., Katoh, E., Naito, S., Meshi, T. & Ishikawa, M. (2011). A host small GTP-binding protein ARL8 plays crucial roles in tobamovirus RNA replication. *PLoS Pathog* **7**, e1002409.
- Noeury, A. O., Lucas, W. J. & Gilbertson, R. L. (1994). Two proteins of a plant DNA virus coordinate nuclear and plasmodesmal transport. *Cell* **76**, 925-932.
- Nurkiyanova, K. M., Ryabov, E. V., Commandeur, U., Duncan, G. H., Canto, T., Gray, S. M., Mayo, M. A. & Taliansky, M. E. (2000). Tagging potato leafroll virus with the jellyfish green fluorescent protein gene. *J Gen Virol* **81**, 617-626.
- Oh, J. W., Kong, Q., Song, C., Carpenter, C. D. & Simon, A. E. (1995). Open reading frames of turnip crinkle virus involved in satellite symptom expression and incompatibility with *Arabidopsis thaliana* ecotype Dijon. *Mol Plant Microbe Interact* **8**, 979-987.
- Osman, T. A. & Buck, K. W. (1997). The tobacco mosaic virus RNA polymerase complex contains a plant protein related to the RNA-binding subunit of yeast eIF-3. *J Virol* **71**, 6075-6082.
- Osman, T. A., Coutts, R. H. & Buck, K. W. (2006). In vitro synthesis of minus-strand RNA by an isolated cereal yellow dwarf virus RNA-dependent RNA polymerase requires VPg and a stem-loop structure at the 3' end of the virus RNA. *J Virol* **80**, 10743-10751.
- Ouko, M. O., Sambade, A., Brandner, K., Niehl, A., Pena, E., Ahad, A., Heinlein, M. & Nick, P. (2010). Tobacco mutants with reduced microtubule dynamics are less susceptible to TMV. *Plant J* **62**, 829-839.
- Overall, R. L. & Blackman, L. M. (1996). A model of the macromolecular structure of plasmodesmata. *Trends in plant science* **1**.
- Overall, R. L., White, R. G., Blackman, L. M. & Radford, J. E. (2000). Actin and myosin in plasmodesmata. In: Actin: a dynamic framework for multiple plant cell functions. *Staiger, JC, Baluska, F, Volkmann, D, and Barlow, PW Eds, Kluwer Academic, Dordrecht*, 1-19.
- Paape, M., Solovyyev, A. G., Erokhina, T. N., Minina, E. A., Schepetilnikov, M. V., Lesemann, D. E., Schiemann, J., Morozov, S. Y. & Kellmann, J. W. (2006). At-4/1, an interactor of the Tomato spotted wilt virus movement protein, belongs to a new family of plant proteins capable of directed intra- and intercellular trafficking. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 874-883.
- Padgett, H. S., Epel, B. L., Kahn, T. W., Heinlein, M., Watanabe, Y. & Beachy, R. N. (1996). Distribution of tobamovirus movement protein in infected cells and implications for cell-to-cell spread of infection. *Plant J* **10**, 1079-1088.
- Padgett, H. S., Watanabe, Y. & Beachy, R. N. (1997). Identification of the TMV Replicase Sequence That Activates the N Gene-Mediated Hypersensitive Response. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **10**, 709-715.
- Padmanabhan, M. S., Goregaoker, S. P., Golem, S., Shiferaw, H. & Culver, J. N. (2005). Interaction of the tobacco mosaic virus replicase protein with the Aux/IAA protein PAP1/IAA26 is associated with disease development. *J Virol* **79**, 2549-2558.

- Padmanabhan, M. S., Kramer, S. R., Wang, X. & Culver, J. N. (2008).** Tobacco mosaic virus replicase-auxin/indole acetic acid protein interactions: reprogramming the auxin response pathway to enhance virus infection. *J Virol* **82**, 2477-2485.
- Padmanabhan, M. S., Shiferaw, H. & Culver, J. N. (2006).** The Tobacco mosaic virus replicase protein disrupts the localization and function of interacting Aux/IAA proteins. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 864-873.
- Palukaitis, P. & Garcia-Arenal, F. (2003).** Cucumoviruses. *Adv Virus Res* **62**, 241-323.
- Panavas, T., Serviène, E., Brasher, J. & Nagy, P. D. (2005).** Yeast genome-wide screen reveals dissimilar sets of host genes affecting replication of RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 7326-7331.
- Park, H. S., Himmelbach, A., Browning, K. S., Hohn, T. & Ryabova, L. A. (2001).** A plant viral "reinitiation" factor interacts with the host translational machinery. *Cell* **106**, 723-733.
- Park, M. R., Park, S. H., Cho, S. Y. & Kim, K. H. (2009).** Nicotiana benthamiana protein, NbPCIP1, interacting with Potato virus X coat protein plays a role as susceptible factor for viral infection. *Virology* **386**, 257-269.
- Pazhouhandeh, M., Dieterle, M., Marrocco, K., Lechner, E., Berry, B., Brault, V., Hemmer, O., Kretsch, T., Richards, K. E., Genschik, P. & Ziegler-Graff, V. (2006).** F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1994-1999.
- Peiffer, M. L., Gildow, F. E. & Gray, S. M. (1997).** Two distinct mechanisms regulate luteovirus transmission efficiency and specificity at the aphid salivary gland. *J Gen Virol* **78** (Pt 3), 495-503.
- Peng, K., Radivojac, P., Vucetic, S., Dunker, A. K. & Obradovic, Z. (2006).** Length-dependent prediction of protein intrinsic disorder. *BMC bioinformatics* **7**, 208.
- Peremyslov, V. V., Hagiwara, Y. & Dolja, V. V. (1999).** HSP70 homolog functions in cell-to-cell movement of a plant virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 14771-14776.
- Peter, K. A., Gildow, F., Palukaitis, P. & Gray, S. M. (2009).** The C terminus of the polerovirus p5 readthrough domain limits virus infection to the phloem. *Journal of virology* **83**, 5419-5429.
- Peter, K. A., Liang, D., Palukaitis, P. & Gray, S. M. (2008).** Small deletions in the potato leafroll virus readthrough protein affect particle morphology, aphid transmission, virus movement and accumulation. *J Gen Virol* **89**, 2037-2045.
- Pfeffer, S. (2002).** Identification et étude fonctionnelle de protéines virales impliquées dans la suppression de l'extinction post-transcriptionnelle de gène (ou PTGS). Strasbourg: Université Louis Pasteur.
- Pink, D. C. A., Walkey, D. G. A. & McLement, S. J. (1991).** Genetic of resistance to beet western yellows virus in lettuce. *Plant pathology* **40**, 542-545.
- Piroux, N., Saunders, K., Page, A. & Stanley, J. (2007).** Geminivirus pathogenicity protein C4 interacts with Arabidopsis thaliana shaggy-related protein kinase AtSKeta, a component of the brassinosteroid signalling pathway. *Virology* **362**, 428-440.
- Pouwels, J., Kornet, N., van Bers, N., Guighelaar, T., van Lent, J., Bisseling, T. & Wellink, J. (2003).** Identification of distinct steps during tubule formation by the movement protein of Cowpea mosaic virus. *J Gen Virol* **84**, 3485-3494.
- Pouwels, J., van der Velden, T., Willemse, J., Borst, J. W., van Lent, J., Bisseling, T. & Wellink, J. (2004).** Studies on the origin and structure of tubules made by the movement protein of Cowpea mosaic virus. *J Gen Virol* **85**, 3787-3796.
- Power, A. G. (1992).** Patterns of virulence and benevolence in insect-borne pathogens of plants. *Crit Rev Plant Sci* **11**, 351-372.
- Prokhnovsky, A. I., Peremyslov, V. V. & Dolja, V. V. (2005).** Actin cytoskeleton is involved in targeting of a viral Hsp70 homolog to the cell periphery. *J Virol* **79**, 14421-14428.
- Prufer, D., Kawchuk, L., Monecke, M., Nowok, S., Fischer, R. & Rohde, W. (1999).** Immunological analysis of potato leafroll luteovirus (PLRV) P1 expression identifies a 25 kDa RNA-binding protein derived via P1 processing. *Nucleic Acids Res* **27**, 421-425.
- Prufer, D., Wipf-Scheibel, C., Richards, K., Guilley, H., Lecoq, H. & Jonard, G. (1995).** Synthesis of a full-length infectious cDNA clone of cucurbit aphid-borne yellows virus and its use in gene exchange experiments with structural proteins from other luteoviruses. *Virology* **214**, 150-158.
- Raffaele, S., Bayer, E., Lafarge, D., Cluzet, S., German Retana, S., Boubekour, T., Leborgne-Castel, N., Carde, J. P., Lherminier, J., Noirot, E., Satiat-Jeunemaitre, B., Laroche-Traineau, J., Moreau, P., Ott, T., Maule, A. J., Reymond, P., Simon-Plas, F., Farmer, E. E., Bessoule, J. J. & Mongrand, S. (2009).** Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. *Plant Cell* **21**, 1541-1555.
- Raja, P., Sanville, B. C., Buchmann, R. C. & Bisaro, D. M. (2008).** Viral genome methylation as an epigenetic defense against geminiviruses. *J Virol* **82**, 8997-9007.
- Ramachandran, S., Christensen, H. E., Ishimaru, Y., Dong, C. H., Chao-Ming, W., Cleary, A. L. & Chua, N. H. (2000).** Profilin plays a role in cell elongation, cell shape maintenance, and flowering in Arabidopsis. *Plant Physiol* **124**, 1637-1647.
- Receveur-Brechot, V., Bourhis, J. M., Uversky, V. N., Canard, B. & Longhi, S. (2006).** Assessing protein disorder and induced folding. *Proteins* **62**, 24-45.
- Reinbold, C., Gildow, F. E., Herrbach, E., Ziegler-Graff, V., Goncalves, M. C., van Den Heuvel, J. F. & Brault, V. (2001).** Studies on the role of the minor capsid protein in transport of Beet western yellows virus through Myzus persicae. *J Gen Virol* **82**, 1995-2007.
- Reinbold, C., Herrbach, E. & Brault, V. (2003).** Posterior midgut and hindgut are both sites of acquisition of Cucurbit aphid-borne yellows virus in Myzus persicae and Aphis gossypii. *J Gen Virol* **84**, 3473-3484.

- Reinbold, C., Lacombe, S., Ziegler-Graff, V., Scheidecker, D., Wiss, L., Beuve, M., Carole, C. & Brault, V. (2012). Closely related poleroviruses depend on distinct translation initiation factors to infect *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact*.
- Ren, T., Qu, F. & Morris, T. J. (2000). HRT gene function requires interaction between a NAC protein and viral capsid protein to confer resistance to turnip crinkle virus. *Plant Cell* **12**, 1917-1926.
- Ren, T., Qu, F. & Morris, T. J. (2005). The nuclear localization of the *Arabidopsis* transcription factor TIP is blocked by its interaction with the coat protein of Turnip crinkle virus. In *Virology*, pp. 316-324. United States.
- Requena, A., Simon-Buela, L., Salcedo, G. & Garcia-Arenal, F. (2006). Potential involvement of a cucumber homolog of phloem protein 1 in the long-distance movement of Cucumber mosaic virus particles. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 734-746.
- Reutenauer, A., Ziegler-Graff, V., Lot, H., Scheidecker, D., Guilley, H., Richards, K. & Jonard, G. (1993). Identification of beet western yellows luteovirus genes implicated in viral replication and particle morphogenesis. *Virology* **195**, 692-699.
- Revollon, S. (2010). Rôles des modifications post-traductionnelles des particules virales du CABYV dans la transmission par puceron. *Thèse*.
- Revollon, S., Strub, J. M., Fitchette, A. C., Wiss, L., Gomord, V., Van Dorselaer, A. & Brault, V. (2010). A reinvestigation provides no evidence for sugar residues on structural proteins of poleroviruses and argues against a role for glycosylation of virus structural proteins in aphid transmission. *Virology* **402**, 303-314.
- Rhee, Y., Tzfira, T., Chen, M. H., Waigmann, E. & Citovsky, V. (2000). Cell-to-cell movement of tobacco mosaic virus: enigmas and explanations. *Mol Plant Pathol* **1**, 33-39.
- Robaglia, C. & Caranta, C. (2006). Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends Plant Sci* **11**, 40-45.
- Robards, A. W. (1963). Desmotubul - a plasmodesmal substructure. *Nature* **218**.
- Roberts, M. R. (2003). 14-3-3 proteins find new partners in plant cell signalling. In *Trends Plant Sci*, pp. 218-223. England.
- Rossmann, M. G. & Johnson, J. E. (1989). Icosahedral RNA virus structure. *Annual review of biochemistry* **58**, 533-573.
- Roudet-Tavert, G., Michon, T., Walter, J., Delaunay, T., Redondo, E. & Le Gall, O. (2007). Central domain of a potyvirus VPg is involved in the interaction with the host translation initiation factor eIF4E and the viral protein HcPro. *J Gen Virol* **88**, 1029-1033.
- Sambade, A., Brandner, K., Hofmann, C., Seemanpillai, M., Mutterer, J. & Heinlein, M. (2008). Transport of TMV movement protein particles associated with the targeting of RNA to plasmodesmata. *Traffic* **9**, 2073-2088.
- Sanchez-Duran, M. A., Dallas, M. B., Ascencio-Ibanez, J. T., Reyes, M. I., Arroyo-Mateos, M., Ruiz-Albert, J., Hanley-Bowdoin, L. & Bejarano, E. R. (2011). Interaction between Geminivirus Replication Protein and the SUMO Conjugating Enzyme Is Required for Viral Infection. *J Virol*.
- Sanfaçon, H. (2005). Replication of positive-strand RNA viruses in plants: contact points between plant and virus components. *Canadian Journal of Botany* **83**, 1529-1549.
- Schaad, M. C., Anderberg, R. J. & Carrington, J. C. (2000). Strain-specific interaction of the tobacco etch virus NIa protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. *Virology* **273**, 300-306.
- Scharf, K. D., Siddique, M. & Vierling, E. (2001). The expanding family of *Arabidopsis thaliana* small heat stress proteins and a new family of proteins containing alpha-crystallin domains (Acid proteins). *Cell Stress Chaperones* **6**, 225-237.
- Schepetilnikov, M., Kobayashi, K., Geldreich, A., Caranta, C., Robaglia, C., Keller, M. & Ryabova, L. A. (2011). Viral factor TAV recruits TOR/S6K1 signalling to activate reinitiation after long ORF translation. *EMBO J* **30**, 1343-1356.
- Schluter, K., Jockusch, B. M. & Rothkegel, M. (1997). Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochim Biophys Acta* **1359**, 97-109.
- Schmitz, J., Stussi-Garaud, C., Tacke, E., Prufer, D., Rohde, W. & Rohfritsch, O. (1997). In situ localization of the putative movement protein (pr17) from potato leafroll luteovirus (PLRV) in infected and transgenic potato plants. *Virology* **235**, 311-322.
- Scholthof, H. B. (2005). Plant virus transport: motions of functional equivalence. *Trends Plant Sci* **10**, 376-382.
- Seddas, P., Boissinot, S., Strub, J., Van Dorselaer, A., Van Regenmortel, M. H. V. & Pattus, F. (2004). Rack-1, GAPDH3, and actin: proteins of *Myzus persicae* potentially involved in the transcytosis of beet western yellows virus particles in the aphid. *Virology* **325**, 399-412.
- Sehnke, P. C., DeLille, J. M. & Ferl, R. J. (2002). Consummating signal transduction: the role of 14-3-3 proteins in the completion of signal-induced transitions in protein activity. *Plant Cell* **14 Suppl**, S339-354.
- Selman, I. W., Brierley, M. R., Pegg, G. F. & Hill, T. A. (1961). Changes in the free amino acids and amides in tomato plants inoculated with tomato spotted wilt virus. *Ann Appl Biol* **49**, 601-615.
- Selth, L. A., Dogra, S. C., Rasheed, M. S., Randles, J. W. & Rezaian, M. A. (2006). Identification and characterization of a host reversibly glycosylated peptide that interacts with the Tomato leaf curl virus V1 protein. *Plant Mol Biol* **61**, 297-310.
- Semashko, M. A., Gonzalez, I., Shaw, J., Leonova, O. G., Popenko, V. I., Taliansky, M. E., Canto, T. & Kalinina, N. O. (2012a). The extreme N-terminal domain of a hordeivirus TGB1 movement protein mediates its localization to the nucleolus and interaction with fibrillarin. *Biochimie* **94**, 1180-1188.
- Semashko, M. A., Rakitina, D. V., Gonzalez, I., Canto, T., Kalinina, N. O. & Taliansky, M. E. (2012b). Movement protein of hordeivirus interacts in vitro and in vivo with coilin, a major structural protein of Cajal bodies. *Dokl Biochem Biophys* **442**, 57-60.

- Serazev, T. V., Nadezhdina, E. S., Shanina, N. A., Leshchiner, A. D., Kalinina, N. O. & Morozov, S. (2003). [Virions and membrane proteins of the potato X virus interact with microtubules and enables tubulin polymerization in vitro]. *Mol Biol (Mosk)* **37**, 1080-1088.
- Seron, K. & Haenni, A. L. (1996). Vascular movement of plant viruses. *Mol Plant Microbe Interact* **9**, 435-442.
- Shen, R., Rakotondrafara, A. M. & Miller, W. A. (2006). trans regulation of cap-independent translation by a viral subgenomic RNA. *J Virol* **80**, 10045-10054.
- Shen, W., Yan, P., Gao, L., Pan, X., Wu, J. & Zhou, P. (2010). Helper component-proteinase (HC-Pro) protein of Papaya ringspot virus interacts with papaya calreticulin. *Mol Plant Pathol* **11**, 335-346.
- Shepardson, S., Esau, K. & McCrum, R. (1980). Ultrastructure of potato leaf phloem infected with potato leafroll virus. *Virology* **105**, 379-392.
- Shi, B. J., Miller, J., Symons, R. H. & Palukaitis, P. (2003). The 2b protein of cucumoviruses has a role in promoting the cell-to-cell movement of pseudorecombinant viruses. *Mol Plant Microbe Interact* **16**, 261-267.
- Shimizu, T., Yamaji, Y., Ogasawara, Y., Hamada, K., Sakurai, K., Kobayashi, T., Watanabe, T. & Hibi, T. (2004). Interaction between the helicase domain of the tobacco mosaic virus replicase and a tobacco arginine decarboxylase. *Journal of General Plant Pathology* **70**, 353-358.
- Shimizu, T., Yoshii, A., Sakurai, K., Hamada, K., Yamaji, Y., Suzuki, M., Namba, S. & Hibi, T. (2009). Identification of a novel tobacco DnaJ-like protein that interacts with the movement protein of tobacco mosaic virus. *Arch Virol* **154**, 959-967.
- Siddique, M., Gernhard, S., von Koskull-Doring, P., Vierling, E. & Scharf, K. D. (2008). The plant sHSP superfamily: five new members in Arabidopsis thaliana with unexpected properties. *Cell Stress Chaperones* **13**, 183-197.
- Simon, A. E., Li, X. H., Lew, J. E., Stange, R., Zhang, C., Polacco, M. & Carpenter, C. D. (1992). Susceptibility and Resistance of Arabidopsis thaliana to Turnip Crinkle Virus. *Mol Plant-Microbe Interact* **5**, 496-503.
- Sjolund, R. D. (1997). The Phloem Sieve Element: A River Runs through It. *Plant Cell* **9**, 1137-1146.
- Slagsvold, T., Pattni, K., Malerod, L. & Stenmark, H. (2006). Endosomal and non-endosomal functions of ESCRT proteins. In *Trends Cell Biol*, pp. 317-326. England.
- Soards, A. J., Murphy, A. M., Palukaitis, P. & Carr, J. P. (2002). Virulence and differential local and systemic spread of cucumber mosaic virus in tobacco are affected by the CMV 2b protein. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 647-653.
- Soellick, T., Uhrig, J. F., Bucher, G. L., Kellmann, J. W. & Schreier, P. H. (2000). The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV): RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 2373-2378.
- Sokolova, M., Pruffer, D., Tacke, E. & Rohde, W. (1997). The potato leafroll virus 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C. *FEBS Lett* **400**, 201-205.
- Stafford, C. A., Walker, G. P. & Ullman, D. E. (2011). Infection with a plant virus modifies vector feeding behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 9350-9355.
- Storozhenko, S., Inze, D., Van Montagu, M. & Kushnir, S. (2001). Arabidopsis coactivator ALY-like proteins, DIP1 and DIP2, interact physically with the DNA-binding domain of the Zn-finger poly(ADP-ribose) polymerase. *J Exp Bot* **52**, 1375-1380.
- Strokovskaia, L. I., Grzela, R., Chroboczek, J., Kikhno, I. M., Chashchina, L. I. & Solomko, A. P. (2007). [Complex formation between recombinant protein VPg of potato virus Y and heterologous eukaryotic translation initiation factors eIF4E]. *Ukr Biokhim Zh* **79**, 85-93.
- Stutz, F., Bachi, A., Doerks, T., Braun, I. C., Seraphin, B., Wilm, M., Bork, P. & Izaurralde, E. (2000). REF, an evolutionary conserved family of hnRNP-like proteins, interacts with TAP/Mex6p and participates in mRNA nuclear export. *Rna* **6**, 638-650.
- Su, S., Liu, Z., Chen, C., Zhang, Y., Wang, X., Zhu, L., Miao, L., Wang, X. C. & Yuan, M. (2010). Cucumber mosaic virus movement protein severs actin filaments to increase the plasmodesmal size exclusion limit in tobacco. *Plant Cell* **22**, 1373-1387.
- Sun, W., Van Montagu, M. & Verbruggen, N. (2002). Small heat shock proteins and stress tolerance in plants. *Biochim Biophys Acta* **1577**, 1-9.
- Tacke, E., Pruffer, D., Schmitz, J. & Rohde, W. (1991). The potato leafroll luteovirus 17K protein is a single-stranded nucleic acid-binding protein. *The Journal of general virology* **72** (Pt 8), 2035-2038.
- Tacke, E., Schmitz, J., Pruffer, D. & Rohde, W. (1993). Mutational analysis of the nucleic acid-binding 17 kDa phosphoprotein of potato leafroll luteovirus identifies an amphipathic alpha-helix as the domain for protein/protein interactions. *Virology* **197**, 274-282.
- Tagami, Y. & Watanabe, Y. (2007). Effects of brefeldin A on the localization of Tobamovirus movement protein and cell-to-cell movement of the virus. *Virology* **361**, 133-140.
- Taliansky, M., Roberts, I. M., Kalinina, N., Ryabov, E. V., Raj, S. K., Robinson, D. J. & Oparka, K. J. (2003). An umbraviral protein, involved in long-distance RNA movement, binds viral RNA and forms unique, protective ribonucleoprotein complexes. *J Virol* **77**, 3031-3040.
- Taliansky, M., Torrance, L. & Kalinina, N. O. (2008). Role of plant virus movement proteins. *Methods Mol Biol* **451**, 33-54.
- Tavert-Roudet, G., Abdul-Razzak, A., Doublet, B., Walter, J., Delaunay, T., German-Retana, S., Michon, T., Le Gall, O. & Candresse, T. (2012). The C terminus of lettuce mosaic potyvirus cylindrical inclusion helicase interacts with the viral VPg and with lettuce translation eukaryotic initiation factor 4E. *J Gen Virol* **93**, 184-193.

- Terauchi, H., Honda, K., Yamagishi, N., Kanematsu, S., Ishiguro, K. & Hidaka, S. (2003).** The N-Terminal Region of the Readthrough Domain Is Closely Related to Aphid Vector Specificity of Soybean dwarf virus. *Phytopathology* **93**, 1560-1564.
- Thiebauld, O., Schepetilnikov, M., Park, H. S., Geldreich, A., Kobayashi, K., Keller, M., Hohn, T. & Ryabova, L. A. (2009).** A new plant protein interacts with eIF3 and 60S to enhance virus-activated translation re-initiation. *EMBO J* **28**, 3171-3184.
- Thiel, H., Hleibieh, K., Gilmer, D. & Varrelmann, M. (2012).** The P25 pathogenicity factor of BNYVV targets the sugar beet 26S proteasome involved in the induction of a hypersensitive resistance response via interaction with an F-box protein. *Mol Plant Microbe Interact.*
- Thivierge, K., Cotton, S., Dufresne, P. J., Mathieu, I., Beauchemin, C., Ide, C., Fortin, M. G. & Laliberte, J. F. (2008).** Eukaryotic elongation factor 1A interacts with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase and VPg-Pro in virus-induced vesicles. *Virology* **377**, 216-225.
- Thomas, P. E., Evans, D. W., Biever, K. D. & Fox, L. (1990).** Resistance to beet western yellows virus among gorage brassicas. *Plant disease* **74**, 327-330.
- Tian, T., Medina, V., Mayhew, D. E., Maeda, S. & Falk, B. W. (1995).** Beet western yellows luteovirus capsid proteins produced by recombinant baculoviruses assemble into virion-like particles in cells and larvae of *Bombyx mori*. In *Virology*, pp. 204-212. United States.
- Tompa, P., Dosztanyi, Z. & Simon, I. (2006).** Prevalent structural disorder in *E. coli* and *S. cerevisiae* proteomes. *J Proteome Res* **5**, 1996-2000.
- Torrance, L. (1992).** Analysis of epitopes on potato leafroll virus capsid protein. *Virology* **191**, 485-489.
- Torrance, L., Lukhovitskaya, N. I., Schepetilnikov, M. V., Cowan, G. H., Ziegler, A. & Savenkov, E. I. (2009).** Unusual long-distance movement strategies of Potato mop-top virus RNAs in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 381-390.
- Tyulkina, L. G., Karger, E. M., Sheveleva, A. A. & Atabekov, J. G. (2010).** Binding of monoclonal antibodies to the movement protein (MP) of Tobacco mosaic virus: influence of subcellular MP localization and phosphorylation. *J Gen Virol* **91**, 1621-1628.
- Uehara, Y., Takahashi, Y., Berberich, T., Miyazaki, A., Takahashi, H., Matsui, K., Ohme-Takagi, M., Saitoh, H., Terauchi, R. & Kusano, T. (2005).** Tobacco ZFT1, a transcriptional repressor with a Cys2/His2 type zinc finger motif that functions in spermine-signaling pathway. *Plant Mol Biol* **59**, 435-448.
- Ueki, S. & Citovsky, V. (2002).** The systemic movement of a tobamovirus is inhibited by a cadmium-ion-induced glycine-rich protein. *Nat Cell Biol* **4**, 478-486.
- Ueki, S. & Citovsky, V. (2005).** Identification of an interactor of cadmium ion-induced glycine-rich protein involved in regulation of callose levels in plant vasculature. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 12089-12094.
- Ueki, S., Spektor, R., Natale, D. M. & Citovsky, V. (2010).** ANK, a Host Cytoplasmic Receptor for the Tobacco mosaic virus Cell-to-Cell Movement Protein, Facilitates Intercellular Transport through Plasmodesmata. *PLoS Pathog* **6**, e1001201.
- Uhrig, J. F., Canto, T., Marshall, D. & MacFarlane, S. A. (2004).** Relocalization of nuclear ALY proteins to the cytoplasm by the tomato bushy stunt virus P19 pathogenicity protein. *Plant Physiol* **135**, 2411-2423.
- Van den Heuvel, J. F., Boerma, T. M. & Peters, D. (1991).** Transmission of potato leafroll virus from plants and artificial diets by *Myzus persicae*. *Phytopathology* **81**, 150-154.
- van den Heuvel, J. F., Bruyere, A., Hogenhout, S. A., Ziegler-Graff, V., Brault, V., Verbeek, M., van der Wilk, F. & Richards, K. (1997).** The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to *Buchnera* GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *J Virol* **71**, 7258-7265.
- van den Heuvel, J. F. J. M., Boerma, T. M. & Peters, D. (1991).** Transmission of Potato Leafroll Virus from Plants and Artificial Diets by *Myzus persicae*. *Phytopathology* **81**, 150-154.
- van der Wilk, F., Houterman, P., Molthoff, J., Hans, F., Dekker, B., van den Heuvel, J., Huttinga, H. & Goldbach, R. (1997).** Expression of the potato leafroll virus ORF0 induces viral-disease-like symptoms in transgenic potato plants. *Mol Plant Microbe Interact* **10**, 153-159.
- Veidt, I., Bouzoubaa, S. E., Leiser, R. M., Ziegler-Graff, V., Guilley, H., Richards, K. & Jonard, G. (1992).** Synthesis of full-length transcripts of beet western yellows virus RNA: messenger properties and biological activity in protoplasts. *Virology* **186**, 192-200.
- Veidt, I., Lot, H., Leiser, M., Scheidecker, D., Guilley, H., Richards, K. & Jonard, G. (1988).** Nucleotide sequence of beet western yellows virus RNA. *Nucleic Acids Res* **16**, 9917-9932.
- Vidali, L. & Hepler, P. K. (1997).** Characterization and localization of profilin in pollen grains and tubes of *Lilium longiflorum*. *Cell Motil Cytoskeleton* **36**, 323-338.
- Vijayapalani, P., Maeshima, M., Nagasaki-Takekuchi, N. & Miller, W. A. (2012).** Interaction of the Trans-Frame Potyvirus Protein P3N-PIPO with Host Protein PCaP1 Facilitates Potyvirus Movement. *PLoS Pathog* **8**, e1002639.
- Virbasius, C. M., Wagner, S. & Green, M. R. (1999).** A human nuclear-localized chaperone that regulates dimerization, DNA binding, and transcriptional activity of bZIP proteins. *Mol Cell* **4**, 219-228.
- Vogel, F., Hofius, D. & Sonnewald, U. (2007).** Intracellular trafficking of Potato leafroll virus movement protein in transgenic *Arabidopsis*. *Traffic* **8**, 1205-1214.
- Volkman, D., Mori, T., Tirlapur, U. K., Konig, K., Fujiwara, T., Kendrick-Jones, J. & Baluska, F. (2003).** Unconventional myosins of the plant-specific class VIII: endocytosis, cytokinesis, plasmodesmata/pit-fields, and cell-to-cell coupling. *Cell Biol Int* **27**, 289-291.

- Von Bargaen, S., Salchert, K., Paape, M., Piechulla, B. & J.W., K. (2001). *Interactions between the tomato spotted wilt virus movement protein and plant proteins showing homologies to myosin, kinesin and Dnal-like chaperones*. Paris, FRANCE: Elsevier.
- Waigmann, E., Lucas, W. J., Citovsky, V. & Zambryski, P. (1994). Direct functional assay for tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1433-1437.
- Waigmann, E., Ueki, S., Trutnyeva, K. & Citovsky, V. (2004). The ins and outs of non-destructive cell-to-cell and systemic movement of plant viruses. *Crit Rev Plant Sci* **23**, 195-250.
- Walkey, D. G. A. & Pink, D. C. A. (1990). Studies on resistance to beet western yellows virus in lettuce (*Lactuca sativa*) and the occurrence of field sources of the virus. *Plant pathology* **39**, 141-155.
- Wang, H., Buckley, K. J., Yang, X., Buchmann, R. C. & Bisaro, D. M. (2005). Adenosine kinase inhibition and suppression of RNA silencing by geminivirus AL2 and L2 proteins. *J Virol* **79**, 7410-7418.
- Wang, H., Hao, L., Shung, C. Y., Sunter, G. & Bisaro, D. M. (2003). Adenosine kinase is inactivated by geminivirus AL2 and L2 proteins. *Plant Cell* **15**, 3020-3032.
- Wang, J., Chay, C., Gildow, F. E. & SM, G. (1995). Readthrough protein associated with virions of barley yellow dwarf luteovirus and its potential role in regulating the efficiency of aphid transmission. *Virology* **206**, 954-962.
- Wang, S., Guo, L., Allen, E. & Miller, W. A. (1999). A potential mechanism for selective control of cap-independent translation by a viral RNA sequence in cis and in trans. *Rna* **5**, 728-738.
- Wang, X. & Culver, J. N. (2012). DNA binding specificity of ATAF2, a NAC domain transcription factor targeted for degradation by Tobacco mosaic virus. *BMC Plant Biol* **12**, 157.
- Wang, X., Goregaoker, S. P. & Culver, J. N. (2009). Interaction of the Tobacco mosaic virus replicase protein with a NAC domain transcription factor is associated with the suppression of systemic host defenses. *J Virol* **83**, 9720-9730.
- Waterhouse, P. M. (1988). Luteovirus group. *Dans CMI/AAB Description of plant viruses* **339**.
- Wei, T., Zhang, C., Hong, J., Xiong, R., Kasschau, K. D., Zhou, X., Carrington, J. C. & Wang, A. (2010). Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathog* **6**, e1000962.
- Weidman, M. K., Sharma, R., Raychaudhuri, S., Kundu, P., Tsai, W. & Dasgupta, A. (2003). The interaction of cytoplasmic RNA viruses with the nucleus. *Virus Res* **95**, 75-85.
- Wells, D. R., Tanguay, R. L., Le, H. & Gallie, D. R. (1998). HSP101 functions as a specific translational regulatory protein whose activity is regulated by nutrient status. *Genes Dev* **12**, 3236-3251.
- Werner, B. J., Mowry, T. M., Bosque-Perez, N. A., Ding, H. & Eigenbrode, S. D. (2009). Changes in green peach aphid responses to potato leafroll virus-induced volatiles emitted during disease progression. *Environ Entomol* **38**, 1429-1438.
- White, R. G., Badelt, K., Overall, R. L. & Vesik, M. (1994). Actin associated with plasmodesmata. *Protoplasma* **180**, 169-184.
- Whitham, S., Dinesh-Kumar, S. P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C. & Baker, B. (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* **78**, 1101-1115.
- Whitham, S. A., Anderberg, R. J., Chisholm, S. T. & Carrington, J. C. (2000). Arabidopsis RTM2 gene is necessary for specific restriction of tobacco etch virus and encodes an unusual small heat shock-like protein. *Plant Cell* **12**, 569-582.
- Whitham, S. A., Quan, S., Chang, H. S., Cooper, B., Estes, B., Zhu, T., Wang, X. & Hou, Y. M. (2003). Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible Arabidopsis thaliana plants. *Plant J* **33**, 271-283.
- Whitham, S. A., Yamamoto, M. L. & Carrington, J. C. (1999). Selectable viruses and altered susceptibility mutants in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 772-777.
- Wilmarth, P. A., Riviere, M. A., Rustvold, D. L., Lauten, J. D., Madden, T. E. & David, L. L. (2004). Two-dimensional liquid chromatography study of the human whole saliva proteome. *Journal of proteome research* **3**, 1017-1023.
- Wittmann, S., Chatel, H., Fortin, M. G. & Laliberte, J. F. (1997). Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of Arabidopsis thaliana using the yeast two-hybrid system. *Virology* **234**, 84-92.
- Wolf, S., Deom, C. M., Beachy, R. N. & Lucas, W. J. (1989). Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science* **246**, 377-379.
- Wright, K. M., Cowan, G. H., Lukhovitskaya, N. I., Tilsner, J., Roberts, A. G., Savenkov, E. I. & Torrance, L. (2010). The N-terminal domain of PMTV TGB1 movement protein is required for nucleolar localization, microtubule association, and long-distance movement. *Mol Plant Microbe Interact* **23**, 1486-1497.
- Xie, Q., Sanz-Burgos, A. P., Guo, H., Garcia, J. A. & Gutierrez, C. (1999). GRAB proteins, novel members of the NAC domain family, isolated by their interaction with a geminivirus protein. *Plant Mol Biol* **39**, 647-656.
- Yahalom, A., Lando, R., Katz, A. & Epel, B. L. (1998). A calcium-dependent protein kinase is associated with maize mesocotyl plasmodesmata. *J Plant Physiol* **153**, 354-362.
- Yahalom, A., Warmbrodt, R. D., Laird, D. W., Traub, O., Revel, J. P., Willecke, K. & Epel, B. L. (1991). Maize mesocotyl plasmodesmata proteins cross-react with connexin gap junction protein antibodies. *Plant Cell* **3**, 407-417.
- Yamaji, Y., Hamada, K., Sakurai, K., Yoshii, A., Shimizu, T., Hashimoto, M., Suzuki, M., Namba, S. & Hibi, T. (2010a). Inhibitory effect on the tobacco mosaic virus infection by a plant RING finger protein. *Virus Res*.
- Yamaji, Y., Kobayashi, T., Hamada, K., Sakurai, K., Yoshii, A., Suzuki, M., Namba, S. & Hibi, T. (2006). In vivo interaction between Tobacco mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase and host translation elongation factor 1A. *Virology* **347**, 100-108.

- Yamaji, Y., Sakurai, K., Hamada, K., Komatsu, K., Ozeki, J., Yoshida, A., Yoshii, A., Shimizu, T., Namba, S. & Hibi, T. (2010b). Significance of eukaryotic translation elongation factor 1A in tobacco mosaic virus infection. *Arch Virol* **155**, 263-268.
- Yamanaka, T., Imai, T., Satoh, R., Kawashima, A., Takahashi, M., Tomita, K., Kubota, K., Meshi, T., Naito, S. & Ishikawa, M. (2002). Complete inhibition of tobamovirus multiplication by simultaneous mutations in two homologous host genes. *J Virol* **76**, 2491-2497.
- Yamanaka, T., Ohta, T., Takahashi, M., Meshi, T., Schmidt, R., Dean, C., Naito, S. & Ishikawa, M. (2000). TOM1, an Arabidopsis gene required for efficient multiplication of a tobamovirus, encodes a putative transmembrane protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 10107-10112.
- Yang, X., Thannhauser, T. W., Burrows, M., Cox-Foster, D., Gildow, F. E. & Gray, S. M. (2008). Coupling genetics and proteomics to identify aphid proteins associated with vector-specific transmission of polerovirus (luteoviridae). *J Virol* **82**, 291-299.
- Yeam, I., Cavatorta, J. R., Ripoll, D. R., Kang, B. C. & Jahn, M. M. (2007). Functional dissection of naturally occurring amino acid substitutions in eIF4E that confers recessive potyvirus resistance in plants. *Plant Cell* **19**, 2913-2928.
- Yoshioka, K., Matsushita, Y., Kasahara, M., Konagaya, K. & Nyunoya, H. (2004). Interaction of tomato mosaic virus movement protein with tobacco RIO kinase. *Mol Cells* **17**, 223-229.
- Zavaliev, R., Ueki, S., Epel, B. L. & Citovsky, V. (2011). Biology of callose (beta-1,3-glucan) turnover at plasmodesmata. *Protoplasma* **248**, 117-130.
- Zeenko, V. V., Ryabova, L. A., Spirin, A. S., Rothnie, H. M., Hess, D., Browning, K. S. & Hohn, T. (2002). Eukaryotic elongation factor 1A interacts with the upstream pseudoknot domain in the 3' untranslated region of tobacco mosaic virus RNA. *J Virol* **76**, 5678-5691.
- Zhang, C., Liu, Y., Sun, X., Qian, W., Zhang, D. & Qiu, B. (2008). Characterization of a specific interaction between IP-L, a tobacco protein localized in the thylakoid membranes, and Tomato mosaic virus coat protein. *Biochem Biophys Res Commun* **374**, 253-257.
- Zhang, H. S. & Dean, D. C. (2001). Rb-mediated chromatin structure regulation and transcriptional repression. *Oncogene* **20**, 3134-3138.
- Zhang, X. & Wong, S. M. (2009). Hibiscus chlorotic ringspot virus upregulates plant sulfite oxidase transcripts and increases sulfate levels in kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.). *J Gen Virol* **90**, 3042-3050.
- Zhang, X., Yuan, Y. R., Pei, Y., Lin, S. S., Tuschl, T., Patel, D. J. & Chua, N. H. (2006). Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits Arabidopsis Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev* **20**, 3255-3268.
- Zhang, Z., Chen, H., Huang, X., Xia, R., Zhao, Q., Lai, J., Teng, K., Li, Y., Liang, L., Du, Q., Zhou, X., Guo, H. & Xie, Q. (2011). BSCTV C2 Attenuates the Degradation of SAMDC1 to Suppress DNA Methylation-Mediated Gene Silencing in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**, 273-288.
- Zhou, F., Wu, G., Deng, W., Pu, Y., Wei, C. & Li, Y. (2007). Interaction of rice dwarf virus outer capsid P8 protein with rice glycolate oxidase mediates relocalization of P8. *FEBS Lett* **581**, 34-40.
- Zhou, Y., Rojas, M. R., Park, M. R., Seo, Y. S., Lucas, W. J. & Gilbertson, R. L. (2011). Histone H3 interacts and colocalizes with the nuclear shuttle protein and the movement protein of a geminivirus. *J Virol* **85**, 11821-11832.
- Zhou, Z., Luo, M. J., Straesser, K., Katahira, J., Hurt, E. & Reed, R. (2000). The protein Aly links pre-messenger-RNA splicing to nuclear export in metazoans. *Nature* **407**, 401-405.
- Zhu, S., Feng, G., Cao, X., Chen, M., Ye, G., Wei, C. & Li, Y. (2005). The rice dwarf virus P2 protein interacts with entkaurene oxidases in vivo, leading to reduced biosynthesis of gibberellins and rice dwarf symptoms. *Plant Physiol* **139**, 1935-1945.
- Ziegler-Graff, V., Brault, V., Mutterer, J. D., Simonis, M.-T., Herrbach, E., Guillely, H., Richards, K. E. & Jonard, G. (1996). The coat protein of beet western yellows luteovirus is essential for systemic infection but the viral gene products P29 and P19 are dispensable for systemic infection and aphid transmission. *Molecular Plant Microbe Interactions* **9**, 501-510.

Table des figures

| | |
|--|----|
| Figure 1 : Représentation schématique de l'implication des protéines ESCRT dans le tri des endosomes | 9 |
| Figure 2 : Représentation schématique du contrôle de la réplication de l'IMYMV par les protéines PCNA et RF C | 11 |
| Figure 3 : Le complexe d'initiation de la traduction chez les eucaryotes | 13 |
| Figure 4 : Modèle proposé du mécanisme de ré-initiation de la traduction des ARN contrôlé par la protéine TAV du CaMV et mettant en jeu les protéines RISP et TOR de l'hôte | 16 |
| Figure 5 : Modification de la structure des plasmodesmes par des virus entraînant la formation de tubules ou se déplaçant de cellule à cellule grâce à la formation de complexes viraux ribonucléoprotéiques | 18 |
| Figure 6 : Représentation schématique du mouvement à longue distance des virus. | 20 |
| Figure 7 : Le mécanisme de <i>gene silencing</i> anti-viral chez les plantes (rôle de la protéine AGO1) et suppression de ce mécanisme par la protéine PO des polérovirus | 33 |
| Figure 8 : Représentation schématique du complexe transmissible constitué des particules virales du CaMV décorées de protéines P3 | 38 |
| Figure 9 : Répartition des composés du complexe transmissible à l'intérieur d'une cellule de mésophylle de navet infectée par le CaMV | 38 |
| Figure 10 : Modèle de l'acquisition séquentielle du CaMV par puceron dans une cellule infectée | 39 |
| Figure 11 : Représentation simplifiée du modèle de l'accumulation du TMV et de son mouvement dans la cellule grâce à l'implication de plusieurs protéines de dans les différentes étapes | 46 |
| Figure 12 : Observation par MET de particules virales du CABYV. Représentation schématique de la structure icosaédrique de la particule des membres de la famille des <i>Luteoviridae</i> | 45 |
| Figure 13 : Symptômes causés par le <i>Barley yellow dwarf virus</i> (BYDV) sur blé; le <i>Beet mild yellowing virus</i> (BMV) sur betterave ; le <i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i> (CABYV) sur courgette ; le CABYV sur melon ; le <i>Potato leafroll virus</i> (PLRV) sur pomme de terre ; et par le <i>Pea enation mosaic virus</i> (PEMV) sur pois | 46 |
| Figure 14 : Représentation schématique de l'organisation génomique des 3 genres viraux appartenant à la famille des <i>Luteoviridae</i> | 47 |
| Figure 15 : Structure secondaire de l'ARN génomique au niveau du site de <i>frameshift</i> -1 permettant la synthèse de la protéine de fusion P1-P2.. | 50 |
| Figure 16 : Domaines fonctionnels des protéines P1 et P2 des polérovirus.. | 50 |
| Figure 17 : Domaines fonctionnels et structuraux de la protéine CP des polérovirus | 52 |
| Figure 18 : Organisation et fonctions du domaine de <i>readthrough</i> (DRT) des virus appartenant à la famille des <i>Luteoviridae</i> | 54 |
| Figure 19 : Domaines fonctionnels de la protéine P4 des polérovirus | 55 |
| Figure 20 : Organisation des pièces buccales d'un puceron | 57 |
| Figure 21 : Représentation schématique du mécanisme de la transmission circulante des virus par puceron. | 58 |
| Figure 22 : Modèle pour le transport des polérovirus à travers les cellules intestinales et les cellules des glandes salivaires accessoires | 59 |
| Figure 23 : Analyse par western blot de l'expression dans les levures des protéines codées par les ORF3 et ORF5 du CABYV, utilisées pour cribler la banque d'ADNc de cellules compagnes d' <i>A. thaliana</i> | 65 |
| Figure 24 : Principe du test d'interaction entre deux protéines par la technique du double hybride dans la levure | 66 |

| | |
|--|-----|
| Figure 25 : Alignement des 5 séquences protéiques d' <i>A. thaliana</i> codant pour des profilines et du clone isolé de la banque d'ADNc de cellules compagnes | 68 |
| Figure 26 : Tests d'interactions par double hybride dans la levure entre les protéines CP et RT* du CABYV | 69 |
| Figure 27 : Alignement des séquences protéiques de la protéine CP du CABYV et du TuYV. Positionnement, par homologies de séquences, des domaines R et S sur la protéine CP du CABYV. | 70 |
| Figure 28 : Représentation schématique des constructions obtenues à partir de la protéine CP du CABYV, clonées dans le pGBKT7 et le pGADT7 afin d'analyser leur auto-association dans la levure. | 70 |
| Figure 29 : Test d'auto-association dans la souche de levure Y2HGold des constructions obtenues à partir de la CP du CABYV. | 70 |
| Figure 30 : Test d'interaction par double hybride dans la levure dans la souche Y2HGold, entre les 4 protéines ALY d' <i>A. thaliana</i> et différentes protéines virales du CABYV et du TuYV. | 72 |
| Figure 31 : Test d'interaction par double hybride dans la levure Y2HGold, de différents domaines protéiques d'AtALY2 avec les protéines virales du CABYV et du TuYV. | 72 |
| Figure 32 : Caractérisation par PCR des mutants d'arabidopsis touchés dans les différents gènes candidats. | 84 |
| Figure 33 : Analyse de l'accumulation des ARNm du gène <i>prf3</i> par RT-PCR dans les deux lignées mutantes | 84 |
| Figure 34 : Localisation <i>in planta</i> des protéines RFP:RT _{C-ter} et EGFP:PRF3, hors contexte viral, après agro-inoculation de <i>N. benthamiana</i> | 93 |
| Figure 35 : Etude de l'interaction par FLIM entre la protéine EGFP:PRF3 et la protéine RFP:RT _{C-ter} 48 h post-inoculation de <i>N. benthamiana</i> . | 93 |
| Figure 36 : Prédiction de domaines intrinsèquement désordonnés (programme IUPred) dans les séquences des protéines de structure CP et du domaine de <i>readthrough</i> de différents virus de la famille des <i>Luteoviridae</i> | 95 |
| Figure 37 : Représentation schématique de l'organisation du système vasculaire chez les plantes. | 104 |
| Figure 38 : Observation par MET d'un plasmodesme branché entre une cellule compagne et un tube criblé, et observation de particules virales du TuYV dans un plasmodesme connectant une cellule compagne et un tube criblé | 104 |
| Figure 39 : Organisation des domaines constituant la protéine RT des virus appartenant à la famille des <i>Luteoviridae</i> | 106 |
| Figure 40 : Schematic representation of CABYV mutants | 113 |
| Figure 41 : Detection of CABYV proteins and virions in infected <i>C. sativus</i> and <i>M. perfoliata</i> . | 116 |
| Figure 42 : Schematic representation of CABYV-NM3 used to obtain CABYV-RT Δ C _{ter} . | 122 |
| Figure 43 : Assessment of the presence of CABYV-RT Δ C _{ter} in sieve elements of <i>C. sativus</i> by RT-PCR. | 119 |
| Figure 44 : Synthesis of the RT protein by CABYV mutants and incorporation of the RT* into purified virions | 121 |
| Figure 45 : Negatively stained viral particles of CABYV-WT, PCS1, PCS3+, CABYV-NM3 and CABYV-RT Δ C _{ter} observed by transmission electron microscopy | 123 |
| Figure 46 : Western-blot analysis of protein contents of purified mutant viruses | 123 |
| Figure 47 : MALDI-TOF analysis of the structural viral protein of 30 kDa detected in PCS3+ virus particles.. | 123 |
| Figure 48 : Nucleotide changes introduced in the CABYV genome to obtain the PCS1 mutant. | 123 |
| Figure 49 : Hypothetical model for the role of the different forms of the RT protein in CABYV movement | 127 |
| Figure 50 : Prediction of disordered domains of CABYV ORF3 and ORF5 encoded proteins using PONDR and IUPred programs | 128 |
| Figure 51 : Test de transmission du CABYV-RT Δ C _{ter} sur disques foliaires. Détection par RT-PCR d'un ARN (-) dans les ARNs extraits des particules virales du CABYV | 132 |
| Figure 52 : Caractérisation des arabidopsis exprimant la RT complète du CABYV ou le domaine RT _{C-ter} | 133 |

| | |
|---|-----|
| Figure 53 : Localisation subcellulaire de la protéine GFP:RT et de la protéine EGFP:RT* dans <i>N. benthamiana</i> par microscopie à fluorescence.. | 134 |
| Figure 54 : Analyse par western blot du clivage de la protéine EGFP:RT en présence du CABYV-RT _{ΔC-ter} après agro-infiltration dans des feuilles de <i>N. benthamiana</i> | 135 |
| Figure 55 : Recherche par western blot des protéines de structure du CABYV dans des protoplastes de <i>C. quinoa</i> , 24, 48 et 72h post-inoculation. Observation par MET de particules virales du CABYV dans des protoplastes de <i>C. quinoa</i> , 24, 48 et 72h post inoculation. | 136 |
| Figure 56 : Représentation schématique des étapes du clonage par la technologie Gateway® | 152 |

Table des tableaux

| | |
|--|-----|
| Tableau 1 : Interactions entre protéines virales et protéines de l'hôte impliquées dans l'inhibition de la réplication virale pour lesquels les mécanismes sont inconnus | 12 |
| Tableau 2 : Interactions identifiées entre des protéines virales et des protéines appartenant au complexe d'initiation de la traduction | 14 |
| Tableau 3 : Protéines virales qui interagissent avec des protéines de plante associées au cytosquelette | 22 |
| Tableau 4: Protéines virales qui interagissent avec des protéines kinases | 26 |
| Tableau 5 : Protéines virales qui interagissent avec des protéines chaperonnes | 27 |
| Tableau 6 : Protéines virales qui interagissent avec des protéines de plantes associées au système sécrétoire et au trafic vésiculaire | 28 |
| Tableau 7 : interactions entre protéines virales et protéines de l'hôte, impliquées dans la charge virale mais pour lesquelles le mode d'action n'a pas encore été identifié | 37 |
| Tableau 8 : Relevé des interactions protéines virales-protéines de plantes dont le rôle dans le cycle viral n'est pas connu | 42 |
| Tableau 9 : Taxonomie des virus de la famille des <i>Luteoviridae</i> | 44 |
| Tableau 10 : Contexte d'initiation de la traduction d'ORFs se chevauchant | 49 |
| Tableau 11 : Caractéristiques des différents types de transmission de virus par Hémiptères | 60 |
| Tableau 12 : Analyse de l'activation de la transcription des gènes rapporteurs <i>Ade2</i> et <i>His3</i> par les protéines virales fusionnées au domaine de fixation à l'ADN du facteur de transcription Gal4 dans la souche de levure AH109 | 67 |
| Tableau 13 : Protéines candidates identifiées au cours des criblages de la banque d'ADNc de cellules compagnes d' <i>A. thaliana</i> | 67 |
| Tableau 14 : Classification des protéines sHsps selon leur localisation subcellulaire | 73 |
| Tableau 15 : Nomenclature des 5 profilines d' <i>A. thaliana</i> selon les différents auteurs | 77 |
| Tableau 16 : Pourcentage d'homologie entre les séquences protéiques des profilines d' <i>A. thaliana</i> | 77 |
| Tableau 17 : Pourcentage d'homologie entre les séquences des protéines « Low sulfur » d' <i>A. thaliana</i> | 78 |
| Tableau 18: Pourcentage d'homologie entre les séquences protéiques des protéines ALY d' <i>A. thaliana</i> et la protéine ALY d' <i>Acyrtosiphon pisum</i> | 80 |
| Tableau 19 : Localisations subcellulaires des protéines ALY d' <i>A. thaliana</i> | 81 |
| Tableau 20 : Caractérisation des mutants d' <i>A. thaliana</i> touchés dans l'expression des gènes candidats (ou leurs homologues) identifiés lors des criblages de la banque d'ADNc de cellules compagnes d' <i>A. thaliana</i> ou d'ADNc de puceron (<i>A. pisum</i>) | 83 |
| Tableau 21 : Accumulation du CABYV dans le mutant d'arabidopsis touché dans le gène <i>Din10</i> . Test de transmission par puceron du CABYV à partir de plantes mutantes DIN10 ou de plantes références Col-0 infectées | 87 |
| Tableau 22 : Accumulation du CABYV dans les mutants d'arabidopsis touchés dans les gènes codant pour les profilines après une inoculation du virus par pucerons. Accumulation du CABYV dans le mutant d'arabidopsis touché dans le gène <i>prf3</i> après agro-inoculation du virus avec deux concentrations d'agrobactéries | 88 |
| Tableau 23 : Accumulation du TuYV dans les mutants d'arabidopsis touchés dans les gènes <i>Aly</i> (simples et doubles mutants) | 91 |
| Tableau 24 : Principales données sur les fonctions assurées par la protéine RT des polérovirus | 109 |

| | |
|---|-----|
| Tableau 25 : Virus accumulation in <i>M. perfoliata</i> agroinoculated with CABYV mutants | 118 |
| Tableau 26: Virus accumulation in <i>C. sativus</i> or in <i>A. thaliana</i> agroinoculated with CABYV mutants. | 119 |
| Tableau 27: Composition du milieu Murashige et Skoog | 142 |
| Tableau 28 : Vecteurs utilisés pour la fusion des protéines avec les protéines EGFP et RFP | 144 |
| Tableau 29 : Espèces végétales utilisées au cours des différentes expériences | 145 |
| Tableau 30 : Description des mutants d'arabidopsis utilisés pour le suivi de l'accumulation du virus et pour les tests de transmission du CABYV | 146 |
| Tableau 31 : Anticorps utilisés pour les expériences de western blot ou les tests ELISA | 146 |
| Tableau 32 : Principaux oligonucléotides utilisés pour les différentes expérimentations | 147 |
| Tableau 33: Composition des gels et des tampons utilisés pour la réalisation d'électrophorèse sur gel d'acrylamide en conditions dénaturantes | 155 |