UNIVERSITE DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE

INRA Colmar – UMR Santé de la Vigne et Qualité du Vin

THÈSE

présentée par

Clémence HIPPER

le 20 septembre 2013 en vue de l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG.

Discipline: Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Nature du complexe viral impliqué dans le mouvement à longue distance du virus de la jaunisse du navet

THÈSE dirigée par :
Dr Véronique Brault, Directrice de Recherche, INRA Colmar

RAPPORTEURS :
Dr Sylvie Dinant, Chargée de Recherche, INRA Versailles-Grignon
Dr Thierry Candresse, Directeur de Recherche, INRA Bordeaux-Aquitaine

EXAMINATEURS :
Pr David Gilmer, Professeur à l'Université de Strasbourg, IBMP Strasbourg
Dr Emmanuel Jacquot, Directeur de Recherche, CIRAD Montpellier

Clémence HIPPER

Nature du complexe viral impliqué dans le mouvement à longue distance du virus de la jaunisse du navet.

RESUME

Le projet de thèse consistait à étudier le mouvement du Virus de la jaunisse du navet (TuYV) dans le système vasculaire. Le premier objectif était d'identifier la nature du complexe viral cheminant dans les tubes criblés : virions et/ou complexes ribonucléoprotéiques. L'analyse du mouvement de mutants viraux dans différentes espèces végétales, en absence ou en présence de protéines de capside de type sauvage apportées en *trans*, a permis de démontrer une étroite relation entre la formation de virions et le transport à longue distance. Le second objectif de cette étude portait sur l'identification de partenaires cellulaires de la protéine P4 du TuYV. Deux protéines ont été identifiées par un criblage de banques d'ADNc d'*A. thaliana* par le système du double hybride dans la levure, et l'analyse de leur implication dans le cycle viral a été amorcée par des expériences de localisation subcellulaire et de validation fonctionnelle *in planta*.

Mots-clés : Mouvement à longue distance ; Phloème ; *Polerovirus* ; Virions ; Complexes ribonucléoprotéiques ; Protéine de capside ; Protéine de mouvement ; Interactions ARN/protéine.

ABSTRACT

In the project, *Turnip yellows virus* (TuYV) transport in the phloem was analysed. The first objective was to identify the nature of the viral complex involved in vascular movement: virions and/or ribonucleoprotein complexes. Mutant viruses were modified in the capsid protein gene to inhibit formation of virions. By analyzing their movement in different host plants, in the absence or in the presence of the wild-type capsid proteins brought in *trans*, we demonstrated a strong relation between virion formation and virus long-distance movement. The second objective was to identify cellular partners of the TuYV-P4 protein, a putative movement protein which is host-specific. Two proteins were identified by screening a cDNA library of *A. thaliana* using the yeast two hybrid technique, and their function in the virus cycle was assessed by performing sub-cellular localizations and infection of *A. thaliana* KO mutants.

Keywords : Long-distance movement; Phloem; Polerovirus; Virions; Ribonucleoprotein complexes; Capsid protein; Movement protein; RNA/protein interactions.

“All we have to decide is what to do with the time that is given us.”
— J.R.R. Tolkien, *The Fellowship of the Ring*

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Véronique Brault pour m'avoir accueillie pendant ces trois années et demie durant lesquelles j'ai pu progresser scientifiquement. Merci pour tes idées et conseils, et pour avoir patiemment corrigé ce manuscrit.

Je tiens à remercier les membres du jury, Dr Sylvie Dinant, Dr Thierry Candresse, Pr David Gilmer et Dr Emmanuel Jacquot, pour le temps passé à évaluer ce travail de thèse. J'aimerai en particulier remercier David chez qui j'ai découvert le monde du laboratoire il y a maintenant cinq ans, et qui a été un formidable professeur en master de virologie.

Je remercie aussi tous les membres présents et passés du laboratoire « polérovirus » : vos conseils scientifiques, votre écoute lors de nos réunions hebdomadaires, et votre soutien dans certaines expériences m'ont été indispensables. Vous m'avez accueillie chaleureusement parmi vous pendant ces trois ans et demi. Merci donc à Véronique, Sylvaine, Cathy, Monique, Gabriel, Maryam, Baptiste, Caren, et à tous ceux qui ont passé un peu de temps dans notre labo. Votre aide a grandement contribué au bon déroulement de cette thèse.

Merci aux autres membres de l'équipe Virologie et Vection qui m'ont parfois aidé dans mes expériences, et souvent entendu parler trop vite lors des réunions du vendredi. Un grand merci à mes voisins du tout récent bureau des doctorants, Claire, Lorène, Lise, Antoine et Maryam ; je garde un très bon souvenir de nos discussions plus ou moins scientifiques! Merci à Frédérique Pelsy pour nous avoir aidé dans le grand jeu des chaises musicales ayant permis la mise en place de ce bureau.

Les membres de mes deux comités de thèse m'ont fourni un grand nombre d'idées alors que je n'en avais plus beaucoup en stock. Merci aussi à Véronique Ziegler-Graff, Luc Sofer et Frédéric Revers pour notre collaboration enrichissante dans le projet Viromouv.

Merci aux autres personnes présentes sur le Centre de Colmar. Au personnel des serres pour avoir semé et repiqué une quantité phénoménale de plantes pour mes manips. Merci à Louis pour les élevages de pucerons. Merci aux membres des équipes MSV et GAV qui m'ont prêté toutes sortes d'objets et de produits pendant ces trois ans. Enfin, un grand merci à mes collègues badistes avec qui j'ai appris à être dernière d'un classement et à être contente quand même ! Merci donc à Lauriane, Sophie, Ines, Yohan, Gabriel, David, Lise, Gisèle et Anne.

Je remercie beaucoup toute ma famille. Merci à mes parents qui ont toujours soutenu mes ambitions scientifiques, même quand j'avais six ans et que je ramenais des fourmis dans mes poches de pantalon. Un grand merci à mon grand frère qui est malheureusement parti loin de l'Alsace et à qui je pense souvent.

Merci à mes amis pour toutes les soirées qui m'ont permis de m'évader et d'oublier les soucis du boulot. Merci à Agathe et Carole, toujours là depuis la licence même si on n'arrive pas à se croiser aussi souvent qu'on le souhaiterait. Merci à la petite promotion de master Viro 2008/2010 pour tout ce qu'on a vécu ensemble.

Un GRAND Merci à Alexandre et Bénédicte pour tant de choses que quelques lignes ne sauraient résumer.

Et enfin, le plus important à mes yeux…

Merci à mon Homme, Eric. Pour tout.

SOMMAIRE, INDEX, ABREVIATIONS

SOMMAIRE

Sommaire 1
Index des Figures 4
Index des Tableaux 6
Abréviations 7

Introduction bibliographique 9
1. Concepts généraux sur le cycle viral infectieux 11
1.1 Transmission des phytovirus 11
1.2 Site primaire d'infection 13
i) Etapes de réplication et traduction 13
ii) Mouvement à courte distance 13
a) Complexes viraux de transport 13
b) Les plasmodesmes 13
c) Protéines de mouvement 15
d) Mouvement de cellule à cellule 16
e) Cas particulier des virus à ADN 19
1.3 Mouvement à longue distance 20
i) Le système vasculaire phloémien : l'autoroute des virus 20
a) Structure du phloème 20
b) Callose et protéines P 21
c) Transport de molécules dans le phloème 23
ii) **Revue: Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses.** 26

2. Les *Luteoviridae* 27
2.1 Description des genres viraux, des hôtes et des symptômes 27
2.2 Génomes et protéines des *Luteoviridae* 28
i) Organisation génétique des trois genres 28
ii) Fonctions des protéines des *Luteoviridae* 30
a) P0 : suppresseur de RNA silencing 30
b) P1 et P1-P2 : protéines de réplication 30
c) P3 et P3-P5 : protéines de capside 31
d) P4 : protéine de mouvement 33
e) Protéines putatives 34
2.3 Restriction aux cellules du phloème 35
2.4 Transmission par pucerons 36
2.5 Cycle viral des polérovirus 37

3. Enjeux du travail de thèse 39

Chapitre 1 : Nature du complexe viral impliqué dans le mouvement à longue distance des polerovirus 40
1. Objectifs du chapitre 1 41

2. Les complexes RNP jouent-ils un rôle dans le mouvement des polérovirus ? 42
2.1 Recherche de complexes RNP dans la sève de *C. sativus* infecté par le CABYV 42
2.2 Recherche des partenaires protéiques phloémiens de l'ARN génomique viral 44

i) Recherche des protéines phloémiennes de *C. sativus* capables d'interagir avec l'ARN du CABYV 45
ii) Recherche des protéines phloémiennes d'*A. thaliana* interagissant avec l'ARN du TuYV 49
a) Vérification de la pureté de la sève d'*A. thaliana* récoltée 50
b) Analyse des protéines de sève récoltées 50
c) Northwestern blot 51
2.3 Conclusions et perspectives de l'étude visant à rechercher les complexes RNP des polérovirus 51

3. Analyse du rôle de la protéine de capside et des virions dans le mouvement à longue distance du TuYV 53
3.1 Stratégie expérimentale 53
3.2 Analyse de l'effet des mutations dans la CP sur le transport à longue distance du virus et la formation de virions 55
i) Vérification de la réplication des mutants dans des protoplastes 55
ii) Analyse de la relation entre la formation de particules virales et le transport à longue distance du TuYV 56
iii) Conclusions et perspectives de cette étude 61
3.3 Cas particulier du mutant R7AR8A 62
i) Accumulation du R7AR8A dans différents hôtes 62
ii) Localisation subcellulaire de la CP du R7AR8A 63
iii) Stabilité des particules virales du R7AR8A 64
a) Tests de transmission du virus par puceron 64
b) Stabilité aux variations de pH 66
c) Intégrité des ARN présents dans les virions 67
iv) Conclusions et perspectives de l'étude du mutant R7AR8A 69
3.4 Complémentation du mouvement de mutants du TuYV par la CP_{WT} 71
i) Stratégie expérimentale 71
ii) Présentation des *Arabidopsis* P35S:CP 72
iii) **Article : Formation of virions is strictly required for *Turnip yellows virus* long-distance movement in plant** 74
iv) Résultats complémentaires obtenus avec les plantes P35S:CP 75
a) Inoculation des plantes P35S:CP avec le mutant S79R/G80R 75
b) Effet de la CP_{WT} exprimée dans les plantes transgéniques sur l'accumulation ou la réplication du TuYV 76
v) Conclusions des études portant sur la complémentation du mouvement des mutants du TuYV par l'apport en *trans* de la CP_{WT} 77

Chapitre 2 : Etude de la protéine de mouvement P4 du TuYV 79
1. Introduction générale au chapitre 2 80

2. Etude du rôle de la P4 dans différents hôtes 81

3. Recherche des partenaires protéiques de la protéine P4 chez *Arabidopsis thaliana* 84
3.1 Stratégie expérimentale : le criblage d'une banque d'ADNc par double hybride dans la levure 84
i) Choix de la technique, avantages et inconvénients 84
ii) Principe du criblage d'une banque d'ADNc par double hybride dans la levure 84
iii) Obtention du vecteur appât 86
3.2 Etapes préliminaires au criblage 87
i) Vérification de l'expression dans les levures des protéines 87

ii) Tests préliminaires pour le choix du vecteur appât 87
3.3 Criblage des banques d'ADNc d'*A. thaliana* en Y2H 88
i) Résultats des criblages des banques d'ADNc d'*A. thaliana* 88
ii) Choix des candidats utilisés pour la suite de l'étude 90
3.4 Présentation des candidats CDA1 et RACK1C 91
i) Vérification des interactions avec la P4 en Y2H 91
ii) La protéine RACK1C 92
iii) La protéine CDA1 96
3.5 Vérification de l'interaction *in planta* 97
i) Localisation subcellulaire de CDA1 97
ii) Localisation subcellulaire de RACK1C 99
iii) Localisation de la P4 du TuYV 100
iv) Etude de l'interaction *in planta* 100
3.6 Accumulation du TuYV dans des mutants d'*A. thaliana* affectés dans l'expression des protéines CDA1, RACK1A, et RACK1C 104
i) Présentation et caractérisation des lignées KO 104
ii) Accumulation du TuYV dans les mutants *cda1*, *rack1a* et *rack1c* 105
iii) Obtention de plantes doubles mutantes *rack1c-rack1a* 107
3.7 Accumulation du TuYV dans les plantes sur-exprimant les protéines CDA1 et RACK1C 107
3.8 Spécificité de l'interaction $P4_{TuYV}$/CDA1 ou $P4_{TuYV}$/RACK1C, et tests d'auto-association de différentes P4 108
3.9 Conclusions et perspectives de la recherche des partenaires cellulaires de la P4 109

Conclusions et perspectives générales du travail de thèse 111

Matériel et Méthodes 119
1. Plantes, Virus et Pucerons 120
2. Méthodes spécifiques aux bactéries et aux clonages 121
3. Méthodes spécifiques aux levures et au criblage en double hybride 125
4. Méthodes d'inoculation de plantes ou de protoplastes 128
5. Méthodes spécifiques aux acides nucléiques 130
6. Méthodes spécifiques aux protéines 135
7. Méthodes spécifiques d'analyse des exsudats de sève phloémienne 138
8. Etudes des interactions entre protéines et ARN 141
9. Transformation et caractérisation des lignées mutantes d'*A. thaliana* 141
10. Méthodes diverses 144

Annexes 146

Bibliographie 158

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Cycle infectieux d'un phytovirus transmis par un insecte vecteur. 10
Figure 2 : Diversité des modes de transmission des phytovirus. 12
Figure 3 : Structure des plasmodesmes. 14
Figure 4 : Modification des plasmodesmes par les protéines de mouvement. 17
Figure 5 : Structure du phloème. 22
Figure 6 : Les *Luteoviridae*. 28
Figure 7 : Organisation génétique des *Luteoviridae*. 29
Figure 8 : Représentation schématique des protéines codées par les ORFs 1 et 2. 31
Figure 9 : Protéines codées par les ORF3 et 5 des polérovirus. 33
Figure 10 : Représentation schématique des deux régions de la protéine P4 du TuYV. 34
Figure 11 : Organisation de l'ARNsg2 de différents *Luteoviridae*. 35
Figure 12 : Transport des virions des polérovirus dans les pucerons vecteurs. 37
Figure 13 : Etapes majeures du cycle viral d'un *Polerovirus* dans une plante hôte. 38
Figure 14 : RT-PCR sur les échantillons après passage sur des colonnes de séparation Amicon® 30 kDa. 43
Figure 15 : Multimérisation des protéines phloémiennes AtPP2-A1 et AtPP2-A2. 44
Figure 16 : Exsudation de sève phloémienne de *C. sativus*. 45
Figure 17 : Retard de migration de l'ARN du CABYV après incubation avec des protéines. 46
Figure 18 : Interactions entre l'ARN du CABYV et les protéines de sève de *C. sativus*. 47
Figure 19 : Protéines de la sève d'*A. thaliana* récoltées par exsudation à l'EDTA. 51
Figure 20 : Stratégie expérimentale pour identifier le complexe viral transporté à longue distance. 54
Figure 21 : Représentation des mutants de la CP du TuYV. 55
Figure 22 : Expression des protéines CP et RT par les mutants du TuYV dans les protoplastes de *C. quinoa*. 56
Figure 23 : Estimation de l'accumulation des mutants viraux par test ELISA. 58
Figure 24 : Détection des ARN viraux par RT-PCR. 58
Figure 25 : Test d'encapsidation des ARN viraux par traitement à la RNAse A. 59
Figure 26 : Expression des protéines CP et RT par les mutants de la CP du TuYV dans les feuilles inoculées de *M. perfoliata*. 59
Figure 27 : Spécificité des anticorps utilisés lors des tests ELISA vis-à-vis des virions et des protéines libres de capside. 60
Figure 28 : Observation de particules virales en ISEM. 61
Figure 29 : Comparaison entre les séquences en acides aminés de la CP_{PLRV} et de la CP_{TuYV}. 64
Figure 30 : Localisation subcellulaire des CP_{WT} et CP_{R7AR8A}. 64
Figure 31 : Analyse de la composition protéique des particules virales purifiées du TuYV-WT et du R7AR8A. 65
Figure 32 : Test de transmission par pucerons des virions R7AR8A. 66
Figure 33 : Vérification de la stabilité des virions du TuYV-WT et du mutant R7AR8A à pH 7 et 9. 67
Figure 34 : Ensemble de sondes utilisées en northern blot pour détecter les ARN viraux. 68
Figure 35 : Clivages de l'ARN génomique du R7AR8A. 70
Figure 36 : Schéma hypothétique de clivage de l'ARN génomique du R7AR8A. 71
Figure 37 : Stratégie d'expérimentation pour l'étude de la complémentation du mouvement systémique de mutants du TuYV par apport en *trans* de la CP_{WT}. 72
Figure 38 : Organisation du fragment T-DNA permettant l'expression de la CP du TuYV dans les *Arabidopsis* transformées. 72
Figure 39 : Détection de la CP du TuYV dans les *Arabidopsis* transgéniques P35S:CP. 73
Figure 40 : Accumulation du TuYV-WT dans les feuilles inoculées et non-inoculées d'*A. thaliana*. 74
Figure 41 : Détection par RT-PCR de l'ARN viral du mutant S79R/G80R dans les feuilles non-inoculées. 75
Figure 42 : Accumulation du TuYV-WT et du mutant S79R/G80R dans Col-0 et P35S:CP. 76

Figure 43 : Recherche de la protéine P0 dans les plantes Col-0 et P35S:CP inoculées avec le TuYV-WT. 77
Figure 44 : Expression de la P4 dans les quatre hôtes du TuYV. 83
Figure 45 : Principe général test d'interaction entre deux protéines par le système du double hybride dans la levure (Y2H). 85
Figure 46 : Schématisation des protéines P4 et P4ΔN en fusion avec les domaines GAL4. 86
Figure 47 : Analyse par western blot de l'expression dans la levure des protéines P4 et P4ΔN du TuYV. 87
Figure 48 : Tests préliminaires au criblage effectués avec les vecteurs appâts. 88
Figure 49 : Tests d'auto-activation de la transcription par les 10 candidats. 90
Figure 50 : Présentation schématique des protéines CDA1 et RACK1C. 91
Figure 51 : Test d'interactions entre la P4 ou son domaine C-terminal et les peptides CDA1 et RACK1C. 92
Figure 52 : Caractéristiques générales des protéines RACK1. 94
Figure 53 : Phénotype de développement des mutants d'*Arabidopsis* touchés dans les protéines RACK1. 95
Figure 54 : Structure cristallographique de la protéine CDA d'*E. coli*. 96
Figure 55 : Localisation subcellulaire de la protéine CDA1-eGFP. 98
Figure 56 : Evolution de l'expression de la protéine de fusion CDA1-eGFP au cours du temps. 98
Figure 57 : Localisation subcellulaire de la protéine RACK1C-eGFP. 99
Figure 58 : Expression des protéines eGFP et RACK1C-eGFP. 99
Figure 59 : Expression de la protéine RFP-P4. 100
Figure 60 : Localisation subcellulaire de la RFP-P4. 101
Figure 61 : Expression des protéines eGFP, RACK1C-eGFP, et RFP-P4. 102
Figure 62 : Observation de la localisation subcellulaire de RFP-P4 et RACK1C-eGFP lors d'une co-infiltration. 103
Figure 63 : Présentation schématique de l'insertion du T-DNA dans les lignées SAIL et SALK d'*A. thaliana* affectées dans l'expression des protéines CDA1, RACK1C et RACK1A. 104
Figure 64 : Caractérisation des lignées d'*A. thaliana* mutées dans les gènes *CDA1* et *RACK1A*. 105
Figure 65 : Accumulation du TuYV-WT dans les lignées *cda1*. 106
Figure 66 : Accumulation du TuYV-WT dans les lignées *rack1a* et *rack1c*. 106
Figure 67 : Expression des protéines de fusion RACK1C-HA et CDA1-HA dans les *A. thaliana* transformées. 107
Figure 68 : Tests d'auto-association et d'activation de la transcription des P4 du TuYV, du PLRV, du CABYV et du BYDV. 108
Figure 69 : Tests d'association des P4 du TuYV, du PLRV, du CABYV et du BYDV avec les protéines CDA1 et RACK1C. 109
Figure 70 : Photos des plantes utilisées lors de ce travail de thèse. 120
Figure 71 : Photos du puceron *Myzus persicae*. 121
Figure 72 : Etapes du clonage utilisant la technologie Gateway®. 124
Figure 73 : Préparation des levures Y2H Gold compétentes pour la transformation. 126
Figure 74 : Transformation des levures Y2H Gold compétentes. 127
Figure 75 : Photo illustrant l'agro-infiltration d'une feuille de *N. benthamiana*. 128
Figure 76 : Méthodes d'acquisition et d'inoculation des plantes par pucerons. 129
Figure 77 : Positions des amorces utilisées pour la détection par RT-PCR du TuYV. 133
Figure 78 : Protocole du Test ELISA pour détecter le TuYV dans les broyats de feuilles. 136
Figure 79 : Coloration des gels au bleu de Coomassie. 137
Figure 80 : Coloration des gels à l'argent. 138
Figure 81 : Exsudation de sève phloémienne d'*A. thaliana*. 139
Figure 82 : Protocole de concentration dans les colonnes Centricon (Milipore). 139
Figure 83 : Filtration des échantillons dans les colonnes Amicon. 140
Figure 84 : Sélection sur boites des *A. thaliana* transformées. 142
Figure 85 : PCR permettant la caractérisation des lignées SALK et SAIL. 143

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des virus en fonction de leurs protéines de mouvement. 17
Tableau 2 : Protéines identifiées dans la sève phloémienne de différentes espèces végétales. 25
Tableau 3 : Membres de la famille des Luteoviridae. 27
Tableau 4 : Résultats du séquençage en spectrométrie de masse (LC-MS/MS). 49
Tableau 5 : Cinétique d'infection des trois hôtes par le virus WT et le mutant R7AR8A. 63
Tableau 6 : Quatre gènes rapporteurs de la levure Y2H Gold. 86
Tableau 7 : Résultats des criblages Y2H avec la protéine P4. 90
Tableau 8 : Identité des séquences protéiques entre RACK1. 95
Tableau 9 : Identité des séquences protéiques entre CDA d'espèces différentes. 97
Tableau 10 : Identité des séquences protéiques entre différentes P4. 108

ABREVIATIONS

Abréviations générales

@X : anticorps dirigé contre X
AbA : Auréobasidine A
AcSG : Acétosyringone
A : Adénine
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
Amp : Ampicilline
Antibio^{R} : Résistance à l'antibiotique indiqué
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messager
ARNg : ARN génomique viral
ARNsg : ARN subgénomique
BET : bromure d'éthidium
BSA : *bovine serum albumine*
BS : *bundle sheath*
CC : cellules compagnes
CDA1 : *cytidine deaminase 1*
CP : protéine (majeure) de capside
CP_{WT} : CP du TuYV-WT (CP sauvage)
C-terminal : extrémité COOH d'une protéine
DIG : digoxygénine
DNAse : désoxyribonucléase
dNTPs : désoxyribonucléotides
DTT : dithiothréitol
dpi : *days post inoculation*
EDTA : *ethylene diamine tetraacetic acid*
EGTA : *ethylene glycol tetraacetic acid*
ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*
EMSA : *electrophoretic mobility shift assay*
GAL4-AD : *GAL4 – activation domain*
GAL4-BD : *GAL4 – binding domain*
Genta : Gentamycine
GFP : *green fluorescent protein*
HCl: chlorure d'hydrogène
HC-Pro : *Helper Component-Proteinase*
H : Histidine
IBMP : Institut de Biologie Moléculaire des Plantes
INRA : Institut National de Recherche Agronomique
IRES : *internal ribosome entry site*
ISEM : *Immunosorbent electron microscopy*
Kana : Kanamycine
KH_2PO_4 : dihydrogénophosphate de potassium
KO : *knock-out*
LB : milieu Lysogeny Broth /Luriana-Bertani
L : Leucine
MES : acide morpholino-éthane-sulfonique
miRNA : *micro RNA*
$MgCl_2$: chlorure de magnésium
MOPS : 3 -(N-morpholino) propanesulfonic acid
MP : protéine de mouvement
NaCl : chlorure de sodium
NaOH : hydroxide de sodium
NCAPs : *Non Cell Autonomous Proteins*
NES : Signal d'export nucléaire
NLS : Signal de localisation nucléaire
NoLS : Signal de localisation nucléolaire
NPCs: *Nuclear pore complexes*
NSP : *Nuclear shuttle protein*
N-terminal : extrémité NH2 d'une protéine
ORF : *open reading frame* (cadre de lecture ouvert)
P35S : promoteur 35S
pb : paire de bases
pbin : plasmide binaire
PBS : *phosphate buffered saline*
PCR : *polymerase chain reaction*
PDLP: *Plasmodesmata Located Proteins*
PEG : polyéthylene glycol
PKC : protéine kinase C
Protéines P : protéines phloémiennes
PP1, PP2 : protéines phloémiennes 1 et 2
PPUs : *pore plasmodesmal units*
PV : parenchyme vasculaire
RACK1 : receptor for activated kinase 1C
RE : réticulum endoplasmique
RdRp: ARN polymérase-ARN dépendante
Rif : Rifampicine
RFP : *red fluorescent protein*
RNAses : ribonucléases
RNP : (complexe) ribonucléoprotéique
rNTPs : ribonucléotides
RT : protéine mineure de capside
RT* : RT clivée présente dans les virions
RT (-PCR) : reverse transcription
SD : milieu synthétique défini (levures)
SDS : *sodium dodecyl sulfate*
SDS-PAGE : SDS *polyacrylamide gel electrophoresis*
SEL: *size exclusion limit*
siRNA : *small interfering RNA*
Spectino : Spectinomycine
SSC : tampon saline-sodium citrate
TAE : tampon Tris, Acétate, EDTA
TGBp : *Triple Gene Block protein*
Tm : température de fusion (amorces)
TC : tubes criblés
T-DNA : ADN de transfert (pbin)
TuYV-WT : TuYV *wild-type* (sauvage)

UV : Ultra-violet
VLPs : *Virus-Like Particles*
VPg : *viral protein genome-linked*
VSR : *Viral suppressor of silencing*
WT : *wild-type*
W : Tryptophane
X : X-α-gal (substrat)
Y2H : *Yeast two hybrid* **wpi :** *week post inoculation*

Unités	Espèces végétales, virales, animales et bactériennes
°C : degré Celsius	***A. tumefaciens :*** *Agrobacterium tumefaciens*
Da : dalton	***A. thaliana* :** *Arabidopsis thaliana*
DO : Densité optique	**BMYV:** *Beet mild yellowing virus*
h : heures	**BWYV :** *Beet western yellows virus*
kb : kilobase	**BYDV :** *Barley yellow dwarf virus*
kDa : kilodalton	**CABYV :** *Cucurbit aphid-borne yellows virus*
M : masse molaire (g/mol)	**CaMV :** *Cauliflower mosaic virus*
min : minutes	**CMV :** *Cucumber mosaic virus*
nm : nanomètre	***C. sativus :*** *Cucumis sativus*
pH : potentiel hydrogène	***C. maxima*** : *Cucurbita maxima*
PM : poids moléculaire	***C. quinoa :*** *Chenopodium quinoa*
rpm : rotation par minute	***E. coli* :** *Escherichia coli*
sec : secondes	**GFLV:** *Grapevine fanleaf virus*
U : Unité	**GRV:** *Groundnut rosette virus*
V : Volt	**GRAV :** *Groundnut rosette assistor virus*
Vol : Volume	**HIV-1 :** *Human immunodeficiency virus 1*
µm : micromètre	***M. perfoliata :*** *Montia perfoliata*
	M. persicae : *Myzus persicae*
	N. benthamiana *: Nicotiana benthamiana*
	N. clevelandii *: Nicotiana clevelandii*
	N. tabacum *: Nicotiana tabacum*
	PEMV : *Pea enation mosaic virus*
	PLRV: *Potato leafroll virus*
	PMTV : *Potato mop-top virus*
	PSTVd : *Potato spindle tuber viroïd*
	PVX : *Potato virus X*
	TuYV : *Turnip yellows virus*
	TMV : *Tobacco mosaic virus*
	TYLCV : *Tomato yellow leaf curl virus*

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

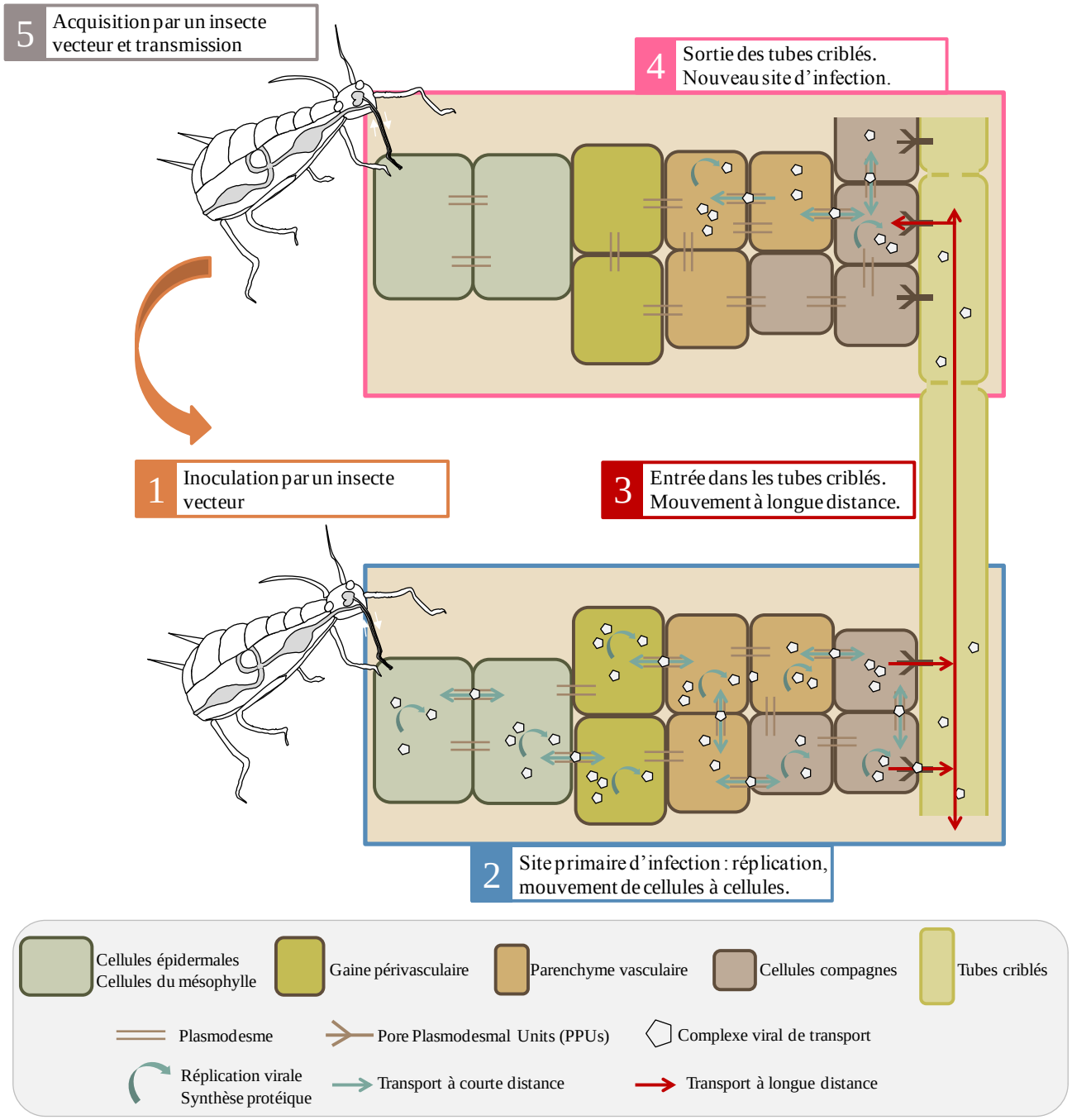


Figure 1 : Cycle infectieux d'un phytovirus transmis par un insecte vecteur. Le cycle viral représenté ici de manière schématique est un cycle « type » décrivant les principales étapes dans le cas d'une infection hôte compatible impliquant l'inoculation du virus par un insecte vecteur. L'insecte virulifère inocule les virions dans une plante saine (1). Dans les cellules inoculées, le virus se réplique et le génome est traduit en protéines virales grâce aux facteurs cellulaires (2). Le virus forme des complexes de transport qui vont être acheminés entre les cellules adjacentes via les plasmodesmes (2). La réplication/traduction du génome se poursuit dans les nouvelles cellules infectées (2). Après avoir traversé les cellules phloémiennes nucléées, le complexe de transport arrive dans les tubes criblés où il est transporté à longue distance vers les parties distales de l'hôte (3). Lorsque le complexe de transport sort des tubes criblés, la réplication du virus permet le démarrage d'un nouveau site d'infection (4). La propagation du virus dans l'ensemble de la plante permet l'acquisition efficace du virus par les pucerons, et la transmission vers des plantes saines (5).

1. Concepts généraux sur le cycle viral infectieux

Etant des parasites intracellulaires obligatoires, les virus de plantes constituent un groupe de phytopathogènes bien particuliers. Ne pouvant pas se multiplier de façon autonome, ils ont évolué pour utiliser toutes les ressources disponibles dans les cellules qu'ils infectent. Leur survie dépend donc entièrement de leurs hôtes pour la synthèse de protéines virales et la réplication de leur génome, mais aussi très souvent de vecteurs pour leur propagation entre plantes. Les étapes du cycle viral infectieux (**Figure 1**), de la réplication à la transmission, impliquent ainsi des interactions spécifiques entre le virus et la plante hôte. Ces interactions sont le fruit d'une longue coévolution ayant amené chaque partenaire à développer des stratégies de défense et contre-défense, en suivant le modèle en zigzag amplement décrit pour les interactions plantes/microbes (Jones & Dangl, 2006). Les symptômes développés par les plantes infectées résultent d'un déséquilibre de ces interactions virus/hôte. La compétition pour les ressources présentes dans l'hôte amène à des dérèglements physiologiques causés par le virus qui induit ou réprime l'expression de gènes impliqués dans plusieurs processus cellulaires (régulation hormonale, division cellulaire, transport de molécules, etc.) (Pallas & García, 2011).

Je vous propose dans cette première partie de l'introduction bibliographique de suivre les phytovirus dans les différentes étapes de leur cycle infectieux présentées en **Figure 1**, en se focalisant tout particulièrement sur les étapes de mouvement dans la plante.

1.1 Transmission des phytovirus

La transmission du virus d'une plante infectée à une plante saine est une étape cruciale pour la survie de l'espèce virale, car elle permet sa dispersion géographique. En effet, un virus qui ne peut pas s'échapper de la plante qu'il a infectée disparait avec la mort de son hôte. Plusieurs stratégies de transmission existent; le mode de transmission utilisé dépend à la fois de l'espèce virale mais aussi de l'hôte infecté ou à infecter.

La transmission « verticale » d'une plante mère infectée à une plante fille s'effectue par la présence du virus dans le pollen ou les graines, ou lors de la multiplication végétative (**Figure 2**). Le virus est soit sous la forme de particules virales, soit sous une forme intégrative comme dans le cas des pararétrovirus endogènes (EPRV) de la famille des *Caulimoviridae* (Iskra-Caruana *et al.*, 2003, 2010).

La transmission « horizontale » d'une plante source infectée à une plante saine peut s'effectuer soit par voie mécanique (inoculation par contact au travers de blessures), soit par le biais de vecteurs (**Figure 2**). Les vecteurs sont des organismes vivants d'origine variée: arthropodes (thrips, cicadelles, pucerons, aleurodes, cochenilles…), nématodes, et autres pathogènes végétaux (plasmodiophorales et champignons). Les insectes, en particulier les pucerons, sont les vecteurs de phytovirus les plus communs. Le fait que les pucerons soient de très bons vecteurs provient en partie du fait que ce sont des insectes polyphages pouvant se nourrir sur un grand nombre d'espèces végétales, favorisant ainsi la dissémination des virus infectant plusieurs hôtes (Brault *et al.*, 2010; Ng & Perry, 2004). De plus, le comportement alimentaire des pucerons, avec des phases de piqures d'épreuve dans les tissus non vasculaires et des phases d'alimentation dans la sève, permet l'acquisition et l'inoculation de virus présents dans les différents tissus végétaux (Louis *et al.*, 2012; Ng & Perry, 2004). Le mécanisme de transmission par les insectes nécessite une interaction spécifique entre des protéines virales et des récepteurs dans l'insecte, indiquant ainsi une forte coévolution entre le pathogène et son vecteur. Il existe deux types de transmission par

les insectes et qui ont été principalement étudiés chez le puceron: la transmission circulante et non-circulante (Brault *et al.*, 2010; Ng & Perry, 2004).

- **La transmission non-circulante** est la plus communément utilisée par les phytovirus. Les virions, acquis par le puceron lors des piqûres d'épreuve, restent attachés à l'intérieur du stylet au niveau de récepteurs spécifiques. Cette rétention, avant l'inoculation dans de nouvelles cellules hôtes, peut durer quelques minutes (transmission non persistante) ou plusieurs heures (transmission semi-persistante) (Brault *et al.*, 2010; Ng & Perry, 2004). L'interaction entre les virions et les récepteurs peut se faire de manière directe (exemple du *Cucumber mosaic virus*, CMV (Chen & Francki, 1990)), ou par l'intermédiaire de protéines virales (exemples de la protéine *Helper Component-Proteinase* « HC-Pro » des *Potyvirus*, (Flasinski & Cassidy, 1998), et des protéines P2 et P3 du *Cauliflower mosaic virus*, CaMV, (Plisson *et al.*, 2005)).

  La transmission circulante nécessite le transport des virions dans l'insecte, depuis le stylet vers les glandes salivaires, ce qui implique un franchissement de différentes barrières cellulaires (Brault *et al.*, 2010; Ng & Perry, 2004). Les virus sont acquis au cours des longues phases d'alimentation dans les tubes criblés. La rétention des virus dans l'insecte peut durer toute la vie de ce dernier (Brault *et al.*, 2010). Les virus transmis par ce mode sont généralement restreints aux cellules phloémiennes de l'hôte : *Luteoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Geminiviridae*… Par ailleurs, les *Rhabdoviridae*, transmis de manière circulante par pucerons, ont la particularité de se multiplier dans les cellules de l'insecte (Sylvester, 1980). La transmission circulante étant utilisée par les *Luteoviridae*, elle est décrite plus amplement ci-après dans la section consacrée à ces virus.

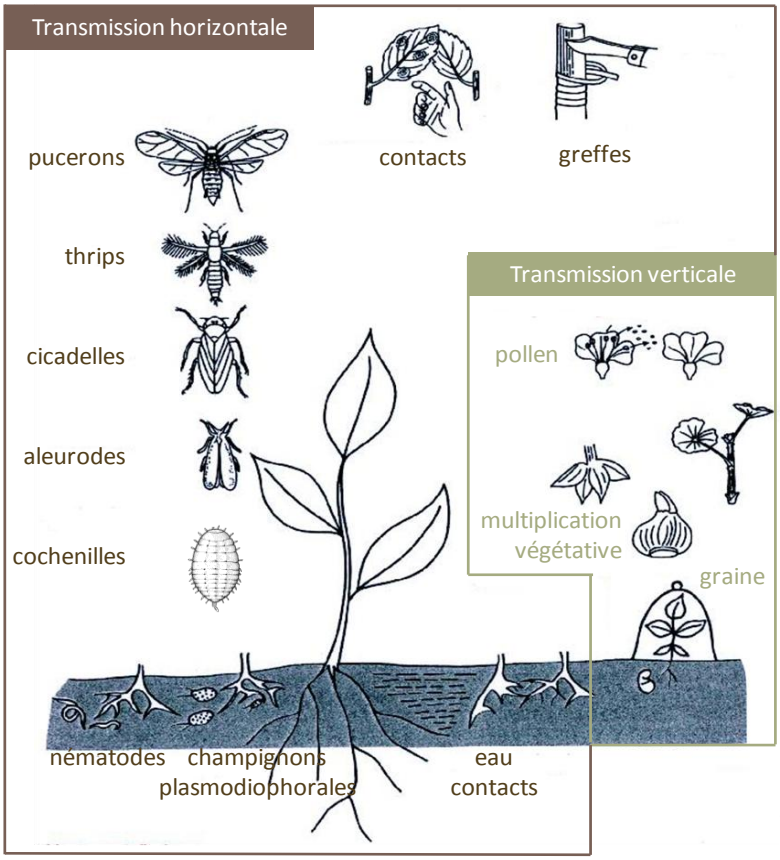


Figure 2 : Diversité des modes de transmission des phytovirus. La transmission de virus de plante à plante peut se faire par la voie horizontale (vecteurs aériens et telluriques, contacts, pratiques culturales…) ou par la voie verticale (pollen, graine, multiplication végétative) (adapté de Iskra-Caruana et al., 2003).

1.2 Site primaire d'infection

i) Etapes de réplication et traduction

L'étape suivant directement l'inoculation dans les premières cellules est la libération du génome viral par décapsidation des virions. Le génome est ensuite traduit et répliqué grâce aux facteurs cellulaires.

La majorité des virus infectant les plantes sont des virus dont le génome est constitué d'un ARN de polarité positive (ARN+), mais il existe aussi des virus dont l'ARN génomique est de polarité négative (ARN-) ou ambisens, ainsi que des génomes à ARN double brin (ARNdb) ou à ADN (liste complète sur http://viralzone.expasy.org).
De manière générale, les génomes constitués d'une molécule d'ARN+ sont immédiatement traduits par les enzymes cellulaires, permettant ainsi la synthèse rapide de réplicases virale de type ARN polymérase-ARN dépendante (RdRp) ; tandis que les génomes à ARN- ou ARNdb doivent d'abord être transcrits en ARNm par la RdRp qui est systématiquement présente dans les virions. Dans le cas des virus à ADN, le génome viral, envoyé au noyau, utilise la machinerie de l'hôte pour sa transcription en ARNm puis sa traduction en protéines.
Dès les premiers stades de l'infection, le génome est associé aux membranes cellulaires (réticulum endoplasmique, mitochondries, peroxysomes, membrane nucléaire, ...) où se forment des complexes réplicatifs (Laliberté & Sanfaçon, 2010; Netherton *et al.*, 2007). Ces sites dédiés à la réplication, et parfois à la traduction, proviennent de réarrangements cellulaires et sont visibles dans la cellule sous forme d'inclusions encore appelées « usines à virions ». L'ensemble des composants viraux et cellulaires nécessaire à la multiplication du génome viral est adressé vers ces sites de réplication (Laliberté & Sanfaçon, 2010; Netherton *et al.*, 2007). Les ARN viraux ainsi répliqués servent de nouvelles matrices à la traduction des protéines virales.

ii) Mouvement à courte distance

a) Complexes viraux de transport

La réplication et la traduction permettent d'obtenir de grandes quantités de protéines virales qui peuvent, entre autres, s'associer aux génomes viraux pour former des complexes macromoléculaires de transport de deux types :

- **Les particules virales** : l'interaction entre le génome et les protéines de capside permet la formation de virions. Le nombre de protéines de capside, de même que la présence d'autres protéines virales (RdRp et autres protéines non structurales), varient d'une espèce virale à l'autre. La forme des virions est variée, mais généralement les capsides virales sont icosaédriques ou hélicoïdales.
- **Les complexes ribonucléoprotéiques (RNP)** : le génome viral est associé à un ensemble de protéines d'origine virale et/ou cellulaire. Les interactions ARN/protéines ne forment pas des virions à proprement parler, mais les complexes RNP ont tout de même une structure bien définie.

b) Les plasmodesmes

Les plasmodesmes sont des structures cellulaires essentielles à la communication entre cellules végétales. Visuellement, un plasmodesme est un canal simple ou branché reliant deux cellules adjacentes (**Figure 3 A**). Les constituants majeurs des plasmodesmes sont les membranes : la membrane plasmique forme l'extérieur du plasmodesme, tandis que la

membrane intérieure est constituée de réticulum endoplasmique (RE) compressé et appelé desmotubule (**Figure 3 B)** (Benitez-Alfonso *et al.*, 2010; Burch-smith & Zambryski, 2012). L'espace laissé libre entre les deux membranes est une continuité de cytosol entre les deux cellules, et constitue le canal majeur de transport intercellulaire de molécules. Chez *N. tabacum*, la largeur moyenne des plasmodesmes du mésophylle est de 30 nm avec un canal cytosolique d'environ 10 nm de largeur (Ding *et al.*, 1992b). Cet espace n'est cependant pas vide, car de nombreuses protéines connectent les deux membranes entre elles et réduisent ainsi l'espace disponible pour le transport de molécules (Benitez-Alfonso *et al.*, 2010; Burch-smith & Zambryski, 2012) (**Figure 3 B)**. Le canal central est ainsi divisé en micro-canaux d'environ 2.5 nm de largeur (Ding *et al.*, 1992b).
Les plasmodesmes sont cependant des structures dynamiques. Des modifications dans la composition, ou la structure des protéines associées aux plasmodesmes, permettent d'agrandir ou de réduire la largeur du canal interne du plasmodesme. La taille limite d'exclusion (*size exclusion limit*, SEL) définit ainsi la taille maximale de protéines de type globulaire pouvant passer au travers des plasmodesmes.

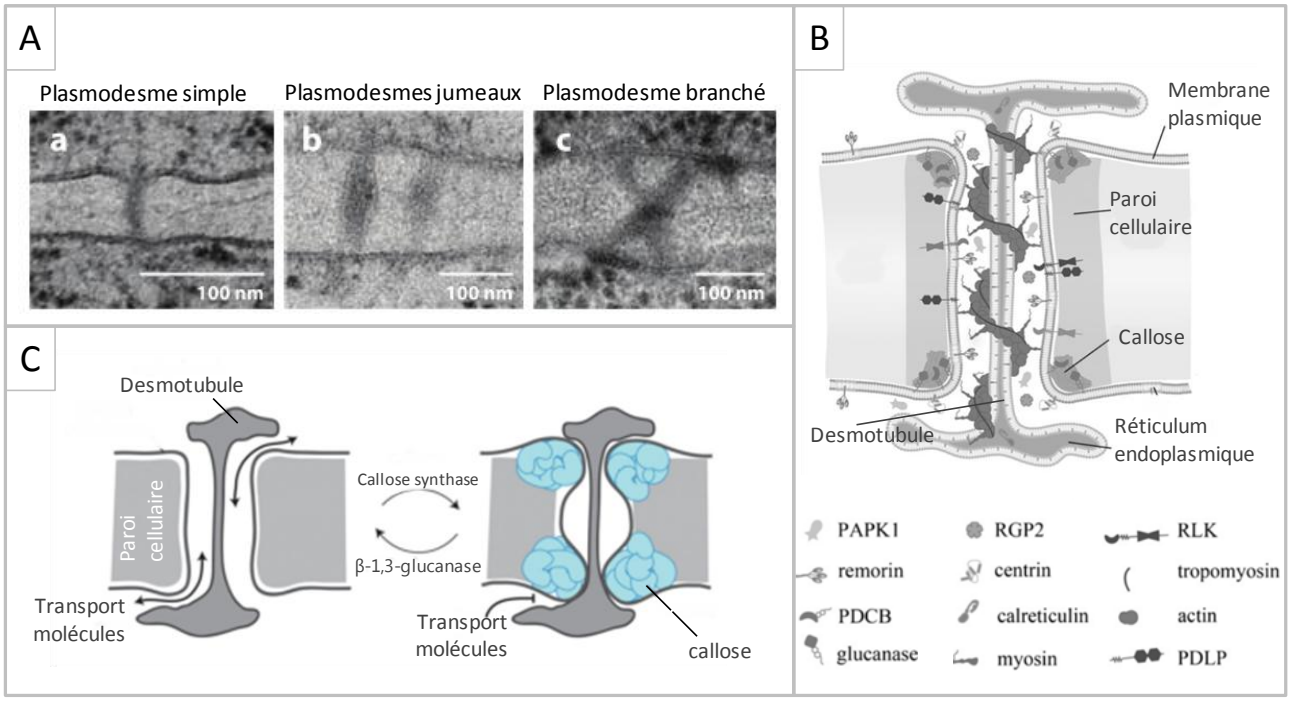


Figure 3 : Structure des plasmodesmes. **A)** Visualisation par microscopie électronique des plasmodesmes d'*A. thaliana* : simples canaux droits (a) parfois séparés de moins de 100 nm (b), ou plasmodesmes branchés adoptant des structures en X (c) ou Y. (Burch-smith & Zambryski, 2012) **B)** Modèle de la structure d'un plasmodesme incorporant les protéines connues pour y être localisées (d'après Faulkner and Maule, 2010) **C)** L'espace entre le desmotubule et la membrane plasmique peut être modulé par la callose synthase et la β-1,3-glucanase qui modifient la quantité de callose déposée autour des plasmodesmes (d'après Maule et al., 2012).

Plusieurs mécanismes de modification du SEL existent dans la plante :

- **La contraction ou le relâchement des filaments d'actine** présents sur toute la longueur du plasmodesme**.** Ces filaments sont organisés en hélices entourant le desmotubule, et la myosine associée à l'actine permet de relier la membrane plasmique et le RE (Benitez-Alfonso *et al.*, 2010; Burch-smith & Zambryski, 2012) (**Figure 3 B)**. Des agents perturbant l'actine permettent ainsi d'augmenter le mouvement de macromolécules au travers des plasmodesmes, alors que des agents bloquant l'actine inhibent ce type de transport (Ding *et al.*, 1996).

- **La modification du dépôt de callose**. La callose est un polysaccharide de type β-glucane qui peut être déposé dans la paroi cellulaire entourant les plasmodesmes suite à un stress biotique ou abiotique. L'ajout de callose par la callose synthase diminue le SEL du plasmodesme, alors que la dégradation de callose par la β-1,3-glucanase associée aux plasmodesmes permet de l'augmenter (Levy *et al.*, 2007; Maule *et al.*, 2012) (**Figure 3 C)**.
- **D'autres mécanismes encore peu étudiés** font intervenir des protéines associées aux plasmodesmes (Burch-smith & Zambryski, 2012).

c) Protéines de mouvement

Le nombre et la fonction des protéines virales nécessaires au transport dépendent de l'espèce virale considérée, voire parfois de l'hôte végétal. Néanmoins, les phytovirus ont comme particularité de posséder une protéine, ou plusieurs, dont la fonction principale est dédiée au mouvement, et qui est ainsi appelée protéine de mouvement (MP) (Lucas, 2006).
La première MP décrite est la protéine 30K du *Tobacco mosaic virus* (TMV, *Tobamovirus*). Des études ont montré que des mutants thermosensibles de la 30K étaient incapables de mouvement intercellulaire à une température restrictive (32°C) alors qu'ils étaient susceptibles de se déplacer de cellule à cellule à une température permissive (22°C) (Jockusch, 1968; Leonard & Zaitlin, 1982). L'apport en *trans* de la MP restaurait le mouvement de ces mutants (Deom *et al.*, 1987; Meshi *et al.*, 1987). La protéine non structurale 30K est nécessaire et suffisante pour assurer le mouvement local des ARN viraux du TMV.
Les études réalisées depuis lors sur la 30K et d'autres MP ont permis de définir les caractéristiques communes liées à la fonction des MP, malgré l'absence d'une similarité de séquences entre les MP des différents genres viraux et malgré la diversité de leurs mécanismes d'action. Ces propriétés sont détaillées ci-dessous en prenant la 30K comme exemple.

- **Interaction avec l'ARN ou l'ADN viral.** La protéine 30K du TMV est capable de se fixer aux acides nucléiques (ARN ou ADN) simples brins de manière séquence non-spécifique grâce à deux domaines protéiques identifiés (Citovsky *et al.*, 1990, 1992). L'interaction entre l'ARN viral et la 30K conduit à la formation de complexes RNP de forme allongée dont le diamètre de 2 à 3 nm permet leur passage au travers des plasmodesmes dilatés au préalable par la 30K (Citovsky *et al.*, 1992; Kiselyova *et al.*, 2001).
- **Interaction avec les plasmodesmes : localisation subcellulaire, augmentation du SEL et transport intercellulaire.** Pour permettre le transport de complexes viraux au travers des plasmodesmes, les protéines de mouvement doivent être capables d'en augmenter le SEL. La protéine 30K possède un domaine de localisation aux plasmodesmes (Atkins *et al.*, 1991; Ding *et al.*, 1992a; Tomenius *et al.*, 1987). L'interaction entre la 30K et les plasmodesmes augmente le SEL (Wolf *et al.*, 1989). Les plasmodesmes non dilatés acceptent la diffusion passive de molécules jusqu'à 1 kDa, alors que les plasmodesmes dilatés par la 30K permettent le transport actif de molécules allant de 10 à 20 kDa, ce qui correspond à un diamètre des micro-canaux d'environ 4 nm (Taliansky & Torrance, 2008).
- **Fonctions contrôlées par la phosphorylation.** La 30K existe sous une forme active et inactive, en fonction de la position de la cellule infectée dans le front d'infection. La forme active, présente dans les cellules en bordure du site d'infection, est localisée au niveau des plasmodesmes et en augmente le SEL. La forme inactive, retrouvée au centre du site d'infection, ne permet plus l'augmentation du SEL mais garde sa localisation au

niveau des plasmodesmes (Oparka *et al.*, 1997). Il a depuis été prouvé que le passage entre les formes active et inactive de la protéine dépend de la phosphorylation de la 30K par une kinase cellulaire associée aux plasmodesmes (PAPK) (Haley *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2005a).

- **Homodimérisation.** La 30K est capable de s'auto-associer via son domaine C-terminal (Brill *et al.*, 2004).

d) Mouvement de cellule à cellule

La première phase de mouvement des complexes viraux, pour assurer le transport du virus, se déroule à l'intérieur des cellules. Il s'agit de l'acheminement intracellulaire depuis les sites de réplication jusqu'aux plasmodesmes. En effet, les complexes de transport ne peuvent pas simplement diffuser librement dans la cellule, mais ont besoin de se diriger spécifiquement vers la porte de sortie des cellules que sont les plasmodesmes. Le mode de transport intracellulaire dépend de chaque espèce virale (Schoelz *et al.*, 2011). Ensuite, les plasmodesmes étant dilatés grâce à l'action des protéines de mouvement, le complexe de transport peut passer dans la cellule adjacente. Le mouvement de cellule à cellule, aussi appelé mouvement à courte distance, permet au virus d'étendre localement son site d'infection. Ce type de mouvement nécessite très souvent l'action du cytosquelette (microtubules, filaments d'actine), ainsi que les membranes cellulaires (Harries *et al.*, 2010). On distingue deux grandes stratégies de mouvement intercellulaire employées par les phytovirus:

- **Le mouvement tubule-indépendant** (*Tobamovirus*, *Hordeivirus*, *Polerovirus*, *Benyvirus*, etc.) implique une augmentation du SEL par les protéines MP (**Figure 4 A**) qui utilisent un des mécanismes endogènes de modification des plasmodesmes cités précédemment, et permettant le transport de macromolécules. Par exemple, les MP du CMV et du TMV sont capables de couper les filaments d'actine (Su *et al.*, 2010). D'autres MP, comme la protéine TGBp2 du *Potato virus X* (PVX, *Potexvirus*), sont capables de recruter directement ou indirectement la β-1,3-glucanase au niveau des plasmodesmes pour induire la dégradation de callose et ainsi augmenter le SEL (Fridborg *et al.*, 2003).
- **Le mouvement tubule-dépendant** (*Comovirus*, *Nepovirus*, *Caulimovirus*, *Bromovirus*, etc.) implique une modification structurale importante des plasmodesmes par insertion d'un tubule formé par les MP (**Figure 4 B**). Le desmotubule est absent et la largeur du plasmodesme est augmentée, permettant le passage de virions au travers du tubule. Il semblerait que le transport des virions au travers des tubules nécessite une interaction entre la MP et la protéine de capside (CP), ainsi qu'un processus dynamique avec assemblage des monomères de MP du côté de la cellule infectée et désassemblage du côté de la cellule adjacente (un peu comme la polymérisation/dépolymérisation des microtubules) (Niehl & Heinlein, 2010). Etant donné que les tubules peuvent aussi se former dans les protoplastes, le processus de formation des tubules ne nécessite donc pas la présence d'une paroi cellulaire, mais plutôt de protéines associées aux plasmodesmes qui serviraient de récepteurs à la MP pour débuter le processus (Niehl & Heinlein, 2010).

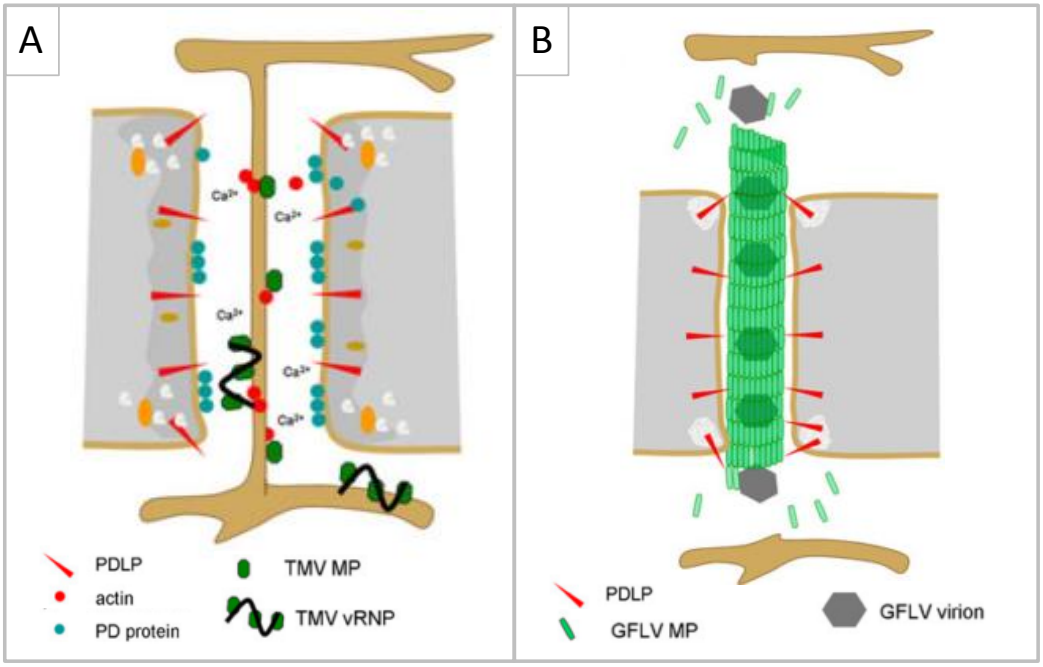


Figure 4 : Modification des plasmodesmes par les protéines de mouvement. **(A) Stratégie tubule-indépendant.** La largeur du canal interne du plasmodesme est augmentée grâce à l'action de la MP virale qui agit sur les mécanismes cellulaires permettant le passage des molécules endogènes (dégradation de callose, modification de l'actine, etc.). **(B) Stratégie tubule-dépendant.** La formation d'un tubule par la MP permet le passage des virions vers la cellule voisine. Le tubule remplace les structures présentes dans le plasmodesme comme le desmotubule (d'après Niehl and Heinlein, 2010).

En fonction du nombre de protéines virales requises pour le mouvement de cellule à cellule, les virus peuvent être classés en trois groupes présentés dans le **Tableau 1** ci-dessous :

Groupes	Genres viraux (génome)	MP	Autres protéines
I	*Tobamovirus* (ARN sb) *Dianthovirus* (ARN sb multipartite) *Umbravirus* (ARN sb)	Type 30K	-
II	*Bromovirus* (ARN sb multipartite) *Cucumovirus* (ARN sb multipartite)	Type 30K	CP
	Begomovirus (ADN sb)	Type 30K	NSP
III	*Potyvirus* (ARN sb)	HC-Pro CP	CI
	Hordei-like viruses (ARN sb multipartite)	TGB1	TGB2 TGB3
	Potex-like viruses (ARN sb)	TGB1	TGB2 TGB3 CP

Tableau 1 : Classification des virus en fonction du nombre de protéines dédiées au mouvement de cellule à cellule.

Le **groupe I** est représenté par les genres *Tobamovirus*, *Dianthovirus* et *Umbravirus*. Une unique protéine MP de type 30K permet le mouvement intercellulaire des ARN viraux sous formes de complexes RNP. La présence de la protéine de capside n'est pas nécessaire.

> Le mouvement du TMV est un exemple de transport tubule-indépendant de complexes RNP impliquant uniquement la protéine virale 30K (**Figure 4 A**). La formation des complexes RNP entre la MP et l'ARN viral se déroule au niveau du réticulum endoplasmique, lieu de la réplication virale. La MP possède deux domaines transmembranaires hydrophobiques nécessaires à sa localisation au niveau du RE (Fujiki *et al.*, 2006). Les complexes RNP diffusent ensuite le long de la membrane du RE jusqu'aux plasmodesmes, ce mouvement pouvant être favorisé par le cytosquelette, bien que le rôle des filaments dans le mouvement du TMV reste encore à élucider. La MP est capable de sectionner les filaments d'actine (Su *et al.*, 2010), et l'infection du TMV induit également la diminution des dépôts de callose au niveau des plasmodesmes conduisant à l'augmentation du SEL. Bien que ce mécanisme ne soit pas encore totalement élucidé, il nécessite l'interaction entre la MP et une protéine *ankyrin repeat-containing* (ANK) (Ueki *et al.*, 2010). Les complexes RNP peuvent alors passer dans la cellule adjacente (mouvement expliqué en détail dans Liu and Nelson, 2013)

> Le mouvement intercellulaire du *Groundnut rosette virus* (GRV, *Umbravirus*) est un autre exemple de transport tubule-indépendant de complexes RNP impliquant une seule protéine MP, ici la protéine codée par l'ORF3 (P3). Les complexes RNP, qui s'accumulent au niveau d'inclusions cytoplasmiques, sont formés par interaction entre l'ARN viral et la P3 (Taliansky *et al.*, 2003). Une protéine nucléaire, la fibrillarine, est cependant essentielle à la formation et au mouvement de ces complexes RNP. La P3 est capable de recruter la fibrillarine dans le noyau et de la relocaliser dans les inclusions cytoplasmiques où elle est intégrée aux complexes RNP (Kim *et al.*, 2007a, b; Ryabov *et al.*, 2004). La reconstitution *in vitro* des complexes RNP infectieux ARN/P3/fibrillarine ont permis de démontrer qu'aucun autre facteur n'est nécessaire au mouvement du GRV (Canetta *et al.*, 2008).

Les virus du **groupe II** ont besoin non seulement d'une protéine de type 30K, mais aussi d'une protéine supplémentaire. Un très grand nombre de genres viraux appartiennent à ce groupe II. Entre autres, les *Bromovirus* et *Cucumovirus* ont besoin de la protéine structurale CP en plus de la 30K. La présence de la CP est parfois directement liée à la formation des complexes RNP ou des virions, mais permet aussi souvent de contrecarrer des défenses de l'hôte. Les *Begomovirus* bipartites utilisent à la fois une protéine de type 30K et une *Nuclear shuttle protein* (NSP) permettant le transport de l'ADN au travers les pores nucléaires. Leur mouvement intercellulaire (décrit ci-après) sous forme de complexes RNP ne nécessite cependant pas la protéine CP.

> Le mouvement du *Grapevine fanleaf virus* (GFLV, *Nepovirus*) est un exemple de transport tubule-dépendant de virions impliquant à la fois les protéines MP et CP (**Figure 4 B**). La MP diffuse librement dans le cytoplasme où elle est transportée de manière active grâce aux microtubules pour rejoindre les plasmodesmes (Amari *et al.*, 2011). Elle interagit avec les protéines *Plasmodesmata Located Proteins* (PDLPs) situées à la base des plasmodesmes. Les protéines PDLPs sont délivrées aux plasmodesmes par l'intermédiaire du système de sécrétion (vésicules de l'appareil de Golgi) (Amari *et al.*, 2011). Les virions assemblés au niveau du complexe de réplication sont envoyés vers les plasmodesmes par un mécanisme encore inconnu, puis l'interaction MP/CP permet le passage au travers des tubules, probablement par un mécanisme d'assemblage/désassemblage des MP (Niehl & Heinlein, 2010).

Les virus du **groupe III** ont besoin d'au moins trois protéines pour leur mouvement.

> Les *Potyvirus* forment une exception chez les phytovirus puisqu'ils ne possèdent pas une protéine dédiée spécifiquement au mouvement. La MP est remplacée par deux protéines multifonctionnelles, HC-Pro et CP. La CP possède notamment un rôle dans le transport du génome viral (Dolja *et al.*, 1994, 1995) et la protéine HC-Pro est importante pour l'infection systémique (Cronin *et al.*, 1995; Rojas *et al.*, 1997). Ces deux protéines sont capables d'augmenter le SEL des plasmodesmes, et agissent conjointement pour le transport local des *Potyvirus*. De plus, la protéine CI, qui est aussi présente au niveau des plasmodesmes en début d'infection, possède un rôle dans le processus de transport au travers des plasmodesmes (Carrington *et al.*, 1998; Gómez de Cedrón *et al.*, 2006; Roberts *et al.*, 1998; Wei *et al.*, 2010).

Les virus *potex-like* (*Alphaflexiviridae* et *Betaflexiviridae*) et *hordei-like* (*Virgaviridae* et *Benyvirus*) possèdent non pas une, mais trois protéines de mouvement appelées *Triple Gene Block proteins* (TGBp). Ces trois protéines non structurales agissent conjointement pour permettre le transport du complexe viral vers et au travers des plasmodesmes (Verchot-Lubicz *et al.*, 2010). Dans le cas des virus *potex-like*, la protéine CP est aussi nécessaire puisque ce sont les virions (ou potentiellement des complexes RNP impliquant la CP) qui sont transportés de cellule à cellule. Les trois TGBp interagissent entre elles et peuvent se lier au génome viral. Il a été proposé que la TGBp1 interagisse avec les virions ou l'ARN viral pour assurer son transport vers et au travers des plasmodesmes (Verchot-Lubicz *et al.*, 2010). La modification des plasmodesmes implique l'action d'une ou de plusieurs TGBp, selon le genre viral considéré (Verchot-Lubicz *et al.*, 2010). Par exemple, la TGBp2 du PVX est capable d'activer indirectement la β-1,3-glucanase pour augmenter le SEL (Fridborg *et al.*, 2003).

e) Cas particulier des virus à ADN

Dans le cas des virus à ADN *Caulimoviridae* et *Geminiviridae*, la réplication se déroulant dans le noyau, des phases d'import et d'export nucléaires précèdent les phases de transports intra- et inter-cellulaires.

Les échanges entre le noyau et le cytoplasme s'effectuent au travers de canaux situés sur l'enveloppe nucléaire, les *Nuclear pore complexes* (NPCs). Ces canaux permettent la diffusion passive de molécules allant jusqu'à 30 kDa, ainsi que le passage actif de plus grosses molécules (Görlich & Krutay, 1999; Krichevsky *et al.*, 2006). L'import actif de molécules dans le noyau nécessite deux récepteurs, les importines α et β. Les dimères α/β reconnaissent des protéines possédant un signal de localisation nucléaire (NLS), et permettent ainsi leur passage au travers des NPCs. L'import nucléaire implique aussi une protéine GTPase, Ran-GDP, qui permet le décrochage de la protéine « cargo » par sa conversion en Ran-GTP une fois dans le noyau (Görlich & Krutay, 1999; Krichevsky *et al.*, 2006). De manière similaire, l'export actif de molécules nécessite un signal d'export nucléaire (NES), ainsi que des protéines récepteurs permettant le transport actif depuis le noyau vers le cytosol, comme par exemple la protéine CMR1 associée à Ran-GTP (Görlich & Krutay, 1999; Krichevsky *et al.*, 2006). Des mécanismes d'import et d'export non conventionnels existent aussi en absence de signaux NLS/NES, ou font intervenir des protéines récepteurs autres que celles citées précédemment (Görlich & Krutay, 1999).

Certaines protéines des *Caulimoviridae* et *Geminiviridae* possèdent des signaux NLS et NES permettant l'import de l'ADN génomique viral dans le noyau (Krichevsky *et al.*, 2006).

Chez les *Begomovirus* bipartites, le gène *BR1* situé sur l'ADN-B code pour une *Nuclear shuttle protein* (NSP), et le gène *BL1* code pour une protéine de mouvement (MBP). Les protéines NSP et MBP du *Squash leaf curl virus* (SLCV) et du *Bean dwarf mosaic virus* (BDMV) sont capables de fixer l'ADN génomique simple brin (ADNsb) du virus, ainsi que les formes réplicatives d'ADN double brin (ADNdb) (Pascal *et al.*, 1994; Rojas *et al.*, 1998). La protéine NSP du SLCV est importée dans le noyau grâce à ses deux NLS, et son association avec la protéine de mouvement MBP permet son export vers le cytoplasme (Krichevsky *et al.*, 2006; Lazarowitz & Beachy, 1999; Sanderfoot & Lazarowitz, 1995; Sanderfoot *et al.*, 1996). Le modèle accepté actuellement pour le SLCV est composé des étapes suivantes : décapsidation du virus dans le cytoplasme ; transport de l'ADNsb vers le noyau grâce à NSP ; réplication dans le noyau ; export des ARNm viraux de manière identique aux ARNm endogènes et traduction protéique ; export nucléaire de l'ADNsb viral par association NSP-MBP ; transport intracellulaire de l'ADNsb vers les plasmodesmes grâce aux fonctions de la protéine MBP (Krichevsky *et al.*, 2006).

Chez les *Geminiviridae* monopartites, aucune protéine NSP ou MBP n'est présente dans le génome. Des études effectuées sur le *Maize streak virus* (MSV, *Mastrevirus*) et le *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV, *Begomovirus*) ont permis de comprendre les mécanismes d'import/export empruntés par ces virus (Krichevsky *et al.*, 2006). Les protéines MP et CP du MSV sont nécessaires et suffisantes pour permettre l'import nucléaire de l'ADNsb viral. La protéine CP est capable d'importer dans le noyau les ADNsb grâce à la séquence NLS située dans un domaine N-terminal (Liu *et al.*,

1997, 1999). La protéine MP du MSV, à l'instar des autres protéines de mouvement, est associée aux plasmodesmes, et permet un transport intercellulaire du complexe CP-ADNsb par interaction avec la CP (Liu *et al.*, 2001). Dans le cas du TYLCV, les fonctions d'import et d'export du noyau dépendent uniquement de la protéine CP qui possède un NLS, un NES, et un domaine de liaison à l'ADNsb (Krichevsky *et al.*, 2006; Rojas *et al.*, 2001).

Chez les *Caulimoviridae*, des pararétrovirus à ADNdb, le génome viral est importé dans le noyau en début d'infection de la cellule où il forme alors des mini-chromosomes à partir desquels il y a traduction en ARNm (Olszewski *et al.*, 1982). Une fois dans le cytoplasme, l'ARN est traduit, mais est aussi retro-transcrit en ADNdb qui retourne vers le noyau. Une partie de l'ADNdb présent dans le noyau est encapsidé pour assurer la transmission du virus par puceron et le mouvement de cellule à cellule (Hull and Covey, 1985). La protéine CP du CaMV possède un domaine NLS en N-terminal et un domaine C-terminal de liaison à l'ADN, permettant ainsi l'import nucléaire du génome viral (Krichevsky *et al.*, 2006).

1.3 Mouvement à longue distance

Afin d'infecter la plante hôte de manière systémique, les phytovirus ne se contentent pas d'un mouvement de cellule à cellule. Les virus ont appris à emprunter une « autoroute » existante, à savoir le transport vasculaire dans le phloème. Ce mouvement à longue-distance, encore appelé mouvement systémique, est largement évoqué dans la revue que nous avons récemment publié et qui est intégrée à ce manuscrit de thèse (Hipper *et al.*, 2013).
Il est toutefois nécessaire de bien connaître la structure du tissu phloémien pour mieux appréhender le mouvement à longue distance des phytovirus, ainsi que le cycle viral des polérovirus qui sont restreints au phloème.

i) Le système vasculaire phloémien : l'autoroute des virus

Le rôle du phloème dans le transport de nutriments essentiels au développement de la plante est connu depuis la fin du 19ème siècle, mais ce sont les études d'Ernst Münch dans les années 1930 qui ont permis une première compréhension du mécanisme de transport des photoassimilats. Les études réalisées dans les décennies suivantes, sur la structure et les fonctions du tissu phloémien, ont fait l'objet ces dernières années de nombreuses revues et chapitres de livres parmi lesquels : Thompson and Schulz, 1999; Oparka and Turgeon, 1999; Lalonde, 2001; Dinant et al., 2003; Lough and Lucas, 2006; Kehr and Buhtz, 2007; Dinant, 2008; Schulz and Thompson, 2009; Turgeon and Wolf, 2009; Atkins et al., 2010; Dinant and Lemoine, 2010; Thompson and van Bel, 2013. Le phloème suscite l'intérêt, car ce tissu profondément enfoui dans la plante, et difficile à étudier, est (i) important pour le développement de la plante, (ii) est une source de nourriture pour les insectes piqueurs-suceurs, et (iii) permet le transport d'un grand nombre de pathogènes.

a) Structure du phloème

Le phloème est composé de trois types cellulaires : les cellules du parenchyme vasculaire phloémien (PV), les cellules compagnes (CC) et les tubes criblés (TC). Le phloème, à l'instar du xylème, est situé à l'intérieur de la gaine périvasculaire (*bundle sheath*, BS) (**Figure 5**). A l'inverse des cellules non vasculaires, les cellules du phloème sont caractérisées par leur petite taille.

Des connections très importantes entre les TC et CC sont mises en place lors du développement du phloème. Chez les angiospermes, ces deux types de cellule pourtant très différents proviennent de la division inégale d'une unique cellule mère. Les CC issues de cette division cellulaire possèdent une forte activité métabolique, visible de par leur

cytoplasme dense contenant de nombreuses mitochondries (**Figure 5** A). De leur côté, les TC se différencient à l'extrême par une dégradation contrôlée de la majorité des composants cellulaires : le noyau gonfle progressivement avant de se désintégrer complètement, et en parallèle, les vacuoles, les éléments du cytosquelette, les ribosomes et les corps de Golgi diminuent en nombre jusqu'à disparaitre complètement. Au stade final de la différenciation, il subsiste dans les TC uniquement la membrane plasmique, une fine couche de cytoplasme, de rares mitochondries et plastes, et des protéines phloémiennes (protéines P). Les TC, qui restent vivants contrairement aux éléments vasculaires du xylème, deviennent donc des cellules entièrement dépendantes des CC pour leur survie. La connexion entre CC et TC se fait par l'intermédiaire de plasmodesmes de structure branchée, les *Pores Plasmodesmal Units* (PPUs) (**Figure 5** B). Par comparaison aux plasmodesmes des tissus non-vasculaires, les PPUs ont un SEL plus important et permettent la diffusion passive de macromolécules. Ainsi, des protéines fusionnées à la GFP dont la taille varie de 36 à 67 kDa peuvent traverser librement les PPUs (Stadler *et al.*, 2005). Les PPUs possèdent une branche unique du côté des TC, et de multiples ramifications du côté des CC. A l'inverse, les connexions entre CC et cellules du PV sont plus rares et sont beaucoup plus proches structurellement des plasmodesmes du mésophylle.
La différenciation des TC permet le libre passage des molécules à l'intérieur de ces cellules qui deviennent de véritables « autoroutes » de transport à travers la plante. Pour que le flux de sève élaborée soit continu entre les TC, les plasmodesmes reliant les TC sont modifiés au cours du développement jusqu'à devenir de véritables pores pouvant aller jusqu'à plusieurs µm de diamètre environ (Esau & Cheadle, 1958). La zone de liaison entre deux TC est ainsi appelée plage de cribles (Esau & Cheadle, 1958) (**Figure 5** C). Le cytoplasme est donc continu entre les TC et permet le passage des sucres, des hormones, des protéines, et même de complexes macromoléculaires. Cependant, ces pores sont aussi un point de vulnérabilité pour la plante puisqu'en cas de rupture le contenu des TC pourrait s'écouler. Des mécanismes de protection existent cependant pour bloquer les pores et éviter l'écoulement de la sève (voir ci-dessous).

Les cellules du PV sont les plus grandes des trois types cellulaires constituant le phloème, et n'ont pas la même origine ontogénique. A l'intérieur de ces cellules s'effectue le chargement, le stockage et la maturation de composés métaboliques variés. Contrairement aux CC, elles possèdent une très grande vacuole.

b) Callose et protéines P

La présence des plages de cribles reliant les TC est un avantage majeur pour le flux de sève, mais il est évident qu'en cas de blessure affectant les TC ceux-ci doivent être rapidement bouchés pour ne pas priver la plante de ses ressources. Les blessures peuvent, par exemple, être causées par les herbivores ou l'homme. Deux éléments importants conduisant à l'obstruction des pores sont connus : la callose et les protéines P.

La callose est un β-1,3-glucane largement présent dans les tissus végétaux. La callose est synthétisée par des calloses synthases (CalS) transmembranaires, au nombre de 12 chez *A. thaliana*. La CalS7 est spécifiquement responsable de la synthèse de callose dans les TC. Il existe trois types de callose déposées dans les éléments conducteurs du phloème : la callose de dormance, la callose définitive, et la callose de blessure. La callose de dormance permet d'inhiber le flux de sève lors des périodes hivernales, et est dégradée au printemps. La callose définitive bouche les pores des TC des feuilles sénescentes, alors que la callose de blessure bouche les plages de cribles lors d'une blessure physique et son dépôt est normalement transitoire. Le dépôt de callose au niveau des pores réduit considérablement,

voire bloque totalement, le flux de sève dans les TC. La vitesse de dépôt de la callose dépend du type de blessures : de quelques heures lors d'une blessure par un insecte piqueur-suceur, à quelques secondes lors de blessures mécaniques.

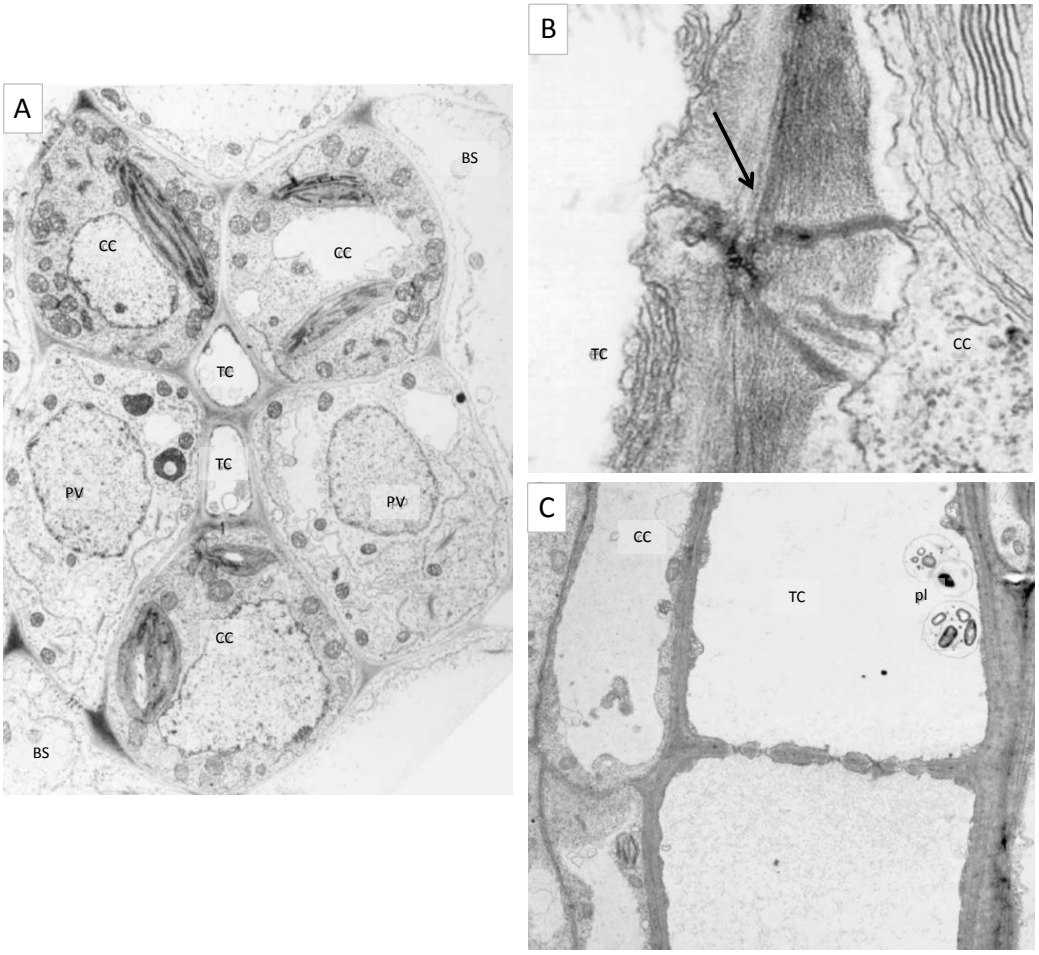


Figure 5 : Structure du phloème (images adaptées de Schulz and Thompson, 2009). **A)** Coupe transversale dans le phloème d'une veine mineure de plant de pomme de terre qui comporte deux tubes criblés (TC) entourés par des cellules compagnes (CC), du parenchyme vasculaire phloémien (PV) et la gaine périvasculaire (BS). **B)** Un plasmodesme entre un TC et une CC, aussi appelé *Pore-plasmodesmal Units* (PPUs) (flèche). **C)** Coupe longitudinale dans le phloème montrant une plage de cribles et des plastes (pl) dans un TC de *Cheiranthus cheiry*.

Les protéines P s'accumulent dans les TC d'un grand nombre d'espèces végétales. Originellement, les protéines P étaient décrites comme des protéines formant des structures particulières dans les TC, mais il est aujourd'hui reconnu qu'elles existent aussi sous une forme soluble dans la sève. Par définition, les protéines P sont des protéines présentes uniquement dans le phloème et formant des corps protéiques de morphologie particulière qui peuvent être observés en microscopie électronique. Selon l'espèce végétale considérée, la structure adoptée par ces protéines peut être de nature amorphe, granulaire, fibrillaire, cristalline, tubulaire ou fibreuse. Ces protéines sont plus abondantes dans les TC que dans les CC et cellules du PV. Les protéines P ont été observées dans les TC de toutes les dicotylédones, et de quelques monocotylédones.

- Chez les fabacées les protéines P forment un corps protéique particulier appelé forisome (du latin *foris* : porte). Cette structure est composée de plusieurs protéines dont FOR1. Le gène *FOR1* est très conservé chez les fabacées. Il faut noter que ce gène est uniquement exprimé dans les TC en stade précoce de différenciation. Des orthologues

ont été retrouvés dans plusieurs autres espèces végétales. La nouvelle nomenclature pour ces protéines est *Sieve element occlusion* (SEO).

- Les protéines P majoritaires de la sève des cucurbitacées sont les lectines phloémiennes PP1 et PP2. Les PP1 sont essentiellement localisées dans les TC sous forme de corps protéiques, et parfois retrouvées dans les CC. Aucun orthologue de PP1 n'a pu être retrouvé chez d'autres espèces végétales. A l'inverse, les PP2 sont retrouvées dans de nombreuses familles de plantes, suggérant leur présence chez toutes les angiospermes. Les ARNm de PP1 et PP2 s'accumulent uniquement dans les CC, mais les protéines PP1 et PP2 sont retrouvées à la fois dans les TC et les CC. Elles sont présentes sous forme de filaments polymérisés ou en tant que monomères solubles et mobiles. Ces deux protéines sont capables d'augmenter le SEL des PPUs, de transiter via ces plasmodesmes vers les TC, d'être transportées à longue distance, et d'être internalisées dans de nouvelles CC. Ces protéines ont, de plus, un rôle dans le transport à longue distance des macromolécules. Par exemple, les protéines CmmLec17 et CmmPP2 de *Cucurbita maxima* sont capables d'interagir *in vitro* de manière séquence non-spécifique avec des ARNm endogènes, mais aussi avec des ARN viraux et viroïdaux (Gomez *et al.*, 2005).

Les filaments de protéines P présents dans les TC sont accrochés à la membrane plasmique. Il a récemment été démontré que des lignées de *N. tabacum* et *A. thaliana* affectées dans l'expression de protéines P perdent plus rapidement les photoassimilats en cas de blessures que des plantes sauvages (Ernst *et al.*, 2012; Jekat *et al.*, 2013). Le rôle des protéines P et SEO dans l'obstruction des tubes criblés reste toutefois controversé.

c) Transport de molécules dans le phloème

Les TC permettent le transport rapide des ressources dans la plante. La sève dite élaborée, qui circule dans les TC, contient de l'eau et des nutriments, contrairement à la sève brute présente dans le xylème, qui est composée uniquement d'eau et d'éléments minéraux. Le transport des éléments dans le phloème se fait selon le modèle *source-to-sink*, c'est-à-dire depuis les feuilles sources jusqu'aux jeunes feuilles puits.

Afin d'analyser le contenu de la sève, différentes méthodes ont été mises au point pour prélever la sève directement des TC. Ainsi, la stylectomie effectuée sur les insectes piqueurs-suceurs ou la collecte d'exsudats phloémiens permettent de récolter des échantillons de sève phloémienne. La stylectomie consiste à couper le stylet d'un insecte, très souvent un puceron, pendant sa phase d'ingestion de sève à partir des TC (Fisher & Frame, 1984). Cette technique ne permet de collecter que de très faibles volumes de sève (ordre du nanolitre), mais la qualité de la sève est jugée très pure (Gaupels *et al.*, 2008). Les techniques de récolte de sève à partir de plantes exsudant naturellement, ou par la méthode d'exsudation à l'EDTA, sont décrites ci-après dans le premier chapitre de thèse. La technique de microdissection au laser a également été plus récemment utilisée pour analyser le contenu des cellules phloémiennes, et notamment le contenu en ARNm (Deeken *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2007).

- **Transport des nutriments :** Le saccharose est la forme majoritaire de transport des sucres dans les espèces végétales, avec quelques exceptions chez les *Cucurbitacées* et *Rosacées* chez lesquelles les dérivés du raffinose et les polyols sont majoritaires respectivement. A l'inverse, les hexoses comme le glucose ne sont pas présents dans la sève élaborée. Le saccharose est chargé dans les TC grâce à des transporteurs spécifiques présents dans la membrane plasmique et permettant le transport

apoplastique vers les TC. L'absence d'hexoses dans la sève élaborée provient probablement de l'absence de transporteurs de ces sucres dans la membrane des TC. La concentration en saccharose dans la sève peut atteindre, selon les espèces végétales 0.5 à 1 M.

Les autres principaux éléments présents dans la sève sont les acides aminés, les hormones (auxine, gibbérellines, cytokinines) et autres molécules signal (jasmonate, acide salicylique), ainsi que différents ions (K+, Na^{+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, PO_4^{3-}, Cl^{-}, $No3^{2-}$, SO_4^{2-}, etc…).

- **Transport des macromolécules :** Le phloème possède un rôle important dans la communication entre les différents organes de la plante, en partie grâce au transport contrôlé de protéines et d'ARN dans les tubes criblés. Ces macromolécules constituent des signaux pour les voies métaboliques qui sont chargés, transportés dans la sève élaborée, puis déchargés dans des cellules compagnes à distance du lieu de synthèse.

  Des études protéomiques ont été effectuées sur la sève élaborée provenant de plusieurs espèces végétales, parmi lesquelles *Ricinus communis* (Schobert *et al.*, 1995) , *Cucumis sativus* et *Cucurbita maxima* (Aki *et al.*, 2008; Walz *et al.*, 2004), et *Arabidopsis thaliana* (Batailler *et al.*, 2012). Parmi les protéines identifiées dans la sève, on trouve les *Non Cell Autonomous Proteins* (NCAPs) qui sont capables de diffuser de cellule à cellule mais aussi à plus longue distance. Ces protéines agissent à distance de leur lieu de synthèse, et ont parfois la capacité d'interagir avec d'autres protéines ou avec des ARN pour former des complexes macromoléculaires transportés dans le phloème (**Tableau 2**). La sève contient également des protéines solubles ne formant pas de complexes et qui peuvent jouer un rôle dans la défense face aux pathogènes (**Tableau 2**).

  Des études transcriptomiques ont permis l'identification d'ARN dans la sève. Trois types majeurs d'ARN sont transportés à longue distance dans le phloème: les ARNm cellulaires endogènes (Atkins *et al.*, 2010; Hannapel, 2010; Harada, 2010; Kehr & Buhtz, 2007; Kragler, 2010; Lucas *et al.*, 2001), les petits ARN (miRNA et siRNA) (Kragler, 2010; Rodriguez-Medina *et al.*, 2011), et les ARN viraux et viroïdaux (Gomez *et al.*, 2005; Kehr & Buhtz, 2007). Même si aucune activité ribonucléasique n'a été trouvée dans la sève (Doering-Saad *et al.*, 2002; Sasaki *et al.*, 1998), il est aujourd'hui établi que les ARNs y sont préférentiellement transportés sous forme de complexes ribonucléoprotéiques (**Tableau 2**).

Protéines	Espèces végétales	Rôles	Références
Protéines impliquées dans des complexes RNP			
PP1/PP2	*Cucumis sp.*	Formation de complexes RNP mobiles avec ARN cellulaires, viraux et viroïdaux	(Gomez & Pallás, 2004; Gómez & Pallás, 2001; Gomez *et al.*, 2005; Owens *et al.*, 2001)
RBP50	*C. maxima*	Fixation des ARN sur un motif polypyrimidine (PTB)	(Ham *et al.*, 2009)
RBP50 CmPP16		Formation avec d'autres protéines d'un large complexe RNP mobile	
Protéines impliquées dans des complexes protéiques			
CmPP16	*C. maxima*	Interaction avec eIF-5A, NCAPP1 et autres protéines cellulaires	(Aoki *et al.*, 2005; Ham *et al.*, 2009; Taoka *et al.*, 2007)
NCAPP1	*N. tabacum*	Interaction avec différentes protéines phloémiennes	(Taoka *et al.*, 2007)
AtPP2	*A. thaliana*	Interaction avec des protéines glycosylées	(Beneteau *et al.*, 2010)
eIF-4A eIF-5A RNA hélicases	*C. maxima*	Formation d'un complexe de traduction	(Lin *et al.*, 2009; Ma *et al.*, 2010)
RTM1, 2 et 3	*A. thaliana*	Formation d'un complexe protéique Restriction du mouvement des *Potyvirus*	(Chisholm *et al.*, 2001; Cosson *et al.*, 2010)
Protéines présentes dans la sève sous forme libre			
FLOWERING LOCUS T	*C. maxima* *A. thaliana* *O. sativa*	Signal de floraison	(Aki *et al.*, 2008; Corbesier *et al.*, 2007; Lin *et al.*, 2007)
Serpine	*C. maxima*	Inhibiteur de protéases à serine	(La Cour Petersen *et al.*, 2005; Yoo *et al.*, 2000)
Cyclophiline	*R. communis*	Repliement des protéines	(Schobert *et al.*, 1995)
Composants du système ubiquitines-protéasome	*Différentes espèces*	Dégradation des protéines par le protéasome	(Aki *et al.*, 2008; Batailler *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2009; Schobert *et al.*, 1995; Walz *et al.*, 2004)
Calmoduline Annexine Calréticuline Kinases	*Différentes espèces*	Protéines fixant le calcium Composants de plusieurs voies de transduction de signal Phosphorylation de protéines	(Aki *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2009; Walz *et al.*, 2004)
Protéines de défense et de réponse aux stress			
CSF-2 SN-1 SLW-1	*C. maxima*	Protéines induites par les blessures	(Walz *et al.*, 2004)
Myrosinases	*A. thaliana*	Activation des glucosinolates (induit la synthèse de composants répulsifs pour les insectes)	(Batailler *et al.*, 2012; Mewis *et al.*, 2006)
Protéines LRR et PR	*A. thaliana*	Protéines de défense	(Batailler *et al.*, 2012; Beneteau *et al.*, 2010)

Tableau 2 : Protéines identifiées dans la sève phloémienne de différentes espèces végétales.

ii) **Revue: Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses.**

Hipper C, Brault V, Ziegler-Graff V and Revers F (2013).
Frontiers in Plant Sciences. (4):154.

Cette revue décrit de manière détaillée le mouvement à longue distance de plusieurs espèces virales, en se focalisant sur les facteurs cellulaires et viraux intervenant dans ce processus. Y sont aussi décrits les formes de transport à longue distance utilisées par les virus : virions et complexes RNP.

frontiers in
PLANT SCIENCE

REVIEW ARTICLE
published: 24 May 2013
doi: 10.3389/fpls.2013.00154

Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses

Clémence Hipper[1], Véronique Brault[1], Véronique Ziegler-Graff[2] and Frédéric Revers[3]*

[1] *UMR INRA-UDS Virus-Vection Group, Colmar, France*
[2] *Laboratoire Propre du CNRS (UPR 2357), Virologie Végétale, Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Université de Strasbourg, Strasbourg, France*
[3] *UMR 1332 de Biologie du Fruit et Pathologie, INRA, Université de Bordeaux, Villenave d'Ornon, France*

Edited by:
Biao Ding, The Ohio State University, USA

Reviewed by:
John W. Patrick, The University of Newcastle, Australia
Rui Shi, North Carolina State University, USA

***Correspondence:**
Frédéric Revers, UMR 1332 de Biologie du Fruit et Pathologie, Centre INRA de Bordeaux, CS 20032, 71 Avenue Edouard Bourlaux, 33882 Villenave d'Ornon Cedex, France.
e-mail: frederic.revers@bordeaux.inra.fr

Phloem transport of plant viruses is an essential step in the setting-up of a complete infection of a host plant. After an initial replication step in the first cells, viruses spread from cell-to-cell through mesophyll cells, until they reach the vasculature where they rapidly move to distant sites in order to establish the infection of the whole plant. This last step is referred to as systemic transport, or long-distance movement, and involves virus crossings through several cellular barriers: bundle sheath, vascular parenchyma, and companion cells for virus loading into sieve elements (SE). Viruses are then passively transported within the source-to-sink flow of photoassimilates and are unloaded from SE into sink tissues. However, the molecular mechanisms governing virus long-distance movement are far from being understood. While most viruses seem to move systemically as virus particles, some viruses are transported in SE as viral ribonucleoprotein complexes (RNP). The nature of the cellular and viral factors constituting these RNPs is still poorly known. The topic of this review will mainly focus on the host and viral factors that facilitate or restrict virus long-distance movement.

Keywords: virus, long-distance movement, phloem, viral factors, host factors

INTRODUCTION

Plant viruses are obligate intracellular parasites living exclusively in the symplast of their hosts. Virus accumulation at high levels throughout the whole plant is a necessary condition for virus survival. Massive titer of virions may facilitate virus transmission from one plant to another, whatever the mode of propagation: by seeds or pollen, by graftings, by mechanical wounds, or by vectors. Viruses are dependent on their hosts to complete their life cycle in the plant, i.e., replication, encapsidation, cell-to-cell movement, and long-distance transport. Therefore, multiple compatible interactions have to be established between viral proteins or virions and cellular factors. The plant reacts to these invaders by developing various strategies to restrict, or even better, eradicate the pathogens. On their side, viruses counteract these defense mechanisms by different ways. The result of this arm race leads to a complete resistance of the plant, if the virus cannot overcome the plant defenses, or to a systemic infection, eventually ending with the host death, if the viral counter defenses are efficient enough to bypass the plant protection system. A wide range of intermediate situations between plant immunity and death can be encountered, which highlights the complexity of interactions that may take place between the virus and the plant.

Virus entry into plant cells, mostly epidermal, and mesophyll, is followed by virion disassembly and genome translation/replication in inoculated tissues. Then, viral transport complexes move from cell-to-cell and on-going replication takes place in the newly infected cells (**Figure 1**). This short-distance movement requires modification of plasmodesmata (PD) by viral movement proteins (MP; reviewed by Schoelz et al., 2011). Virus transport in phloem tissues encompasses translocation from mesophyll cells to sieve elements (SE) via the successive crossings of the bundle sheath (BS), vascular parenchyma cells (VP), and companion cells (CC). Once in SE, the virus is transported with the phloem sap to distant locations, then it exits from SE to initiate new infection sites and to disseminate efficiently throughout the whole plant (**Figure 1**). To carry out cell-to-cell and long-distance movements, viruses take advantage of plant existing transport routes, including PD and phloem vasculature, and follow the source-to-sink transportation of carbohydrates (Maule, 1991; Carrington et al., 1996). This review introduces some general features of virus transport in the phloem and addresses the issue of the type of viral complexes that are transported over long-distance. We then focus on viral and host factors shown to play a direct role in virus long-distance movement without affecting multiplication or cell-to-cell movement.

GENERAL FEATURES OF VIRUS TRANSPORT IN THE PHLOEM

Phloem cells structure and composition reflect their high functional specialization in transporting molecules from source to sink tissues. SE are enucleated cells, modified by selective degradation of organelles, interconnected by wide sieve pores, and forming a low-resistance cellular conduit for elaborated sap flux (Turgeon and Wolf, 2009). SE are maintained alive by an intimate association with CC characterized by a high metabolic activity (Van Bel, 2003). Specialized PD, called Pore Plasmodesmal Units (PPUs), consist of multiple channels on the CC side, and a single channel facing the SE (Oparka and Turgeon, 1999). PPUs exhibit a higher size exclusion limit (SEL) and are therefore more permissive than the PD

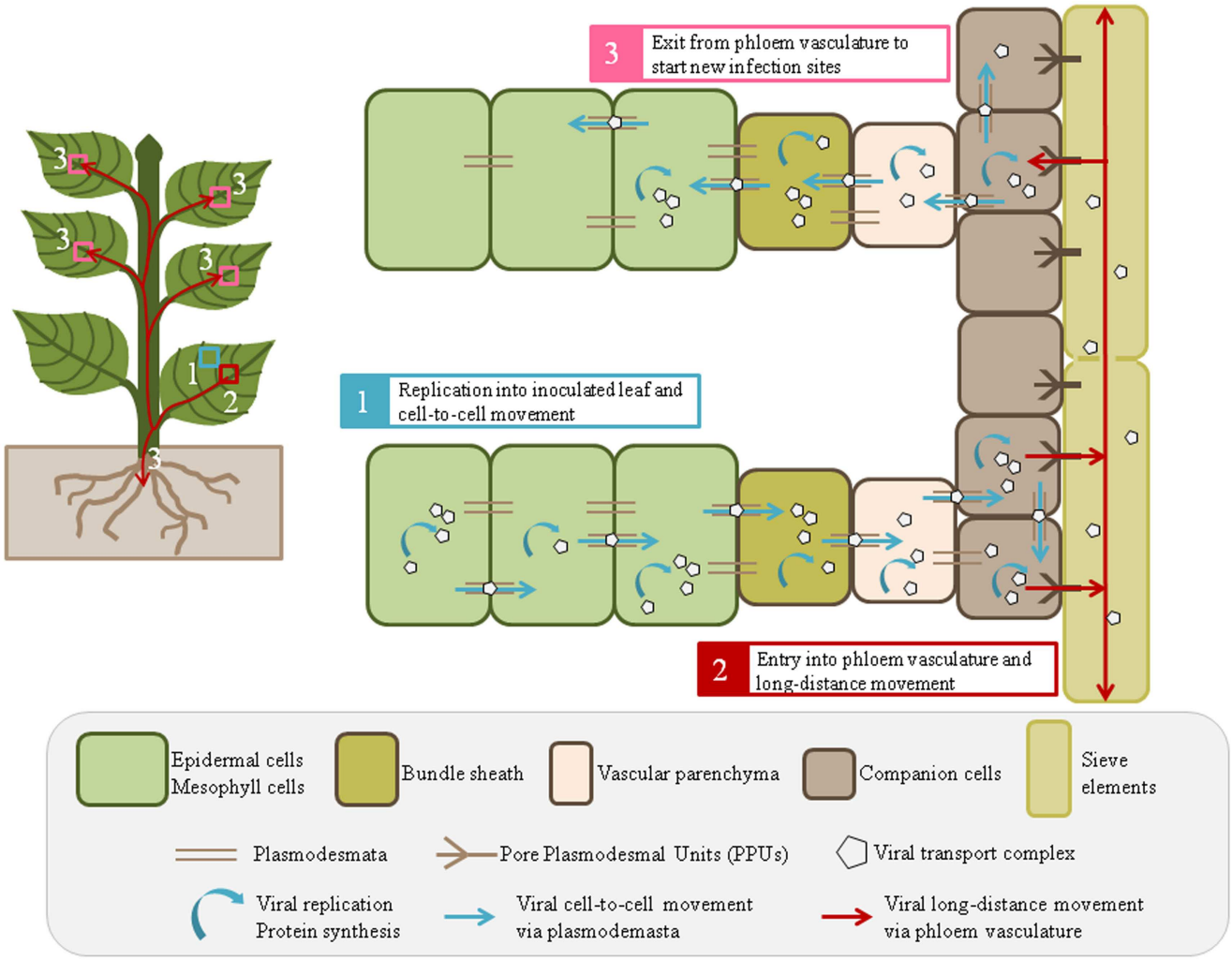


FIGURE 1 | A general view of virus cell-to-cell and long-distance movement in plant tissues. After inoculation, mostly into epidermal or mesophyll cells, virions are disassembled for replication and translation of the viral genome (1). Viral proteins, sometimes associated to cellular factors, interact with the viral genome to form the transport complexes (virions or RNP complexes) allowing virus movement from cell-to-cell via plasmodesmata (1). Viral replication and cell-to-cell movement continue in and between nucleate phloem cells, i.e., bundle sheath, vascular parenchyma and companion cells (2). Then, the transport complexes (in the form of virions or RNPs) are loaded into sieve elements for long-distance movement (2), before being finally released into systemic tissues to start a new infection site (3). The whole process requires an effective crossing of successive boundaries between different cell types and leads to systemic infection of the plant.

between mesophyll cells, suggesting that some macromolecules, like proteins or RNAs, may diffuse to SE without specific regulation (Oparka and Turgeon, 1999; Stadler et al., 2005). However, such passive diffusion cannot apply to viral particles (icosahedral or filamentous) or even to infectious ribonucleoprotein (RNP) complexes, formed by the association of viral genome with cellular and/or viral proteins as they are too large to freely move through PPUs.

As shown in **Figure 1**, viral long-distance movement involves several steps starting from the virus entry into phloem cells (BS, VP, or CC), delivery to SE, transport along SE and exit from SE. This process requires the crossing of successive borders, i.e., mesophyll cell/BS, BS/VP, VP/CC, and CC/SE borders that needs the setting-up of specific interactions between virus and host factors. In the absence of compatible interactions, the virus will be unable to traffic through these gates, making phloem entry, and exit highly restrictive steps for host infection. Several studies on host/virus interactions highlighted that viral transport can be specifically blocked at some of these borders, suggesting precise regulation of the PD permeability at these boundaries (Ueki and Citovsky, 2007 and references therein). The current knowledge on vascular transport infers that virus entry occurs in all vein classes of source leaves, while virus exit is limited to major veins of sink tissues, suggesting different mechanisms for virus loading in and unloading from the phloem (Roberts et al., 1997; Cheng et al., 2000; Oparka and Cruz, 2000; Silva et al., 2002). Virus spread was also shown to follow both internal and external types of phloem, leading to differential directions of transport, either upwards to young

sink tissue or downwards to the roots, with the former translocation being faster than the latter (Andrianifahanana et al., 1997; Cheng et al., 2000). Finally, as source leaves preferentially serve sinks with a direct vascular connection (referred to as orthostichy), the viral movement is also predicted accordingly to orthostichy (Roberts et al., 2007). Following symptom appearance and viral accumulation, Roberts et al. (2007) demonstrated the remarkable similarity between *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) infection and patterns of photoassimilate distribution in sink organs, indicating that virus movement can be mapped very accurately onto the orthostichy. However, spatial and kinetic analyses of long-distance movement of some viruses revealed that the direction and speed of movement may be different than those of photoassimilates. For instance, *Melon necrotic spot virus* (MNSV) is first transported in melon plants from cotyledons to the roots through the external phloem before being carried to the shoot apex through the internal phloem (Gosalvez-Bernal et al., 2008). The slower rate of virus progression observed in some experimental cases, compared to the speed of photoassimilates, could be explained by additional virus unloading and amplification step in CC before being reloaded into the SE (Moreno et al., 2004; Germundsson and Valkonen, 2006).

From a mechanistic point of view, virus cell-to-cell movement strategies are increasingly well-documented, but far less is known on viral transport mechanisms in vascular system. This lack of knowledge mostly comes from the inaccessibility of this deeply buried tissue, which is difficult to reach, to handle, and to study. In addition, collecting phloem sap to identify virus phloem partners may be challenging or even infeasible depending on the host. At last, as the efficiency of cell-to-cell movement influences the long-distance transport of virus, these two interconnected processes are sometimes difficult to distinguish. Consequently, the identification of viral and host factors specifically required for virus long-distance transport is sometimes misinterpreted and still represents a challenge. Nevertheless, during the last 10 years, a growing body of data has shed light on factors involved in virus vascular transport, in particular the viral determinants promoting the long-distance spread and some host factors facilitating or restricting this process.

VIRAL COMPLEXES TRANSPORTED OVER LONG-DISTANCE

The nature of the viral complexes transported in sieve tubes from inoculated to non-inoculated leaves is an important question to address to better understand the mechanisms by which viruses invade whole plants. Two viral forms of transport have been described: virions, protecting the genome by a shell formed by capsid protein (CP) subunits assembly, and RNP complexes, in which the viral genome is associated with viral and/or cellular proteins. As described in more details in the following section, the requirement of a functional CP for systemic movement is common but not universal. Although this occurrence is usually associated with the need to produce virions, the CP can also be required to form RNP complexes. The nature of the complexes involved in long-distance transport of different viral species is described thereafter, emphasizing the central role of the CP (see also **Table A1** in Appendix).

Viral particles have been reported to be the exclusive long-distance moving form of different virus species belonging to distinct genera like *Potexvirus, Alfamovirus*, *Cucumovirus*, *Closterovirus*, *Mastrevirus*, *Begomovirus*, *Dianthovirus*, *Carmovirus*, *Necrovirus, Tobamovirus*, *Sobemovirus,* and *Benyvirus* (**Table A1** in Appendix). For other virus species, although the absolute requirement of a functional CP for virus long-distance transport has been demonstrated, it is still unknown whether virions, or CP-associated RNP complexes, are involved in this process. This concerns members in the *Potexvirus*, *Cucumovirus, Bromovirus*, *Tospovirus, Closterovirus*, *Curtovirus, Polerovirus*, and *Potyvirus* genera (**Table A1** in Appendix).

Interestingly, *Potato mop-top virus* (PMTV, *Pomovirus*) was shown to move simultaneously in the form of RNP complexes and virions, the three RNAs of this multipartite virus being transported in different forms (see also below in the next section; McGeachy and Barker, 2000; Savenkov, 2003; Torrance et al., 2009, 2011; Wright et al., 2010). *Brome mosaic virus* (BMV) is another example for which systemic movement of each of the three genomic RNA may occur in different forms, and may involve constitution of RNP complexes with cellular factors. Gopinath and Kao (2007) showed that BMV-RNA-3 was able to move over long-distance without the assistance of any viral protein whereas BMV-RNA1 and RNA2 were also competent for systemic movement but needed the MP. Whether transport of BMV-RNAs is only required for the initial step of virus infection or is thereafter an alternative mode of virus transport together with virions, previously shown to be required for systemic spread, requires further investigations (Sacher and Ahlquist, 1989; Flasinski et al., 1997). For other viruses, the viral form that traffics in the vasculature may depend on the host plant and the degree of virus-host adaptation. *Bean golden mosaic virus* (BGMV, *Begomovirus*) for example, moves in *N. benthamiana* and in its natural host, *P. vulgaris*, in a CP-dependent manner, most probably virions, but this virus can also be transported in beans, although less efficiently, as CP-independent RNP complexes (Jeffrey et al., 1996; Pooma et al., 1996). A similar bi-modal process was observed in *N. benthamiana* for *Tomato golden mosaic virus* (TGMV), another *Begomovirus* (Pooma et al., 1996), and in *Nicotiana* species for the NM isolate of *Tobacco rattle virus* (TRV, *Tobravirus*) lacking the CP encoded by RNA2 (Swanson et al., 2002; Macfarlane, 2010).

The CP requirement for virus long-distance spread is certainly more a general rule than an exception. Some viruses, however, do not need the CP to move systemically. Mutations introduced in the viral genome of *Tomato leaf curl virus* (ToLCV, *Begomovirus*) (Padidam et al., 1995, 1996) and *Tomato bushy stunt virus* (TBSV, *Tombusvirus*) (Scholthof et al., 1993; Desvoyes and Scholthof, 2002; Qu and Morris, 2002) inhibit synthesis of the CP and formation of virions, but do not alter virus transport in non-inoculated leaves. The presence of the CP, however, is accelerating virus transport resulting in more severe symptoms on the infected plants (Desvoyes and Scholthof, 2002; Qu and Morris, 2002; Manabayeva et al., 2013). However, long-distance movement of TBSV in *N. benthamiana* occurs independently of CP upon root inoculation (Manabayeva et al., 2013). A very singular case is represented by umbraviruses (*Groundnut rosette virus*, GRV, and *Pea enation mosaic virus-2*, PEMV-2) that lack a CP-encoding gene and move naturally in the form of RNP complexes. These complexes are formed by the association of the viral RNA genome

with the viral protein encoded by ORF3 and the host nuclear fibrillarin (see below; Ryabov et al., 2001; Taliansky et al., 2003; Kim et al., 2007a,b; Canetta et al., 2008).

Viral encapsidation was considered for many years as a means to protect the RNA genome from the potential harshness of the phloem environment. Actually, no RNAse activity has ever been found in this plant compartment (Sasaki et al., 1998; Doering-Saad et al., 2002), but an entire machinery for a functional 26S proteasome was identified in pumpkin sap exudates (Lin et al., 2009). Moreover, recent proteome studies identified aminopeptidases and proteases in sieve tube sap of pumpkin and *A. thaliana* (Lin et al., 2009; Batailler et al., 2012) suggesting that viruses may need to develop strategies, like the recruitment of cellular factors, to protect their virions or RNP complexes from these proteolytic enzymes.

VIRAL DETERMINANTS WHICH FACILITATE LONG-DISTANCE MOVEMENT

The CP is obviously the major viral determinant involved in virus long-distance movement but several other viral proteins were also shown to play a role in this process (reviewed in Waigmann et al., 2004; Ueki and Citovsky, 2007). Here, we mainly emphasize recent data on these proteins and highlight the importance of RNA silencing suppressors (RSS) for efficient systemic spread in the plant.

CAPSID PROTEIN

As described in the previous section, CP requirement is often linked to the necessity to form viral particles for systemic transport. However, CP domains distinct from those required for viral encapsidation were reported to participate to virus long-distance movement.

This is the case for potyviruses for which the N- and C-terminal CP domains are dispensable for virus genome encapsidation, but essential for virus long-distance movement (Dolja et al., 1994, 1995). In addition to being a resistance breaking determinant, the N-terminal domain of the CP (CP-N) was shown to be a host- and strain-specific long-distance movement determinant for *Potyviridae* family members (Salvador et al., 2008; Decroocq et al., 2009; Tatineni et al., 2011a). Similarly, the C-terminal domain of the CP of two *Tombusviridae* family members, *Olive latent virus-1* (OLV-1, Pantaleo et al., 2006), and *Carnation ringspot virus* (CRSV, Sit et al., 2001), was reported to be specifically involved in systemic movement but not in particle formation, even though virions are necessary for vascular transport of these two viruses (**Table A1** in Appendix). The most likely hypothesis regarding the role of these CP domains in virus long-distance transport is their exposure on the external surface of the virion allowing them to directly interact with host factors. A recent study showing that a CP domain essential for the systemic movement of the *Cucumber mosaic virus* (CMV, *Cucumovirus*) forms a loop on the surface of the virion reinforces this hypothesis (Salánki et al., 2011).

Regarding the role of virus assembly in long-distance movement, it has been shown for two viruses belonging to the *Tombusviridae* family, the Carmovirus *Turnip crinkle virus* (TCV, Cao et al., 2010), and TBSV (Qu and Morris, 2002), that particles are dispensable for loading into vascular tissues, but are essential for efficient vascular egress. Different molecular mechanisms may therefore control the entry and the exit of viral genomes into and from the SE. These data are in agreement with the fact that some host factors (see below) specifically control viral phloem exit.

MOVEMENT PROTEIN

Plasmodesmata are small channels allowing the movement of molecules between plant cells by forming a cytoplasmic continuum known as symplasm (reviewed in Lucas et al., 2009; Maule et al., 2011). These specialized channels used by viruses to move from cell-to-cell, are however too small to allow passive transport of viruses. MPs are therefore synthesized by viruses to increase PD permeability (reviewed by Scholthof, 2005; Benitez-Alfonso et al., 2010; Niehl and Heinlein, 2010; Schoelz et al., 2011). Interestingly, some viruses like the monopartite and bipartite geminiviruses, CMV, and the *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV, *Dianthovirus*) require MPs for long-distance movement (reviewed in Waigmann et al., 2004; Ueki and Citovsky, 2007). Other studies showed that distinct domains of the MPs are involved in virus cell-to-cell or in long-distance transport. For instance, the C-terminus of the non-structural protein (NSm) of the *Tomato spotted wilt virus* (TSWV, *Tospovirus*), which is the MP of TSWV, is essential for systemic movement (Lewandowski and Adkins, 2005; Li et al., 2009). A similar situation is described for BMV for which the C-terminal domain of the MP is not essential for virus cell-to-cell movement but required for long-distance transport (Takeda et al., 2004).

TRIPLE GENE BLOCK PROTEINS

The triple gene block (TGB) proteins, encoded by three partially overlapping ORFs in nine genera within the *Alphaflexiviridae*, *Betaflexiviridae*, and *Virgaviridae* families, and in the unassigned genus *Benyvirus*, are essential for virus cell-to-cell movement (reviewed in Morozov and Solovyev, 2003; Verchot-Lubicz et al., 2010; Solovyev et al., 2012). Some viruses require the TGB1 protein for systemic spread (hordei-like viruses, *Virgaviridae*) while other viruses (potex-like viruses, *Alphaflexiviridae*) are dependent on the CP in addition to the TGB1 protein, for both cell-to-cell and long-distance movement (reviewed in Verchot-Lubicz et al., 2010).

TGB1 is a multifunctional protein that has, among others, the property to bind single stranded RNA (ssRNA) and form RNP complexes (Lough et al., 2000). This characteristic was further studied for hordeiviruses for which RNP complexes proved to be competent for short- and long-distance viral transport (Lim et al., 2008). The hordeiviral TGB1 proteins differ from the potexvirus-like TGB1 in having a longer N-terminal extension with positively charged amino acids. This extension consists of two structurally and functionally distinct domains, referred to as the N-terminal (NTD) and the internal (ID) domains. TGB1-NTD is dispensable for movement between cells, but is essential for vascular transport (Makarov et al., 2009). The structurally disordered NTD and the structured ID domains are both interacting with ssRNA and could play the role of an RNA chaperone stabilizing RNP complexes in the phloem, thereby functioning like the CP in potex-like viruses (Makarov et al., 2009).

Recently, TGB1-NTD of *Poa semilatent hordeivirus* (PSLV) was shown to contain targeting sequences for the nucleolus and cajal bodies (CB) (Semashko et al., 2012a). PSLV TGB1 interacts *in vitro* and *in vivo* with fibrillarin and coilin (Semashko et al., 2012a,b), two proteins localized respectively in the nucleolus and in CB. As the nucleolar fibrillarin is known to play an essential role in long-distance movement of an *Umbravirus* (see below), interaction with fibrillarin may represent a more general mode of action promoting viral systemic trafficking. Similar *in vitro* interactions between PMTV TGB1 and fibrillarin were reported (Wright et al., 2010; Torrance et al., 2011) but relevance of these interactions in long-distance movement of hordeiviruses remains to be assessed (Solovyev et al., 2012).

A very unusual and complex situation was described for PMTV (*Pomovirus* genus, *Virgaviridae* family) regarding long-distance transport of its three genomic RNAs. All of them require the TGB1 to move systemically. While two of the genomic RNAs can spread in the absence of the CP, the third RNA encoding the CP needs the minor capsid protein (CP-RT) for phloem transport (Torrance et al., 2009). Deletion of the N-terminal domain of PMTV TGB1 did not affect the capacity to self-interact, to interact with CP-RT nor with the viral RNA (Wright et al., 2010). This domain could therefore be required for the binding to a host factor involved in viral systemic transport (Wright et al., 2010; Torrance et al., 2011). Together with additional observations, these data suggest that the CP-encoding RNA moves over long-distance packaged into virions decorated with both TGB1 and the CP-RT protein at one extremity (Torrance et al., 2009, 2011). This example illustrates perfectly the situation where a virus can reach non-inoculated leaves using different viral forms (virus particles and CP-independent RNP complexes) (see also "Viral complexes transported over long-distance").

POTYVIRUS VPg

Besides its role in virus replication (Jiang and Laliberté, 2011), the viral genome-linked protein (VPg) of potyviruses is also involved in virus movement. Several studies showed that VPg is the breaking determinant of the resistance based on virus long-distance movement restriction. This function of the VPg was demonstrated for *Tobacco etch virus* (TEV) in tobacco (Schaad et al., 1997) and in different plant species for *Potato virus A* (PVA), *Nicandra physaloides* (Rajamäki and Valkonen, 1999), a diploid potato hybrid (Hämäläinen et al., 2000), and *Solanum commersonii* (Rajamäki and Valkonen, 2002). For PVA, one amino acid change in the central domain of the VPg is sufficient to restore viral long-distance movement, although this resistance bypass is host-specific (Rajamäki and Valkonen, 1999, 2002). Using grafting experiments, it was also shown that the PVA long-distance movement restriction was likely due to the absence of virus loading into SE (Hämäläinen et al., 2000; Rajamäki and Valkonen, 2002). The VPg is covalently linked to the 5' end of the viral RNA and is exposed at one extremity of the virion. It is therefore accessible for interaction with proteins and in particular with phloem host factors involved in virus movement (Puustinen et al., 2002). Consequently, any mutation in either the VPg or the host factors disrupting these interactions may abolish virus long-distance movement, thereby conferring resistance to the host. This is exemplified by a mutation in the N-terminal part of *Turnip mosaic virus* (TuMV) VPg that abolishes its interaction with the cellular protein PVIP (see "host factors involved in phloem transport of potyviruses") and results in a strong delay in systemic infection (Dunoyer et al., 2004).

POTYVIRUS 6K2

The small 6K2 protein of potyviruses is an integral membrane protein associated to VPg in endoplasmic reticulum-derived membranes (Schaad et al., 1997; Léonard et al., 2004) forming cytoplasmic vesicles which are viral replication sites (Cotton et al., 2009). Rajamäki and Valkonen (1999) showed that, in addition to the VPg (see above), the 6K2 of PVA is a virulence determinant in *N. physaloides* enabling the virus to overcome the resistance that restricts PVA long-distance movement in this host. One amino acid change in the N-terminal sequence of 6K2 (6K2-N) was indeed sufficient to restore virus systemic spread. As 6K2-N is located on the cytoplasmic side of the membrane (Schaad et al., 1997b), it can potentially interact with viral or host factors implicated in potyvirus long-distance movement. In particular a coordinated role for the VPg and the 6K2 proteins in PVA vascular transport can be envisaged. Whether the 6K2 protein from other potyviruses participates to virus long-distance movement needs to be addressed.

UMBRAVIRUSES ORF3

Another well characterized viral protein involved in virus long-distance movement is the *Umbravirus* ORF3 protein. Umbraviruses, which do not encode a CP are unable to produce typical virus particles (Taliansky and Robinson, 2003). Instead, they move as filamentous RNP complexes formed by the interaction between ORF3 protein and viral RNA (Taliansky et al., 2003). ORF3 protein of GRV is able to translocate heterologous viral RNA through the whole plant (Ryabov et al., 1999, 2001). In all cell types, and particularly in phloem cells, ORF3 protein accumulates in cytoplasmic inclusions containing filamentous RNP particles (Taliansky et al., 2003). A remarkable shuffling of ORF3 protein from the cytoplasm to the nucleus is essential for virus movement (Ryabov et al., 1998, 2004). Indeed, the ORF3 protein traffics to the nucleolus via a mechanism involving the reorganization of CBs into multiple CB-like structures (CBL) and their fusion with the nucleolus (Kim et al., 2007a,b). In these nuclear structures, the interaction between the ORF3 protein and the nuclear protein fibrillarin mediates the relocalization of fibrillarin to the cytoplasm where it is integrated into viral RNP complexes together with the ORF3 protein (Kim et al., 2007a,b). A direct interaction between the leucine-rich domain of the ORF3 protein and the Glycine- and Arginine-Rich domain of fibrillarin was further demonstrated (Kim et al., 2007a). Functional analysis using ORF3 protein mutants and *N. benthamiana* silenced for fibrillarin expression, revealed a correlation between the ORF3/fibrillarin interaction, the formation of RNP complexes, and the virus long-distance transport (Kim et al., 2007a,b). Finally, *in vitro* reconstituted ORF3 protein/fibrillarin/viral RNA complexes were shown to be infectious *in planta* suggesting that no additional viral or plant factor is required for *Umbravirus* long-distance movement (Canetta et al., 2008).

LONG-DISTANCE VIRAL DETERMINANTS OF PHLOEM-LIMITED VIRUSES

Closterovirus proteins

Closteroviruses form long filamentous particles bearing a tail composed of several proteins involved in cell-to-cell transport (Napuli et al., 2003; Peremyslov et al., 2004). The tail of the particle was therefore proposed to be a specialized transport device and not merely a protection for viral RNA. The MP Hsp70h of *Beet yellows virus* (BYV) is one of the tail components that targets the cell periphery and PD (Prokhnevsky et al., 2005). Hsp70 interacts with p20, a protein which was shown, by atomic force microscopy on BYV particles, to be also located at the tip of the tail (Prokhnevsky et al., 2002; Peremyslov et al., 2004). This interaction may therefore provide a PD docking site for p20. P20 has a moderate effect on virus local spread, whereas it is essential for virus long-distance movement (Prokhnevsky et al., 2002). By it localization, p20 may facilitate entry into or exit from the phloem via direct or indirect modifications of the PPUs connecting CC and SE (Prokhnevsky et al., 2002). P20 could also function to stabilize virions inside the phloem sap or could eventually inactivate phloem antiviral plant defense response (Prokhnevsky et al., 2002; Peremyslov et al., 2004).

Another BYV protein involved in virus long-distance movement is the leader proteinase (L-Pro) which functions in RNA replication and in polyprotein processing (Peng et al., 2003). Both non-conserved N-terminal and conserved C-terminal domains of L-Pro seem to be involved in BYV long-distance movement. However, in contrast to the p20 protein, L-Pro is not associated to virions and its mode of action in virus long-distance transport remains to be determined.

In the case of *Citrus tristeza virus* (CTV), three non-conserved genes corresponding to the p33, p18, and p13 proteins can be deleted without affecting the ability of the virus to systemically infect the more susceptible citrus trees (Tatineni et al., 2008). In some others citrus species, one or two of these genes are essential for systemic infection (Tatineni et al., 2011b). Two additional genes encoding p20 and p6 proteins are suspected to be required for virus wide spread throughout citrus trees (Tatineni et al., 2008). However, the BYV p6 homolog was considered by Alzhanova et al. (2000) as a MP.

Polerovirus P4 and readthrough proteins

Polerovirus virions are composed of the major coat protein of 23 kDa and a minor component, the readthrough protein (RT). This protein of about 74 kDa is a C-terminally extended form of the CP produced by occasional suppression of the CP termination codon. It gets processed by an unknown mechanism into a 54 kDa protein (RT*), which is found incorporated into virions. CP, RT, and RT* are involved in virus long-distance transport (Bruyère et al., 1997; Brault et al., 2000; Peter et al., 2008; Brault and Boissinot, personal communication). Particles were detected in PD connecting nucleated phloem cells and SE suggesting that virions are the phloem mobile device of poleroviruses (Esau and Hoefert, 1972; Shepardson et al., 1980; Mutterer et al., 1999). Moreover, virions were observed in sap collected from cucumbers infected with the polerovirus *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV, Brault and Boissinot, personal communication). Mutations in the CP gene that disrupt virion formation inhibit systemic transport (Brault et al., 2003), reinforcing the role of virus particles in polerovirus long-distance movement. Mutations or deletions affecting synthesis and/or incorporation of the RT* protein into *Potato leafroll virus* (PLRV) virions reduce or completely inhibit virus systemic movement, depending on the hosts (Peter et al., 2008). Furthermore, the C-terminal part of the RT protein was reported to be important to confine PLRV to the phloem tissue (Peter et al., 2009).

P4, on the other hand, is a non-structural protein sharing biochemical and cellular characteristics of conventional cell-to-cell MPs like its ability to bind ssRNA, target PD, increase PD SEL, form homodimers and be phosphorylated (Tacke et al., 1993; Schmitz et al., 1997; Sokolova et al., 1997; Hofius et al., 2001; De Cilia and Ziegler-Graff, personnal communication). P4-defective polerovirus mutants are still able to replicate in protoplasts (Ziegler-Graff et al., 1996), but are impaired in their ability to move over long-distances although only in some hosts. As the involvement of P4 in cell-to-cell movement has not been precisely addressed yet, essentially by the lack of experimental system, it is possible that the impaired vascular movement of P4 mutants originates from a delay in cell-to-cell transport (Lee et al., 2002; Ziegler-Graff and Brault, unpublished results). A working hypothesis could be the co-existence of two movement pathways, one dependent and the other independent of P4 (Ziegler-Graff et al., 1996). Additional experiments are required to decipher the precise role of P4 in polerovirus movement.

RNA SILENCING SUPPRESSORS

The discovery of RNA silencing and the concomitant characterization of the RSS led to shed new light on long-distance trafficking of viruses in the phloem. In higher plants and insects, RNA silencing is an adaptive major defense mechanism against viruses based on the production of virus-specific short interfering RNA (siRNA) able to target cognate RNA sequences. These siRNA are generated from double-stranded RNA (dsRNA) by Dicer-like enzymes (DCL) and then recruited by RNA-induced silencing complexes (RISC) containing an ARGONAUTE (AGO) effector protein. siRNA guide the sequence-specific cleavage by AGO1 of homologous targets (Ding and Voinnet, 2007). Interestingly, RNA silencing is a non-cell autonomous process known to function through a silencing signal able to spread through PD from the initial cell, where silencing was triggered, to the adjacent cells, but also over long-distance following the plant vasculature (Kalantidis et al., 2008). The silencing signal travels ahead of the viral infection front, immunizing the recipient tissues, and preventing the systemic spread of the virus toward upper non-infected leaves (Schwach et al., 2005; Ding and Voinnet, 2007). The silencing signal is amplified by host RNA-dependant RNA polymerases (RDR; Schwach et al., 2005) thereby generating new sources of dsRNA that are processed into secondary siRNA (Wang et al., 2010). The identity of the mobile silencing signal was recently confirmed as being a small RNA duplex (Dunoyer et al., 2010). Thus, the siRNA signal does not only reduce viral accumulation in the initially infected cell, but can also move ahead of the virus, restricting subsequent virus cell-to-cell movement and systemic trafficking.

To counter this host defense, viruses have developed diverse strategies by encoding RSS that interfere with the activity of

various compounds of the silencing pathway (Burgyán and Havelda, 2011). Many RSS were previously known as virulence factors able to intensify symptoms or promote systemic infection (Díaz-Pendón and Ding, 2008). But RSS are often multifunctional proteins that display essential roles in the infection process like replication, coating, movement, and pathogenesis, which may hinder their study. Since the discovery of RSS almost 15 years ago, two main strategies of inhibition of the silencing pathway have emerged. The first one involves binding to the small RNA duplex, thus preventing siRNA loading into the RISC complex (Lakatos et al., 2006; Mérai et al., 2006). This process also inhibits the spread of the silencing signal to neighboring cells (Silhavy et al., 2002) and to distant parts of the plant (Dunoyer et al., 2010). The second mode of action of RSS targets the effector protein AGO1 that functions cell-autonomously (Dunoyer et al., 2010). The mechanism inhibits both the primary and the secondary siRNA-guided cleavage, impairing the generation of new antiviral silencing signals. This section will focus on RSS that were reported to promote viral long-distance movement and will attempt to correlate the mode of action of the RSS with their requirement for viral spread.

Tombusvirus P19

The P19 protein encoded by TBSV (*Tombusviridae*) is essential for long-distance spread in spinach and pepper plants, while it is dispensable for systemic infection of *N. benthamiana* and *N. clevelandii*, suggesting that P19 displays an essential host-dependent role in systemic movement (Scholthof et al., 1995). However, a recent study showed that P19 is required for systemic infection in *N. benthamiana* upon root inoculation with TBSV, inferring that silencing in the inoculated root cells is more immediate and effective than in leaves (Manabayeva et al., 2013). During the following years, several studies have characterized P19 as an RSS. First, expression of P19 was able to prevent RNA silencing in the upper leaves of an infected plant, but P19 could not reverse established RNA silencing, suggesting that P19 compromised the systemic spread of a signal needed for activation of RNA silencing (Voinnet et al., 1999). Molecular studies demonstrated that P19 binds dsRNA of 21 bp with a high affinity (Silhavy et al., 2002). Crystallographic data further confirmed that P19 dimers can specifically sequester siRNA duplexes (Vargason et al., 2003; Ye et al., 2003). Recent findings also showed that P19 interferes with the spread of siRNA duplexes, which were identified as the signal of systemic RNA silencing (Dunoyer et al., 2010). Finally, elegant *in situ* hybridization experiments revealed that the P19 of *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV, *Tombusvirus*) promoted virus exit from vascular tissues into the surrounding cells and the subsequent systemic infection of the upper leaves (Havelda et al., 2003).

Cucumovirus 2b

The second best studied RSS is the 2b protein encoded by CMV. This small protein of 100 amino acids encoded by a cryptic ORF was found to enhance virus systemic spread in a host-dependant manner. The Q-strain of CMV mutant lacking the 2b ORF (CMV-Δ2b) was unable to systemically infect cucumber plants although it accumulated in inoculated cotyledons (Ding et al., 1995). In tobacco plants however, the same CMV-Δ2b virus was able to spread systemically to upper leaves. A similar 2b-deletion mutant of the severe Fny-strain of CMV remained infectious in tobacco and *N. benthamiana,* but its movement dynamics was affected in both inoculated and systemic leaves. Moreover, infected plants did not develop symptoms (Soards et al., 2002; Ziebell et al., 2007). These experiments argue for an effect of both the virus strain and the host in CMV long-distance movement and symptom induction.

Additional studies showed that the 2b protein was able to prevent the spread of the systemic silencing signal (Brigneti et al., 1998; Guo and Ding, 2002), facilitating infection of distal parts of the plant. Information unraveling the mode of action of the 2b protein came from genetic studies on *A. thaliana* wild-type and *rdr* mutants infected with a 2b-deficient CMV mutant (Diaz-Pendon et al., 2007). These studies showed that the 2b protein expressed from the CMV genome severely reduced the accumulation of viral secondary siRNA produced by RDR1 or RDR6 (Wang et al., 2011). In addition, several functional studies also revealed that the 2b protein displays a dual mode of silencing inhibition. First, by physically interacting with AGO1, the 2b protein is able to block the slicing activity of AGO1 (Zhang et al., 2006). Secondly, by binding directly to siRNAs duplexes it could prevent the antiviral activity of the small RNA (Goto et al., 2007). Although the specific contribution of each function of the 2b protein during the CMV infection process is hard to assess presently, it is clear that the CMV 2b protein facilitates short- and long-distance spread of the virus *in planta*.

Potyvirus HC-Pro

Fundamental studies on potyviruses based on mutagenesis showed that the central part of TEV HC-Pro, but not the N- and C-terminal domains, is required for viral long-distance movement and replication-maintenance functions (Dolja et al., 1993; Cronin et al., 1995; Kasschau and Carrington, 2001). Further experiments correlated both replication and long-distance trafficking functions with the silencing suppression activity of HC-Pro (Kasschau and Carrington, 2001). Conversely to TEV HC-Pro, the N-terminal domain of the HC-Pro of *Tobacco vein mottling virus* (TVMV) and *Papaya ringspot virus* (PRSV) was essential to inhibit RNA silencing (Yap et al., 2009).

Long-distance movement deficiency of *Plum pox potyvirus* (PPV) in tobacco plants could be complemented in transgenic plants expressing the 5′ terminal region of the TEV genome (containing the HC-Pro coding sequence), but not in plants transformed with a mutated form of TEV HC-Pro (Sáenz et al., 2002).

Interestingly, a TuMV mutant, deficient in HC-Pro and unable to move systemically in *A. thaliana* wild-type plants, regained long-distance movement when both RDR1 and RDR6 were knocked out (Garcia-Ruiz et al., 2010). This strongly supports the hypothesis that HC-Pro promotes systemic infection by suppressing an siRNA-dependent activity.

Functional studies on the RSS activity of HC-Pro showed that the protein is able to bind siRNA duplexes and thereby impairs loading of new siRNA into RISC complexes and further compromises the amplification step by the plant RDRs (Lakatos et al., 2006). This fundamental siRNA loading into RISC can also be inhibited indirectly as HC-Pro has the potential to suppress the

3′-terminal methylation of siRNA mediated by HEN-1 (Ebhardt et al., 2005; Jamous et al., 2011). Cleavage activity of programed RISC was however not affected.

Recently, a transcription factor RAV2 induced by the ethylene defense pathway was identified as being required for suppression of silencing mediated by HC-Pro (Endres et al., 2010).

Carmovirus P38 (TCV)

Turnip crinkle virus CP (also referred to as P38) is a multifunctional protein involved in virus assembly, but also in suppression of RNA silencing and in induction of R gene-mediated resistance (Cohen et al., 2000; Qu et al., 2003; Choi et al., 2004). Its direct role in long-distance movement was investigated by uncoupling packaging and RSS functions using a genetic approach and a GFP-labeled TCV deleted of its CP gene (Deleris et al., 2006). The deficient encapsidation function was provided by transgenic plants expressing a TCV CP mutant unable to suppress RNA silencing. The successful sap inoculation of P38-expressing plant by this trans-encapsidated GFP-TCV-ΔCP mutant showed for the first time, that TCV CP promotes systemic trafficking by its RNA silencing suppression activity in an assembly independent way. Similarly, the N-terminal domain of the CP eliciting R gene-mediated resistance is not involved in RNA silencing suppression (Choi et al., 2004). More recently, Cao et al. (2010) reinvestigated the genetic requirements for TCV long-distance movement using *A. thaliana* mutants lacking antiviral silencing activity (*dcl2dcl3dcl4*). By monitoring the propagation of several TCV CP mutants in such plants they observed that only mutants bearing a functional silencing suppression activity could invade the vasculature of systemic leaves. Moreover, in this genetic background, all viral mutants unable to form particles remained restricted to the vascular tissues of upper leaves. These observations suggested the existence of two barriers that could block the systemic spread of TCV. The first barrier would be at the entry point into the vascular bundles and could be overcome by the CP, even if the protein is deficient for encapsidation. The second barrier corresponding to the exit from the vascular bundles of systemically infected leaves would be dependent on virus assembly. The apparent discrepancy between these data and those presented by Deleris et al. (2006) could arise from different experimental conditions (inoculum, organ analyzed) (Cao et al., 2010).

Regarding the mechanism of action of CP as RSS, several studies pointed out different properties that would highlight a possible dual function, reminding the case of the CMV 2b protein (see above). Mérai et al. (2006) showed that TCV CP is able to inhibit the processing of dsRNA into siRNA and that it binds dsRNA in a size-independent manner. This infers that CP inhibits the generation of siRNA from hairpin transcripts by competing with DCL for long dsRNA. This hypothesis is in agreement with the genetic evidence showing that DCL4, which confers the primary antiviral activity in *A. thaliana,* is inhibited in TCV-infected cells (Deleris et al., 2006). Moreover, a recent study demonstrated that the TCV CP is able to interact with AGO1 by mimicking the cellular GW/WG repetitive motif of AGO1-interacting proteins, and thereby interfering with AGO1 functions (Azevedo et al., 2010).

Closterovirus

The genome organization of *Closteroviridae* displays complex and diversified coding capacities. Among the 10 proteins encoded by BYV, two were reported to be enhancers of replication and involved in long-distance movement, the L-Pro and the p21 proteins. Only the latter exhibited silencing suppression activity (Reed et al., 2003). Biochemical studies showed that p21 binds siRNA duplexes (Chapman et al., 2004). The crystal structure of p21 revealed an octameric ring architecture with a large central cavity likely involved in RNA-binding (Ye and Patel, 2005). Although the structure bears no similarity with that of the TBSV p19 RSS, their activity might be very similar by sequestering siRNA duplexes.

The situation is very different for the phloem-restricted CTV. Three silencing suppressors were identified among the 12 proteins encoded by CTV: p20, a homolog of BYV p21, CP, and p23 (Lu et al., 2004). P23 which is unique among closteroviruses (Dolja et al., 2006) is an RNA-binding protein with a Zn-finger motif (López et al., 2000). P23 and p20 inhibit intercellular silencing while p20 and the CP act intracellularly on RNA silencing. Among these proteins, only p20 is potentially involved in long-distance spread in citrus, but no molecular data are yet available to explain its mode of action.

Beet necrotic yellow vein virus p14

By a point mutagenesis approach, the reported RSS of *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV, *Benyvirus*), p14, was shown to be essential for virus long-distance movement in *Beta macrocarpa* (Chiba et al., 2013) while it was dispensable for replication or virus cell-to-cell trafficking. P14 is a zinc-finger cysteine-rich protein that targets the nucleolus. Systemic spread was directly correlated to the silencing suppressor activity but was independent of the specific nucleolar localization. Interestingly, the RSS activity of p14 was found more active in root than in leaves, which makes sense as BNYVV is a soil-transmissible virus (Andika et al., 2012).

RNA MOTIFS

Formation of viral RNP complexes and their transport in SE is likely to require the presence of RNA motifs recognized by viral or cellular proteins. RNA sequences critical for systemic infection were first identified for viroids, these unconventional pathogens which do not encode proteins and are transported over long-distances in the form of RNP complexes (Ding, 2009). Specific RNA loops found on the *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) sequence resemble protein-binding sites on rRNAs (Zhong et al., 2007, 2008; Ding, 2009). These structures could potentially be the target site for phloem proteins like the phloem lectin PP2 which was shown to bind viroid RNA *in vitro* and *in vivo* (Gómez and Pallás, 2001, 2004; Owens et al., 2001).

Identification of RNA motifs required for systemic transport is not restricted to viroids and has recently been shown for benyviruses. Although BNYVV RNA-3 is not required for cell-to-cell movement, it is essential for virus vascular movement in *B. macrocarpa*, but not in *S. oleracea* (Tamada and Abe, 1989; Lauber et al., 1998). Using RNA-3 mutants, Lauber et al. (1998) showed that the sequence essential for movement is located in

an internal "core" domain of RNA-3 and does not require protein expression. RNA-3, and not the encoded proteins, is therefore described as a host-specific long-distance factor for BNYVV. Interestingly, BNYVV RNA-3 can be successfully replaced by *Beet soilborne mosaic benyvirus* (BSBMV) RNA-3 for systemic spread in *B. macrocarpa* (Ratti et al., 2009). A fully conserved 22 nucleotides sequence in BNYVV and BSBMV RNA-3 sequences was designated as the "coremin" sequence. This sequence is also present in BNYVV RNA-5, BSBMV RNA-4, as well as in other viral RNA species belonging to the genus *Cucumovirus* (Ratti et al., 2009). It could therefore represent a viral determinant involved in long-distance movement of different viruses. Site directed mutagenesis of the coremin sequence confirmed the role of this sequence in BNYVV systemic spread in *B. macrocarpa* (Peltier et al., 2012). An even more complex view of benyvirus long-distance trafficking can be underlined as BNYVV RSS p14, was found to take part in this function (Chiba et al., 2013; and previous section on RSS). Additional experiments are required to decipher the molecular mechanism by which the coremin sequence affects benyviruses vascular transport and to identify plant and/or viral partners of this RNA sequence.

HOST DETERMINANTS PROMOTING OR RESTRICTING VIRUS LONG-DISTANCE MOVEMENT

In addition to viral components, host factors can be recruited to assist virus phloem transport. Cellular proteins are potentially involved in the formation of viral complexes and can foster an efficient delivery of such complexes to and through PD. They may also act as stabilizing factors or as protective agents against plant defense mechanisms. Such plant factors were mostly identified by different screens, either genetic using various *A. thaliana* mutants or biochemical using host cDNA libraries in yeast two-hybrid experiments. Host proteins interacting with viral movement determinants and whose implication in virus vascular trafficking has been demonstrated are listed in **Table A2** in Appendix. Most of these cellular proteins are usually host and virus-specific, suggesting that more than a unique molecular process governs virus long-distance transport. This implies also that many more factors remain to be discovered, which will certainly help to unravel the mechanisms by which the cellular components assist viral systemic movement.

In contrast to these factors facilitating virus transport, other plant proteins function to restrict virus long-distance movement leading to virus resistance. Information on these specific cellular determinants is still extremely sparse.

HOST DETERMINANTS THAT PROMOTE VIRUS SYSTEMIC MOVEMENT

Host factors involved in phloem transport of tobamoviruses

A screen of EMS *A. thaliana* treated plants identified a mutant named *vsm1* (virus systemic movement) in which entry of *Turnip vein clearing virus* (TVCV) into vascular tissue is inhibited (Lartey et al., 1997, 1998). The effect of *vsm1* on virus systemic spread seems to be specific to tobamoviruses because transport of TCV, a carmovirus, is not affected by the *vsm1* mutation, whereas long-distance movement of the tomato strain of *Tobacco mosaic virus* (TMV), another tobamovirus, is restrained in the *A. thaliana* mutant (Lartey et al., 1998). Genetic analysis showed that *vsm1* is a recessive mutation at a single locus that has not been mapped yet. As the systemic movement was likely blocked at the level of entering the vascular tissue in the mutant plant, it was hypothesized that VSM1 could assist virus loading into SE (Lartey et al., 1998).

Another recessive resistance gene to TMV-U1 strain was identified in *A. thaliana* Col-0 and named *DSTM1* for Delayed Systemic Tobamovirus Movement 1 (Pereda et al., 2000). Strikingly, virus particles observed in the vascular tissue of this accession displayed a different morphology (curved virions) than those observed in mesophyll cells of Col-0 or in susceptible accessions (rigid rods) (Serrano et al., 2008). This suggests that *DSTM1* may encode a phloem host factor required for correct virion assembly, virus stability or virus transport in the SE.

In addition to *VSM1* and *DSTM1* genes that have not yet been precisely mapped, two known cellular proteins have been shown to participate in long-distance transport of tobamoviruses. Pectin methylesterase (PME), a cell wall protein of tobacco required for cell-to-cell movement of TMV, may also assist virus long-distance transport (Chen et al., 2000; Chen and Citovsky, 2003). Specific inhibition of PME expression in tobacco tissues led to a significant delay of TMV systemic infection. Immunofluorescence confocal microscopy observations of inoculated *PME*-silenced plants showed that the virus is loaded into the host vasculature, but is inefficiently unloaded from the phloem into non-inoculated leaves. These results infer that virion entry into and exit from vasculature are controlled by two different mechanisms, and PME could act at the level of virus egress from SE. Whether an interaction between PME and TMV MP is required for virus phloem unloading has not been addressed (Chen and Citovsky, 2003).

The other protein affecting long-distance transport of tobamoviruses is the IP-L protein of 16.8 kDa, an "elicitor responsive protein," also related to senescence. IP-L was identified by screening a tobacco cDNA library using a yeast two-hybrid assay with the CP of *Tomato mosaic virus* (ToMV) as a bait. Repression of IP-L expression by virus-induced gene silencing (VIGS) led to a delay in virus accumulation in non-inoculated leaves. This suggests that a high expression level of IP-L is important for efficient ToMV systemic infection (Li et al., 2005), a hypothesis sustained by the increased IP-L mRNA accumulation observed in ToMV infected *N. tabacum* (Li et al., 2005). The mechanism by which IP-L affects viral systemic movement is still unknown.

Host factors involved in phloem transport of potyviruses

Using a yeast two-hybrid system screen, a cellular factor interacting with the VPg proteins of different potyviruses was identified from pea and named PVIP for *Potyvirus* VPg-interacting protein (Dunoyer et al., 2004). The PVIP orthologs in *N. benthamiana* and *A. thaliana* exhibit the same ability to bind potyvirus VPg proteins. The VPg determinants involved in the binding are located in the N-terminal part of the protein. The PVIP/VPg interaction was shown to be important for virus movement, as mutations in the VPg sequence preventing its interaction with PVIPs strongly reduced TuMV local and systemic movement (Dunoyer et al., 2004). However, it is not clearly determined whether the effect on long-distance movement is a direct consequence or an indirect effect due to slower cell-to-cell movement. Reduction of

PVIP expression in transgenic RNAi lines showed that PVIP is not required for virus replication, but functions as an ancillary factor for potyvirus movement. PVIP is part of a small gene family of *A. thaliana* whose proteins contain a plant homeodomain (PHD) with the capacity to regulate gene expression through histone modifications (reviewed in Cosgrove, 2006). The *Arabidopsis* PVIP2 and PVIP1 correspond to OBERON1 (OBE1) and OBERON2 (OBE2) respectively, which were described as having redundant functions in the establishment and/or maintenance of the shoot and root apical meristems (Saiga et al., 2008; Thomas et al., 2009). They also act as central regulators in auxin-mediated control of development (Thomas et al., 2009). The nuclear localization of both VPg (Restrepo et al., 1990; Rajamäki and Valkonen, 2009) and PVIP factors (Saiga et al., 2008) raises the possibility that PVIP/VPg interaction may modulate expression of host genes involved in virus movement.

A resistance screen of several *A. thaliana* accessions identified a recessive resistance gene, referred to as *SHA3*, which strictly restricts PPV long-distance movement. By genetic linkage and genome-wide association analyses, the gene was positioned at the bottom of chromosome 3 in a cluster of 13 genes encoding *RTM3* (a resistance gene involved in the restriction of potyvirus long-distance movement; see below) and *RTM3*-likes genes (Pagny et al., 2012). However, the two genes *SHA3* and *RTM3,* both involved in potyvirus long-distance transport, were shown to be distinct genes. The cloning of *SHA3* will be an important breakthrough, as it will represent the first identified susceptibility factor directly involved in potyvirus systemic movement.

Role of the nucleolar fibrillarin in viral long-distance movement

There is growing evidence that fibrillarin, a major nucleolar protein essential for RNA processing, functions in long-distance transport of RNA viruses. This implies a nucleolar phase in the virus life cycle, which is the case for umbraviruses (see above; Taliansky et al., 2010). *A. thaliana* fibrillarin expression knockdown by RNA silencing did not affect umbravirus replication, nor virus cell-to-cell movement, but inhibited virus long-distance transport (Kim et al., 2007b). Fibrillarin interacts directly with the GRV long-distance movement factor (ORF3 protein) and this interaction induces a redistribution of the fibrillarin/ORF3 protein complexes in the cytoplasm. Such complexes associate with viral RNA to form RNP particles which are then transported from cell-to-cell, and ultimately loaded into SE for virus systemic movement (Kim et al., 2007a). Implication of fibrillarin in virus long-distance trafficking is likely not limited to umbraviruses because PLRV (*Polerovirus*) is unable to move systemically in fibrillarin-silenced plants, while viral accumulation in inoculated leaves remains unaffected (Kim et al., 2007b). Viruses from the *Virgaviridae* family, like PMTV and PSLV, represent other examples for which the MP TGB1 localizes to the nucleolus and interacts with fibrillarin (see above; Wright et al., 2010; Semashko et al., 2012a). Whether fibrillarin is involved in long-distance movement of these viruses has not been established yet.

Role of Tcoi1 and PP1 in Cucumber mosaic virus movement

A yeast two-hybrid screen of a *N. tabacum* cDNA library with the CMV-1a protein, a replication essential protein, led to the identification of the *Tcoi1* gene product (Kim et al., 2008). Tcoi1 protein contains a methyltransferase domain that interacts with the CMV-1a protein leading to methylation of the viral protein (Kim et al., 2008). When over-expressed in transgenic plants, Tcoi1 protein increased CMV RNA accumulation in non-inoculated leaves. The opposite effect was observed in transgenic plants where *Tcoi* expression was reduced. Conversely, CMV infectivity was not affected by Tcoi1 in inoculated leaves, supporting that Tcoi1 influences CMV long-distance movement (Kim et al., 2008). Overall, these data suggest that protein methylation is crucial for CMV-1a function, thereby facilitating viral replication and/or systemic movement.

P48 is another protein, identified in *C. sativus* phloem exudate, potentially involved in CMV long-distance transport and showing virus-binding capacity (Requena et al., 2006). P48 is homologous to *Cucurbita maxima* PP1, a 96 kDa protein synthesized in CC, found in P-protein filaments together with PP2, and which can be translocated with the phloem stream (Requena et al., 2006). Interaction between p48 and CMV viral particles is partially responsible for the increased resistance of virions to RNase A when they are mixed with phloem exudate (Requena et al., 2006). Based on these results, it is conceivable that CMV virions-p48 complexes could be important for CMV particle stability, virion release into SE or virion transport in the sap.

HOST DETERMINANTS WHICH RESTRICT VIRUS LONG-DISTANCE MOVEMENT

Virus resistance can be achieved by blocking virus long-distance movement. A few examples of such resistance have been genetically characterized for several viruses (Caranta et al., 1997, 2002; Mahajan et al., 1998; Revers et al., 2003; Decroocq et al., 2006; Maule et al., 2007), but only few genes were identified by cloning.

cdiGRP and callose deposition

Experiments performed by Ueki and Citovsky (2002) showed that TMV and TVCV (*Tobamovirus*) systemic movement was reduced in tobacco plants treated specifically with low but not with high concentrations of the heavy metal cadmium. Using cDNA library subtraction experiments, a glycine-rich protein (GRP), which expression is specifically induced by low cadmium level, was identified and named cadmium-ion-induced GRP protein (cdiGRP). This vascular protein is localized in the cell wall of SE and CC. It contains an amino-terminal secretion signal, an internal glycine-rich domain and a carboxy-proximal cysteine-rich domain which could be responsible for protein cell wall targeting. Antisense expression of the cdiGRP cDNA in tobacco plants reduced cdiGRP mRNA accumulation in cadmium-treated plants, and allowed systemic movement of TVCV. Conversely, over-expression of cdiGRP reduces TVCV systemic movement by preventing the exit of virions from vascular bundles, which reinforces the role of cdiGRP in restricting virus long-distance trafficking. The blocking capacity of cdiGRP may be explained by callose deposition in the cell wall of phloem cells observed after cadmium treatment, or after constitutive expression of cdiGRP.

RTM genes

A genetic screen of EMS-mutagenized *A. thaliana* Col-0 populations identified several mutants allowing long-distance movement

of TEV in an ecotype that normally restricts the virus to inoculated leaves. The identified *RTM* (for Restricted TEV Movement) resistance genes are dominant and effective against several potyviruses (Mahajan et al., 1998; Revers et al., 2003; Decroocq et al., 2006). In this resistance process, viral replication and cell-to-cell movement in inoculated leaves are not affected, HR and systemic acquired resistance (SAR) are not triggered and salicylic acid is not involved (Mahajan et al., 1998). Genetic characterization of natural *A. thaliana* accessions and *A. thaliana* mutants showed that at least five dominant genes, named *RTM1*, *RTM2*, *RTM3*, *RTM4*, and *RTM5*, are involved in this resistance (Mahajan et al., 1998; Whitham et al., 1999; Cosson et al., 2012). A single mutation in one of the RTM genes is sufficient to abolish the resistance phenotype (Whitham et al., 1999). RTM1 encodes a protein belonging to the jacalin family (Chisholm et al., 2000). RTM2 expresses a protein with similarities to small heat shock proteins and contains a transmembrane domain (Whitham et al., 2000). RTM3 belongs to a meprin and TRAF homology (MATH) domain protein family, and possesses a coiled-coil domain at its C-terminal end. In addition, it was shown that RTM3 interacts with RTM1 (Cosson et al., 2010). RTM4 and RTM5 have only been genetically characterized (Cosson et al., 2012). RTM1 and RTM2 are specifically expressed in phloem-associated tissues and the corresponding proteins localize to SE (Chisholm et al., 2001). Despite the fact that the CP of potyviruses is the viral determinant overcoming the RTM resistance (Decroocq et al., 2009), none of the RTM proteins has been found to interact with CP (Cosson et al., 2010). However, interaction between CP, or whole virions, with RTM proteins mediated by additional cellular or viral proteins is still conceivable. Indeed, self- and cross-interactions of RTM1 and RTM3 were observed which suggest that these proteins may be part of a larger protein complex (Cosson et al., 2010). Different hypothesis can be proposed regarding the RTM resistance mechanism: (i) virus particles, in the process of being loaded into SE, could be sequestered by the RTM complex; (ii) the RTM complex could reduce virus accessibility to cellular factor(s) or structure(s) required for potyvirus long-distance movement; (iii) RTM complex could activate a movement-restricting response of the plant following virus infection.

Proteolysis

A study on PVX long-distance movement suggested an unexpected role of protein degradation in viral phloem exit. PVX TGB1 and CP were fused to GFP and expressed in transgenic *N. benthamiana* under the control of a CC-specific promoter (Mekuria et al., 2008). Whereas the fusion proteins were largely confined to the vasculature in petioles and leaves, indicating their inability to exit the phloem, they spread into mesophyll cells in plants treated with proteasome inhibitors. A similar effect was observed in plants infected with PVX. These data raise the intriguing hypothesis that proteolysis could play a role in restricting viral proteins in the phloem, and that PVX has the ability to protect its own proteins from proteasomal degradation (Mekuria et al., 2008). Further molecular and genetic studies are required to decipher the underlying mechanism. These data point out that the proteasome degradation process may be active in the phloem which is in accordance with the detection of many proteasome components in the SE (Lin et al., 2009; Dinant and Lemoine, 2010). Another study by Jin et al. (2006) showed that down-regulation of the 26S proteasome subunit RPN9 alters vascular development and leads to inhibition of viral systemic infection. However, the effect on virus long-distance movement could also originate from pleiotropic effects due to alteration of the plant vasculature.

SA-mediated defense response

In addition to its essential role in the development of the hypersensitive response (HR) and the SAR (Vlot et al., 2009), salicylic acid (SA) may restrict long-distance movement of plant viruses as exemplified in several studies.

In tobacco and in *A. thaliana* plants treated with SA, CMV systemic movement is delayed whereas virus replication and cell-to-cell movement are unaffected in inoculated leaves. This SA-induced inhibition of CMV systemic movement involves the mitochondrial signaling pathway (Naylor et al., 1998; Mayers et al., 2005). Ji and Ding (2001) showed that systemic movement of a CMV mutant that does not express the RSS 2b, was completely blocked by SA treatment in young *N. glutinosa* seedlings, while the wild-type CMV spread was unaffected. This assay evidenced that the CMV 2b protein antagonized the SA-based host defense mechanism. However, the RSS activity of the CMV 2b protein (see above section) may overlap the effect on SA-resistance. Lewsey and Carr (2009) showed that in *A. thaliana* DCLs 2, 3, and 4 are dispensable for SA-induced resistance to CMV which means that the RNA silencing pathway controlled by these three DCLs is not involved in SA-induced resistance.

Another evidence showing that SA is involved in virus long-distance transport comes from PPV inoculation experiments on *N. tabacum* plants. Although PPV replicates and moves from cell-to-cell in the inoculated leaves, it cannot reach non-inoculated leaves in this host (Sáenz et al., 2002; Alamillo et al., 2006). However, PPV was able to move systematically in transgenic tobacco plants expressing either HC-Pro of TEV or the *NahG* gene encoding the bacterial salicylate hydroxylase, a SA-degrading enzyme (Alamillo et al., 2006). Interestingly, double transgenic plants expressing both TEV HC-Pro and the *NahG* gene showed increased spread of PPV, suggesting that RNA silencing and SA-mediated defense have additive effects on PPV infection.

Finally, inhibition of CaMV long-distance movement was also observed in *cpr1* and *cpr5 A. thaliana* mutants possessing a constitutive over-expression of SA due to the absence of negative regulators of the SA metabolic pathway (Love et al., 2007). Transgenic *A. thaliana* CaMV-encoded RSS P6 protein showed repression of SA-responsive genes, inferring that P6 may inhibit SA-mediated effect (Love et al., 2012). However, SA-deficient *A. thaliana* mutants did not exhibit enhanced susceptibility to CaMV. A plausible mechanism for the enhanced resistance of *cpr* mutants to CaMV could be that, as already suggested in some examples (Xie et al., 2001; Alamillo et al., 2006), SA-dependent defense responses may act synergistically with RNA silencing. These controversial data may arise from experimental conditions settings or from the different mechanisms of action of the RSS. Further investigations are required to shed light on these intricate pathways.

IMPACT OF VIRUS TRANSPORT IN THE PHLOEM ON VIRUS TITER AND DIVERSITY

As previously mentioned, long-distance movement of plant viruses is composed of different steps comprising virus loading (entry) into the phloem tissue, virus movement inside SE, and virus unloading (exit) into cells of the sink tissue. Each of these steps represents a potential barrier for virus trafficking and several examples of viruses blocked at one stage or another were described in this review. Whether the crossing of such cell interfaces induces bottlenecks in a virus population constitutes a new challenge for the future because data on this issue are still sparse. The first quantitative analysis of a virus population in the vasculature has recently being conducted on CaMV using measures of virus titer in aphids as a reflection of virus load in the sap (Gutiérrez et al., 2012a,b). Whereas CaMV overall concentration in the different leaves was relatively constant, the number of genome copies circulating in the sap varied depending of the leaf stage: the number of viral genome increased progressively as the infection progresses and after reaching a maximum, it decreases in the youngest leaves late in infection. The virus titer within the plant vasculature correlates with the multiplicity of cellular infection (the number of viral genomes entering and replicating within a cell) among leaf levels (Gutiérrez et al., 2010, 2012a). In this specific case, the bottleneck is driven by the virus load in the sap. Several hypotheses were raised by the authors to explain this drop in virus load late in infection like an arrest of virion export from infected leaves, an increased virus degradation rate within the sap or a massive storage of virions in unknown plant compartments.

However, evolution of a viral population in infected plants does not seem to always fit the CaMV model. For instance, the viral population, or the genetic bottlenecks, may not be related to the amount of viruses circulating in the sap, but may be rather driven by physical host barriers like the structure of the minor veins or the characteristics of the PD. This situation is exemplified by CMV for which a constant loss of genetic diversity was observed all along the infection (Li and Roossinck, 2004; Ali and Roossinck, 2010). Therefore, in this particular case, virus long-distance transport plays a significant role in reducing virus population variation. Interestingly, these studies on CMV also highlighted the high impact of the host on the genetic bottlenecks, which may explain the virus population diversity in different hosts.

From these data, it has been suggested that the size of the virus population invading the sink organs from vasculature depends either on the concentration of virus in sap or on barriers imposed by the host (Gutiérrez et al., 2012b). However, it is very likely that a range of intermediate situations exists between these two opposite scenarios and more efforts are now required to better understand the viral population dynamics in vasculature for a wide and diverse panel of virus species.

CONCLUDING REMARKS

In the last two decades many viral determinants involved in systemic invasion of plants have been identified or better characterized. It is now well established that beside the CP, many non-structural viral proteins (MP, TGB1, VPg, RSS, . . .) and even structural motifs on viral RNA are implicated in virus long-distance transport. It becomes also clearer that in addition to the predominant virions, RNP complexes constitute an important form of long-distance spread and that several forms of viral devices can even co-exist, in the same host. Understanding whether there is a specialization of these different forms, either in the time course of infection or for the crossing of the various cell borders or even in some specific environments (host species, developmental stage, or stress of the plant) will be a serious challenge. Plant physiology and virology are associated disciplines that should provide reciprocal feedbacks for the understanding of transport processes in phloem. In particular, a better knowledge of the structure and function of the various cell types composing the vascular tissues and the specialized PD at each cell interface would be greatly beneficial for virology. In addition, a deeper characterization of plant defense responses (RNAi, SA-mediated resistance) induced during virus systemic movement is necessary to decipher their molecular mechanisms and their connexions with the viral life cycle. Finally, although many RSS with apparently very diverse modes of action were identified for most viruses, their precise involvement in virus systemic spread remains an essential issue. Among others, the question of how and where viral RSSs interfere with the movement of the extremely abundant siRNA is puzzling.

An emerging field of research that appeared very recently concerns the size of virus population moving in the SE and able to invade the distant organs from the vasculature. Regulation of the virus population through the phloem involves very tightly regulated barriers that are essential check-points for plant development (Dinant and Lemoine, 2010). By restricting the flow of photoassimilates, the plant may regulate at the same time dispersal of pathogens throughout the plant. From the virus point of view, regulating the population dynamics in the vasculature has profound consequences on virus transmission by phloem feeding insects but also on virus evolution. However, investigations on additional virus models than the one studied so far will be necessary to get a broader view on the influence of viral long-distance movement on the epidemiology of virus diseases.

Finally from an agronomical point of view, identification of plant proteins required for viral systemic movement can potentially generate new sources of virus resistance in crops. Selecting from natural populations or by genetic engineering plants deficient for cellular proteins required in viral cycle is an efficient strategy to develop recessive resistance genes against viruses (Maule et al., 2007; Gómez et al., 2009; Truniger and Aranda, 2009; Wang and Krishnaswamy, 2012). In particular, the advent of new technologies such as Targeting-Induced Local Lesions IN Genome (TILLING), EcoTILLING, high-resolution melting (HRM), KeyPoint and next-generation sequencing, may boost the identification of target gene mutants from artificially induced mutant libraries or natural populations, especially in agronomically important crops (Nieto et al., 2007; Hofinger et al., 2009; Rigola et al., 2009; Ibiza et al., 2010; Piron et al., 2010). Genetic resistance can also be generated by silencing or overexpressing the candidate genes depending on the beneficial or the detrimental role of the cellular protein involved in virus long-distance movement (Wang and Krishnaswamy, 2012; Wang et al., 2013).

However, these strategies may be of limited use as they may also strongly affect plant macromolecule transport and consequently plant development. Nevertheless, the current lack of efficient methods to restrict or eradicate plant viruses should foster the exploration of these new strategies.

ACKNOWLEDGMENTS

C. Hipper is supported by a fellowship from the French Ministry of Education and Research. This work was funded by the "Génomique des plantes" program of the French Agence Nationale de la Recherche ANR-08-GENM-016-001 (Viromouv).

REFERENCES

Alamillo, J. M., Saénz, P., and García, J. A. (2006). Salicylic acid-mediated and RNA-silencing defense mechanisms cooperate in the restriction of systemic spread of plum pox virus in tobacco. *Plant J.* 48, 217–227.

Ali, A., and Roossinck, M. J. (2010). Genetic bottlenecks during systemic movement of Cucumber mosaic virus vary in different host plants. *Virology* 404, 279–283.

Allison, R. F., Thompson, C., and Ahlquist, P. (1990). Regeneration of a functional RNA virus genome by recombination between deletion mutants and requirement for cowpea chlorotic mottle virus 3a and coat genes for systemic infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 1820–1824.

Alzhanova, D. V., Hagiwara, Y., Peremyslov, V. V., and Dolja, V. V. (2000). Genetic analysis of the cell-to-cell movement of beet yellows closterovirus. *Virology* 268, 192–200.

Andika, I. B., Kondo, H., Nishiguchi, M., and Tamada, T. (2012). The cysteine-rich proteins of beet necrotic yellow vein virus and tobacco rattle virus contribute to efficient suppression of silencing in roots. *J. Gen. Virol.* 93, 1841–1850.

Andrianifahanana, M., Lovins, K., Dute, R., Sikora, E., and Murphy, J. F. (1997). Pathway for phloem-dependent movement of Pepper mottle potyvirus in the stem of *Capsicum annuum*. *Phytopathology* 87, 892–898.

Azevedo, J., Garcia, D., Pontier, D., Ohnesorge, S., Yu, A., Garcia, S., et al. (2010). Argonaute quenching and global changes in dicer homeostasis caused by a pathogen-encoded GW repeat protein. *Genes Dev.* 24, 904–915.

Batailler, B., Lemaître, T., Vilaine, F., Sanchez, C., Renard, D., Cayla, T., et al. (2012). Soluble and filamentous proteins in *Arabidopsis* sieve elements. *Plant Cell Environ.* 35, 1258–1273.

Benitez-Alfonso, Y., Faulkner, C., Ritzenthaler, C., and Maule, A. J. (2010). Plasmodesmata: gateways to local and systemic virus infection. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23, 1403–1412.

Betti, C., Lico, C., Maffi, D., Angeli, S. D., Altamura, M. M., Benvenuto, E., et al. (2011). Potato virus X movement in *Nicotiana benthamiana*: new details revealed by chimeric coat protein variants. *Mol. Plant Pathol.* 13, 198–203.

Boulton, M., Steinkellner, H., Donson, J., Markham, P. G., King, D. I., and Davies, J. W. (1989). Mutational analysis of the virion-sense genes of maize streak virus. *J. Gen. Virol.* 70, 2309–2323.

Brault, V., Bergdoll, M., Mutterer, J., Prasad, V., Pfeffer, S., Erdinger, M., et al. (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., Mutterer, J. D., Scheidecker, D., Simonis, M. T., Herrbach, E., Richards, K., et al. (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.

Brigneti, G., Voinnet, O., Li, W. X., Ji, L. H., Ding, S. W., and Baulcombe, D. C. (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J.* 17, 6739–6746.

Bruyère, A., Brault, V., Ziegler-Graff, V., Simonis, M. T., Van Den Heuvel, J. F., Richards, K., et al. (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.

Burgyán, J., and Havelda, Z. (2011). Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci.* 16, 265–272.

Canetta, E., Kim, S. H., Kalinina, N. O., Shaw, J., Adya, A. K., Gillespie, T., et al. (2008). A plant virus movement protein forms ringlike complexes with the major nucleolar protein, fibrillarin, in vitro. *J. Mol. Biol.* 376, 932–937.

Cao, M., Ye, X., Willie, K., Lin, J., Zhang, X., Redinbaugh, M. G., et al. (2010). The capsid protein of turnip crinkle virus overcomes two separate defense barriers to facilitate systemic movement of the virus in *Arabidopsis*. *J. Virol.* 84, 7793–7802.

Caranta, C., Lefebvre, V., and Palloix, A. (1997). Polygenic resistance of pepper to potyviruses consists of a combination of isolate-specific and broad-spectrum quantitative trait loci. *Mol. Plant Microbe Interact.* 10, 872–878.

Caranta, C., Pflieger, S., Lefebvre, V., Daubèze, A. M., Thabuis, A., and Palloix, A. (2002). QTLs involved in the restriction of cucumber mosaic virus (CMV) long-distance movement in pepper. *Theor. Appl. Genet.* 104, 586–591.

Carrington, J. C., Kasschau, K. D., Mahajan, S. K., and Schaad, M. C. (1996). Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants. *Plant Cell* 8, 1669–1681.

Chapman, E. J., Prokhnevsky, A. I., Gopinath, K., Dolja, V. V., and Carrington, J. C. (2004). Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev.* 18, 1179–1186.

Chen, M.-H., and 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., and 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 J.* 19, 913–920.

Cheng, N. H., Su, C. L., Carter, S. A., and Nelson, R. S. (2000). Vascular invasion routes and systemic accumulation patterns of tobacco mosaic virus in *Nicotiana benthamiana*. *Plant J.* 23, 349–362.

Chiba, S., Hleibieh, K., Delbianco, A., Klein, E., Ratti, C., Ziegler-Graff, V., et al. (2013). The benyvirus RNA silencing suppressor is essential for long-distance movement, requires both zinc-finger and NoLS basic residues but not a nucleolar localization for its silencing-suppression activity. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26, 168–181.

Chisholm, S. T., Mahajan, S. K., Whitham, S. A., Yamamoto, M. L., and Carrington, J. C. (2000). Cloning of the *Arabidopsis* RTM1 gene, which controls restriction of long-distance movement of tobacco etch virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 489–494.

Chisholm, S. T., Parra, M. A., Anderberg, R. J., and Carrington, J. C. (2001). *Arabidopsis* RTM1 and RTM2 genes function in phloem to restrict long-distance movement of Tobacco etch virus 1. *Plant Physiol.* 127, 1667–1675.

Choi, C. W., Qu, F., Ren, T., Ye, X., and Morris, T. J. (2004). RNA silencing-suppressor function of Turnip crinkle virus coat protein cannot be attributed to its interaction with the *Arabidopsis* protein TIP. *J. Gen. Virol.* 85, 3415–3420.

Cohen, Y., Gisel, A., and Zambryski, P. C. (2000). Cell-to-cell and systemic movement of recombinant green fluorescent protein-tagged turnip crinkle viruses. *Virology* 273, 258–266.

Cosgrove, M. S. (2006). PHinDing a new histone "effector" domain. *Structure* 14, 1096–1098.

Cosson, P., Schurdi-Levraud, V., Le, Q. H., Sicard, O., Caballero, M., Roux, F., et al. (2012). The RTM resistance to potyviruses in *Arabidopsis thaliana*: natural variation of the RTM genes and evidence for the implication of additional genes. *PLoS ONE* 7:e39169. doi:10.1371/journal.pone.0039169

Cosson, P., Sofer, L., Le, Q. H., Léger, V., Schurdi-Levraud, V., Whitham, S. A., et al. (2010). RTM3, which controls long-distance movement of potyviruses, is a member of a new plant gene family encoding a meprin and TRAF homology domain-containing protein. *Plant Physiol.* 154, 222–232.

Cotton, S., Grangeon, R., Thivierge, K., Mathieu, I., Ide, C., Wei, T., et al. (2009). Turnip mosaic virus RNA replication complex vesicles are mobile, align with microfilaments, and are each derived from a single viral genome. *J. Virol.* 83, 10460–10471.

Cronin, S., Verchot, J., Haldeman-Cahill, R., Schaad, M. C., and Carrington, J. C. (1995). Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* 7, 549–559.

Cruz, S., Roberts, A., Prior, D., Chapman, S., and Oparka, K. (1998). Cell-to-cell and phloem-mediated transport of potato virus X. The role of virions. *Plant Cell* 10, 495–510.

Dalmay, T., Rubino, L., Burgyan, J., and Russo, M. (1992). Replication and movement of a Coat protein mutant of *Cymbidium* Ringspot Tombusvirus. *Mol. Plant Microbe Interact.* 5, 379–383.

Decroocq, V., Salvador, B., Sicard, O., Glasa, M., Cosson, P., Svanella-Dumas, L., et al. (2009). The determinant of potyvirus ability to overcome the RTM resistance of *Arabidopsis thaliana* maps to the N-terminal region of the coat protein. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 1302–1311.

Decroocq, V., Sicard, O., Alamillo, J. M., Lansac, M., Eyquard, J.-P., García, J. A., et al. (2006). Multiple resistance traits control Plum pox virus infection in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 19, 541–549.

Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K. D., Carrington, J. C., and Voinnet, O. (2006). Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313, 68–71.

Desvoyes, B., and Scholthof, H. B. (2002). Host-dependent recombination of a tomato bushy stunt virus coat protein mutant yields truncated capsid subunits that form virus-like complexes which benefit systemic spread. *Virology* 304, 434–442.

Díaz-Pendón, J. A., and Ding, S.-W. (2008). Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 46, 303–326.

Diaz-Pendon, J. A., Li, F., Li, W.-X., and Ding, S.-W. (2007). Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in *Arabidopsis* is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *Plant Cell* 19, 2053–2063.

Dinant, S., and Lemoine, R. (2010). The phloem pathway: new issues and old debates. *C. R. Biol.* 333, 307–319.

Ding, B. (2009). The biology of viroid-host interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47, 105–131.

Ding, S. W., Li, W. X., and 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.

Ding, S.-W., and Voinnet, O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130, 413–426.

Doering-Saad, C., Newbury, H. J., Bale, J. S., and Pritchard, J. (2002). Use of aphid stylectomy and RT-PCR for the detection of transporter mRNAs in sieve elements. *J. Exp. Bot.* 53, 631–637.

Dolja, V. V., Haldeman, R., Robertson, N. L., Dougherty, W. G., and Carrington, J. C. (1994). Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO J.* 13, 1482–1491.

Dolja, V. V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A. E., Vandenbosch, K. A., and Carrington, J. C. (1995). Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long-distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology* 206, 1007–1016.

Dolja, V. V., Herndon, K. L., Pirone, T. P., and Carrington, J. C. (1993). Spontaneous mutagenesis of a plant potyvirus genome after insertion of a foreign gene. *J. Virol.* 67, 5968–5975.

Dolja, V. V., Kreuze, J. F., and Valkonen, J. P. T. (2006). Comparative and functional genomics of closteroviruses. *Virus Res.* 117, 38–51.

Dunoyer, P., Schott, G., Himber, C., Meyer, D., Takeda, A., Carrington, J. C., et al. (2010). Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. *Science* 328, 912–916.

Dunoyer, P., Thomas, C., Harrison, S., Revers, F., and 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.

Ebhardt, H. A., Thi, E. P., Wang, M.-B., and Unrau, P. J. (2005). Extensive 3′ modification of plant small RNAs is modulated by helper component-proteinase expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 13398–13403.

Endres, M. W., Gregory, B. D., Gao, Z., Foreman, A. W., Mlotshwa, S., Ge, X., et al. (2010). Two plant viral suppressors of silencing require the ethylene-inducible host transcription factor RAV2 to block RNA silencing. *PLoS Pathog.* 6:e1000729. doi:10.1371/journal.ppat.1000729

Esau, K., and Hoefert, L. L. (1972). Development of infection with beet western yellows virus in the sugarbeet. *Virology* 48, 724–738.

Flasinski, S., Dzianott, A., Speir, J. A., Johnson, J. E., and Bujarski, J. J. (1997). Structure-based rationale for the rescue of systemic movement of brome mosaic virus by spontaneous second-site mutations in the coat protein gene. *J. Virol.* 71, 2500–2504.

Folimonova, S. Y., Folimonov, A. S., Tatineni, S., and Dawson, W. O. (2008). Citrus tristeza virus: survival at the edge of the movement continuum. *J. Virol.* 82, 6546–6556.

Fuentes, A. L., and Hamilton, R. I. (1993). Failure of long-distance movement of southern bean mosaic virus in a resistant host is correlated with lack of normal virion formation. *J. Gen. Virol.* 74, 1903–1910.

Garcia-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E. J., Sullivan, C. M., Fahlgren, N., Brempelis, K. J., et al. (2010). *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection. *Plant Cell* 22, 481–496.

Germundsson, A., and Valkonen, J. P. T. (2006). P1- and VPg-transgenic plants show similar resistance to Potato virus A and may compromise long distance movement of the virus in plant sections expressing RNA silencing-based resistance. *Virus Res.* 116, 208–213.

Gómez, G., and Pallás, V. (2001). Identification of an in vitro ribonucleoprotein complex between a viroid RNA and a phloem protein from cucumber Plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14, 910–913.

Gómez, G., and Pallás, V. (2004). A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex in vivo with hop stunt viroid RNA. *J. Virol.* 78, 10104–10110.

Gómez, P., Rodriguez-Hernandez, A. M., Moury, B., and Aranda, M. A. (2009). Genetic resistance for the sustainable control of plant virus diseases: breeding, mechanisms and durability. *Eur. J. Plant Pathol.* 125, 1–22.

Gopinath, K., and Kao, C. C. (2007). Replication-independent long-distance trafficking by viral RNAs in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 19, 1179–1191.

Gosalvez-Bernal, B., Genoves, A., Navarro, J. A., Pallas, V., and Sanchez-Pina, M. (2008). Distribution and pathway for phloem-dependent movement of Melon necrotic spot virus in melon plants. *Mol. Plant Pathol.* 9, 447–461.

Goto, K., Kobori, T., Kosaka, Y., Natsuaki, T., and Masuta, C. (2007). Characterization of silencing suppressor 2b of cucumber mosaic virus based on examination of its small RNA-binding abilities. *Plant Cell Physiol.* 48, 1050–1060.

Guo, H. S., and Ding, S. W. (2002). A viral protein inhibits the long range signaling activity of the gene silencing signal. *EMBO J.* 21, 398–407.

Schaad, M. C., Jensen, P. E., and Carrington, J. C. (1997b). Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J.* 16, 4049–4059.

Gutiérrez, S., Michalakis, Y., and Blanc, S. (2012a). Virus population bottlenecks during within-host progression and host-to-host transmission. *Curr. Opin. Virol.* 2, 546–555.

Gutiérrez, S., Yvon, M., Pirolles, E., Garzo, E., Fereres, A., Michalakis, Y., et al. (2012b). Circulating virus load determines the size of bottlenecks in viral populations progressing within a host. *PLoS Pathog.* 8:e1003009. doi:10.1371/journal.ppat.1003009

Gutiérrez, S., Yvon, M., Thébaud, G., Monsion, B., Michalakis, Y., and Blanc, S. (2010). Dynamics of the multiplicity of cellular infection in a plant virus. *PLoS Pathog.* 6:e1001113. doi:10.1371/journal.ppat.1001113

Hämäläinen, J. H., Kekarainen, T., Gebhardt, C., Watanabe, K. N., and Valkonen, J. P. (2000). Recessive and dominant genes interfere with the vascular transport of Potato virus A in diploid potatoes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 402–412.

Havelda, Z., Hornyik, C., Crescenzi, A., and Burgyán, J. (2003). In situ characterization of *Cymbidium* Ringspot Tombusvirus infection-induced posttranscriptional gene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *J. Virol.* 77, 6082–6086.

Heaton, L. A., Lee, T. C., Wei, N., and Morris, T. J. (1991). Point mutations in the Turnip crinkle virus capsid protein affect the symptoms expressed by *Nicotiana benthamiana*. *Virology* 183, 143–150.

Herranz, M. C., Pallas, V., and Aparicio, F. (2012). Multifunctional roles for the N-terminal basic motif of Alfalfa mosaic virus coat protein: nucleolar/cytoplasmic shuttling, modulation of RNA-binding activity, and virion formation. *Mol. Plant Microbe Interact.* 25, 1093–1103.

Hofinger, B., Jing, H.-C., Hammond-Kosack, K., and Kanyuka, K. (2009). High-resolution melting analysis of cDNA-derived PCR amplicons for rapid and cost-effective identification of novel alleles in barley. *Theor. Appl. Genet.* 119, 851–865.

Hofius, D., Herbers, K., Melzer, M., Omid, A., Tacke, E., Wolf, S., et al. (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.

Holt, C. A., and Beachy, R. N. (1991). In vivo complementation of infectious transcripts from mutant tobacco mosaic virus cDNAs in transgenic plants. *Virology* 181, 109–117.

Ibiza, V., Canizares, J., and Nuez, F. (2010). EcoTILLING in Capsicum species: searching for new virus resistances. *BMC Genomics* 11:631. doi:10.1186/1471-2164-11-631

Ivanov, K. I., Puustinen, P., Gabrenaite, R., Vihinen, H., Rönnstrand, L., Valmu, L., et al. (2003). Phosphorylation of the potyvirus capsid protein by protein kinase ck2 and its relevance for virus infection. *Plant Cell* 15, 2124–2139.

Jackson, A. O., Lim, H.-S., Bragg, J., Ganesan, U., and Lee, M. Y. (2009). Hordeivirus replication, movement, and pathogenesis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47, 385–422.

Jamous, R. M., Boonrod, K., Fuellgrabe, M. W., Ali-Shtayeh, M. S., Krczal, G., and 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.

Jeffrey, J. L., Pooma, W., and Petty, I. T. (1996). Genetic requirements for local and systemic movement of tomato golden mosaic virus in infected plants. *Virology* 223, 208–218.

Ji, L. H., and 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, J., and Laliberté, J.-F. (2011). The genome-linked protein VPg of plant viruses-a protein with many partners. *Curr. Opin. Virol.* 1, 347–354.

Jin, H., Li, S., and Villegas, A. J. (2006). Down-regulation of the 26S proteasome subunit RPN9 inhibits viral systemic transport and alters plant vascular development. *Plant Physiol.* 142, 651–661.

Kalantidis, K., Schumacher, H. T., Alexiadis, T., and Helm, J. M. (2008). RNA silencing movement in plants. *Biol. Cell* 100, 13–26.

Kao, C. C., Ni, P., Hema, M., Huang, X., and Dragnea, B. (2011). The coat protein leads the way: an update on basic and applied studies with the Brome mosaic virus coat protein. *Mol. Plant Pathol.* 12, 403–412.

Kaplan, I. B., Lee, L., Ripoll, D. R., Palukaitis, P., Gildow, F., and 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.

Kasschau, K. D., and Carrington, J. C. (2001). Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. *Virology* 285, 71–81.

Kim, M. J., Huh, S. U., Ham, B.-K., and Paek, K.-H. (2008). A novel methyltransferase methylates Cucumber mosaic virus 1a protein and promotes systemic spread. *J. Virol.* 82, 4823–4833.

Kim, S. H., Macfarlane, S., Kalinina, N. O., Rakitina, D. V., Ryabov, E. V., Gillespie, T., et al. (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., et al. (2007b). Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. *EMBO J.* 26, 2169–2179.

Knorr, D. A., and Dawson, W. O. (1988). A point mutation in the tobacco mosaic virus capsid protein gene induces hypersensitivity in *Nicotiana sylvestris. Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 85, 170–174.

Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E. J., Carrington, J. C., Liu, Y.-P., et al. (2006). Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J.* 25, 2768–2780.

Lartey, R. T., Ghoshroy, S., and Citovsky, V. (1998). Identification of an *Arabidopsis thaliana* mutation (vsm1) that restricts systemic movement of tobamoviruses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11, 706–709.

Lartey, R. T., Ghoshroy, S., Ho, J., and Citovsky, V. (1997). Movement and subcellular localization of a tobamovirus in *Arabidopsis. Plant J.* 12, 537–545.

Lauber, E., Guilley, H., Tamada, T., Richards, K. E., and Jonard, G. (1998). Vascular movement of beet necrotic yellow vein virus in Beta macrocarpa is probably dependent on an RNA 3 sequence domain rather than a gene product. *J. Gen. Virol.* 79, 385–393.

Lee, L., Kaplan, I. B., Ripoll, D. R., Liang, D., Palukaitis, P., and 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., and 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.

Léonard, S., Viel, C., Beauchemin, C., Daigneault, N., Fortin, M. G., and Laliberté, J.-F. (2004). Interaction of VPg-Pro of turnip mosaic virus with the translation initiation factor 4E and the poly(A)-binding protein in planta. *J. Gen. Virol.* 85, 1055–1063.

Lewandowski, D. J., and Adkins, S. (2005). The tubule-forming NSm protein from Tomato spotted wilt virus complements cell-to-cell and long-distance movement of Tobacco mosaic virus hybrids. *Virology* 342, 26–37.

Lewsey, M. G., and Carr, J. P. (2009). Effects of DICER-like proteins 2, 3 and 4 on cucumber mosaic virus and tobacco mosaic virus infections in salicylic acid-treated plants. *J. Gen. Virol.* 90, 3010–3014.

Li, H., and Roossinck, M. J. (2004). Genetic bottlenecks reduce population variation in an experimental RNA virus population. *J. Virol.* 78, 10582–10587.

Li, W., Lewandowski, D. J., Hilf, M. E., and Adkins, S. (2009). Identification of domains of the Tomato spotted wilt virus NSm protein involved in tubule formation, movement and symptomatology. *Virology* 390, 110–121.

Li, Y., Wu, M. Y., Song, H. H., Hu, X., and 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.

Lim, H.-S., Bragg, J. N., Ganesan, U., Lawrence, D. M., Yu, J., Isogai, M., et al. (2008). Triple gene block protein interactions involved in movement of Barley stripe mosaic virus. *J. Virol.* 82, 4991–5006.

Lin, M.-K., Lee, Y.-J., Lough, T. J., Phinney, B. S., and Lucas, W. J. (2009). Analysis of the pumpkin phloem proteome provides insights into angiosperm sieve tube function. *Mol. Cell Proteomics* 8, 343–356.

Liu, H., Lucy, P., Davies, J. W., and Boulton, M. I. (2001). A single amino acid change in the coat protein of maize streak virus abolishes systemic infection, but not interaction with viral DNA or movement protein. *Mol. Plant Pathol.* 2, 223–228.

Llamas, S., Moreno, I. M., and García-Arenal, F. (2006). Analysis of the viability of coat-protein hybrids between Cucumber mosaic virus and Tomato aspermy virus. *J. Gen. Virol.* 87, 2085–2088.

López, C., Navas-Castillo, J., Gowda, S., Moreno, P., and Flores, R. (2000). The 23-kDa protein coded by the 3′-terminal gene of citrus tristeza virus is an RNA-binding protein. *Virology* 269, 462–470.

López-Moya, J. J., and Pirone, T. P. (1998). Charge changes near the N terminus of the coat protein of two potyviruses affect virus movement. *J. Gen. Virol.* 79, 161–165.

Lough, T. J., Emerson, S. J., Lucas, W. J., and 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.

Lough, T. J., Netzler, N. E., Emerson, S. J., Sutherland, P., Carr, F., Beck, D. L., et al. (2000). Cell-to-cell movement of potexviruses: evidence for a ribonucleoprotein complex involving the coat protein and first triple gene block protein. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 962–974.

Love, A. J., Geri, C., Laird, J., Carr, C., Yun, B.-W., Loake, G. J., et al. (2012). Cauliflower mosaic virus protein P6 inhibits signaling responses to salicylic acid and regulates innate immunity. *PLoS ONE* 7:e47535. doi:10.1371/journal.pone.0047535

Love, A. J., Laval, V., Geri, C., Laird, J., Tomos, A. D., Hooks, M. A., et al. (2007). Components of *Arabidopsis* defense- and ethylene-signaling pathways regulate susceptibility to Cauliflower mosaic virus by restricting long-distance movement. *Mol. Plant Microbe Interact.* 20, 659–670.

Lu, R., Folimonov, A., Shintaku, M., Li, W.-X., Falk, B. W., Dawson, W. O., et al. (2004). Three distinct suppressors of RNA silencing encoded by a 20-kb viral RNA genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 15742–15747.

Lucas, W. J., Ham, B.-K., and Kim, J.-Y. (2009). Plasmodesmata – bridging the gap between neighboring plant cells. *Trends Cell Biol.* 19, 495–503.

Macfarlane, S. A. (2010). Tobraviruses – plant pathogens and tools for biotechnology. *Mol. Plant Pathol.* 11, 577–583.

Mahajan, S. K., Chisholm, S. T., Whitham, S. A., and 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.

Makarov, V. V., Rybakova, E. N., Efimov, A. V., Dobrov, E. N., Serebryakova,

M. V., Solovyev, A. G., et al. (2009). Domain organization of the N-terminal portion of hordeivirus movement protein TGBp1. *J. Gen. Virol.* 90, 3022–3032.

Manabayeva, S. A., Shamekova, M., Park, J.-W., Ding, X. S., Nelson, R. S., Hsieh, Y.-C., et al. (2013). Differential requirements for Tombusvirus coat protein and P19 in plants following leaf versus root inoculation. *Virology* 439, 89–96.

Maule, A. J. (1991). Virus movement in infected plants. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 9, 457–473.

Maule, A. J., Benitez-Alfonso, Y., and Faulkner, C. (2011). Plasmodesmata – membrane tunnels with attitude. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14, 683–690.

Maule, A. J., Caranta, C., and Boulton, M. I. (2007). Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. *Mol. Plant Pathol.* 8, 223–231.

Mayers, C. N., Lee, K.-C., Moore, C. A., Wong, S.-M., and Carr, J. P. (2005). Salicylic acid-induced resistance to Cucumber mosaic virus in squash and *Arabidopsis thaliana*: contrasting mechanisms of induction and antiviral action. *Mol. Plant Microbe Interact.* 18, 428–434.

McGeachy, K. D., and Barker, H. (2000). Potato mop-top virus RNA can move long distance in the absence of coat protein: evidence from resistant, transgenic plants. *Mol. Plant Microbe Interact.* 13, 125–128.

Mekuria, T., Bamunusinghe, D., Payton, M., and Verchot-Lubicz, J. (2008). Phloem unloading of potato virus X movement proteins is regulated by virus and host factors. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 1106–1117.

Mérai, Z., Kerényi, Z., Kertész, S., Magna, M., Lakatos, L., and Silhavy, D. (2006). Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J. Virol.* 80, 5747–5756.

Moreno, I. M., Thompson, J. R., and Garcia-Arenal, F. (2004). Analysis of the systemic colonization of cucumber plants by cucumber green mottle mosaic virus. *J. Gen. Virol.* 85, 749–759.

Morozov, S. Y., and Solovyev, A. G. (2003). Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *J. Gen. Virol.* 84, 1351–1366.

Mutterer, J. D., Stussi-Garaud, C., Michler, P., Richards, K. E., Jonard, G., and 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.

Napuli, A. J., Alzhanova, D. V., Doneanu, C. E., Barofsky, D. F., Koonin, E. V., and Dolja, V. V. (2003). The 64-kilodalton capsid protein homolog of beet yellows virus is required for assembly of virion tails. *J. Virol.* 77, 2377–2384.

Naylor, M., Murphy, A. M., Berry, J. O., and Carr, J. P. (1998). Salicylic acid can induce resistance to plant virus movement. *Mol. Plant Microbe Interact.* 11, 860–868.

Niehl, A., and Heinlein, M. (2010). Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma* 248, 75–99.

Nieto, C., Piron, F., Dalmais, M., Marco, C., Moriones, E., Gomez-Guillamon, M. L., et al. (2007). EcoTILLING for the identification of allelic variants of melon eIF4E, a factor that controls virus susceptibility. *BMC Plant Biol.* 7:34. doi:10.1186/1471-2229-7-34

Noris, E., Vaira, A. M., Caciagli, P., Masenga, V., Gronenborn, B., and Accotto, G. P. (1998). Amino acids in the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus that are crucial for systemic infection, particle formation, and insect transmission. *J. Virol.* 72, 10050–10057.

Okinaka, Y., Mise, K., Suzuki, E. R. I., Okuno, T., and Furusawa, I. (2001). The c terminus of brome mosaic virus coat protein controls viral cell-to-cell and long-distance movement. *J. Virol.* 75, 5385–5390.

Oparka, K. J., and Cruz, S. S. (2000). The great escape: phloem transport and unloading of macromolecules. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 51, 323–347.

Oparka, K. J., and Turgeon, R. (1999). Sieve elements and companion cells – traffic control centers of the phloem. *Plant Cell* 11, 739–750.

Osbourn, J., Sarkar, S., and Wilson, T. (1990). Complementation of coat protein-defective TMV mutants in transgenic tobacco plants expressing TMV coat protein. *Virology* 179, 921–925.

Owens, R. A., Blackburn, M., and Ding, B. (2001). Possible involvement of the phloem lectin in long-distance viroid movement. *Mol. Plant Microbe Interact.* 14, 905–909.

Padidam, M., Beachy, R. N., and Fauquet, C. M. (1995). Tomato leaf curl geminivirus from India has a bipartite genome and coat protein is not essential for infectivity. *J. Gen. Virol.* 76, 25–35.

Padidam, M., Beachy, R. N., and Fauquet, C. M. (1996). The role of AV2 ("precoat") and coat protein in viral replication and movement in tomato leaf curl geminivirus. *Virology* 224, 390–404.

Pagny, G., Paulstephenraj, P. S., Poque, S., Sicard, O., Cosson, P., Eyquard, J.-P., et al. (2012). Family-based linkage and association mapping reveals novel genes affecting Plum pox virus infection in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 196, 873–886.

Pantaleo, V., Grieco, F., Castellano, M. A., and Martelli, G. P. (1999). Synthesis of infectious transcripts of olive latent virus 1: genes required or RNA replication and virus movement. *Arch. Virol.* 144, 1071–1079.

Pantaleo, V., Grieco, F., Di Franco, A., and Martelli, G. P. (2006). The role of the C-terminal region of olive latent virus 1 coat protein in host systemic infection. *Arch. Virol.* 151, 1973–1983.

Park, S., Sit, T. I. M. L., Kim, K., and Lommel, S. A. (2012). The Red clover necrotic mosaic virus capsid protein N-terminal lysine-rich motif is a determinant of symptomatology and virion accumulation. *Mol. Plant Pathol.* 13, 744–754.

Peltier, C., Klein, E., Hleibieh, K., D'Alonzo, M., Hammann, P., Bouzoubaa, S., et al. (2012). Beet necrotic yellow vein virus subgenomic RNA3 is a cleavage product leading to stable non-coding RNA required for long-distance movement. *J. Gen. Virol.* 93, 1093–1102.

Peng, C., Napuli, A. J., and Dolja, V. V. (2003). Leader proteinase of beet yellows virus functions in long-distance transport. *J. Virol.* 77, 2843–2849.

Pereda, S., Ehrenfeld, N., Medina, C., Delgado, J., and Arce-Johnson, P. (2000). Comparative analysis of TMV-Cg and TMV-U1 detection methods in infected *Arabidopsis thaliana*. *J. Virol. Methods* 90, 135–142.

Peremyslov, V. V., Andreev, I. A., Prokhnevsky, A. I., Duncan, G. H., Taliansky, M. E., and Dolja, V. V. (2004). Complex molecular architecture of beet yellows virus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 5030–5035.

Peter, K. A., Gildow, F., Palukaitis, P., and Gray, S. M. (2009). The C terminus of the polerovirus p5 readthrough domain limits virus infection to the phloem. *J. Virol.* 83, 5419–5429.

Peter, K. A., Liang, D., Palukaitis, P., and 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.

Petty, I. T., French, R., Jones, R. W., and Jackson, A. O. (1990). Identification of barley stripe mosaic virus genes involved in viral RNA replication and systemic movement. *EMBO J.* 9, 3453–3457.

Piron, F., Nicolaï, M., Minoïa, S., Piednoir, E., Moretti, A., Salgues, A., et al. (2010). An induced mutation in tomato eIF4E leads to immunity to two potyviruses. *PLoS ONE* 5:e11313. doi:10.1371/journal.pone.0011313

Pooma, W., Gillette, W. K., Jeffrey, J. L., and Petty, I. T. (1996). Host and viral factors determine the dispensability of coat protein for bipartite geminivirus systemic movement. *Virology* 218, 264–268.

Prokhnevsky, A. I., Peremyslov, V. V., and Dolja, V. V. (2005). Actin cytoskeleton is involved in targeting of a viral Hsp70 homolog to the cell periphery. *J. Virol.* 79, 14421–14428.

Prokhnevsky, A. I., Peremyslov, V. V., Napuli, A. J., and Dolja, V. V. (2002). Interaction between long-distance transport factor and hsp70-related movement protein of beet yellows virus. *J. Virol.* 76, 11003–11011.

Puustinen, P., Rajamäki, M., Konstantin, I. I., Valkonen, J. P. T., and Mäkinen, K. (2002). Detection of the Potyviral genome-linked protein vpg in virions and its phosphorylation by host kinases. *J. Virol.* 76, 12703–12711.

Qu, F., and Morris, T. J. (2002). Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by tomato bushy stunt virus is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15, 193–202.

Qu, F., Ren, T., and Morris, T. J. (2003). The coat protein of turnip crinkle virus suppresses posttranscriptional gene silencing at an early initiation step. *J. Virol.* 77, 511–522.

Quillet, L., Guilley, H., Jonard, G., and Richards, K. (1989). In vitro synthesis of biologically active beet necrotic yellow vein virus RNA. *Virology* 172, 293–301.

Rajamäki, M.-L., and Valkonen, J. P. (1999). The 6K2 protein and the VPg of potato virus A are determinants of systemic infection in *Nicandra physaloides*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12, 1074–1081.

Rajamäki, M.-L., and Valkonen, J. P. T. (2002). Viral genome-linked protein (VPg) controls accumulation and phloem-loading of a potyvirus in inoculated potato leaves. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15, 138–149.

Rajamäki, M.-L., and Valkonen, J. P. T. (2009). Control of nuclear and nucleolar localization of nuclear inclusion protein a of picorna-like Potato virus A in *Nicotiana* species. *Plant Cell* 21, 2485–2502.

Ratti, C., Hleibieh, K., Bianchi, L., Schirmer, A., Autonell, C. R., and Gilmer, D. (2009). Beet soil-borne mosaic virus RNA-3 is replicated and encapsidated in the presence of BNYVV RNA-1 and -2 and allows long distance movement in Beta macrocarpa. *Virology* 385, 392–399.

Reed, J. C., Kasschau, K. D., Prokhnevsky, A. I., Gopinath, K., Pogue, G. P., Carrington, J. C., et al. (2003). Suppressor of RNA silencing encoded by Beet yellows virus. *Virology* 306, 203–209.

Requena, A., Simón-Buela, L., Salcedo, G., and García-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.

Restrepo, M. A., Freed, D. D., and Carrington, J. C. (1990). Nuclear transport of plant potyviral proteins. *Plant Cell* 2, 987–998.

Revers, F., Guiraud, T., Houvenaghel, M.-C., Mauduit, T., Le Gall, O., and Candresse, T. (2003). Multiple resistance phenotypes to Lettuce mosaic virus among *Arabidopsis thaliana* accessions. *Mol. Plant Microbe Interact.* 16, 608–616.

Rigola, D., Van Oeveren, J., Janssen, A., Bonné, A., Schneiders, H., Van Der Poel, H. J. A., et al. (2009). High-throughput detection of induced mutations and natural variation using keypoint™Technology. *PLoS ONE* 4:e4761. doi:10.1371/journal.pone.0004761

Roberts, A. G., Santa Cruz, S., Roberts, I. M., Prior, D. A., Turgeon, R., and Oparka, K. J. (1997). Phloem unloading in sink leaves of *Nicotiana benthamiana*: comparison of a fluorescent solute with a fluorescent virus. *Plant Cell* 9, 1381–1396.

Roberts, K., Love, A. J., Laval, V., Laird, J., Tomos, A. D., Hooks, M. A., et al. (2007). Long-distance movement of Cauliflower mosaic virus and host defence responses in *Arabidopsis* follow a predictable pattern that is determined by the leaf orthostichy. *New Phytol.* 175, 707–717.

Ryabov, E. V., Kim, S. H., and Taliansky, M. (2004). Identification of a nuclear localization signal and nuclear export signal of the umbraviral long-distance RNA movement protein. *J. Gen. Virol.* 85, 1329–1333.

Ryabov, E. V., Oparka, K. J., Santa Cruz, S., Robinson, D. J., and Taliansky, M. E. (1998). Intracellular location of two groundnut rosette umbravirus proteins delivered by PVX and TMV vectors. *Virology* 242, 303–313.

Ryabov, E. V., Robinson, D. J., and Taliansky, M. (1999). A plant virus-encoded protein facilitates long-distance movement of heterologous viral RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 1212–1217.

Ryabov, E. V., Robinson, D. J., and Taliansky, M. (2001). Umbravirus-encoded proteins both stabilize heterologous viral RNA and mediate its systemic movement in some plant species. *Virology* 288, 391–400.

Sacher, R., and Ahlquist, P. (1989). Effects of deletions in the N-terminal basic arm of brome mosaic virus coat protein on RNA packaging and systemic infection. *J. Virol.* 63, 4545–4552.

Sáenz, P., Salvador, B., Simón-Mateo, C., Kasschau, K. D., Carrington, J. C., and García, J. A. (2002). Host-specific involvement of the HC protein in the long-distance movement of potyviruses. *J. Virol.* 76, 1922–1931.

Saiga, S., Furumizu, C., Yokoyama, R., Kurata, T., Sato, S., Kato, T., et al. (2008). The *Arabidopsis* OBERON1 and OBERON2 genes encode plant homeodomain finger proteins and are required for apical meristem maintenance. *Development* 135, 1751–1759.

Saito, T., Yamanaka, K., and Okada, Y. (1990). Long-distance movement and viral assembly of tobacco mosaic virus mutants. *Virology* 176, 329–336.

Salánki, K., Kiss, L., Gellért, A., and Balázs, E. (2011). Identification a coat protein region of cucumber mosaic virus (CMV) essential for long-distance movement in cucumber. *Arch. Virol.* 156, 2279–2283.

Salvador, B., Delgadillo, M. O., Sáenz, P., García, J. A., and Simón-Mateo, C. (2008). Identification of Plum pox virus pathogenicity determinants in herbaceous and woody hosts. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21, 20–29.

Sasaki, T., Chino, M., Hayashi, H., and Fujiwara, T. (1998). Detection of several mRNA species in rice phloem sap. *Plant Cell Physiol.* 39, 895–897.

Savenkov, E. I. (2003). Potato mop-top virus: the coat protein-encoding RNA and the gene for cysteine-rich protein are dispensable for systemic virus movement in *Nicotiana benthamiana*. *J. Gen. Virol.* 84, 1001–1005.

Schaad, M. C., Lellis, A. D., and Carrington, J. C. (1997). VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *J. Virol.* 71, 8624–8631.

Schmitz, J., Stussi-Garaud, C., Tacke, E., Prüfer, D., Rohde, W., and Rohfritsch, O. (1997). N situ localization of the putative movement protein (pr17) from Potato leafroll luteovirus (PLRV) in infected and transgenic potato plants. *Virology* 235, 311–322.

Schneider, W. L., Greene, A. E., and Allison, R. F. (1997). The carboxy-terminal two-thirds of the cowpea chlorotic mottle bromovirus capsid protein is incapable of virion formation yet supports systemic movement. *J. Virol.* 71, 4862–4865.

Schoelz, J. E., Harries, P. A., and Nelson, R. S. (2011). Intracellular transport of plant viruses: finding the door out of the cell. *Mol. Plant.* 4, 813–831.

Scholthof, H. B. (2005). Plant virus transport: motions of functional equivalence. *Trends Plant Sci.* 10, 376–382.

Scholthof, H. B., Morris, T. J., and Jackson, O. A. (1993). The capsid protein gene of tomato bushy stunt virus is dispensable for systemic movement and can be replaced for localized expression of foreign genes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 6, 309–322.

Scholthof, H. B., Scholthof, K. B., Kikkert, M., and Jackson, O. A. (1995). Tomato bushy stunt virus spread is regulated by two nested genes that function in cell-to-cell movement and host-dependent systemic invasion. *Virology* 213, 425–438.

Schwach, F., Vaistij, F. E., Jones, L., and Baulcombe, D. C. (2005). An RNA-dependent RNA Polymerase prevents meristem invasion by Potato virus X and Is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. *Plant Physiol.* 138, 1842–1852.

Semashko, M. A., Rakitina, D. V., González, I., Canto, T., Kalinina, N. O., and Taliansky, M. E. (2012a). 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.

Semashko, M. A., González, I., Shaw, J., Leonova, O. G., Popenko, V. I., Taliansky, M. E., et al. (2012b). 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.

Serrano, C., González-Cruz, J., Jauregui, F., Medina, C., Mancilla, P., Matus, J. T., et al. (2008). Genetic and histological studies on the delayed systemic movement of Tobacco Mosaic Virus in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genet.* 9:59. doi:10.1186/1471-2156-9-59

Shepardson, S., Esau, K., and McCrum, R. (1980). Ultrastructure of potato leaf phloem infected with potato leafroll virus. *Virology* 105, 379–392.

Silhavy, D., Molnár, A., Lucioli, A., Szittya, G., Hornyik, C., Tavazza, M., et al. (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J.* 21, 3070–3080.

Silva, M. S., Wellink, J., Goldbach, R. W., and Van Lent, J. W. M. (2002). Phloem loading and unloading of Cowpea mosaic virus in *Vigna unguiculata*. *J. Gen. Virol.* 83, 1493–1504.

Sit, T. L., Haikal, P. R., Callaway, A. S., and Lommel, S. A. (2001). A single amino acid mutation in the Carnation ringspot virus capsid protein allows virion formation but prevents systemic infection. *J. Virol.* 75, 9538–9542.

Soards, A. J., Murphy, A. M., Palukaitis, P., and 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.

Sokolova, M., Prüfer, D., Tacke, E., and Rohde, W. (1997). The potato leafroll virus 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of proteine kinase C. *FEBS Lett.* 400, 201–205.

Solovyev, A. G., Kalinina, N. O., and Morozov, S. Y. (2012). Recent advances in research of plant virus movement mediated by triple gene block. *Front. Plant Sci.* 3:276. doi:10.3389/fpls.2012.00276

Soto, M. J., Chen, L.-F., Seo, Y.-S., and Gilbertson, R. L. (2005). Identification of regions of the Beet mild curly top virus (family Geminiviridae) capsid protein involved in systemic infection, virion formation and leafhopper transmission. *Virology* 341, 257–270.

Spitsin, S., Steplewski, K., Fleysh, N., Belanger, H., Mikheeva, T., Shivprasad, S., et al. (1999). Expression of alfalfa mosaic virus coat protein in tobacco mosaic virus (TMV) deficient in the production of its

native coat protein supports long-distance movement of a chimeric TMV. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 2549–2553.

Stadler, R., Wright, K. M., Lauterbach, C., Amon, G., Gahrtz, M., Feuerstein, A., et al. (2005). Expression of GFP-fusions in *Arabidopsis* companion cells reveals non-specific protein trafficking into sieve elements and identifies a novel post-phloem domain in roots. *Plant J.* 41, 319–331.

Swanson, M., Barker, H., and MacFarlane, S. (2002). Rapid vascular movement of tobraviruses does not require coat protein: evidence from mutated and wild-type viruses. *Ann. Appl. Biol.* 141, 259–266.

Tacke, E., Schmitz, J., Prüfer, D., and 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.

Takeda, A., Kaido, M., Okuno, T., and Mise, K. (2004). The C terminus of the movement protein of Brome mosaic virus controls the requirement for coat protein in cell-to-cell movement and plays a role in long-distance movement. *J. Gen. Virol.* 85, 1751–1761.

Taliansky, M., and García-Arenal, F. (1995). Role of cucumovirus capsid protein in long-distance movement within the infected plant. *J. Virol.* 69, 916–922.

Taliansky, M., Roberts, I. M., Kalinina, N., Ryabov, E. V., Raj, S. K., Robinson, D. J., et al. (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. E., Brown, J. W. S., Rajamäki, M.-L., Valkonen, J. P. T., and Kalinina, N. O. (2010). Involvement of the plant nucleolus in virus and viroid infections: parallels with animal pathosystems. *Adv. Virus Res.* 77, 119–158.

Taliansky, M. E., and Robinson, D. J. (2003). Molecular biology of umbraviruses: phantom warriors. *J. Gen. Virol.* 84, 1951–1960.

Tamada, T., and Abe, H. (1989). Evidence that Beet necrotic yellow vein virus RNA-4 is essential for efficient transmission by the fungus *Polymyxa betae*. *J. Gen. Virol.* 70, 3391–3398.

Tatineni, S., Robertson, C. J., Garnsey, S. M., Bar-Joseph, M., Gowda, S., and Dawson, W. O. (2008). Three genes of Citrus tristeza virus are dispensable for infection and movement throughout some varieties of citrus trees. *Virology* 376, 297–307.

Tatineni, S., Van Winkle, D. H., and French, R. (2011a). The N-terminal region of wheat streak mosaic virus coat protein is a host- and strain-specific long-distance transport factor. *J. Virol.* 85, 1718–1731.

Tatineni, S., Robertson, C. J., Garnsey, S. M., and Dawson, W. O. (2011b). A plant virus evolved by acquiring multiple nonconserved genes to extend its host range. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 17366–17371.

Tenllado, F., and Bol, J. F. (2000). Genetic dissection of the multiple functions of alfalfa mosaic virus coat protein in viral RNA replication, encapsidation, and movement. *Virology* 268, 29–40.

Thomas, C. L., Schmidt, D., Bayer, E. M., Dreos, R., and Maule, A. J. (2009). *Arabidopsis* plant homeodomain finger proteins operate downstream of auxin accumulation in specifying the vasculature and primary root meristem. *Plant J.* 59, 426–436.

Thompson, J. R., Doun, S., and Perry, K. L. (2006). Compensatory capsid protein mutations in cucumber mosaic virus confer systemic infectivity in squash (*Cucurbita pepo*). *J. Virol.* 80, 7740–7743.

Torrance, L., Lukhovitskaya, N. I., Schepetilnikov, M. V., Cowan, G. H., Ziegler, A., and 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.

Torrance, L., Wright, K. M., Crutzen, F., Cowan, G. H., Lukhovitskaya, N. I., Bragard, C., et al. (2011). Unusual features of pomoviral RNA movement. *Front. Microbiol.* 2:259. doi:10.3389/fmicb.2011.00259

Truniger, V., and Aranda, M. A. (2009). Recessive resistance to plant viruses. *Adv. Virus Res.* 75, 119–159.

Turgeon, R., and Wolf, S. (2009). Phloem transport: cellular pathways and molecular trafficking. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 207–221.

Ueki, S., and 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., and Citovsky, V. (2007). "Spread throughout the plant: systemic transport of viruses," in *Viral Transport in Plants*, eds E. Waigmann and M. Heinlein (Berlin: Springer), 85–118.

Vaewhongs, A., and Lommel, S. A. (1995). Virion formation is required for the long-distance movement of red clover necrotic mosaic virus in movement protein transgenic plants. *Virology* 212, 607–613.

Van Bel, A. J. E. (2003). The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant Cell Environ.* 26, 125–149.

Vargason, J. M., Szittya, G., Burgyán, J., and Hall, T. M. T. (2003). Size selective recognition of siRNA by an RNA silencing suppressor. *Cell* 115, 799–811.

Verchot-Lubicz, J., Torrance, L., Solovyev, A. G., Morozov, S. Y., Jackson, A. O., and Gilmer, D. (2010). Varied movement strategies employed by triple gene block-encoding viruses. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23, 1231–1247.

Vlot, A. C., Dempsey, D. A., and Klessig, D. F. (2009). Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47, 177–206.

Voinnet, O., Pinto, Y. M., and Baulcombe, D. C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 14147–14152.

Waigmann, E., Ueki, S., Trutnyeva, K., and Citovsky, V. (2004). The ins and outs of nondestructive cell-to-cell and systemic movement of plant viruses. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 23, 195–250.

Wang, A., and Krishnaswamy, S. (2012). Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. *Mol. Plant Pathol.* 13, 795–803.

Wang, X., Kohalmi, S. E., Svircev, A., Wang, A., Sanfaçon, H., and Tian, L. (2013). Silencing of the host factor *eIF(iso)4E* gene confers *Plum Pox Virus* resistance in Plum. *PLoS ONE* 8:e50627. doi:10.1371/journal.pone.0050627

Wang, X.-B., Jovel, J., Udomporn, P., Wang, Y., Wu, Q., Li, W.-X., et al. (2011). The 21-nucleotide, but not 22-nucleotide, viral secondary small interfering RNAs direct potent antiviral defense by two cooperative argonautes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 23, 1625–1638.

Wang, X.-B., Wu, Q., Ito, T., Cillo, F., Li, W.-X., Chen, X., et al. (2010). RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 484–489.

Wartig, L., Kheyr-Pour, A., Noris, E., De Kouchkovsky, F., Jouanneau, F., Gronenborn, B., et al. (1997). Genetic analysis of the monopartite tomato yellow leaf curl geminivirus: roles of V1, V2, and C2 ORFs in viral pathogenesis. *Virology* 228, 132–140.

Whitham, S. A., Anderberg, R. J., Chisholm, S. T., and 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., Yamamoto, M. L., and Carrington, J. C. (1999). Selectable viruses and altered susceptibility mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 772–777.

Wright, K. M., Cowan, G. H., Lukhovitskaya, N. I., Tilsner, J., Roberts, A. G., Savenkov, E. I., et al. (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, Z., Fan, B., Chen, C., and Chen, Z. (2001). An important role of an inducible RNA-dependent RNA polymerase in plant antiviral defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 6516–6521.

Xiong, Z., Kim, K. H., Giesman-Cookmeyer, D., and Lommel, S. A. (1993). The roles of the red clover necrotic mosaic virus capsid and cell-to-cell movement proteins in systemic infection. *Virology* 192, 27–32.

Yap, Y.-K., Duangjit, J., and Panyim, S. (2009). N-terminal of Papaya ringspot virus type-W (PRSV-W) helper component proteinase (HC-Pro) is essential for PRSV systemic infection in zucchini. *Virus Genes* 38, 461–467.

Ye, K., Malinina, L., and Patel, D. J. (2003). Recognition of small interfering RNA by a viral suppressor of RNA silencing. *Nature* 426, 874–878.

Ye, K., and Patel, D. J. (2005). RNA silencing suppressor p21 of Beet yellows virus forms an RNA binding octameric ring structure. *Structure* 13, 1375–1384.

Zhang, X., Yuan, Y., Pei, Y., Lin, S., Tuschl, T., Patel, D. J., et al. (2006). Cucumber mosaic virus-encoded 2b suppressor inhibits *Arabidopsis* Argonaute1 cleavage activity to counter plant defense. *Genes Dev.* 20, 3255–3268.

Zhang, Y., Zhang, C., and Li, W. (2011). The nucleocapsid protein of an enveloped plant virus, tomato spotted wilt virus, facilitates long-distance movement of Tobacco mosaic virus hybrids. *Virus Res.* 163, 246–253.

Zhong, X., Archual, A. J., Amin, A. A., and Ding, B. (2008). A genomic map of viroid RNA motifs critical for replication and systemic trafficking. *Plant Cell* 20, 35–47.

Zhong, X., Tao, X., Stombaugh, J., Leontis, N., and Ding, B. (2007). Tertiary structure and function of an RNA motif required for plant vascular entry to initiate systemic trafficking. *EMBO J.* 26, 3836–3846.

Ziebell, H., Payne, T., Berry, J. O., Walsh, J. A., and Carr, J. P. (2007). A cucumber mosaic virus mutant lacking the 2b counter-defence protein gene provides protection against wild-type strains. *J. Gen. Virol.* 88, 2862–2871.

Ziegler-Graff, V., Brault, V., Mutterer, J. D., Simonis, M. T., Herrbach, E., Guilley, H., et al. (1996). The coat protein of Beet western yellows virus 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.

Ziegler-Graff, V., Guildford, P. J., and Baulcombe, D. C. (1991). Tobacco rattle virus RNA-1 29K gene product potentiates viral movement and also affects symptom induction in tobacco. *Virology* 182, 145–155.

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 31 March 2013; paper pending published: 22 April 2013; accepted: 05 May 2013; published online: 24 May 2013.

*Citation: Hipper C, Brault V, Ziegler-Graff V and Revers F (2013) Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. Front. Plant Sci. **4**:154. doi: 10.3389/fpls.2013.00154*

This article was submitted to Frontiers in Plant Physiology, a specialty of Frontiers in Plant Science.

Copyright © 2013 Hipper, Brault, Ziegler-Graff and Revers. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in other forums, provided the original authors and source are credited and subject to any copyright notices concerning any third-party graphics etc.

APPENDIX

Table A1 | Viral proteins and transport complexes involved in virus long-distance movement.

Genus	Capsid structure	Genome	Viral species	Viral factors required for long-distance movement	Viral form used for long-distance movement	Hosts	Reference
ALPHAFLEXIVIRIDAE							
Potexvirus	Helical capsid	ssRNA + monopartite	*White clover mosaic virus* (WCMV)	CP, TGB1	*RNP*	*N. benthamiana*	Lough et al. (2001)
			Potato virus X (PVX)	CP	Virions	*N. benthamiana*	Betti et al. (2011), Cruz et al. (1998)
BROMOVIRIDAE							
Alfamovirus	Icosahedral capsid	ssRNA + multipartite	*Alfalfa mosaic virus* (AMV)	CP	Virions	*N. benthamiana, N. tabacum, S. oleracea*	Herranz et al. (2012), Spitsin et al. (1999), Tenllado and Bol (2000)
Cucumovirus	Icosahedral capsid	ssRNA + multipartite	*Tomato aspermy virus* (TAV)	CP	*Virions*	*C. sativus, N. tabacum, N. clevelandii*	Llamas et al. (2006), Salánki et al. (2011), Taliansky and García-Arenal (1995)
			Cucumber mosaic virus (CMV)	CP, MP	Virions	*C. sativus, N. tabacum,* Squash, *N. clevelandii*	Llamas et al. (2006), Requena et al. (2006), Salánki et al. (2011), Taliansky and García-Arenal (1995), Thompson et al. (2006); Ueki and Citovsky (2007); Waigmann et al. (2004)
				2b		*C. sativus*	Brigneti et al. (1998), Ding et al. (1995), Guo and Ding (2002)
Bromovirus	Icosahedral capsid	ssRNA + multipartite	*Brome mosaic virus* (BMV)	CP, MP	*RNP,* Virions	*C. hybridum, H. vulgare, N. benthamiana*	Flasinski et al. (1997), Gopinath and Kao (2007), Kao et al. (2011), Okinaka et al. (2001), Sacher and Ahlquist (1989), Takeda et al. (2004)
			Cowpea chlorotic mottle virus (CCMV)	CP	?	*N. benthamiana, H. vulgare, V. unguiculata*	Allison et al. (1990), Schneider et al. (1997)
BUNYAVIRIDAE							
Tospovirus	Icosahedral enveloped capsid	Ambisense ssRNA multipartite	*Tomato spotted wilt virus* (TSWV)	N (CP), NSm	*RNP*	*N. benthamiana, N. tabacum*	Lewandowski and Adkins (2005) Li et al. (2009), Zhang et al. (2011)
CLOSTEROVIRIDAE							
Closterovirus	Helical capsid	ssRNA, monopartite	*Beet yellows virus* (BYV)	CP, p20, p21, L-Pro	Virions	*N. benthamiana, A. thaliana*	Prokhnevsky et al. (2002), Peng et al. (2003), Peremyslov et al. (2004), Chapman et al. (2004)
			Citrus tristeza virus (CTV)	p20, p33, p18, p13	?	*Citrus* species	Tatineni et al. (2008), Folimonova et al. (2008), Tatineni et al. (2011b)

(Continued)

Table A1 | Continued

Genus	Capsid structure	Genome	Viral species	Viral factors required for long-distance movement	Viral form used for long-distance movement	Hosts	Reference
GEMINIVIRIDAE							
Monopartite and Bipartite *Geminiviridae*				MP			Reviewed in Waigmann et al. (2004), Ueki and Citovsky (2007)
Mastrevirus	Icosahedral capsid	ssDNA monopartite	*Maize streak virus* (MSV)	CP	Virions	*Zea mays*	Boulton et al. (1989), Liu et al. (2001)
Curtovirus	Icosahedral capsid	ssDNA monopartite	*Beet mild curly top virus* (BMCTV)	CP	*Virions*	*N. benthamiana*	Soto et al. (2005)
Begomovirus	Icosahedral capsid	ssDNA monopartite or bipartite	*Tomato golden mosaic virus* (TGMV)	ΔCP, ? CP	RNP* *Virions*	*N. benthamiana* *N. benthamiana, N. tabacum, D. stramonium*	Jeffrey et al. (1996), Pooma et al. (1996)
			Bean golden mosaic virus (BGMV)	ΔCP, ? CP	RNP* *Virions*	*Phaseolus vulgaris* *Phaseolus vulgaris N. benthamiana*	Pooma et al. (1996)
			Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV)	CP	Virions	*N. benthamiana*	Noris et al. (1998), Wartig et al. (1997)
			Tomato leaf curl virus (ToLCV) – India	ΔCP, ? CP	RNP* *Virions*	*N. benthamiana, S. lycopersicum*	Padidam et al. (1995, 1996)
LUTEOVIRIDAE							
Polerovirus	Icosahedral capsid	ssRNA + monopartite	*Turnip yellows virus* (TuYV)	CP, RT, RT*, P4	*Virions*	*C. quinoa, N. clevelandii*	Brault et al. (2000, 2003), Bruyère et al. (1997), Ziegler-Graff et al. (1996)
			Potato leafroll virus (PLRV)	CP, RT, RT*, P4	*Virions*	*N. benthamiana, N. clevelandii, P. floridana, S. tuberosum*	Kaplan et al. (2007), Lee et al. (2002, 2005), Peter et al. (2008)
POTYVIRIDAE							
Potyvirus	Helical capsid	ssRNA + monopartite	*Tobacco etch virus* (TEV)	CP, VPg, HC-Pro	?	*N. tabacum*	Dolja et al. (1994), Cronin et al. (1995), López-Moya and Pirone (1998), Schaad et al. (1997), Kasschau and Carrington (2001)
			Potato virus A (PVA)	CP, VPg, 6K2	?	*N. physaloides, S. commersonii*	Hämäläinen et al. (2000), Ivanov et al. (2003), Rajamäki and Valkonen (1999, 2002)
TOMBUSVIRIDAE							
Dianthovirus	Icosahedral capsid	ssRNA + multipartite	*Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV)	MP			Reviewed in Waigmann et al. (2004), Ueki and Citovsky (2007)
				CP	Virions	*N. benthamiana, N. clevelandii*	Vaewhongs and Lommel (1995), Xiong et al. (1993)

(Continued)

Table A1 | Continued

Genus	Capsid structure	Genome	Viral species	Viral factors required for long-distance movement	Viral form used for long-distance movement	Hosts	Reference
				ΔCP, ?	RNP	*N. benthamiana* (15˚C)	
				ΔCP, ?	RNP*	*N. benthamiana*	Park et al. (2012)
			Carnation ringspot virus (CRSV)	CP	Virions	*N. benthamiana*	Sit et al. (2001)
Tombusvirus	Icosahedral capsid	ssRNA + monopartite	*Tomato bushy stunt virus* (TBSV)	ΔCP, ?	RNP*	*N. benthamiana, N. clevelandii*	Desvoyes and Scholthof (2002), Qu and Morris (2002), Scholthof et al. (1993)
				CP	Virions		
				P19		*S. oleracea, Capsicum*	Dunoyer et al. (2010), Scholthof et al. (1995), Voinnet et al. (1999)
			Cymbidium ringspot virus (CymRSV)	ΔCP, ?	RNP	*N. benthamiana*	Dalmay et al. (1992)
				CP	Virions	*N. clevelandii*	
				P19		*N. benthamiana*	Havelda et al. (2003)
Carmovirus	Icosahedral capsid	ssRNA + monopartite	*Turnip crinkle virus* (TCV)	CP	Virions	*B. campestris, N. benthamiana, A. thaliana*	Heaton et al. (1991), Cohen et al. (2000), Qu et al. (2003), Choi et al. (2004), Deleris et al. (2006), Cao et al. (2010)
Necrovirus	Icosahedral capsid	ssRNA + monopartite	*Olive latent virus* (OLV-1)	CP	Virions	*N. benthamiana*	Pantaleo et al. (1999, 2006)
VIRGAVIRIDAE							
Tobamovirus	Helical capsid	ssRNA + monopartite	*Tobacco mosaic virus* (TMV)	CP	Virions	*N. sylvestris, N. tabacum*	Holt and Beachy (1991), Knorr and Dawson (1988), Osbourn et al. (1990), Saito et al. (1990)
Hordeivirus	Helical capsid	ssRNA + multipartite	*Barley stripe mosaic virus* (BSMV)	TGB1	RNP	*H. vulgare, N. benthamiana, C. quinoa*	Jackson et al. (2009), Lim et al. (2008), Makarov et al. (2009), Petty et al. (1990), Solovyev et al. (2012), Verchot-Lubicz et al. (2010)
Pomovirus	Helical capsid	ssRNA + multipartite	*Potato mop-top virus* (PMTV)	ΔCP, TGB1	RNP (RNA1 and 2 only)	*N. benthamiana, N. clevelandii*	McGeachy and Barker (2000), Savenkov (2003), Torrance et al. (2009, 2011), Wright et al. (2010)
				CP, CP-RT, TGB1	Virions		
Tobravirus	Helical capsid	ssRNA + multipartite	*Tobacco rattle virus* (TRV)	ΔCP, ? (NM isolates)	RNP*	*N. benthamiana, N. clevelandii*	Macfarlane (2010), Swanson et al. (2002), Torrance et al. (2011), Wright et al. (2010), Ziegler-Graff et al. (1991)
				CP (M isolates)	Virions		
UNASSIGNED FAMILY							
Umbravirus	Icosahedral capsid	ssRNA + monopartite	*Groundnut rosette virus* (GRV)	P3	RNP	*N. benthamiana, C. quinoa*	Canetta et al. (2008), Kim et al. (2007a,b), Ryabov et al. (2001), Taliansky et al. (2003)

(Continued)

Table A1 | Continued

Genus	Capsid structure	Genome	Viral species	Viral factors required for long-distance movement	Viral form used for long-distance movement	Hosts	Reference
			Pea enation mosaic virus-2 (PEMV-2)	P3	RNP	*N. benthamiana*	Kim et al. (2007a,b), Ryabov et al. (2001)
Sobemovirus	Icosahedral capsid	ssRNA + monopartite	*Southern bean mosaic virus* (SBMV)	CP	Virions	Bean, *V. unguiculata*	Fuentes and Hamilton (1993)
Benyvirus	Helical capsid	ssRNA + multipartite	*Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV)	CP, P14 Coremin sequence	Virions	*C. quinoa, T. expansa* *B. macrocarpa*	Chiba et al. (2013), Lauber et al. (1998), Peltier et al. (2012), Quillet et al. (1989), Ratti et al. (2009)
Betaflexiviridae, Caulimoviridae, Nanoviridae, Rhabdoviridae, Secoviridae, Tymoviridae							
No reference on long-distance movement							

Viral proteins, described in the review and involved in virus long-distance movement, are listed in the table (CP: capsid protein; N: nucleocapsid protein; MP: movement protein; TGB: triple gene block protein; VPg: viral protein genome-linked; RT: readthrough protein; RT: truncated form of RT; HC-Pro: helper component-proteinase). The viral complex transported over long-distances [virions or ribonucleoprotein (RNP) complexes], is also indicated when clearly identified. For some viruses, uncertainties still remain concerning the nature of the viral form moving systemically. In these cases, the most likely form of transport is indicated in italics. In some cases, in addition to virions, an alternative form of virus transport can be observed when the CP is deleted or mutated (ΔCP) but the systemic movement of these RNP complexes (RNP*) is usually less efficient than the one involving virions.*

Table A2 | Host factors known or suspected to be involved in virus long-distance transport.

Virus species	Host factors involved on viral long-distance movement		Host plants	Reference
	Positive effect	Negative effect		
BROMOVIRIDAE (CUCUMOVIRUS)				
Cucumber mosaic virus (CMV)	Tcoi1		*N. tabacum, N. benthamiana*	Kim et al. (2008)
	p48 (PP1)		*C. sativus*	Requena et al. (2006)
		Salicylic acid	*A. thaliana*	Naylor et al. (1998), Ji and Ding (2001), Mayers et al. (2005), Lewsey and Carr (2009)
CAULIMOVIRIDAE (CAULIMOVIRUS)				
Cauliflower mosaic virus (CaMV)	PME		*N. tabacum*	Chen et al. (2000)
		Salicylic acid	*A. thaliana*	Xie et al. (2001), Alamillo et al. (2006), Love et al. (2007, 2012)
LUTEOVIRIDAE (POLEROVIRUS)				
Potato leafroll virus (PLRV)	Fibrillarin		*A. thaliana*	Kim et al. (2007a,b)
POTYVIRIDAE (POTYVIRUS)				
Pea seed-borne mosaic virus (PSbMV), *Lettuce mosaic virus* (LMV), *Turnip mosaic virus* (TuMV)	PVIPnb AtPVIP (OBERON) PVIPp		*N. benthamiana* *A. thaliana* *P. sativum*	Dunoyer et al. (2004), Saiga et al. (2008)
Lettuce mosaic virus (LMV), *Plum pox virus* (PPV), *Tobacco etch virus* (TEV)		RTM genes	*A. thaliana*	Cosson et al. (2012), Decroocq et al. (2006), Mahajan et al. (1998), Revers et al. (2003), Whitham et al. (1999)
Plum pox virus (PPV)	SHA3		*A. thaliana*	Pagny et al. (2012)
		Salicylic acid	*N. tabacum*	Alamillo et al. (2006), Sáenz et al. (2002)
VIRGAVIRIDAE (TOBAMOVIRUS, POMOVIRUS)				
Turnip vein clearing virus (TVCV)	VSM1		*A. thaliana*	Lartey et al. (1997, 1998)
	PME		*N. tabacum*	Chen et al. (2000)
		cdiGRP	*N. tabacum*	Ueki and Citovsky (2002)
Tobacco mosaic virus (TMV)	DSTM1		*A. thaliana*	Pereda et al. (2000), Serrano et al. (2008)
	VSM1		*A. thaliana*	Lartey et al. (1998)
	PME		*N. tabacum*	Chen and Citovsky (2003), Chen et al. (2000)
		cdiGRP	*N. tabacum*	Ueki and Citovsky (2002)
Tomato mosaic virus (ToMV)	IP-L		*N. tabacum*	Li et al. (2005)
Potato mop-top virus (PMTV), *Poa semilatent virus* (PSLV)	Fibrillarin		*A. thaliana*	Semashko et al. (2012b), Wright et al. (2010)
UNASSIGNED FAMILY (UMBRAVIRUS, TENUIVIRUS)				
Groundnut rosette virus (GRV)	Fibrillarin		*A. thaliana*	Kim et al. (2007a,b)

Host factors, described in the review for their beneficial or antagonist action on virus long-distance movement, are listed in the table.

2. Les *Luteoviridae*

2.1 Description des genres viraux, des hôtes et des symptômes

Les virus appartenant à la famille des *Luteoviridae* sont répartis en trois genres : *Polerovirus*, *Luteovirus*, et *Enamovirus*. Pour chacun de ces genres viraux il existe un membre type, à savoir le *Potato leafroll virus* (PLRV) pour le genre *Polerovirus*, le *Barley yellow dwarf virus*–PAV (BYDV–PAV) pour le genre *Luteovirus*, et le *Pea enation mosaic virus*-1 (PEMV-1) pour le genre *Enamovirus*. L'ensemble des membres des *Luteoviridae* décrits à ce jour est indiqué dans le **Tableau 3** ci-dessous.

Genres	Espèces
Polerovirus	***Potato leafroll virus* (PLRV)**
	Beet chlorosis virus (BchV)
	Beet mild yellowing virus (BMYV)
	Beet western yellows virus (BWYV)
	Carrot red leaf virus (CtRLV)
	Cereal yellow dwarf virus-RPS (CYDV-RPS)
	Cereal yellow dwarf virus-RPV (CYDV-RPV)
	Chickpea chlorotic stunt virus (CpCSV)
	Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV)
	Melon aphid-borne yellows virus (MABYV)
	Sugarcane yellow leaf virus (ScYLV)
	Tobacco vein distorting virus (TVDV)
	Turnip yellows virus (TuYV)
Luteovirus	***Barley yellow dwarf virus-PAV* (BYDV-PAV)**
	Barley yellow dwarf virus-MAV (BYDV-MAV)
	Barley yellow dwarf virus-PAS (BYDV-PAS)
	Bean leafroll virus (BLRV)
	Soybean dwarf virus (SbDV)
	Rose spring dwarf-associated virus (RSDaV)
Enamovirus	***Pea enation mosaic virus-1* (PEMV-1)**

Tableau 3 : Membres de la famille des Luteoviridae. Source : liste 2012 ICTV (http://ictvonline.org).

Un grand nombre d'espèces végétales, en particulier des espèces à importance agricole, peuvent être infectées par les membres de la famille des *Luteoviridae* : des grandes cultures (céréales, betterave sucrière, colza, pomme de terre, tabac,…) et des cultures maraichères (légumineuses, laitue, crucifères, cucurbitacées…). Il existe une grande variété de symptômes provoqués par les *Luteoviridae*, selon le virus concerné et l'hôte infecté (Brault *et al.*, 2001). Le symptôme majoritairement observé est le jaunissement du limbe des feuilles, caractéristique ayant donné le nom à la famille (du latin *luteus* = jaune) (Figure **6 A**). Ainsi, les betteraves sucrières infectées par le BMYV ou les cucurbitacées infectées par le CABYV développent un jaunissement important des feuilles. Des céréales infectées par le BYDV ou le CYDV présentent un raccourcissement des entre-nœuds et une décoloration des feuilles. Enfin, les plants de pomme de terre infectés par le PLRV présentent un enroulement du feuillage et un retard de croissance.
Les maladies dommageables aux cultures causées par les *Luteoviridae* peuvent entrainer d'importantes pertes de rendement. Ainsi, les feuilles de laitue infectées par le TuYV sont

impropres à la consommation car jaunes et déformées, et les cucurbitacées infectées par le CABYV produisent moins de fruits. Les symptômes sont provoqués par les dérèglements cellulaires induits par l'infection virale dans les tissus phloémiens (Brault *et al.*, 2001).
La propagation de ces virus se fait exclusivement par le biais de l'insecte vecteur, le puceron, sauf dans le cas du PLRV où la propagation du virus peut aussi se faire via les tubercules infectés (University of California, Pest Management Online, PLRV : http://www.ipm.ucdavis.edu/PMG/r607101811.html). Les seuls moyens de lutte existant à l'heure actuelle sont les traitements insecticides et l'arrachage des plants infectés. L'utilisation de la lutte chimique a cependant un coût économique et environnemental, et peut éventuellement mener à l'apparition d'espèces vectrices résistantes aux traitements. Pour cette raison, des variétés résistantes aux virus ou aux pucerons ont été sélectionnées ou sont en cours de développement. Ainsi, la présence du gène *vat* dans certaines variétés de melons confère une résistance à *Aphis gossypii* (Villada *et al.*, 2009), un vecteur efficace du CABYV ; et les variétés de laitues *Burse 17* et *Crystal Hearth* montrent une résistance partielle à l'infection par le BWYV grâce à la présence du gène *Bw* (Pink *et al.*, 1991).

2.2 Génomes et protéines des *Luteoviridae*

i) Organisation génétique des trois genres

Les *Luteoviridae* possèdent un génome à ARN+ monopartite de 5,5 à 6 kb, nommé ci-après ARN génomique (ARNg). Cet ARN est protégé dans une particule virale icosaédrique (T=3) qui mesure environ 25 nm de diamètre (Figure 6 **B et C**).

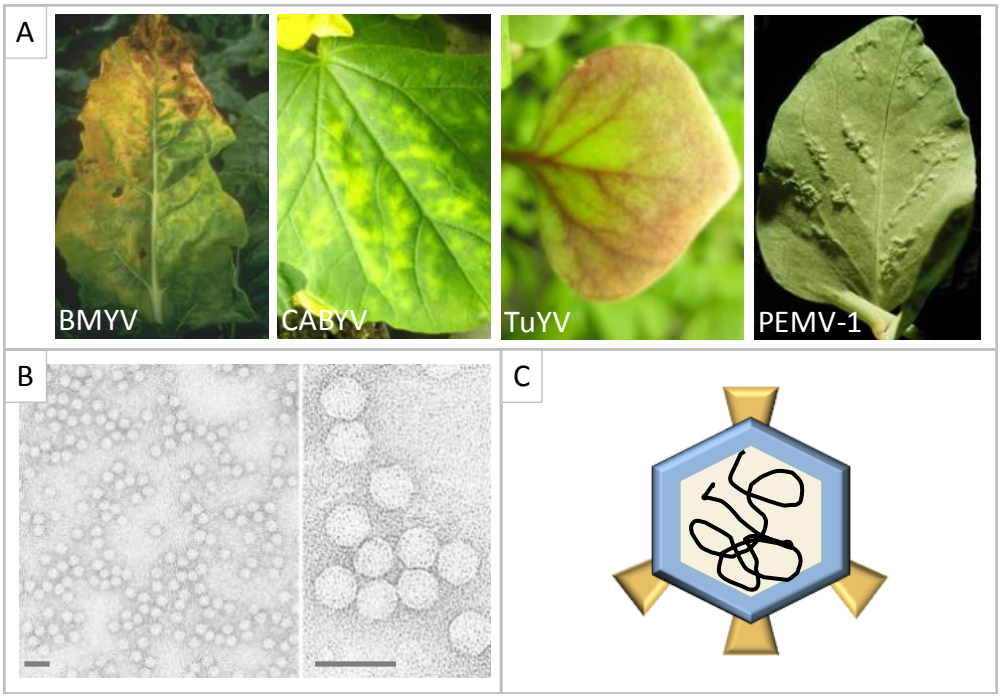


Figure 6 : A) Symptômes provoqués par les *Luteoviridae*. De gauche à droite : épaississement et jaunissement des feuilles d'une betterave infectée par le BMYV (http://inra.fr); jaunissement d'une feuille de concombre infectée par le CABYV (photo personnelle); rougissement d'une feuille de *M. perfoliata* infectée par le TuYV (photo personnelle); énation des nervures sur une feuille de pois infecté par le PEMV-1 (http://dpvweb.net). **B)** Observation au microscope électronique de virions du TuYV. Echelles : 45nm (Photos : C. Reinbold). **C)** Représentation schématique d'une particule virale d'un *Luteoviridae*. L'ARN génomique est protégé dans la particule icosaédrique formée par l'association des protéines majeures (CP, en bleu) et mineures (RT*, en jaune) de la capside.

L'organisation génétique, bien que très conservée au sein des *Luteoviridae*, permet de distinguer clairement les 3 genres. Une protéine *Viral protein genome-linked* (VPg) est fixée de manière covalente à l'extrémité 5' de l'ARN génomique des *Polerovirus* et *Enamovirus*, mais est absente chez les *Luteovirus* (**Figure 7**). Cinq cadres de lecture ouverts (*Open reading frames*, ORFs) sont au minimum présents sur le génome des *Luteoviridae*. Les ORFs 1, 2, 3, et 5 existent chez les trois genres. Les *Luteovirus* et *Polerovirus* possèdent une ORF supplémentaire dans la deuxième moitié du génome, l'ORF 4 ; les *Polerovirus* et *Enamovirus* possèdent une ORF supplémentaire en 5' du génome, l'ORF 0. Enfin, trois petites ORFs existent chez les *Polerovirus* (Rap1, et ORFs 6 et 7) ; l'ORF 6 étant aussi potentiellement présente chez les *Luteovirus* (**Figure 7**).

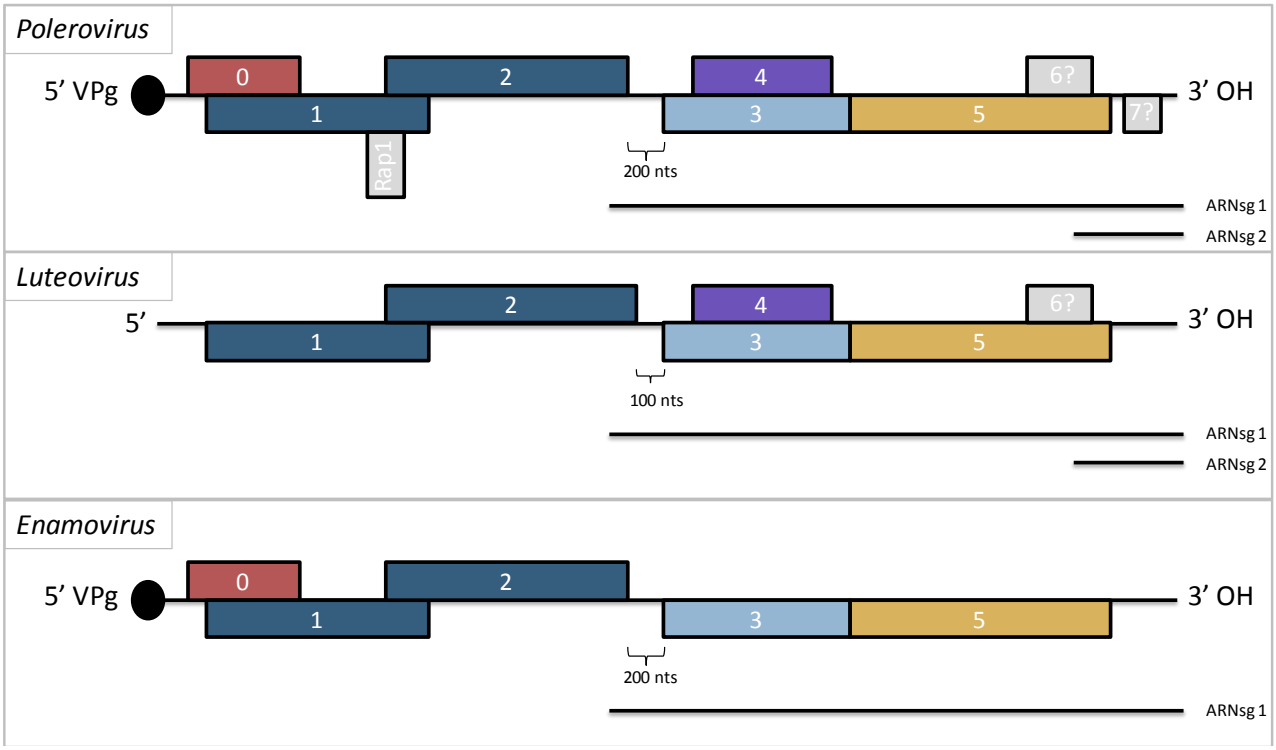


Figure 7 : Organisation génétique des *Luteoviridae*. Les ARN génomiques (ARNg) et subgénomiques (ARNsg) sont représentés par des traits noirs fixés le cas échéant à la VPg en 5'. On ne sait pas encore si les ARNsg possèdent une VPg à leur extrémité 5'. Les cadres ouverts de lecture (ORF) sont présentés par des rectangles de couleur.

Les *Luteoviridae* ont un petit génome, ce qui les conduit à utiliser plusieurs stratégies d'expression des protéines :

- Stratégies liées à la traduction par les ribosomes cellulaires:
  - décalage du cadre de lecture (*frameshift*) : synthèse de P1-P2
  - initiation interne (*leaky scanning*) : synthèse de P1 et P4
  - translecture du codon stop (*readthrough*) : synthèse de P3-P5
  - présence d'IRES (*internal ribosome entry site*) : synthèse de Rap1
- Maturation de la polyprotéine P1 qui permet notamment la synthèse de la VPg
- Synthèse d'un ou plusieurs ARN subgénomiques (ARNsg).

ii) Fonctions des protéines des *Luteoviridae*

a) P0 : suppresseur de RNA silencing

La protéine codée par l'ORF 0 des *Polerovirus* et *Enamovirus,* la P0, a tout d'abord été décrite comme un facteur de pathogénicité impliqué dans la symptomatologie ou dans la réplication virale (Sadowy *et al.*, 2001; Ziegler-Graff *et al.*, 1996). Depuis la découverte du mécanisme de *RNA silencing*, la P0 est connue pour son activité de suppression du *RNA silencing*. Elle fait donc partie de la famille des *Viral suppressor of RNA silencing* (VSR) (Fusaro *et al.*, 2012; Kozlowska-Makulska *et al.*, 2010; Pfeffer *et al.*, 2002; Reed *et al.*, 2003). Les VSRs existent dans la majorité des genres viraux, et sont des protéines essentielles pour l'infection des hôtes puisqu'elles protègent le virus contre le plus important mécanisme de défense de la plante développé à son encontre, le *RNA silencing* (Burgyán & Havelda, 2011).
Les protéines P0 des polérovirus PLRV, TuYV, BMYV et de l'énamovirus PEMV-1 ciblent et entrainent la dégradation de la protéine argonaute 1 (AGO1) d'*A. thaliana,* une enzyme clé du mécanisme de *RNA silencing* qui guide les siRNA jusqu'à un ARN-cible et entraine la dégradation de cet ARN (Baumberger *et al.*, 2007; Bortolamiol *et al.*, 2007; Fusaro *et al.*, 2012; Kozlowska-Makulska *et al.*, 2010; Pazhouhandeh *et al.*, 2006). La protéine P0 contient un domaine F box caractéristique des *E3 ubiquitin ligase* qui ajoutent des motifs ubiquitines sur des protéines cibles pour entrainer leur dégradation par le protéasome. La présence du domaine F box est nécessaire pour la fonction VSR de P0 (Baumberger *et al.*, 2007; Bortolamiol *et al.*, 2007; Fusaro *et al.*, 2012; Pazhouhandeh *et al.*, 2006). Cependant, le protéasome n'est apparemment pas nécessaire à la déstabilisation ou à la dégradation de AGO1 après son ubiquitinylation par le biais de la P0 du TuYV (Baumberger *et al.*, 2007; Bortolamiol *et al.*, 2007).
La fonction de suppression de *RNA silencing* doit être assurée par une autre protéine chez les *Luteovirus* puisque ceux-ci ne possèdent pas d'ORF 0.

Bien que la présence de P0 soit nécessaire à l'infection efficace de la plante hôte, comme le montrent des expériences de mutations de l'ORF 0 (Ziegler-Graff *et al.*, 1996), la protéine n'a pourtant jamais été détectée dans les protoplastes ou les plantes infectés (Pfeffer *et al.*, 2002). La faible expression de la P0 peut s'expliquer par le contexte défavorable pour la traduction dans lequel se trouve le codon d'initiation de cette protéine (Cavener & Ray, 1991). Ce contexte favorise le passage des ribosomes vers le deuxième AUG, celui de l'ORF 1, qui se trouve dans un meilleur environnement pour assurer la traduction de la P1 (Li *et al.*, 2000). Pour le virus, il est important de limiter l'expression de sa protéine VSR en raison des dégâts importants causés par cette protéine qui agit sur la régulation des gènes via les miRNA endogènes. Il est d'ailleurs impossible de créer des lignées d'*A. thaliana* exprimant la P0 sous le contrôle d'un promoteur fort et constitutif, comme le promoteur 35S, car les plantules meurent à la germination. Il est en revanche possible de créer des lignées exprimant la P0 sous le contrôle d'un promoteur inductible (De Cilia, 2011).

b) P1 et P1-P2 : protéines de réplication

La synthèse de la protéine P1, codée par l'ORF 1, s'effectue par un mécanisme de *leaky scanning* expliqué ci-dessus. La synthèse de la protéine P1-P2 résulte d'un mécanisme de décalage du cadre de lecture au cours duquel les ribosomes reculent d'un nucléotide (*frameshift-1*). Ce décalage a lieu au niveau d'une séquence consensus de 7 nucléotides localisée sur l'ORF 1 : XXXYYYZ (avec X=A, U, G, C; Y=A, U; Z=A, U, C). Ce mécanisme est aussi favorisé par une région fortement structurée, dénommée « pseudo-nœud », présente en aval de la séquence consensus (Miller *et al.*, 1995).

Les protéines P1 et P1-P2 interviennent dans la réplication du virus et possèdent plusieurs domaines fonctionnels représentés ci-dessous dans la **Figure 8**:

- **Un domaine protéase** uniquement présent chez les *Polerovirus* et *Enamovirus*, permet le clivage de la polyprotéine P1 et la libération de la partie C-terminale de la P1 (P1Cter) d'environ 25 kDa chez le PLRV (Prüfer *et al.*, 1999). Le domaine catalytique de la protéase à sérine de type *chymotrypsin-like* est conservé chez les polérovirus : $HX_{29-34}[D/E]X_{62-63}TXKGYSG$. (Habili & Symons, 1989; Mayo & Ziegler-Graff, 1996; Miller *et al.*, 1995). Le clivage se fait potentiellement en *trans*, comme cela a pu être montré dans un système baculovirus et en traduction *in vitro* (Li *et al.*, 2000). Aucune preuve d'un clivage en *cis* n'a été observée dans le système de traduction *in vitro*, mais un clivage en *cis* faisant intervenir un co-facteur est toujours envisageable (Li *et al.*, 2000).
- Le peptide libéré par le clivage de P1 comprend le **domaine de liaison à l'ARN** et libère la protéine VPg probablement après la fixation de P1Cter sur l'ARNg (Prüfer *et al.*, 1999). La VPg, un peptide d'environ 30 acides aminés, est liée de manière covalente à l'extrémité 5' de l'ARNg (Mayo *et al.*, 1982; van der Wilk *et al.*, 1997).
- **Le domaine hélicase** présent dans la P1 permet de dérouler l'ARN viral et de dissocier les interactions ARN/protéines pour faciliter la réplication.
- **Le domaine polymérase (RdRp),** situé en C-terminal de P1-P2, possède le motif GDD consensus des RdRp virales : $GX_3TX_3NX_{25-40}GDD$.
- **Un domaine hydrophobe potentiellement transmembranaire** est localisé en N-terminal des P1 et P1-P2, appuyant l'hypothèse que le complexe de réplication pourrait être lié aux membranes (Prüfer *et al.*, 1999)

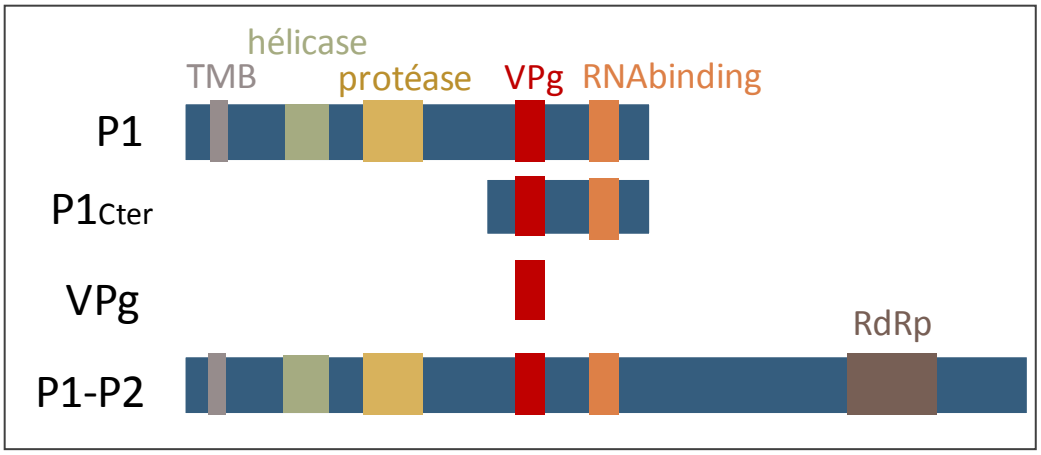


Figure 8 : Représentation schématique des protéines codées par les ORFs 1 et 2. Les protéines P1, P1-P2 et P1Cter sont représentées par trois rectangles bleus. La position des différents domaines protéiques est indiquée par différentes couleurs : domaine transmembranaire TMB (gris), hélicase (vert), protéase (jaune), domaine VPg (rouge), domaine de liaison à l'ARN (orange), et domaine RdRp (brun). Le clivage de la protéine P1 permet la libération d'un peptide P1Cter, lui-même maturé pour libérer la VPg. C'est le domaine protéase de la P1 qui permet l'ensemble de ces clivages.

c) P3 et P3-P5 : protéines de capside

Les deux protéines codées par les ORFs 3 et 5 sont les protéines structurales du virus qui entrent dans la composition des particules virales. L'expression de ces deux protéines nécessite au préalable la synthèse de l'ARNsg1. La P3, synthétisée à partir de l'ORF 3, est la protéine majeure de capside (CP) d'environ 22 kDa. La protéine P3-P5, synthétisée par un mécanisme de translecture du codon stop de l'ORF 3, est la protéine de readthrough (RT)

d'environ 75 kDa, dont une version délétée de son domaine C-terminal est présente dans les virions. Cette protéine structurale d'environ 55 à 65 kDa est appelée RT* (**Figure 9 A**). Une particule virale est composée de 180 sous-unités de capside, majoritairement des protéines CP et quelques RT* dont le nombre exact n'est pas connu.

Aucune structure cristalline n'existe pour la protéine CP ou pour les particules virales, mais un grand nombre de données sont disponibles sur la structure prédictive de la CP du PLRV. La structure secondaire de la protéine CP est similaire à celle du *Southern cowpea mosaic virus* (SCPMV, *Sobemovirus*) et du *Tomato bushy stunt virus* (TBSV, *Tombusvirus*) (Dolja & Koonin, 1991; Mayo & Ziegler-Graff, 1996; Terradot *et al.*, 2001; Torrance, 1992). La protéine CP du PLRV est constituée de deux domaines (Chavez *et al.*, 2012; Terradot *et al.*, 2001; Torrance, 1992) (**Figure 9 A**) dont l'organisation est conservée chez les *Luteoviridae*:

- **Un domaine N-terminal riche en arginines (R)** situé très probablement à l'intérieur des virions et associé à l'ARN viral par des interactions de charges.
- **Domaine C-terminal formant la coque (*shell*, S)** de la particule virale et qui adopte une conformation en *jelly-roll*. Deux séquences du domaine S de la CP du PLRV ont été décrites comme fortement immunogéniques et nommées épitopes 5 et 10 (Torrance, 1992). Ces deux épitopes sont localisés au niveau de boucles exposées en surface des virions (Terradot *et al.*, 2001; Torrance, 1992).

Malgré l'absence de structure cristalline de la CP, l'ensemble des données obtenues au cours d'études faisant intervenir des virus portant des mutations ciblant la séquence de la CP ont permis de valider un modèle tridimensionnel de la CP du PLRV et du TuYV (Brault *et al.*, 2003; Chavez *et al.*, 2012; Kaplan *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2005b) (**Figure 9 B et C**).

La présence de la CP n'est pas indispensable à la réplication virale dans des protoplastes, mais son absence empêche la protection des ARN viraux face aux ribonucléases cellulaires et réduit l'accumulation des ARN viraux (Reutenauer *et al.*, 1993). Contrairement à la CP qui est essentielle à l'infection systémique des plantes, la RT n'est pas strictement nécessaire mais influence grandement le phénomène (Brault *et al.*, 2003; Ziegler-Graff *et al.*, 1996). Ainsi, dans le cas du CABYV, la RT ou le domaine C-terminal de la RT seraient indispensables au mouvement systémique du virus en agissant en *trans* sur les particules virales pour promouvoir leur libération dans les tubes criblés (Boissinot, 2013). La CP et la RT* sont par contre toutes deux strictement nécessaires à la transmission par puceron (Brault *et al.*, 1995, 2003; Bruyère *et al.*, 1997). De plus, la localisation nucléaire et nucléolaire de la CP du TuYV et du PLRV suggère que cette protéine virale pourrait aussi influencer la régulation des gènes cellulaires, ou interagir avec des protéines nucléaires essentielles au cycle viral (De Cilia, 2011; Haupt *et al.*, 2005).

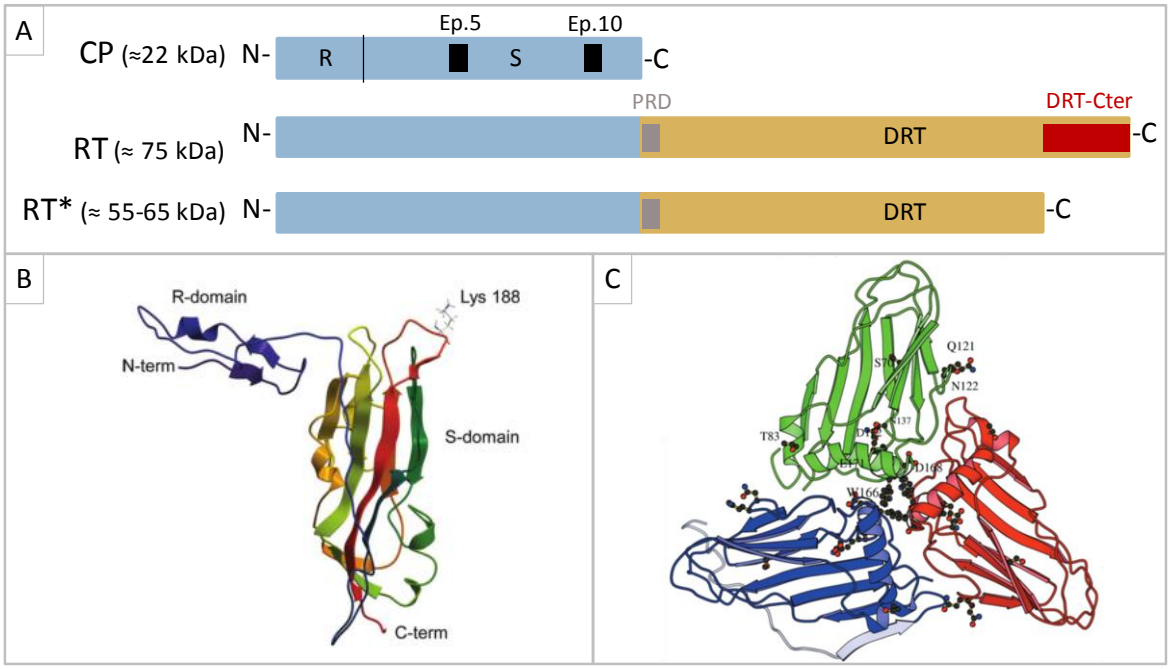


Figure 9 : Protéines codées par les ORF3 et 5 des polérovirus. **A)** Représentation schématique des trois protéines de capside : la protéine majeure (CP) est constituée d'un domaine riche en arginines (R) et d'un domaine C-terminal situé en surface des particules virales (S). Dans ce domaine S, deux séquences du PLRV ont été décrites comme fortement immunogéniques et nommées épitopes (ep.)5 et 10. La protéine RT comporte la CP dans sa partie N-terminale et le domaine de *readthrough* (DRT) en C-terminal. Les deux domaines sont séparés par une séquence riche en prolines (*Proline rich domain*, PRD). La RT*, insérée dans les virions, est dépourvue du domaine C-terminal de la RT (DRT-Cter). **B)** Modèle tridimensionnel d'un monomère de la CP du PLRV. Le domaine S adopte une conformation en *jelly-roll*, tandis que le domaine R est désordonné (Chavez *et al.*, 2012). **C)** Modèle tridimensionnel d'un trimère de CP du TuYV, le domaine R désordonné n'étant représenté que dans la sous-unité bleue (Brault *et al.*, 2003).

d) P4 : protéine de mouvement

La protéine codée par l'ORF 4 est exprimée à partir de l'ARNsg1. Le contexte de l'AUG de cet ORF 4 est meilleur que celui de la CP, mais les deux protéines sont toutes les deux bien exprimées dans les plantes et facilement détectables par western blot. La P4 est une protéine de 17 à 21 kDa, selon l'espèce virale considérée. La région N-terminale chargée négativement adopte une conformation en trois hélices α, tandis que la région C-terminale chargée positivement se replie en feuillets β (Mayo & Ziegler-Graff, 1996; Tacke *et al.*, 1991, 1993) (**Figure 10**).

La protéine P4 est à l'heure actuelle considérée comme la protéine de mouvement des *Polerovirus* et *Luteovirus* puisqu'elle possède les caractéristiques décrites précédemment pour la 30K du TMV.

- **Interaction avec l'ARN viral.** La région C-terminale possède la capacité de liaison aux acides nucléiques de manière séquence-indépendante (Tacke *et al.*, 1991) et peut donc se lier à l'ARNg viral.
- **Interaction avec les plasmodesmes : localisation subcellulaire et augmentation du SEL.** La P4 du PLRV est la première à avoir été localisée au niveau des plasmodesmes (Schmitz *et al.*, 1997), puis cette localisation a été confirmée pour les P4 du TuYV, du CABYV et du BYDV qui co-localisent avec la protéine PDLP1 au niveau des plasmodesmes (De Cilia, 2011). De plus, la P4 du PLRV est capable d'augmenter le SEL des plasmodesmes du mésophylle de 1 à 12 kDa (Hofius *et al.*, 2001). Cette

localisation aux plasmodesmes dépend des filaments d'actine et des membranes du réseau RE/Golgi (Vogel *et al.*, 2007).

- **Fonctions contrôlées par la phosphorylation.** La P4 est retrouvée sous une forme phosphorylée dans les cellules infectées, mais les fonctions qu'assurent la phosphorylation ne sont pas encore élucidées (Tacke *et al.*, 1993). Il a par ailleurs été montré que la p17 du PLRV est phosphorylée par une kinase membranaire de type protéine kinase C (PKC) (Sokolova *et al.*, 1997).
- **Homodimérisation.** La P4 est capable de s'auto-associer via son domaine N-terminal, responsable des interactions protéine/protéine (Tacke *et al.*, 1991).

En tenant compte de ces caractéristiques, il a été suggéré que cette protéine intervienne dans le mouvement à courte distance entre cellules nucléées du phloème, participant potentiellement au transport de complexes RNP (Ziegler-Graff *et al.*, 1996). Cependant, cette protéine se localise également au niveau de vésicules autour du noyau pouvant correspondre à des sites de réplication du virus (Liu *et al.*, 2005; Schmitz *et al.*, 1997), et il est donc envisageable que la fonction de cette protéine ne se restreigne pas au mouvement, mais qu'elle intervienne aussi dans d'autres étapes du cycle viral comme la réplication.

Par ailleurs, et de manière tout à fait singulière, la synthèse de la protéine P4 n'est pas une nécessité dans tous les hôtes. Ainsi, un mutant du PLRV ne synthétisant pas la p17 est incapable d'infecter de manière systémique les hôtes *Solanum tuberosum* et *Physalis floridana*, alors qu'il s'accumule très bien dans les feuilles inoculées de cet hôte (Lee *et al.*, 2002). A l'inverse, ce même mutant accomplit son cycle infectieux complet dans *N. benthamiana* et *N. clevelandii* (Lee *et al.*, 2002). Dans le cas du TuYV, la protéine P4 n'est pas nécessaire à l'infection systémique de *N. clevelandii* (Ziegler-Graff *et al.*, 1996). Ainsi, il existerait un cycle viral P4-dépendant et un cycle P4-indépendant, selon l'hôte du virus.

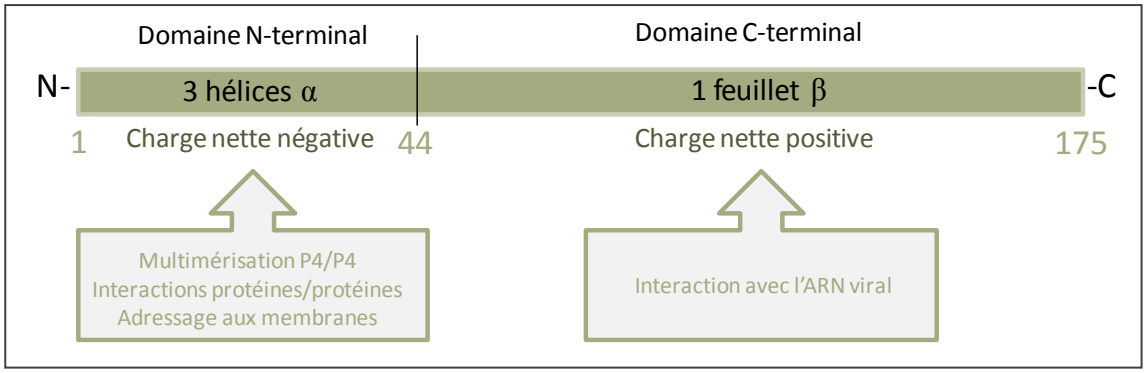


Figure 10 : Représentation schématique des deux régions de la protéine P4 du TuYV. La P4 peut être séparée en deux domaines fonctionnels selon la charge globale et l'organisation en hélices α ou feuillet β.

e) Protéines putatives

Un ARNsg supplémentaire couvrant l'extrémité 3' du génome des *Luteovirus* et *Polerovirus* et contenant deux ORFs additionnelles pourrait être synthétisé. Cet ARNsg 2 a été mis en évidence dans les plantes et protoplastes infectés par le BYDV (Dinesh-Kumar *et al.*, 1992), et dans les plantes infectées par le PLRV et le CABYV (Ashoub *et al.*, 1998). Cet ARNsg 2 d'environ 0.8 kb contient les ORFs 6 et 7 codant potentiellement et respectivement pour une P6 et une P7. D'après des prédictions informatiques, seule une grande ORF 7 serait

présente sur l'ARNsg2 du BMYV et du BWYV (Ashoub *et al.*, 1998; Dinesh-Kumar *et al.*, 1992) (**Figure 11**).
Les ORFs 6 et 7 sont dans deux cadres de lecture différents, l'ORF 7 correspondant au domaine C-terminal de l'ORF 5 (Ashoub *et al.*, 1998). Des expériences d'expression transitoire en protoplastes du gène rapporteur β-glucuronidase (GUS, *E. coli*) fusionné à l'une ou l'autre des deux ORFs, ont démontré que le ratio d'expression P6-GUS : P7-GUS est de 16 : 1 (Ashoub *et al.*, 1998).
Les fonctions de ces protéines, si elles sont effectivement synthétisées lors de l'infection virale, restent encore inconnues. Cependant, les P6 et P7 du PLRV sont des protéines basiques pouvant potentiellement interagir avec l'ARN viral. Une interaction P7/ARN a d'ailleurs été mise en évidence *in vitro* pour le PLRV (Ashoub *et al.*, 1998).

Par ailleurs, une ORF incluse dans l'ORF 1 et codant potentiellement pour une protéine de 5 kDa a été identifiée chez le PLRV (Jaag *et al.*, 2003). La protéine Rap1 (*Replication-associated protein 1*) serait exprimée par un mécanisme d'initiation interne grâce à la présence d'une séquence IRES localisée, de façon surprenante, 22 nucléotides en aval de l'AUG de cette petite ORF (Jaag *et al.*, 2003). Il semblerait que cette protéine intervienne dans la réplication du PLRV, mais également dans la synthèse de l'ARNsg 1. En effet, un mutant ponctuel affecté dans l'expression de Rap1 est capable, dans les protoplastes, de synthétiser la P1 mais pas la CP (Jaag *et al.*, 2003).

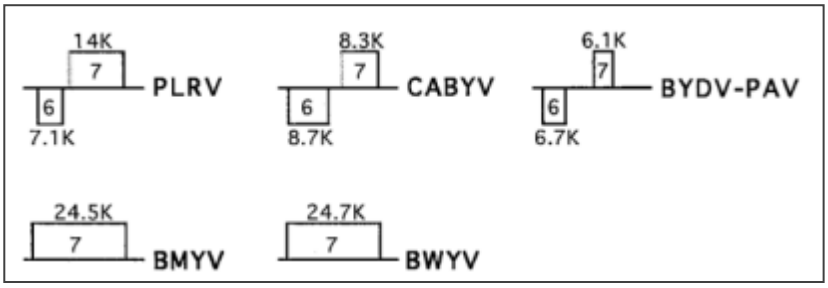


Figure 11 : Organisation de l'ARNsg2 de différents *Luteoviridae*. Les ORFs 6 et 7 prédites codent potentiellement pour des protéines dont la taille en kDa est indiquée au-dessus de chaque rectangle représentant une ORF (Ashoub *et al.*, 1998).

2.3 Restriction aux cellules du phloème

Une des particularités des polérovirus (et des *Luteoviridae* de manière générale) est leur restriction aux cellules du phloème. Cependant, quelques cellules non vasculaires peuvent aussi être infectées, probablement suite aux piqures d'épreuve des pucerons. Ainsi le PLRV est retrouvé dans des cellules du mésophylle de *N. clevelandii* (Barker, 1987) et de *S. tuberosum* (Van Den Heuvel *et al.*, 1995), mais aucun mouvement de cellule à cellule n'est détecté dans ce type cellulaire. Les polérovirus se répliquent et sont transportés à courte distance dans les CC et cellules du PV, puis sont transportés à longue distance dans les TC. Les polérovirus sont aussi capables de se répliquer dans les protoplastes de cellules du mésophylle (Reutenauer *et al.*, 1993). Leur restriction phloémienne ne peut donc pas s'expliquer par une incapacité de se répliquer dans les cellules non-phloémiennes.
De manière intéressante, dans des plantes transgéniques exprimant le génome complet du PLRV sous le contrôle d'un promoteur 35S, seules quelques cellules du mésophylle et de l'épiderme sont infectées par le virus (Barker *et al.*, 2001; Franco-Lara *et al.*, 1999) qui se retrouve exclusivement dans les cellules du phloème. Un résultat similaire a été trouvé dans le cas de plantes transgéniques exprimant le clone complet infectieux du TuYV, mais pas

lorsque les plantes sont transformées avec un clone viral défectif pour la réplication portant une délétion dans l'ORF2 (De Cilia, 2011).
Plusieurs hypothèses sont émises à l'heure actuelle pour expliquer cette restriction aux cellules phloémiennes :

- Les polérovirus ne sont pas capables de transiter à courte distance entre cellules non phloémiennes (Taliansky & Barker, 1999). La protéine P4 est en effet majoritairement associée aux PPUs du tissu vasculaire (Schmitz *et al.*, 1997) et pourrait être peu ou pas efficace dans les tissus non vasculaires.
- La protéine P0 ne permet pas de bloquer le transport du signal de *RNA silencing* vers les cellules du mésophylle (Csorba *et al.*, 2010). Ce phénomène empêcherait l'invasion de cellules non-phloémiennes, car l'ARN viral serait immédiatement ciblé par le mécanisme de défense de la plante (De Cilia, 2011).
- Le domaine DRT-C-ter de la protéine RT (**Figure 9 A**) serait nécessaire à la restriction du PLRV aux cellules du phloème. En absence de ce domaine, le virus mutant est capable d'envahir les tissus non-phloémiens, mais seulement chez certaines espèces végétales et après la taille de la plante (Peter *et al.*, 2009, 2008).

Du fait de cette restriction aux cellules du phloème, les polérovirus ne peuvent pas être transmis mécaniquement de plante à plante. Leur inoculation dépend des pucerons, mais peut aussi être réalisée artificiellement par agro-infiltration. Cependant, des études ont démontré que certaines associations entre des *Luteoviridae* et des *Umbravirus* peuvent permettre aux *Luteoviridae* de s'échapper des cellules du phloème. Par exemple, il a été montré que le PEMV-1 (*Enamovirus*) peut être inoculé mécaniquement en présence du PEMV-2 (*Umbravirus*). Le complexe PEMV est très particulier puisque ces deux virus sont strictement dépendants l'un de l'autre: le PEMV-1 fournit les protéines de capside qui assure la transmission par puceron du PEMV-2 ; le PEMV-2 fournit les protéines de mouvement à courte distance qui permettent au PEMV-1 de bouger dans toute la plante (Falk *et al.*, 1999). Ce type de complémentation a également été montré entre le PLRV et le PEMV-2 (Mayo *et al.*, 2000; Ryabov *et al.*, 2001), permettant au PLRV d'être transmis mécaniquement et transporté de cellule à cellule.

2.4 Transmission par puceron

Les polérovirus sont uniquement transmis par puceron via le mode circulant non réplicatif. Le processus complet est décrit dans la légende de la **Figure 12**. L'internalisation des virions dans les cellules de l'insecte nécessite la reconnaissance du virus par des récepteurs spécifiques. Ces récepteurs se trouvent au niveau de la membrane apicale du tube digestif et au niveau de la lamelle basale et de la membrane basale des cellules des glandes salivaires accessoires (GSA). L'identification des récepteurs du TuYV se poursuit à l'heure actuelle au laboratoire.

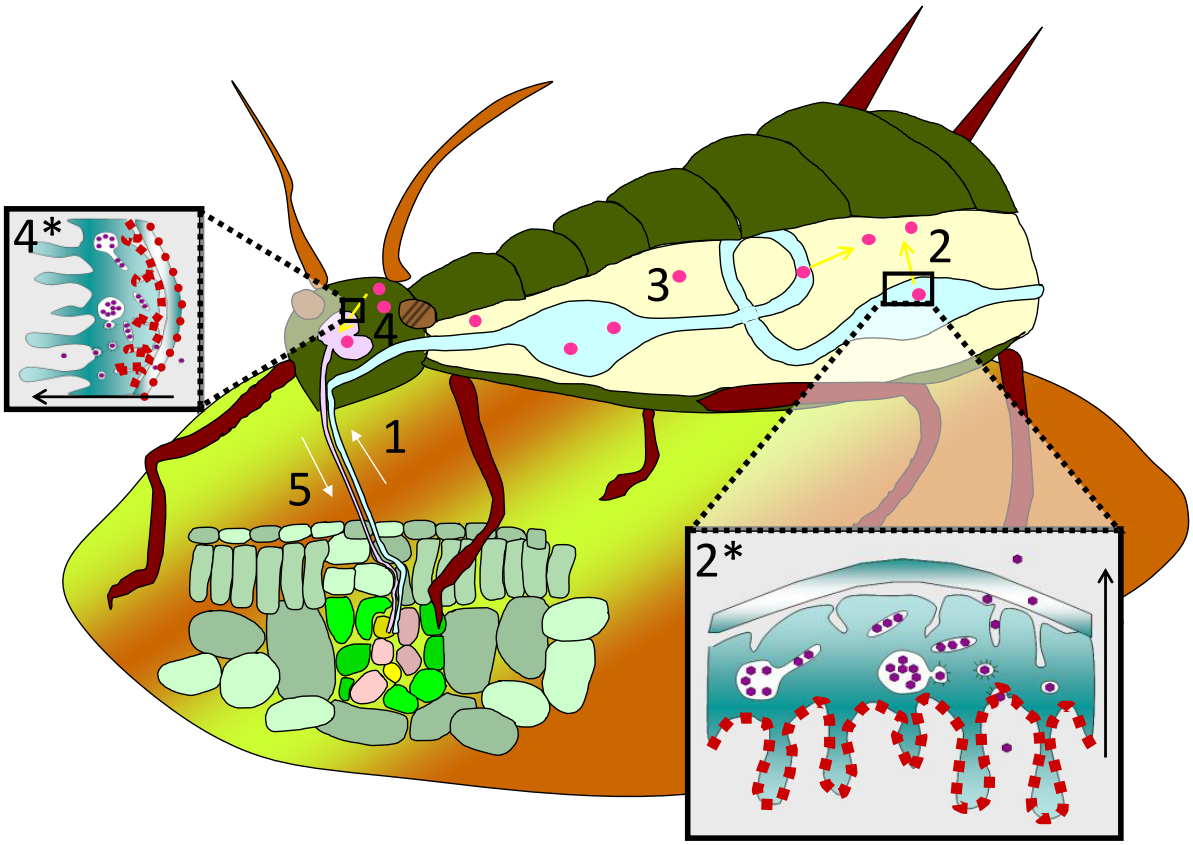


Figure 12 : Transport des virions des polérovirus dans les pucerons vecteurs (dessin adapté de Brault et al., 2007a). Les virions présents dans les tubes criblés sont acquis lorsque les pucerons se nourrissent de sève phloémienne (1). Les virions cheminent ensuite dans le corps de l'insecte en traversant les cellules du tube digestif pour se retrouver dans l'hémolymphe (2), puis rejoignent les cellules des glandes salivaires accessoires (GSA) (4). Lorsque le puceron se nourrit sur une nouvelle plante, les pucerons présents dans le canal salivaire sont injectés avec la salive (5). Les polérovirus ne se répliquent pas dans les cellules de l'insecte ; on parle de transcytose. Les particules virales sont internalisées au niveau de la membrane apicale du tube digestif par un mécanisme d'endocytose faisant intervenir des vésicules à clathrine (2*). Plusieurs vésicules fusionnent dans la cellule pour former des vésicules tubulaires, voire des endosomes. L'exocytose se déroule au niveau de la membrane basale et permet la libération des virions dans l'hémolymphe (2*). Le mécanisme de transcytose au niveau des cellules des GSA est similaire, sauf que les virions sont acheminés depuis la membrane basale jusqu'à la membrane apicale (4*). Dans l'hémolymphe, les virions sont probablement associés à la symbionine, une protéine d'origine symbiotique proche de GroEL et synthétisée par les bactéries symbiotiques présentes dans le corps du puceron (3).
Résultats de (Brault *et al.*, 2007a; Gildow, 1999; Reinbold *et al.*, 2001).

2.5 Cycle viral des polérovirus

En raison de la restriction des *Luteoviridae* aux cellules du phloème, leur cycle viral se déroule exclusivement dans le tissu vasculaire (**Figure 13**). Il est généralement admis que les pucerons vecteurs inoculent directement les virions dans les tubes criblés via leur salive lors de leur prise de nourriture. Cependant, les pucerons effectuent aussi des piqures d'épreuve tout au long du cheminement du stylet jusqu'aux TC et les cellules nucléés du phloème peuvent donc être potentiellement inoculées avec quelques virions (Moreno *et al.*, 2011; Tjallingii, 2006). A partir de ces cellules du phloème primo-infectées, le cycle viral peut être amorcé et le virus peut ensuite se propager à l'ensemble de la plante. Le site de la réplication des polérovirus n'est pas encore clairement identifié, mais dans le cas du PLRV, il semblerait que des vésicules associées à la membrane périnucléaire jouent ce rôle (Schmitz *et al.*, 1997). Le mouvement à courte distance des polérovirus au travers des

plasmodesmes concerne uniquement les cellules nucléées phloémiennes. Lorsque le virus entre dans les tubes criblés au travers des PPUs, il est alors transporté à longue distance en cheminant vraisemblablement avec le flux de sève élaborée. Le virus rejoint ensuite de nouvelles cellules nucléées du phloème pour le démarrage de nouveaux sites d'infection distants du site primaire d'inoculation par le puceron. On parle alors d'infection systémique de la plante.

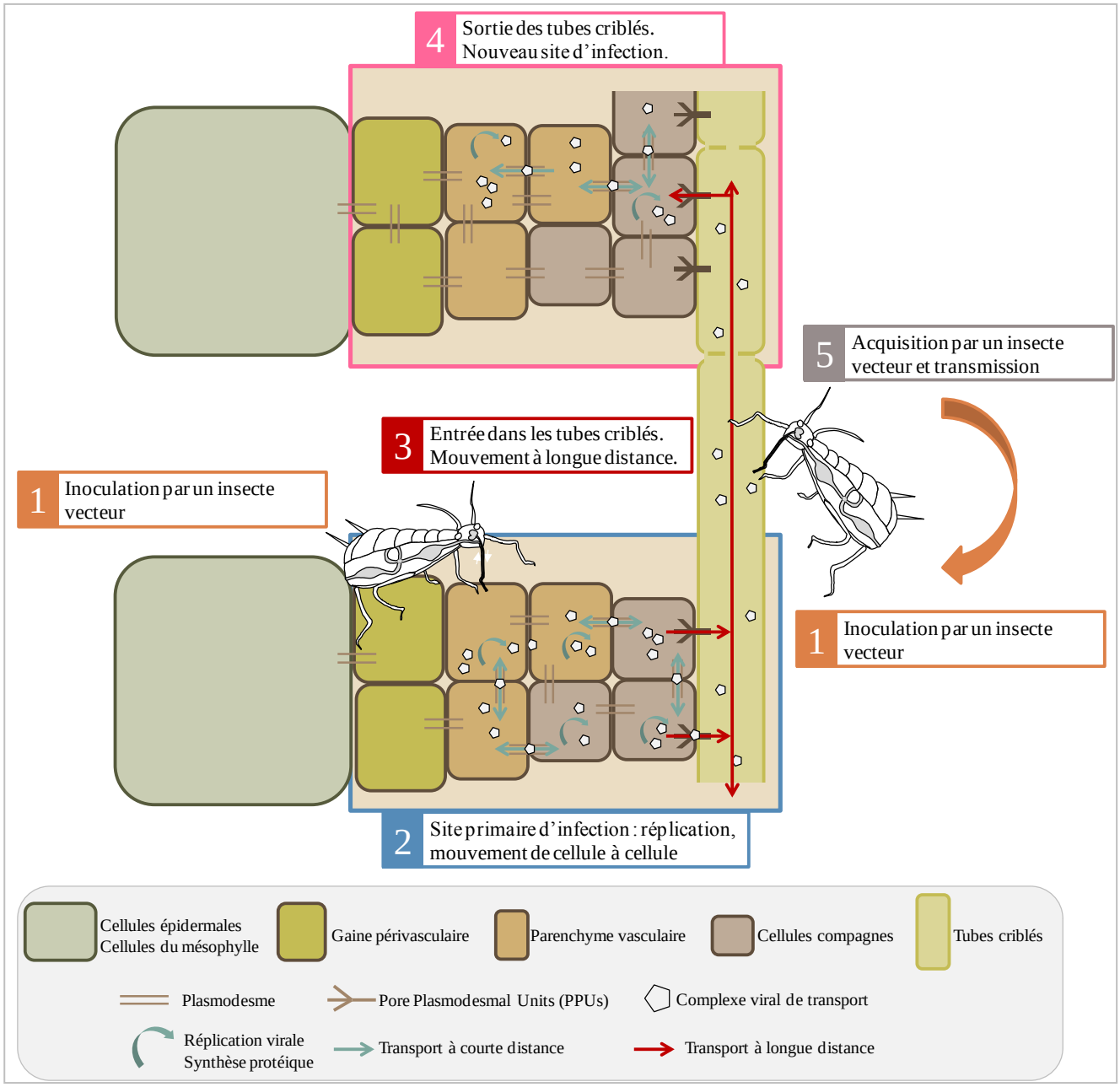


Figure 13 : Etapes majeures du cycle viral d'un *Polerovirus* dans une plante hôte. Après inoculation par puceron des virions dans le tissu vasculaire (1), l'ARN génomique viral est répliqué et les protéines virales synthétisées au niveau du site primaire d'infection (2). Des complexes viraux (virions ou complexes RNP), formés par association entre l'ARN génomique et différentes protéines virales et/ou cellulaires, permettent le transport à courte distance entre les cellules nucléées du phloème (2) et à longue distance via les tubes criblés (3). De nouveaux sites d'infection apparaissent dans les parties distales de la plante lorsque les complexes viraux sortent des tubes criblés (4), permettant ainsi l'infection systémique de l'hôte. Les virions présents dans la sève peuvent être acquis par des pucerons vecteurs et transmis à de nouvelles plantes hôtes pour démarrer une nouvelle infection (5).

3. Enjeux du travail de thèse

Comme décrit précédemment, les différentes espèces de *Polerovirus* causent des dommages importants sur les cultures. Le seul moyen de lutte efficace utilisé actuellement est le traitement insecticide visant à réduire la population de pucerons vecteurs. Cependant, avec les enjeux actuels de préservation de l'environnement et de la santé humaine, des nouvelles méthodes de lutte efficaces et respectueuses de l'environnement et de l'homme doivent être trouvées. L'obtention de connaissances dites fondamentales sur le cycle des polérovirus, et l'utilisation de ces données pour la création, ou la sélection, de nouvelles variétés permettant de limiter les dégâts causés par les *Luteoviridae*, est une stratégie à part entière.

L'étape du cycle viral sur laquelle s'est concentrée mon travail de thèse est le mouvement à longue distance du virus. En effet, cette étape contrôle non seulement l'infection systémique de la plante, mais également l'acquisition du virus par le puceron puisque c'est au niveau des tubes criblés que s'effectuent ces deux processus. En inhibant ou diminuant le transport vasculaire du virus, il est envisageable de réduire l'acquisition du virus par les pucerons ainsi que les dégâts causés par l'infection virale. Plusieurs questions ont donc été posées au début de cette thèse :

- Comment se déroule le mouvement à longue distance des polérovirus? Sous quelle forme le virus se déplace-t-il dans les tubes criblés : virions ou complexes RNP? Quelles protéines phloémiennes pourraient éventuellement entrer dans la formation ou le mouvement des complexes RNP viraux ?
- Quel rôle joue la protéine de mouvement P4 dans le cycle viral ? A-t-elle un rôle dans le transport du virus à longue distance ? Quels sont ses partenaires cellulaires ?

Pour répondre à ces questions, j'ai recherché la présence des complexes RNP dans la sève de *C. sativus* et d'*A. thaliana* (Chapitre 1). En utilisant des mutants du TuYV modifiés dans la protéine de capside, j'ai aussi cherché à déterminer si les particules virales sont la seule forme de transport du virus à longue distance (Chapitre 1). En parallèle, grâce à un criblage en double hybride de banques d'ADNc d'*A. thaliana*, j'ai recherché les partenaires cellulaires de la protéine P4 (Chapitre 2) qui a potentiellement une fonction dans le mouvement à longue distance.

CHAPITRE 1 : NATURE DU COMPLEXE VIRAL IMPLIQUE DANS LE MOUVEMENT A LONGUE DISTANCE DES POLEROVIRUS

1. Objectifs du chapitre 1

La nature du complexe viral transporté dans la sève n'a pas encore été identifiée pour les polérovirus. L'hypothèse actuellement énoncée est un mouvement à longue distance sous forme de virions. Cette hypothèse se base sur plusieurs données : l'observation de virions dans la sève phloémienne et dans les plasmodesmes reliant les CC et les TC (D'Arcy & De Zoeten, 1979; Esau & Hoefert, 1972; Mutterer *et al.*, 1999; Schmitz *et al.*, 1997; Shepardson *et al.*, 1980), et l'importance de la CP pour obtenir une infection systémique du virus (Brault *et al.*, 2000, 2003; Bruyère *et al.*, 1997; Chavez *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2005b; Mutterer *et al.*, 1999; Reutenauer *et al.*, 1993; Ziegler-Graff *et al.*, 1996). Cependant, la seule présence des virions dans les tubes criblés ne peut en aucun cas prouver que les virions sont responsables du mouvement à longue distance des polérovirus. En effet, ce pool de virus dans la sève peut constituer un réservoir de virions pour la transmission par pucerons et il est envisageable que le transport des virus soit assuré par une autre entité virale. De même, dans le cas où les virions permettraient effectivement le cheminement du virus dans les TC, un transport parallèle sous forme de complexes RNP pourrait également exister. Un système bimodal de transport a déjà été observé pour le *Potato mop-top virus* (PMTV, *Pomovirus*) pour lequel la formation de virions est nécessaire au mouvement de l'ARN 3, tandis que les ARN 1 et 2 peuvent aussi être transportés sous forme de complexes RNP (McGeachy & Barker, 2000; Savenkov, 2003; Torrance *et al.*, 2009, 2011; Wright *et al.*, 2010). Dans le cas du PMTV les deux formes de transport sont utilisées dans tous les hôtes, mais le *Cymbidium ringspot virus (*CymRSV, *Tombusvirus*) varie son mode de transport selon l'hôte infecté. En effet, alors que des complexes RNP permettent un mouvement efficace dans *N. benthamiana*, la formation de virions est nécessaire à l'infection systémique de *N. clevelandii* (Dalmay *et al.*, 1992; Havelda *et al.*, 2003).

Les expériences préalables de mutagenèse dirigée ciblant la CP des polérovirus ont suggéré l'importance de cette protéine dans le mouvement à longue distance. Néanmoins, cette conclusion se basant sur l'utilisation de formes mutées de la CP ne permet pas non plus d'écarter l'implication des complexes RNP dans ce processus si ceux-ci sont constitués, en partie, de protéines CP natives.
L'objectif de ce premier chapitre de mon travail de thèse est donc (i) de rechercher l'existence de complexes RNP dans les plantes infectées par les *Polerovirus*, et (ii) de connaître la nature du (des) complexe(s) viral(aux) de transport à longue distance. Le TuYV et le CABYV, décrits dans l'introduction bibliographique, ont servi de modèles pour cette étude.

2. Les complexes RNP jouent-ils un rôle dans le mouvement des polérovirus ?

2.1 Recherche de complexes RNP dans la sève de *C. sativus* infecté par le CABYV

Dans l'éventualité où les complexes RNP permettent le mouvement à longue distance des polérovirus, ceux-ci doivent cheminer dans la sève phloémienne. Leur présence a donc été directement recherchée dans la sève de *C. sativus* (concombre) infecté par le CABYV. La détection des complexes RNP à partir de sève élaborée par une réaction de RT-PCR ne peut malheureusement pas être envisagée en raison de la présence des particules virales dans la sève qui seraient, elles aussi, détectées par ce procédé. Nous avons donc cherché une technique permettant de séparer les virions présents dans la sève des éventuels complexes RNP.
Il existe des méthodes de séparation des protéines et des ARN utilisant des membranes de nitrocellulose, et nous avons voulu nous approcher de cette technique en testant l'utilisation de colonnes Amicon® (*Millipore*) permettant de séparer les molécules selon leur poids moléculaire (PM) par filtration sur une membrane de cellulose (**cf matériel et méthodes**).

Des colonnes Amicon® présentant différentes tailles d'exclusion (10, 30 et 50 kDa) ont servi à la mise au point de la technique. Pour tester la rétention des virions sur la membrane, une colonne a été chargée avec 1 µg de particules virales purifiées de CABYV. Une deuxième colonne a servi à tester le passage des transcrits de ce virus. Après centrifugation des échantillons dans les colonnes, le contenu du retenu (R) ainsi que de l'éluât (E) a été analysé par RT-PCR. Les colonnes d'exclusion de 30 kDa ont finalement été choisies pour la suite des expériences, car ce sont les seules qui permettent de retenir les virions dans la partie R (**Figure 14 A**), alors que les transcrits viraux passent au travers du filtre de la colonne et se retrouvent dans la partie E (**Figure 14 A**). Les colonnes avec un filtre de 10 kDa ne laissant pas passer les transcrits viraux, et celles avec un filtre de 50 kDa ne donnant pas de résultats reproductibles, ces deux types de colonnes n'ont pas été utilisés pour la suite des expériences.
Les colonnes de 30 kDa ont ensuite été chargées avec de la sève prélevée sur des *C. sativus* infectés par le CABYV. La RT-PCR réalisée sur les contenus de R et de E montre seulement un signal dans l'échantillon R, suggérant que seuls des virions et non des ARN viraux libres sont présents dans la sève (**Figure 14 B**). Cependant, si nous considérons que les ARN viraux ne circulent pas sous une forme libre dans la sève, mais plutôt en tant que complexes RNP, il est tout à fait envisageable que la fixation de protéines sur ces ARN bloque leur passage au travers de la membrane.

Afin d'évaluer cette hypothèse, nous avons incubé des transcrits du CABYV avec différentes protéines. La **Figure 14 C** montre que l'ajout de protéines de sève de *C. sativus* non-infectés aux transcrits viraux bloque leur passage à travers la membrane, et ce, quelque soit la quantité de protéines ajoutées, suggérant que les protéines présentes dans la sève peuvent s'associer à l'ARN génomique viral pour former des complexes RNP incapables de traverser la membrane de filtration. Une autre hypothèse pourrait être la saturation de la membrane par les protéines d'un PM supérieur à 30 kDa, présentes dans la sève, empêchant ainsi le passage de l'ARN viral. Cette hypothèse semble se confirmer lorsque l'on analyse les résultats de la filtration des transcrits viraux mélangés à des protéines purifiées qui n'ont pas de propriétés connues de fixation aux ARN (BSA : 67 kDa, et cytochrome C : 11 kDa).

L'ajout du Cytochrome C aux transcrits ne modifie pas leur capacité à traverser la membrane de filtration (**Figure 14 C**), alors qu'ils ne sont plus élués en présence de BSA (**Figure 14 C**).
Ces résultats montrent que la capacité des ARN viraux à être fixés à des protéines ne peut être évaluée par cette technique qu'avec des protéines qui possèdent un PM inférieur à 30 kDa et qui ne forment pas d'oligomères. Or, certaines protéines présentes dans la sève sont capables de former des dimères ou multimères pouvant entrainer la rétention de l'ARN viral sur les colonnes. C'est en effet le cas des protéines P d'*A. thaliana* AtPP2-A1 (26 kDa) et AtPP2-A2 (17 kDa) (Don de Sylvie Dinant, INRA Versailles et Denis Renard, INRA Nantes) qui possèdent un PM inférieur à 30 kDa, mais qui sont capables de former des multimères (**Figure 15**) pouvant entrainer la rétention des transcrits viraux sur les colonnes de 30 kDa (**Figure 14 C**). La recherche des complexes RNP des polérovirus dans la sève a été poursuivie en développant d'autres approches.

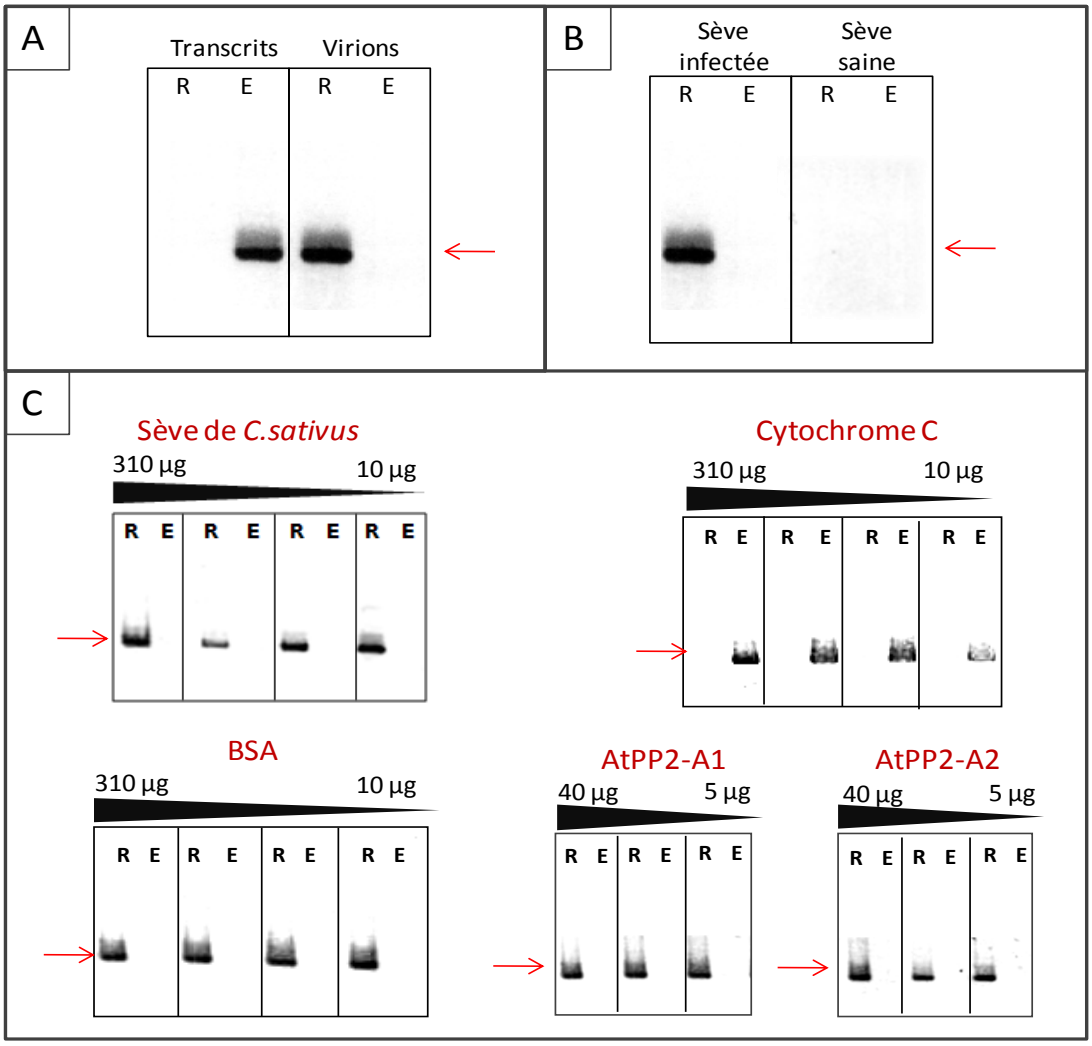


Figure 14 : RT-PCR sur les échantillons après passage sur des colonnes de séparation Amicon® 30 kDa. Une RT-PCR amplifiant un fragment de l'ARN viral du CABYV est réalisée sur le contenu du retenu (R) et de l'éluât (E). **(A)** La membrane d'exclusion de 30 kDa permet le passage des transcrits viraux et la rétention des virions. **(B)** Les virus présents dans les échantillons de sève de *C. sativus* infectés par le CABYV sont retenus sur la membrane. **(C)** RT-PCR après passage sur colonnes des transcrits viraux incubés avec différentes protéines. La quantité de protéines ajoutée aux ARN est indiquée au-dessus de chaque gel. Flèche rouge : fragment de RT-PCR de taille attendue.

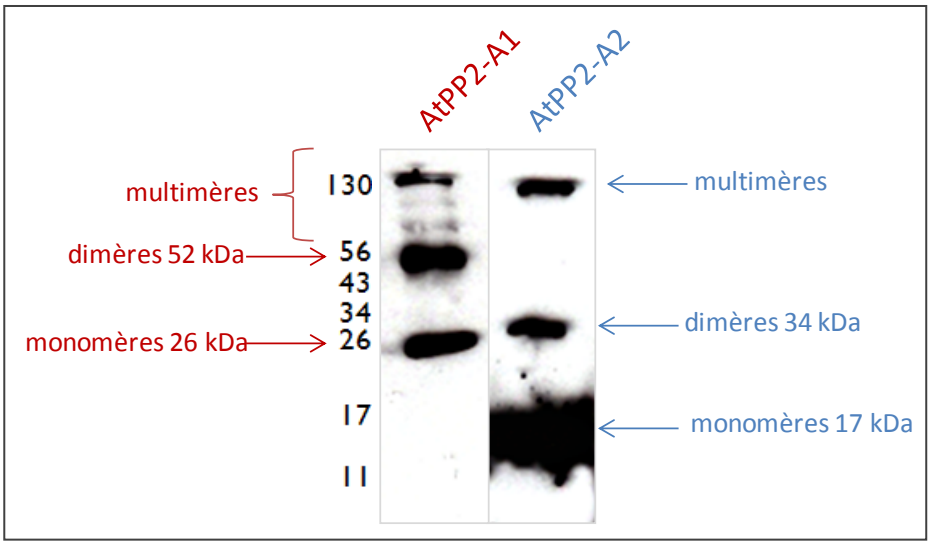


Figure 15 : Multimérisation des protéines phloémiennes AtPP2-A1 et AtPP2-A2. Les protéines fusionnées à une étiquette 6His sont détectées par un anticorps reconnaissant le tag 6His en western blot. AtPP2-A1 **(A)** et AtPP2-A2 **(B)** sont présentes sous forme de monomères, de dimères et de multimères.

2.2 Recherche des partenaires protéiques phloémiens de l'ARN génomique viral

De nombreuses espèces d'ARN ont été détectées dans la sève de plantes non-infectées, parmi lesquelles des ARNm, miRNA, et siRNA. Les ARN transportés à longue distance sont souvent associés à des protéines d'origines variées (Dinant & Lemoine, 2010; Kehr & Buhtz, 2007; Kragler, 2010; Pallas & Gómez, 2013). Dans le cas de plantes infectées par certains virus et viroïdes, on peut également trouver des complexes RNP qui cheminent dans la sève. Dans le cas des *Umbravirus*, les complexes RNP responsables du mouvement du virus sont formés par interaction entre l'ARN viral, la protéine virale P3 et une protéine nucléaire, la fibrillarine (Canetta *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2007a). Dans le cas des viroïdes, ce sont des protéines phloémiennes qui sont impliquées dans le mouvement à longue distance des ARN (Gómez & Pallás, 2001; Gomez *et al.*, 2005; Owens *et al.*, 2001). L'implication de protéines phloémiennes dans le transport vasculaire des ARN viraux peut s'effectuer à différentes étapes : la formation des complexes RNP, la modification des PPUs, la translocation de l'ARN au travers des PPUs, la protection de l'ARN face aux défenses de l'hôte, le mouvement dans les tubes criblés puis la sortie vers les cellules compagnes.

Dans le cas du mouvement à longue distance des polérovirus, il est envisageable que l'ARN viral soit associé à des protéines phloémiennes sous forme de complexes RNP capables d'être transportés au travers des PPUs et dans les tubes criblés. Ces protéines ayant pour origine les cellules nucléées phloémiennes où elles sont synthétisées, l'interaction avec l'ARN viral peut donc s'effectuer dans ces cellules, ou bien seulement lorsque les deux partenaires se trouvent dans les tubes criblés.
Nous avons recherché dans la sève la présence de protéines de l'hôte capables d'interagir avec l'ARN viral. Le but de cette étude est de voir s'il existe *in vitro* des interactions ARN/protéines pouvant potentiellement conduire *in vivo* au transport à longue distance de complexes RNP viraux. Le CABYV et le TuYV ont servi de modèles pour cette étude, en utilisant comme hôtes *C. sativus* et *A. thaliana* respectivement.

i) Recherche des protéines phloémiennes de *C. sativus* capables d'interagir avec l'ARN du CABYV

Les cucurbitacées possèdent une exsudation naturelle de sève phloémienne lorsqu'une coupure est effectuée au niveau des tiges ou des pétioles (**Figure 16**). Une quantité importante de sève peut ainsi être récoltée très facilement, faisant des cucurbitacées des plantes modèles pour l'étude du contenu de la sève élaborée (Turgeon & Oparka, 2010). En réalité, les cucurbitacées possèdent deux types de phloème. Le phloème fasciculaire, entourant le xylème qui est rapidement obstrué après coupure des tiges. L'obstruction des cribles de ce phloème implique le dépôt de callose et de protéines P (Turgeon & Oparka, 2010). A l'inverse, le phloème extra-fasciculaire, qui forme un réseau dans la tige, exsude longuement après une coupure (Turgeon & Oparka, 2010; Zhang *et al.*, 2010). L'absence de callose dans le phloème extra-fasciculaire pourrait expliquer l'obstruction lente des cribles (Turgeon & Oparka, 2010). La sève prélevée après exsudation de cucurbitacées provient donc en majeure partie du phloème extra-fasciculaire

Figure 16 : Exsudation de sève phloémienne de *C. sativus*. Après avoir coupé le pétiole à l'aide d'un scalpel, une gouttelette d'exsudation se forme rapidement. Celle-ci est prélevée et récupérée dans un tampon évitant sa gélification (cf Matériel et Méthodes).

La première expérience développée pour voir s'il existe dans la sève de *C. sativus* des protéines fixant les ARN du CABYV est le gel retard. Après récolte des exsudats de *C. sativus*, ceux-ci ont été incubés avec des transcrits du CABYV marqués à la digoxygénine (CABYV-DIG). Plusieurs incubations ont ainsi été réalisées avec une quantité croissante de protéines de sève. Après migration des échantillons sur un gel d'agarose non-dénaturant, les ARN ont été transférés sur une membrane de nylon et leur migration a été visualisée par révélation du marquage à la digoxygénine. Le retard de migration des ARN CABYV-DIG indique qu'il existe dans la sève des composants capables de se fixer à l'ARN (**Figure 17 A**). A l'inverse aucun retard de migration n'est observé lorsque les ARN sont incubés avec de la BSA, une protéine ne fixant pas les ARN (**Figure 17 B**). Un traitement préalable de la sève à la protéinase K abolit complètement la formation des complexes RNP (**Figure 17 C**), indiquant ainsi la nature protéique du composant fixant l'ARN CABYV-DIG.

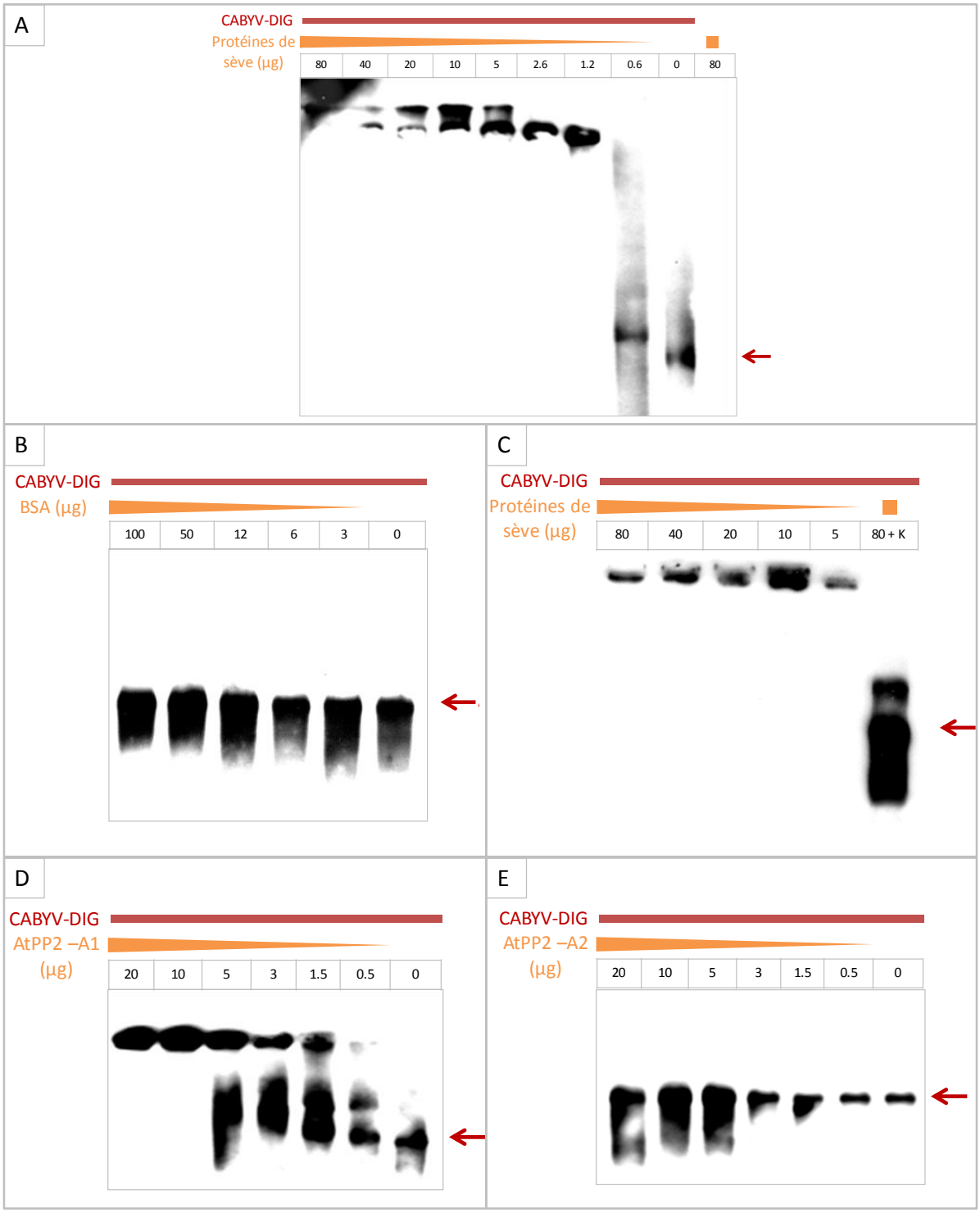


Figure 17 : Retard de migration de l'ARN du CABYV après incubation avec des protéines. La technique du gel retard permet de visualiser un retard de migration de l'ARN lorsqu'il y a interaction avec une protéine. Incubation préalable des ARN CABYV-DIG avec des quantités croissantes de protéines de sève de *C. sativus* (A), de BSA (B), d'AtPP2-A1 (D) et d'AtPP2-A2 (E). La dénaturation des protéines de sève de *C. sativus* par la protéinase K (80 + K) permet d'inhiber le retard de migration de l'ARN (C). La flèche rouge indique toujours la position de migration de l'ARN viral libre.

La technique du northwestern blot permet ensuite d'identifier les protéines de sève de *C. sativus* interagissant *in vitro* avec l'ARN génomique du CABYV. Des transcrits CABYV-DIG ont été incubés avec les protéines phloémiennes séparées sur un gel SDS-

PAGE puis transférées sur une membrane de nitrocellulose Six bandes correspondant à des protéines interagissant avec l'ARN du CABYV ont ainsi été détectées par révélation du marquage à la digoxygénine (**Figure 18**). Sur un gel SDS-PAGE réalisé en parallèle et simplement coloré au bleu de Coomassie, les bandes correspondant aux signaux ont été prélevées pour être soumises à un séquençage en spectrométrie de masse. La masse apparente des protéines interagissant potentiellement avec l'ARN du CABYV est de 16, 26, 27, 43, 55 et 57 kDa (**Figure 18**).

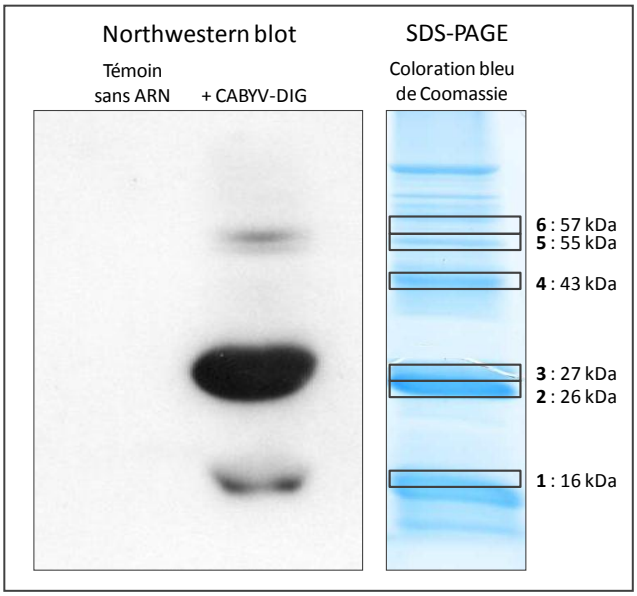


Figure 18 : Interactions entre l'ARN du CABYV et les protéines de sève de *C. sativus*. Les six protéines révélées par northwestern blot (à gauche) ont été prélevées à partir d'un gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie (à droite). Le signal sur l'autoradiographie correspondant à la bande 4 à 43 kDa est très faible et n'est visible que sur le film original.

Le séquençage en spectrométrie de masse donne plusieurs identifications de protéines dans certaine des bandes (**Tableau 4**). Cet inconvénient provient de la séparation des protéines sur un gel en une dimension qui n'est pas assez résolutif pour conduire à des identifications uniques de protéines dans chaque bande.

Deux protéines représentent les peptides majoritaires dans quatre échantillons sur six; ce sont les **lectines phloémiennes CsLec17 et CsLec26**. Ces deux protéines ont comme orthologues chez *A. thaliana* les protéines AtPP2-A2 et AtPP2-A1 respectivement (Dinant *et al.*, 2003). Les lectines phloémiennes PP2 appartiennent à la grande famille des protéines P, ces structures protéiques présentes dans les tubes criblés de toutes les dicotylédones (Batailler *et al.*, 2012; Dinant *et al.*, 2003). Chez les cucurbitacées, les filaments de protéines P sont formés par association entre PP1 et PP2. PP1 est une protéine de 96 kDa présente uniquement chez les cucurbitacées et formant la structure filamenteuse. Les PP2 forment des homodimères, voire des multimères (**Figure 15**), capables de fixer de manière covalente les PP1. Les protéines PP1 et PP2 sont les deux protéines les plus abondantes dans les exsudats de sève phloémienne de cucurbitacées. Les PP2 sont synthétisées dans les cellules compagnes, puis sont transportées vers les tubes criblés au travers des PPUs dont elles peuvent modifier la taille d'exclusion limite. La forme homodimérique libre des PP2, trouvée uniquement chez les cucurbitacées, est mobile dans le flux de sève (Batailler *et al.*, 2012; Dinant *et al.*, 2003; Knoblauch & Mullendore, 2013). Les lectines CsLec17 et CsLec26 sont donc de très bons candidats pour le transport des ARN viraux dans la sève, d'autant plus que ce sont des protéines basiques dont les charges positives permettent

potentiellement des interactions électrostatiques avec les ARN chargées négativement. Elles ne possèdent cependant pas de séquences *RNA-binding* connues (Owens et al., 2001). De manière intéressante, des tests d'interaction *in vitro* et *in vivo* ont permis de démontrer que CsLec26 peut se fixer à l'ARN très structuré du *Hop stunt viroid* (HSVd) (Gómez and Pallás, 2001 ; Gómez and Pallás, 2004), mais aussi à d'autres ARN moins structurés mais polyadénylés (Owens *et al.*, 2001). Par ailleurs, le complexe RNP formé par interaction entre CsLec26 et l'ARN du HSVd est mobile au travers d'une greffe *C. sativus – C. maxima* (Gomez & Pallás, 2004). Cependant, ces tests d'interactions ont aussi permis de montrer que la fixation de CsLec26 aux ARN n'est pas spécifique. Ainsi l'ARN du *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd), un viroïde n'infectant pas les cucurbitacées, est, comme l'ARN du HSVd, capable de se fixer à CsLec26 (Owens *et al.*, 2001). De manière similaire, les protéines CmmPP2 et CmmLec17 de *Cucumis melo* sont capables d'interagir avec des ARN de viroïdes et un ARNm (Gomez *et al.*, 2005), indiquant que la fixation non spécifique des protéines PP2 aux ARN est un mécanisme général, probablement présent dans toutes les espèces végétales synthétisant ces PP2 (PP2 des Angiospermes : Dinant et al., 2003).
Parmi les autres protéines identifiées, la **Serpine** (CsPS-1) semble aussi être un bon candidat pour le transport de complexes RNP. En effet, cette protéine inhibitrice des protéases à sérine est présente uniquement dans les tubes criblés, et est connue pour être mobile dans le phloème (La Cour Petersen *et al.*, 2005). Jusqu'à présent, aucune interaction serpine/ARN n'a été reportée dans la littérature.
Enfin, les autres protéines identifiées ne semblent pas avoir de rôle particulier dans les tubes criblés ou dans le transport vasculaire. La protéine **Csf-2** est surexprimée lors de la croissance des fruits de *C. sativus* et est apparentée à une protéine animale de défense face à un stress biotique (Référence uniprot **Q9SXL8). La protéine MATE efflux protein-related** est un composant membranaire possédant une activité de transport de molécules au travers des membranes cellulaires (*A. thaliana* At5g19700 et At2g38510). Le **facteur d'initiation de la traduction EIF-6** se fixe à la sous-unité 60S du ribosome pour l'empêcher de s'associer à la sous-unité 40S (*Oryza sativa,* OsJ_25302). Enfin, les protéines **UDP-glucose pyrophosphorylase** (Référence uniprot **A1BQJ4), Glutathione reductase** (Référence uniprot **E0XJQ3), Monodehydroascorbate reductase fruit isozyme** (Référence uniprot **P83966) et Enolase** (Référence uniprot **Q6WB92)** sont impliquées dans différentes voies métaboliques.

Les deux protéines candidates que nous avons retenues pour poursuivre les expériences ont été les protéines P CsLec26 et CsLec17, car nous avions à notre disposition les protéines orthologues AtPP2-A1 et AtPP2-A2 marquées avec un tag 6His et purifiées (dont de Sylvie Dinant, INRA Versailles et Denis Renard, INRA Nantes). Un gel retard réalisé avec ces deux protéines montre un retard de migration de l'ARN viral du CABYV uniquement lorsqu'il est incubé avec AtPP2-A1 (CsLec26), mais pas lorsqu'il est mis en présence d'AtPP2-A2 (CsLec17) (**Figure 17 D, E**).
Plusieurs lignées d'*A. thaliana* exprimant une structure en tige-boucle correspondant au gène *AtPP2-A1*, et pour lesquelles l'accumulation de l'ARNm d'AtPP2-A1 est réduite de 50 à 80% par rapport aux Col-0, avaient précédemment été inoculées par pucerons avec le CABYV et le TuYV (Revollon, 2010). Dans ces lignées, l'infection par le TuYV mesurée par ELISA était similaire à celle observée dans Col-0, alors que le nombre de plantes knock-down infectées par le CABYV était plus faible que pour Col-0. La forte variation des DO_{405nm} mesurées par ELISA n'a cependant pas permis de montrer une différence significative d'accumulation du CABYV dans les lignées knock-down par rapport aux Col-0 (Revollon, 2010).

Une nouvelle lignée knock-out (KO) d'*A. thaliana* présentant une insertion de T-DNA dans le promoteur du gène *AtPP2-A1* (lignée GABI-pp2-a1-1, don de Sylvie Dinant, Versailles) a été inoculée avec le TuYV. Dans cette lignée, la synthèse de l'ARNm d'AtPP2-A1 est complètement inhibée, mais l'accumulation de l'ARNm d'AtPP2-A2 est augmentée (Beneteau, 2008). A 20 dpi, 90% des Col0 et des plantes GABI-pp2-a1-1 sont infectées par le virus, montrant que la protéine AtPP2-A1 n'est pas nécessaire pour l'infection par le virus. Cependant, il est possible que la fonction de la protéine AtPP2-A1 soit complémentée par la surexpression d'AtPP2-A2 dans ces plantes mutantes (Beneteau, 2008; Dinant *et al.*, 2003). Pour poursuivre ces expériences, il serait intéressant d'analyser l'accumulation du virus dans des *A. thaliana* sur-exprimant AtPP2-A1 ou son homologue CsLec26.

	Peptides	%	Score Mascot	Protéines identifiées	Masse apparente	Masse théorique
1	8	28	298,27	17 kDa phloem lectin (CsLec17)	17	17,5
	1	8	80,32	Csf-2	17	17,5
2	7	18	230,92	26 kDa phloem lectin (CsLec26)	26	26
	6	4	59,83	MATE efflux protein-related [A. thaliana]	26	18
	2	8	83,66	17 kDa phloem lectin (CsLec17)	26	17,5
	1	5	49,62	Translation initiation factor EIF-6 [Oryza sativa]	26	25
3	4	16	59,14	26 kDa phloem lectin (CsLec26)	27	26
	1	8	82 ,90	17 kDa phloem lectin (CsLec17)	27	17,5
4	1	8	91,22	17 kDa phloem lectin (CsLec17)	43	17,5
	1	3	39,24	Serpin (CsPS-1)	43	42,5
5	7	15	292,52	UDP-glucose pyrophosphorylase [C. melo]	55	52
	4	27	200,79	Glutathione reductase	55	19
	1	8	66,43	17 kDa phloem lectin (CsLec17)	55	17
	1	8	57,23	Monodehydroascorbate reductase, fruit isozyme (MDAR fruit)	55	18
6	2	10	90,13	UDP-glucose pyrophosphorylase	56	15
	2	6	109,29	UDP-glucose pyrophosphorylase [C. melo]	56	52
	2	4	75,60	Enolase [Gossypium barbadense]	56	47

Tableau 4 : Résultats du séquençage en spectrométrie de masse (LC-MS/MS). Les peptides identifiés après séquençage sont comparés aux séquences présentes dans les bases de données grâce au logiciel Mascot (www.matrixscience.com). Le score mascot est un score de fiabilité : plus le score est élevé, plus il dénote que les peptides correspondent bien à la protéine identifiée dans les bases de données. Ce score dépend du nombre de peptides, de leur taille et du pourcentage de recouvrement (%). Les protéines identifiées dans les échantillons 1 à 6 sont indiquées dans le tableau, suivies de la masse apparente sur gel et de la masse théorique. Sauf indication contraire, les protéines proviennent de la base de données de *C. sativus*.

ii) Recherche des protéines phloémiennes d'*A. thaliana* interagissant avec l'ARN du TuYV

Contrairement à *C. sativus*, la sève phloémienne d'*A. thaliana* ne peut être récoltée par un simple prélèvement des gouttes d'exsudation après coupure des tiges. Pour éviter l'obstruction des tubes criblés par dépôt de callose, il est nécessaire d'utiliser la méthode d'exsudation à l'EDTA (développée par King and Zeevaart, 1974) ou de recourir à la

stylectomie. Ces deux techniques ne permettent cependant l'obtention que d'une faible quantité de protéines de sève.
Pour cette étude, la méthode d'exsudation à l'EDTA a été utilisée pour récolter la sève phloémienne d'*A. thaliana.* En raison de la grande taille de ses tiges et pétioles, la variété Cvi166 a servi à cette étude. Le protocole utilisé est détaillé dans la partie Matériel et Méthodes. L'EDTA est un chélateur d'ions réduisant l'obstruction des cribles lors de la coupure des pétioles, soit en limitant l'agrégation des protéines P, soit en ralentissant le dépôt de callose (Knoblauch & Mullendore, 2013). Cette méthode est relativement rapide et facile à mettre en place, mais il existe trois inconvénients majeurs : (i) la sève est récupérée dans un volume important qu'il est ensuite nécessaire de réduire pour concentrer l'extrait protéique ; (ii) il est difficile d'évaluer la concentration exacte de protéines de sève dans l'échantillon en raison de la dilution de la sève dans le tampon d'exsudation ; (iii) même si la première goutte après coupure n'est pas conservée, il peut y avoir une faible contamination par des contenus cellulaires non phloémiens.

a) Vérification de la pureté de la sève d'*A. thaliana* récoltée

Dans un premier temps, la pureté de l'échantillon de sève récoltée a été évaluée en vérifiant par un essai enzymatique la teneur en sucres. En effet, dans la sève phloémienne, la quantité de sucrose doit être plus élevée que celle en glucose et fructose (Kühn, 2013; Patrick, 2013). L'analyse des sucres présents dans la sève récoltée par exsudation a été réalisée en suivant le protocole du kit Enzytec D-Glucose/D-Fructose/Sucrose (*R-biopharm*) comme indiqué dans Beneteau et al.,(2010). Le dosage enzymatique permet de calculer les concentrations en sucres par mesures de DO_{340nm} après ajouts de différents substrats. Le tableau suivant indique les valeurs moyennes de concentration en sucres obtenues lorsqu'on récolte la sève de 50 ou 100 feuilles d'*A. thaliana* Cvi166:

	50 feuilles	100 feuilles
Glucose	0 mg/L	28 mg/L
Fructose	43 mg/L	45 mg/L
Sucrose	100 mg/L	180 mg/L

La sève récoltée étant plus concentrée en sucrose qu'en glucose/fructose, elle semble donc très peu contaminée par du contenu cellulaire.

b) Analyse des protéines de sève récoltées

Après concentration des échantillons de sève sur des colonnes Centricon® possédant une membrane filtrante de 3 kDa, l'estimation de la quantité de protéines présentes dans les exsudats a été réalisée par visualisation directe sur gels SDS-PAGE 12% colorés au nitrate d'argent. De manière attendue, en combinant le volume de sève obtenu à partir de 150 feuilles, la quantité de protéines est plus importante qu'en partant de 25 ou 50 feuilles (**Figure 19**). De plus, une exsudation pendant 6 h au lieu de 2 h permet d'augmenter la quantité de protéines récupérées. Enfin, les colonnes servant à concentrer les protéines peuvent, au préalable, être saturées avec du PEG 6000 à 5% pendant une nuit pour éviter la fixation des protéines sur les parois des colonnes, ce qui permet d'accroitre encore la quantité de protéines récupérées (**Figure 19**). Malgré les optimisations du protocole pour

augmenter la quantité de protéines récoltées, peu de protéines de faible poids moléculaire (PM inférieur à 34 kDa) sont observées sur gel (**Figure 19**).

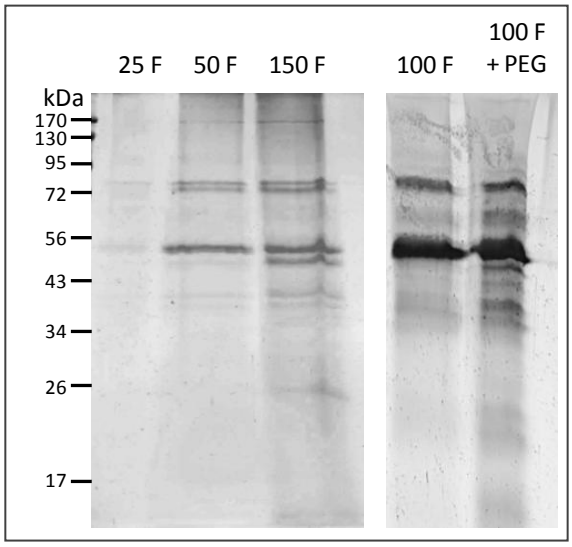


Figure 19 : **Protéines de la sève d'*A. thaliana* récoltées par exsudation à l'EDTA**. Gels SDS-PAGE 12% colorés au nitrate d'argent après migration des protéines. Les échantillons correspondent à la combinaison des extraits de sève collectés à partir de 25 à 150 feuilles (F), avec ou sans saturation des colonnes Centricon® au PEG 6000 à 5%.

c) Northwestern blot

Comme précédemment avec le CABYV, la technique du northwestern blot a été appliquée pour rechercher les protéines de sève d'*A. thaliana* interagissant avec l'ARN du TuYV marqué à la digoxygénine. Cette technique n'a pas permis l'identification de protéines capables de se fixer à l'ARN du TuYV (figure non montrée ici).
Deux hypothèses permettent d'expliquer ce résultat : (i) la trop faible quantité de protéines récoltées, et/ou (ii) l'absence de protéines fixant l'ARN génomique du TuYV dans la sève d'*A thaliana*.

2.3 Conclusions et perspectives de l'étude visant à rechercher les complexes RNP des polérovirus

Les différentes expériences mises en place pour rechercher les complexes RNP des polérovirus dans la sève, ou identifier des protéines de la sève susceptibles de se fixer aux ARN viraux, n'ont pas abouti à des résultats concluants. Aucune des techniques développées n'a clairement permis de montrer, ou d'éliminer, la présence de complexes RNP dans la sève de plantes infectées par le CABYV ou le TuYV.
L'utilisation d'une technique *in vitro* comme le northwestern blot possède un inconvénient majeur qui est celui de la dénaturation des protéines et/ou des complexes protéiques. La poursuite de cette étude nécessiterait l'utilisation d'autres techniques permettant de rechercher *in vivo* des complexes macromoléculaires impliquant plus que deux partenaires. En effet, la formation de complexes RNP pourrait nécessiter une première étape de constitution d'un complexe protéique avant la fixation à l'ARN viral. Or, ce type de complexes n'est pas identifiable par northwestern blot. L'immuno-précipitation (IP) pourrait être une méthode alternative qui permettrait d'isoler les complexes RNP directement de la sève en utilisant un anticorps dirigé contre une protéine faisant partie du complexe. Sachant que les protéines virales VPg, MP et CP ont la capacité de se fixer à l'ARN viral (Chavez *et*

al., 2012; Prüfer *et al.*, 1999; Tacke *et al.*, 1991; Terradot *et al.*, 2001; Torrance, 1992; van der Wilk *et al.*, 1997), elles peuvent représenter des intermédiaires importants pour la formation de complexes RNP viraux. Il pourrait donc être intéressant d'utiliser des anticorps dirigés contre ces protéines pour rechercher directement dans la sève la présence de complexes RNP.

Pour l'ensemble des points évoqués ci-dessus, mais aussi en raison des résultats obtenus et développés dans la suite de ce chapitre, la recherche des complexes RNP et des partenaires protéiques de l'ARN viral n'a pas été poursuivie.

3. Analyse du rôle de la protéine de capside et des virions dans le mouvement à longue distance du TuYV

3.1 Stratégie expérimentale

Une nouvelle approche a été utilisée pour évaluer la capacité de mouvement à longue distance des polérovirus en absence de particules virales, mais en présence de CP pouvant éventuellement permettre la formation et/ou le mouvement de complexes RNP. La stratégie, présentée de manière schématique dans la **Figure 20**, consiste en l'introduction de mutations ponctuelles dans la séquence de la CP dans le but d'empêcher la formation de virions tout en affectant le moins possible ses autres fonctions. Après avoir contrôlé la réplication des mutants dans les protoplastes de *Chenopodium quinoa*, l'agro-inoculation a été réalisée sur *Montia perfoliata*. L'analyse de l'accumulation dans les feuilles inoculées et non-inoculées a ensuite permis de déterminer s'il y a eu, ou non, transport du virus via les tubes criblés. En fonction de la capacité des mutants à former des particules virales et à entrainer une infection systémique de la plante, quatre cas peuvent être considérés :

- **Les cas n°1 et 2** ne permettent pas d'obtenir de réponse quant à l'existence potentielle de complexes RNP puisque des virions sont formés malgré les mutations introduites, et qu'il n'est pas possible par les techniques utilisées de distinguer le mouvement des virions de celui des complexes RNP.
- **Le cas n°3** permet sans ambigüité de conclure que des complexes RNP permettent le mouvement à longue distance du virus. Néanmoins, comme expliqué dans l'introduction, il est envisageable que ce mouvement sous forme de complexes RNP ne soit pas la forme principale de mouvement, et qu'il soit moins efficace qu'un mouvement sous forme de virions.

  Le cas n°4 permet d'appuyer l'hypothèse des virions comme entités se déplaçant dans les tubes criblés bien que l'existence des complexes RNP ne puisse toujours pas totalement être écartée sans expériences complémentaires.

Le *Polerovirus* choisi comme modèle pour cette étude a été le TuYV car certains mutants viraux étaient disponibles avant mon arrivée au laboratoire. Comme indiqué précédemment, l'implication de la CP dans l'infection systémique du TuYV a déjà été montrée. En effet, certaines mutations ponctuelles affectant la séquence de la CP, ou des mutations empêchant son expression, entrainent une absence d'infection systémique sur l'hôte *N. clevelandii* (Brault *et al.*, 2003; Ziegler-Graff *et al.*, 1996). Néanmoins, il faut préciser que la détection des mutants viraux dans les feuilles non-inoculées a été réalisée par ELISA ou northern blot plusieurs semaines après inoculation. Ces deux techniques pouvaient ne pas être suffisamment sensibles pour détecter une faible quantité de virus dans les tissus systémiques. Or, il est possible que le mouvement de complexes RNP soit moins efficace qu'un transport sous forme de virions. Il faut également ajouter que l'accumulation des ARNs de ces virus mutés dans des protoplastes est inférieure à ceux du TuYV *wild-type* (TuYV-WT), probablement en raison de l'absence d'encapsidation des ARN viraux qui sont alors facilement accessibles par les ribonucléases cellulaires (Brault *et al.*, 2003; Ziegler-Graff *et al.*, 1996). Enfin, il est envisageable que ces mêmes mutants du TuYV, incapables de réaliser une infection systémique sur *N. clevelandii*, soient capables d'infecter un autre type d'hôte, comme par exemple les hôtes naturels que sont le navet et la laitue par mouvement de complexes RNP.

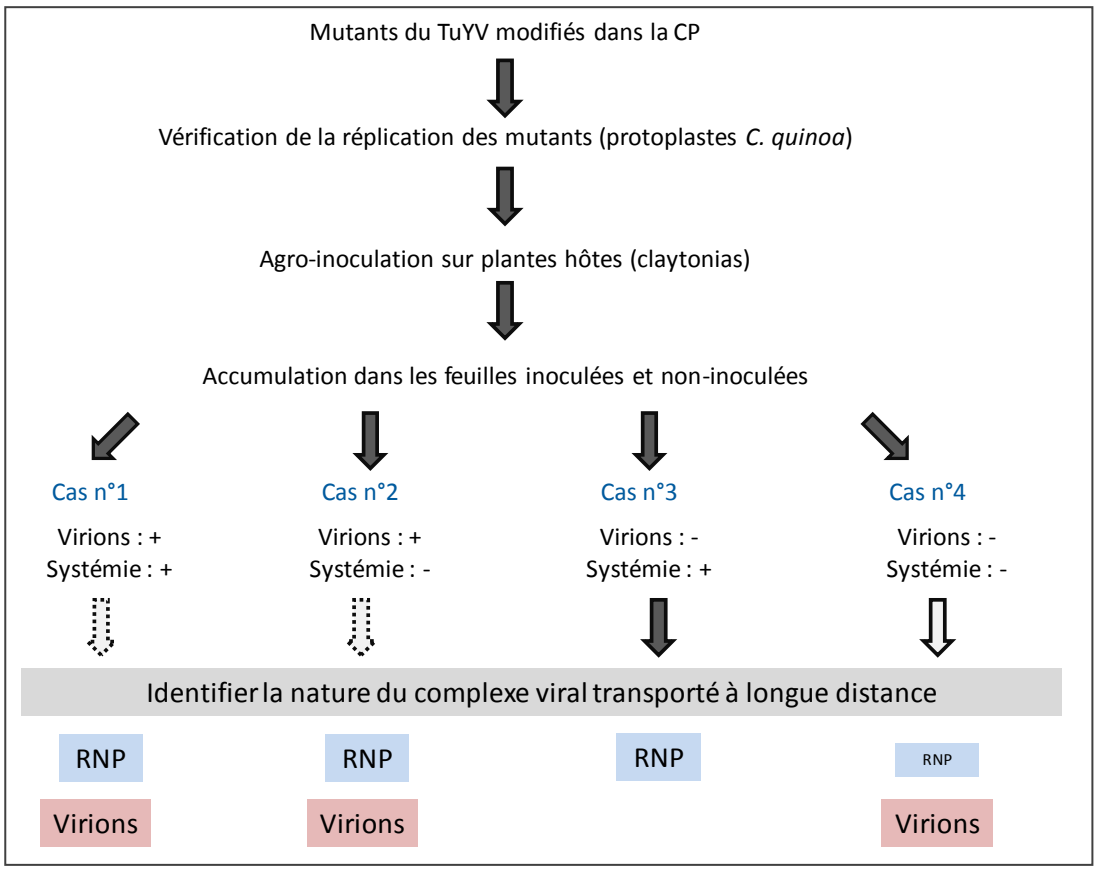


Figure 20 : Stratégie expérimentale pour identifier le complexe viral transporté à longue distance.

En tenant compte des différents points soulevés ci-dessus, une nouvelle série de mutants du TuYV a été utilisée pour suivre le mouvement systémique du virus dans la plante. Les onze mutants choisis pour cette étude sont présentés en détails dans la **Figure 21** ci-dessous. Ces onze mutants étaient disponibles au laboratoire et ont été utilisés précédemment notamment pour des travaux sur la transmission du virus. Les détails concernant la création de ces mutants et les résultats publiés précédemment sont indiqués dans le Matériel et Méthodes en fin de manuscrit.

Deux mutants ne synthétisent plus les protéines de capside, soit par mutation du codon d'initiation de la CP (NoCPRT 4.2), soit par délétion de 37 nucléotides englobant le codon d'initiation de la CP (NoCPRT 4.3). Un seul mutant ponctuel possède une modification dans la région R de la CP : le changement de deux arginines en alanines (R7AR8A) permet de supprimer des charges positives importantes pour l'interaction avec l'ARN. Enfin, huit mutants possèdent des modifications au niveau des épitopes de surface (5 et 10) du domaine S de la CP. Les modifications en acides aminés ont un effet sur la charge globale de la protéine (S79R/G80R, D90N/C91R, et W166R) ou changent la position de cycles aromatiques (F84Q/G85W, T83S/F84L, F84V, et W166R) ou d'une proline (T83P/P86T). Le mutant S87G possède une mutation semi-conservative ne modifiant pas la charge globale de la protéine CP. Il est important de signaler qu'aucune des mutations ponctuelles décrite ci-dessus n'altère la séquence de la protéine P4.

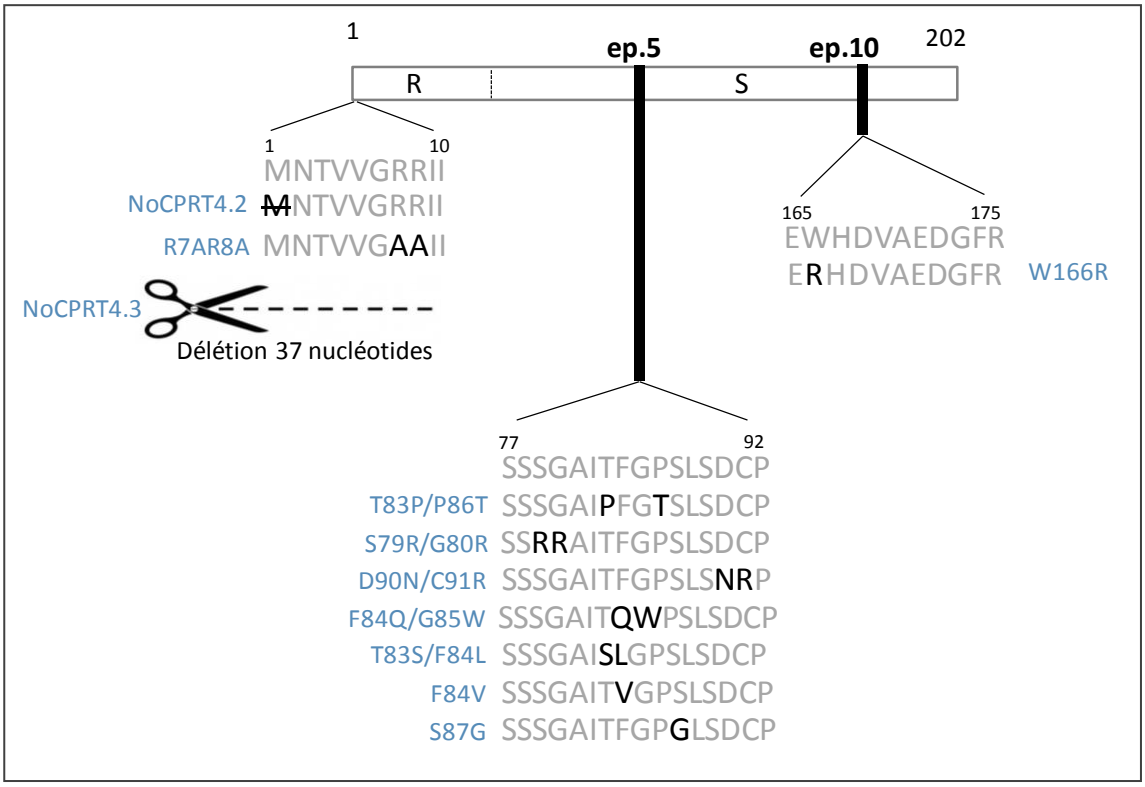


Figure 21 : Représentation des mutants de la CP du TuYV. La CP (202 acides aminés) est présentée de manière schématique par un rectangle blanc, avec son domaine N-terminal (R) et son domaine C-terminal (S). La position des épitopes (ep.) 5 et 10 est indiquée par deux traits noirs épais. Pour chaque mutant, les modifications en acides aminés sont indiquées en caractères noirs sous la séquence du TuYV-WT en lettres grises. Le nom des mutants de type XnY indique que l'acide aminé X en position « n » a été remplacé par l'acide aminé Y. Le mutant NoCPRT4.3 possède une délétion de 37 nucléotides englobant le codon d'initiation AUG qui empêche la synthèse de la CP et de la RT. Le mutant NoCPRT4.2 possède une mutation du codon d'initiation de l'ORF3 qui change l'AUG en codon sens CCG empêchant aussi l'expression de ces protéines.

3.2 Analyse de l'effet des mutations dans la CP sur le transport à longue distance du virus et la formation de virions

i) Vérification de la réplication des mutants dans des protoplastes

L'étude de la réplication dans les protoplastes, réalisée précédemment sur les mutants R7AR8A, W166R, et NoCPRT 4.2 (Brault *et al.*, 2003; Reutenauer *et al.*, 1993; Ziegler-Graff *et al.*, 1996), a montré que les modifications apportées au niveau de la CP n'empêchent pas la réplication du virus. Cependant, la quantité d'ARN génomique viral observée en northern blot pour le W166R et le NoCPRT 4.2 est plus faible que pour le TuYV-WT. Une des hypothèses émises pour expliquer la moindre accumulation des ARN mutés est leur dégradation plus importante en absence de protection par la protéine majeure de capside car ces mutants ne sont pas ou mal encapsidés.

Pour cette nouvelle étude, des protoplastes de *C. quinoa* ont été inoculés avec les transcrits du TuYV-WT, ainsi qu'avec ceux correspondant aux mutants R7AR8A, W166R, S79R/G80R, D90N/C91R, T83P/P86T, et F84Q/G85W. Ces mutants, de par la nature et la position des mutations introduites dans la séquence de la CP, peuvent être considérés comme représentatifs de l'ensemble des neuf mutants ponctuels. Trois jours après inoculation, les protoplastes ont été récoltés et l'expression des protéines CP et RT a été

analysée par western blot. On observe que les deux protéines sont bien exprimées par les six mutants, et ce de manière équivalente au TuYV-WT (**Figure 22**). La synthèse de l'ARNsg indispensable pour l'expression de ces deux protéines étant directement liée à la capacité de réplication, les mutants sont donc tous compétents pour assurer leur réplication dans des protoplastes de *C. quinoa*.

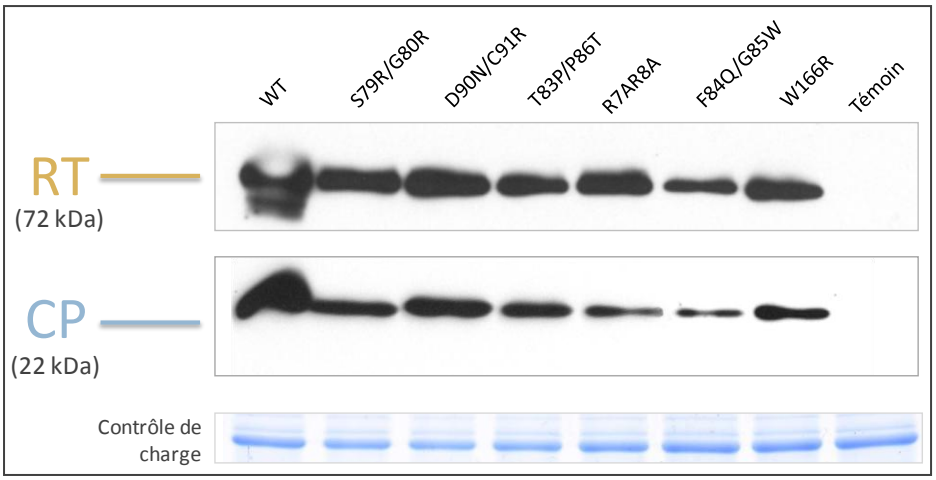


Figure 22 : Expression des protéines CP et RT par les mutants du TuYV dans les protoplastes de *C. quinoa*. Après récolte des protoplastes de *C. quinoa*, un western blot (@CP + @RT) réalisé sur les extraits de protéines totales permet la détection des deux protéines CP et RT dans tous les échantillons à l'exception du témoin (protéines extraites de protoplastes non transfectés). WT : TuYV-WT.

ii) Analyse de la relation entre la formation de particules virales et le transport à longue distance du TuYV

Cinq expériences indépendantes d'agro-inoculation de *M. perfoliata*, correspondant à un total de 21 à 31 plantes inoculées avec chacun des virus mutants, ont été réalisées. Dans les échantillons prélevés à six jours après agro-inoculation (6 dpi) sur les feuilles inoculées, ou à 15 dpi sur les feuilles non-inoculées, la présence de l'ARN et des protéines virales a été recherchée en utilisant quatre techniques complémentaires : le test ELISA pour estimer l'accumulation du virus (**Figure 23**), le western blot pour vérifier l'expression des protéines CP et RT (**Figure 26**), la RT-PCR pour analyser de manière plus sensible la présence de l'ARN viral et séquencer la descendance dans le cas d'une infection systémique (**Figure 24**), et le northern blot pour vérifier l'accumulation et la réplication des ARN viraux (**Figure 25**). Pour analyser la capacité des mutants à former des particules virales, des broyats de feuilles inoculées ont été observés par *Immunosorbent electron microscopy* (ISEM) (**Figure 28**). Ces observations ont été complétées par un test d'encapsidation à la RNAse A (**Figure 25**).

Seuls le TuYV-WT et les mutants S87G et R7AR8A sont détectés par ELISA dans les feuilles inoculées (**Figure 23**). La RT-PCR étant une méthode plus sensible, elle permet de détecter la présence de l'ensemble des virus mutants dans les feuilles inoculées (**Figure 24 A**). Un northern blot réalisé sur les mêmes échantillons d'ARN permet de confirmer la capacité de réplication des mutants, par visualisation de l'ARNsg (**Figure 25**). Il est surprenant de constater que malgré la détection dans les feuilles inoculées des protéines CP et RT par western blot (**Figure 26**), certains mutants ne sont pas détectables par ELISA (**Figure 23**). Comme différents anticorps ont été utilisés pour les deux protocoles, il est possible que différentes conformations protéiques soient reconnues par les anticorps : les

virions ou multimères de protéines de capside seraient détectés par le test ELISA (sérum polyclonal dirigé contre les particules virales entières) qui, contrairement au western blot (sérums polyclonaux dirigés contre les protéines libres CP ou RT), ne permettrait pas la détection des protéines libres. Pour tester cette hypothèse, nous avons réalisé un test ELISA sur une gamme de dilution de virus purifié et en parallèle sur les mêmes échantillons dénaturés par un traitement au SDS. On observe qu'à quantité similaire, les protéines CP dissociées sont moins bien détectées en ELISA comparées aux virions natifs (**Figure 27**). Par conséquent, l'absence de détection des virus mutants par ELISA suggère une incapacité des mutants de la CP à former des virions, ou des multimères de CP, à l'exception des mutants S87G et R7AR8A.

Cette hypothèse a été évaluée par une observation de broyats de feuilles inoculées par les différents mutants de la CP en utilisant la technique de l'ISEM. Le TuYV-WT et le mutant S87G forment un grand nombre de particules virales, de forme et de taille semblables (**Figure 28 A et E**). Des particules virales de type sauvage sont aussi observables dans les broyats de feuilles inoculées par le mutant R7AR8A, mais leur nombre est cependant réduit par rapport au TuYV-WT (**Figure 28 C**). En revanche, pour l'ensemble des autres mutants, aucune particule virale n'a pu être observée par cette technique (**Figure 28 D et F**).

La capacité d'encapsidation des virus mutants a aussi été vérifiée par le test à la ribonucléase A (RNAse A) (**Figure 25**). Le principe de ce test se base sur la capacité de la RNAse A de dégrader les ARN non-encapsidés mais également une partie des ARN encapsidés. En effet, cette enzyme de faible PM (13.7 kDa) a la capacité de pénétrer dans les virions pour y dégrader l'ARN. Lorsque les virions sont mal formés et instables, la capacité de pénétration de la RNAseA est augmentée et la dégradation de l'ARN accentuée (Revollon *et al.*, 2010). A partir d'une même extraction des ARN totaux de feuilles inoculées, la moitié de l'échantillon a été traité à la RNAse A (noté +), l'autre moitié ne subissant aucun traitement après extraction (noté -). Les ARNg et ARNsg ont ensuite été visualisés par northern blot. Ainsi, les ARN totaux non traités (notés -) correspondent à l'ensemble des ARN encapsidés et libres. Les ARN ayant subi le traitement (notés +) correspondent aux ARNg viraux protégés notamment par les capsides ou représentent les ARN viraux libres ayant échappé à la dégradation par la RNAse A.
Pour le TuYV-WT et le mutant S87G, une plus faible quantité d'ARN viral est observée après traitement à la RNAse A ce qui suggère, de manière attendue, la présence d'ARN encapsidés et non encapsidés dans ces extraits. A l'inverse, l'accumulation des ARN du mutant R7AR8A après traitement à la RNAse est surprenante. En effet, on observe de manière reproductible une quantité plus importante d'ARN viraux après traitement à la RNAse A qu'avant traitement. Afin d'élucider ce phénomène, des expériences complémentaires ont été réalisées et sont présentées ci-après (cf. partie **3.3**). Enfin, pour les mutants dont aucune particule virale n'a été observée par ISEM dans les feuilles inoculées, on observe peu de différence d'accumulation de l'ARN viral entre les deux traitements. Ce résultat suggère que les ARN viraux probablement libres dans la cellule ont déjà été soumis à une dégradation par les RNAses cellulaires, ne modifiant pas de manière perceptible la quantité d'ARN viral présent dans l'échantillon après le court traitement supplémentaire à la RNAse A.

Enfin, alors que les mutants sont effectivement tous capables de se répliquer dans les cellules inoculées, seuls les mutants S87G et R7AR8A sont détectables par ELISA et RT-PCR dans les tissus non-inoculés (**Figure 23**; **Figure 24 B**) bien que le mutant R7AR8A s'accumule plus faiblement que le TuYV-WT dans les feuilles non-inoculées.

La descendance virale des mutants S87G et R7AR8A a été analysée après extraction des ARN totaux extraits des feuilles non-inoculées puis amplification par une réaction de RT-PCR d'un fragment d'ADN couvrant la séquence de la CP (nucléotides 3331-4136). Le séquençage de l'amplicon montre que les mutations initialement introduites sont toujours présentes, et qu'aucune modification supplémentaire n'apparaît dans la séquence de la CP.

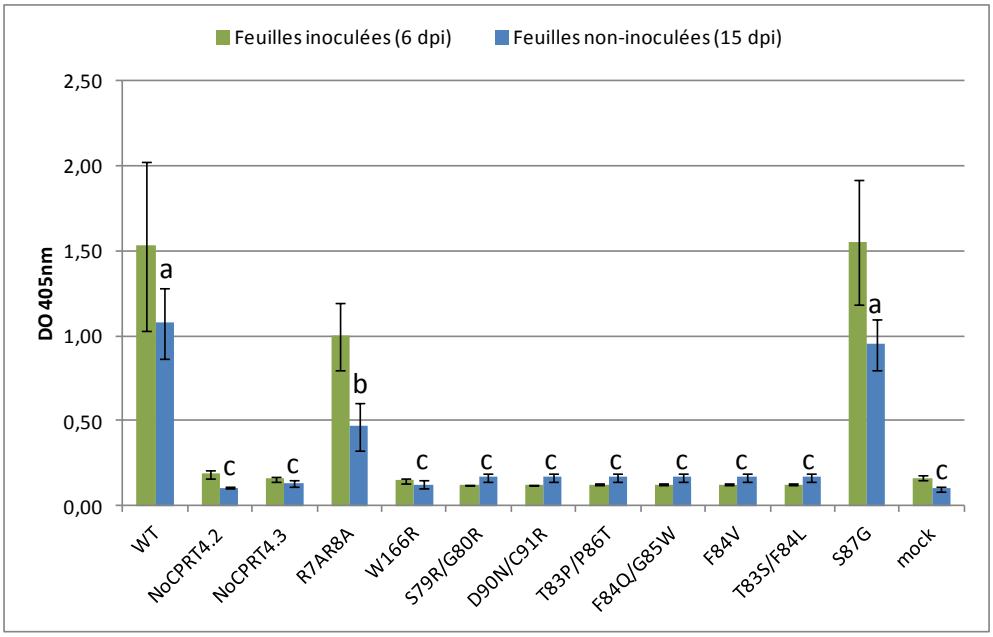


Figure 23 : Estimation de l'accumulation des mutants viraux par test ELISA. L'accumulation virale dans les feuilles inoculées à 6 dpi (en vert) et non-inoculées à 15 dpi (en bleu) est exprimée en valeur de $DO_{405\ nm}$. Pour les virus WT, S87G et R7AR8A les valeurs données correspondent à la moyenne des DO des plantes positives en ELISA. Pour les autres mutants, la valeur donnée correspond à la moyenne des DO de toutes les plantes inoculées dans les cinq expériences indépendantes réalisées. Une analyse statistique (Test de Student) permet de distinguer trois groupes de valeurs, avec a>b>c (p valeur < 0.05).

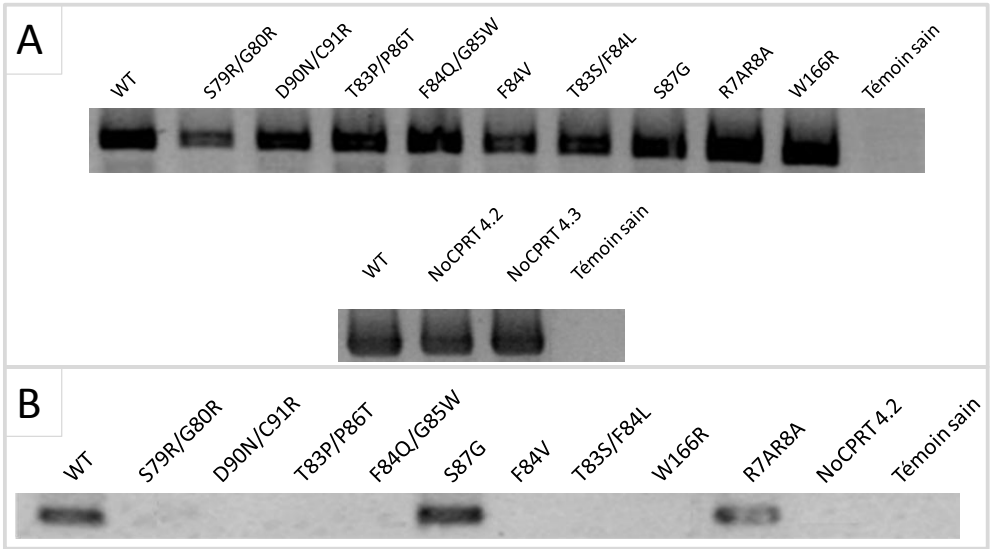


Figure 24 : Détection des ARN viraux par RT-PCR. Amplification d'un fragment du génome viral, correspondant à la séquence complète de la CP, par RT-PCR sur des extraits d'ARN totaux provenant de feuilles inoculées à 6 dpi **(A)** et de feuilles non-inoculées à 15 dpi **(B)**. La quantité d'ARN totaux utilisée pour la réaction de RT est la même pour tous les échantillons. WT : TuYV-WT

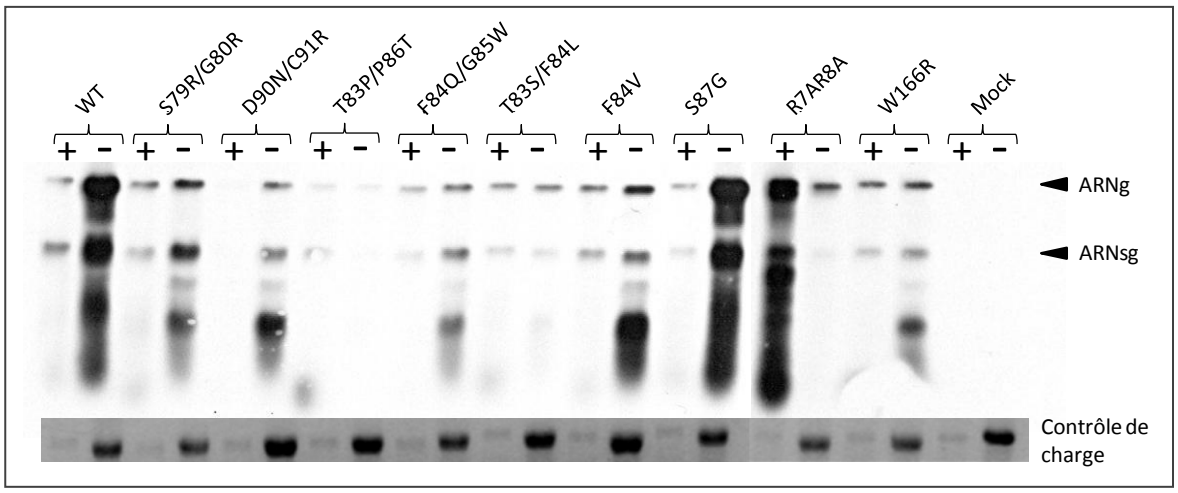


Figure 25 : Test d'encapsidation des ARN viraux par traitement à la RNAse A. Les ARNg et ARNsg extraits de feuilles inoculées par les mutants, sont visualisés en northern blot avec une sonde dirigée contre la partie 3' du génome du TuYV. Une partie des échantillons est traité à la RNAse A (notés +), le reste des échantillons n'a pas subi ce traitement (notés -).
WT : TuYV-WT ; Mock : plante non-inoculée.

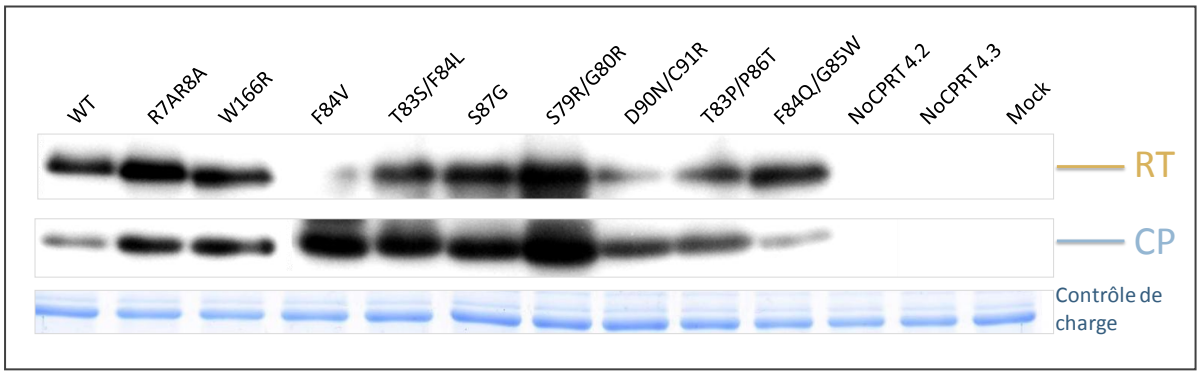


Figure 26 : Expression des protéines CP et RT par les mutants de la CP du TuYV dans les feuilles inoculées de *M. perfoliata*. Après prélèvement de 100 mg de feuilles inoculées à 6 dpi, un western blot (@CP + @RT) réalisé sur les extraits de protéines totales permet la détection des deux protéines exprimées par les onze mutants et le TuYV-WT (WT). Le témoin (Mock) correspond à des plantes non-inoculées. Le contrôle de charge correspond à une coloration des protéines au bleu de Coomassie sur un gel SDS-PAGE réalisé en parallèle avec les mêmes échantillons.

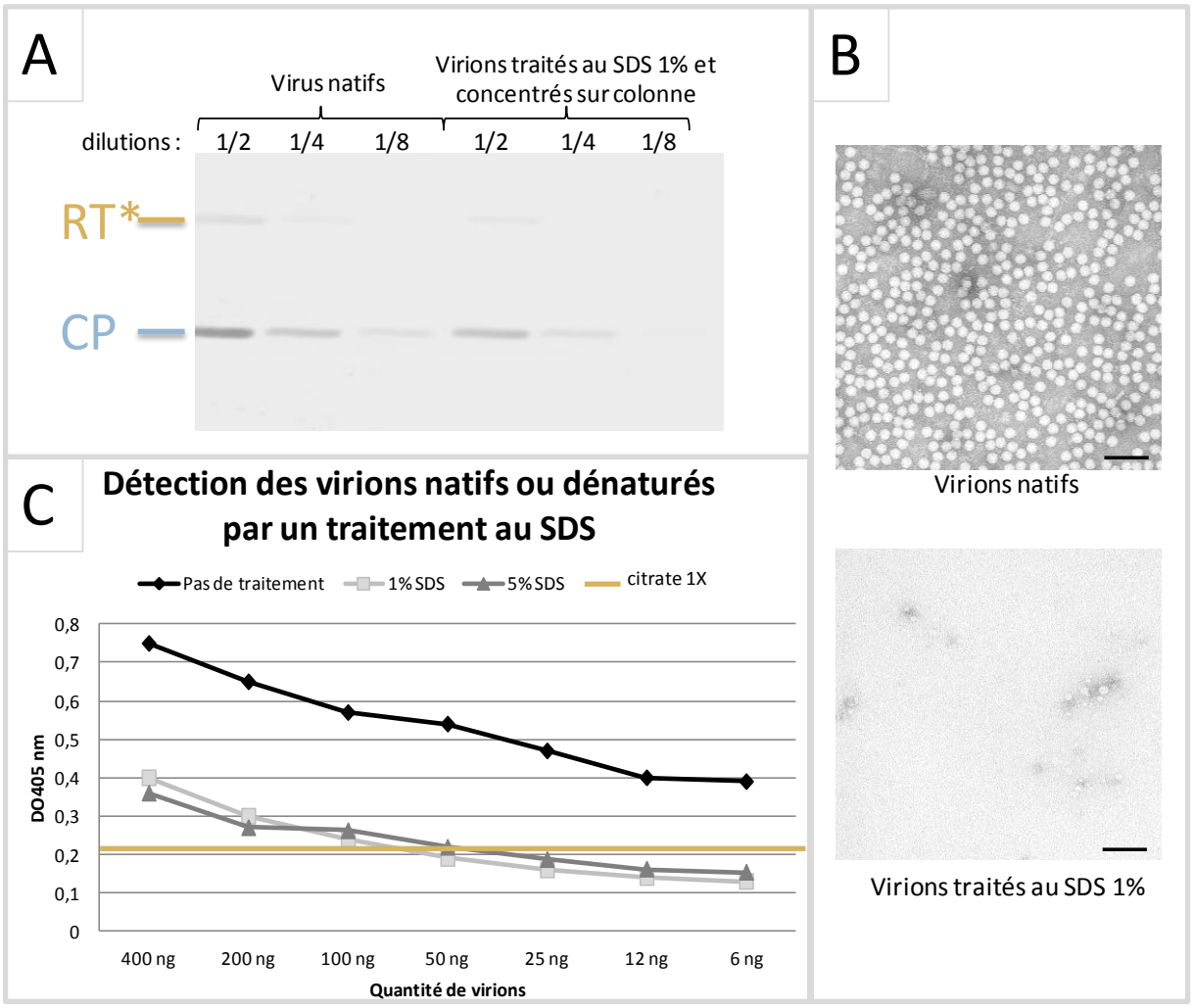


Figure 27 : Spécificité des anticorps utilisés lors des tests ELISA vis-à-vis des virions et des protéines libres de capside. 1 µg de particules virales purifiées du TuYV-WT ont été traitées avec 1 ou 5% de SDS dans du tampon citrate 1X. Après mélange de l'échantillon avec un vortex pendant 1 min et incubation de 10 min à 100°C, le SDS est éliminé par filtration à travers une colonne Centricon® (Millipore) possédant une membrane filtrante de 10 kDa. **A)** Gel SDS-PAGE coloré au bleu de Coomassie réalisé avec des fractions aliquotes de virus purifié et de virus dénaturé au SDS 1% et concentré sur la colonne. La filtration de l'échantillon sur la colonne a entrainé une perte d'environ 20% de la quantité de protéines initialement déposée sur la colonne. Les expériences réalisées par la suite tiennent compte de cette perte de matériel viral. **B)** Observation en ISEM de 800 ng de virions dénaturés au SDS ou natifs. Echelle : 100 nm. **C)** Détection des virions natifs et dénaturés au SDS par ELISA. Les échantillons ont ensuite été analysés par ELISA, et les valeurs de DO obtenues ont été comparées à celles d'une gamme de virus purifié non dénaturé. La valeur de DO_{405nm} a été mesurée 25 min après ajout du substrat. Le tampon citrate 1X, utilisé pour reprendre les purifications de virions, a servi de témoin négatif (ligne jaune).

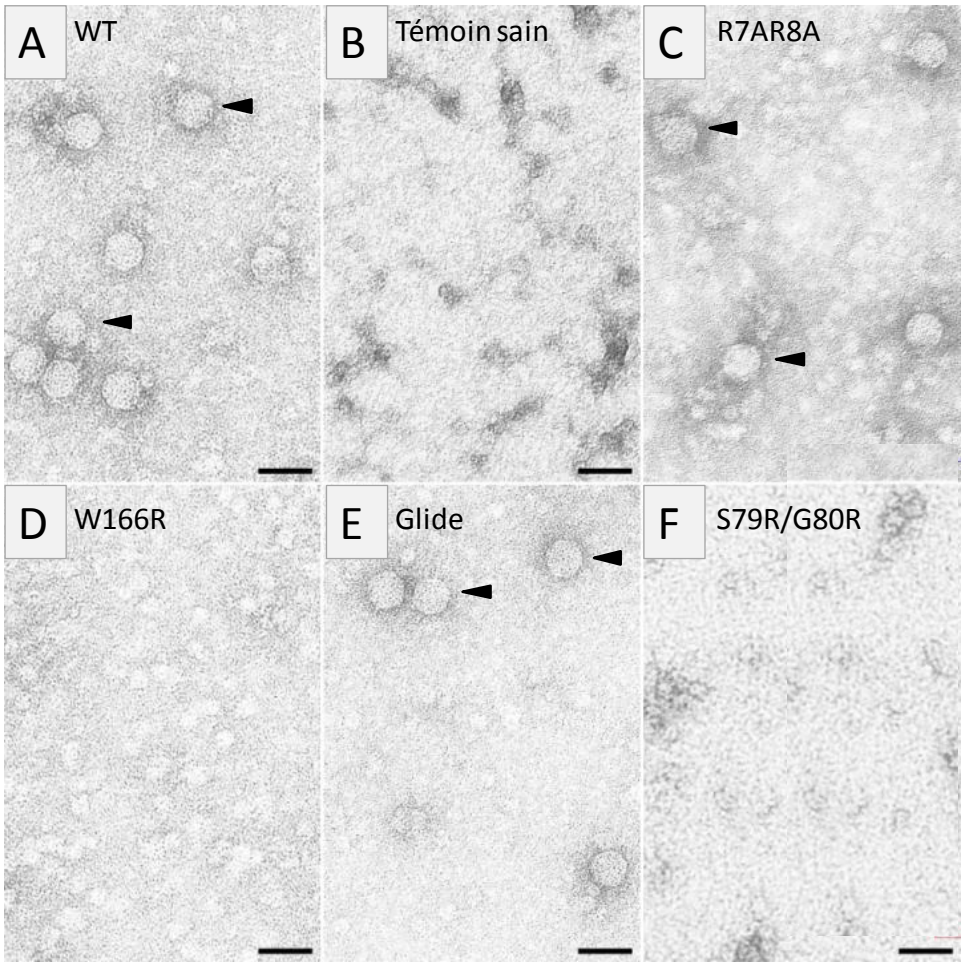


Figure 28 : Observation de particules virales en ISEM. Des particules virales (flèches) peuvent être observées pour le TuYV-WT **(A)**, et les mutants R7AR8A **(C)** et S87G **(E).** En revanche, tout comme dans le témoin sain non-inoculé **(B)**, aucune particule virale n'est observée pour tous les autres mutants représentés ici par le W166R **(D)** et le S79R/G80R **(F).** Echelle : 30 nm.

iii) Conclusions et perspectives de cette étude

Les résultats obtenus sur l'ensemble de ces expériences ont été comparés aux quatre cas hypothétiques présentés ci-dessus dans la stratégie expérimentale (**Figure 20**).

- **Le mutant S87G** se comporte de manière similaire au TuYV-WT dans la plante entière. La modification de l'acide aminé S87 en G dans la CP n'a pas eu de conséquences perceptibles sur le mouvement à longue distance du virus, ni sur la formation de particules virales (cas hypothétique n°1). La capacité d'encapsidation n'étant pas inhibée, ce mutant ne nous permet pas de déterminer la nature du complexe viral transporté à longue distance, et n'a donc pas été étudié plus amplement.
- **Le mutant R7AR8A** est lui aussi détecté dans l'ensemble de la plante par les trois techniques. Cependant, son accumulation mesurée par ELISA est toujours plus faible que celle du TuYV-WT, même si cette différence n'est significative que dans les feuilles non-inoculées. L'observation de virions par ISEM dans les broyats de feuilles inoculées indique que la mutation n'a pas altéré la capacité d'encapsidation, mais a probablement modifié une autre fonction de la CP ayant altéré le mouvement à longue distance (Cas hypothétique n°2). Comme la formation de virions n'est pas inhibée par la mutation, ce mutant ne nous permet pas de connaître la nature du complexe viral

transporté à longue distance. Cependant, l'analyse de ce mutant a été complétée par d'autres expériences qui sont présentées ci-après (cf. **partie 3.3**).

- **Les neufs autres mutants** sont uniquement détectables dans les feuilles inoculées, indiquant une absence de mouvement à longue distance. Les ARN viraux détectés en northern blot dans les extraits de feuilles inoculées montrent que les mutants sont capables de se répliquer, mais que la charge virale est plus faible que celle du TuYV-WT, probablement en raison de l'absence de protection de l'ARN viral par encapsidation. Les mutations introduites dans la séquence de la CP chez ces neufs mutants ont donc entrainé l'absence d'encapsidation et de mouvement à longue distance (cas hypothétique n°4).

Il existe ainsi une relation étroite entre la capacité d'encapsidation et le transport à longue distance. En effet, les mutants capables de former des particules virales sont transportés vers les feuilles non-inoculées, à l'inverse des mutants pour lesquels la modification de la CP a entrainé la perte d'encapsidation et qui ne sont jamais transportés à longue distance. Ces résultats appuient l'hypothèse selon laquelle le transport dans les tubes criblés se fait exclusivement sous la forme de virions, et non de complexes RNP. Cependant, nous ne pouvons pas totalement écarter l'hypothèse selon laquelle le mouvement systémique sous forme de complexes RNP nécessite la présence d'une protéine CP sauvage donc totalement fonctionnelle. Or, dans les expériences menées ci-dessus, les mutations introduites dans la séquence de la CP peuvent, en plus d'inhiber la formation de virions, avoir modifié d'autres fonctions de la CP qui seraient essentielles au mouvement de complexes RNP. Ainsi, nous avons poursuivi les expériences en apportant en *trans* la CP sauvage aux mutants défectueux dans leur mouvement (cf. **partie 3.4** ci-dessous).

3.3 Cas particulier du mutant R7AR8A

Bien que capable de former des particules virales visuellement similaires à celles du TuYV-WT, le mutant R7AR8A possède un mouvement à longue distance peu efficace, suggérant qu'une autre fonction de la CP a été altérée par la mutation. L'étude de ce mutant a donc été poursuivie par des expériences complémentaires.

i) Accumulation du R7AR8A dans différents hôtes

La capacité du mutant R7AR8A à se déplacer de façon systémique a été analysée en réalisant une cinétique d'accumulation du virus dans trois hôtes : *M. perfoliata*, *A. thaliana*, et *N. benthamiana*. Lors de deux expériences indépendantes correspondant à un total de 20 plantes inoculées par virus, l'accumulation dans les feuilles non-inoculées a été mesurée à 7, 15 et 22 dpi par un test ELISA (**Tableau 5**).

Le TuYV-WT est détecté dans les feuilles non-inoculées dans les trois hôtes dès 7 dpi, puis le pourcentage de plantes infectées ainsi que l'accumulation du virus augmentent progressivement au cours du temps.

Le mutant R7AR8A, quant à lui, n'est jamais détecté en systémie à 7 dpi quel que soit l'hôte inoculé. Dans *A. thaliana* et *M. perfoliata*, le mutant est détecté à partir de 15 dpi mais le pourcentage de plantes infectées est toujours inférieure à celui du TuYV-WT et l'accumulation du virus mutant est statistiquement plus faible que celle du TuYV-WT. Enfin, le mutant R7AR8A n'est jamais détecté en systémie sur l'hôte *N. benthamiana*. Ce résultat est en accord avec l'absence d'infection de *N. clevelandii* trouvée précédemment, un hôte de la même famille (Brault *et al.*, 2003). Ainsi, le mutant R7AR8A, bien que capable de former des particules virales, possède un mouvement à longue distance altéré dans deux

hôtes (*A. thaliana* et *M. perfoliata*), et inexistant chez les deux autres (*N. benthamiana* et *N. clevelandii*). Ces résultats indiquent que la seule formation de particules virales n'est pas suffisante pour permettre un transport efficace, mais que d'autres facteurs liés à l'hôte peuvent modifier les prérequis nécessaires au mouvement à longue distance du virus.

	7 dpi		15 dpi		22 dpi	
	$DO_{405\ nm}$ moyenne	Pourcentage d'infection	$DO_{405\ nm}$ moyenne	Pourcentage d'infection	$DO_{405\ nm}$ moyenne	Pourcentage d'infection
M. perfoliata						
WT	1,22	20 %	1,35[a]	80 %	1,45[a]	91 %
R7AR8A	-	0 %	0,7[b]	40 %	0,6[b]	50 %
A. thaliana						
WT	0,8	20 %	1,22[a]	88 %	1,22[a]	61 %
R7AR8A	-	0 %	0,52[b]	34 %	0,37[b]	53 %
N. benthamiana						
WT	0.51	27 %	1,05	81 %	1,5	90 %
R7AR8A	-	0 %	-	0 %	-	0 %

Tableau 5 : Cinétique d'infection des trois hôtes par le TuYV-WT et le mutant R7AR8A. La valeur de DO_{405nm}, mesurée par test ELISA, représente l'accumulation moyenne du virus dans les plantes infectées. Une analyse statistique (Test de Student) permet de distinguer deux groupes de valeurs, avec a>b (p valeur < 0.005). La valeur "-" signifie que la $DO4_{05nm}$ est identique à celle du témoin non-inoculé. Le pourcentage d'infection des plantes est aussi indiqué pour chaque groupe de plantes.

Deux hypothèses ont été considérées pour tenter d'expliquer l'effet de la mutation introduite dans le mutant R7AR8A sur l'une des fonctions de la CP essentielle au cycle infectieux :

- La mutation pourrait avoir modifié la localisation subcellulaire de la CP. Il a en effet été montré pour différentes protéines virales que certaines fonctions protéiques nécessitent la relocalisation vers des compartiments cellulaires spécifiques où se déroulent des interactions ou modifications protéiques (Herranz *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2007a).
- Les particules virales observées en ISEM seraient instables avec une conformation altérée, ou présenteraient des caractéristiques physico-chimiques différentes de celles du TuYV-WT. Pour une ou plusieurs de ces raisons, elles ne permettraient pas un transport efficace du virus dans la plante.

Pour tenter de valider ou d'écarter ces hypothèses, des expériences complémentaires ont donc été réalisées.

ii) Localisation subcellulaire de la CP du R7AR8A

Un signal de localisation nucléolaire (NoLS) a été positionné dans la séquence de la CP_{PLRV} (Haupt *et al.*, 2005). La séquence riche en arginine ^{17}PRMRRRQSLRRRANR^{31} (**Figure 29**) permet la localisation dans le nucléole de la CP_{PLRV}, et de protéines chimères telle que la GFP fusionnée en N-terminal à la séquence $NoLS_{PLRV}$. Le rôle de la localisation de la CP dans le nucléole n'a pas encore été déterminé. Il se pourrait que la CP module l'expression de certains gènes de l'hôte afin d'adapter la cellule à l'infection virale. Il est aussi envisageable que la CP soit modifiée par des protéines nucléolaires, ou même qu'elle interagisse avec ces protéines pour permettre leur relocalisation afin d'exploiter leurs fonctions dans un autre compartiment cellulaire (Haupt *et al.*, 2005). Par homologie de séquences entre les deux protéines CP_{PLRV} et CP_{TuYV}, le NoLS potentiel de la CP_{TuYV} a été localisé entre les acides aminés 13 et 25 de la CP: ^{13}RRRPRRQTRRAQR^{25} (**Figure 29**). Or,

la mutation R7AR8A se trouve juste en amont de ce signal. En raison de cette proximité, une modification potentielle de conformation dans le N-terminal de la CP_{R7AR8A}, ainsi que la diminution du nombre de charges positives, ont pu affecter la localisation nucléolaire de la protéine R7AR8A.

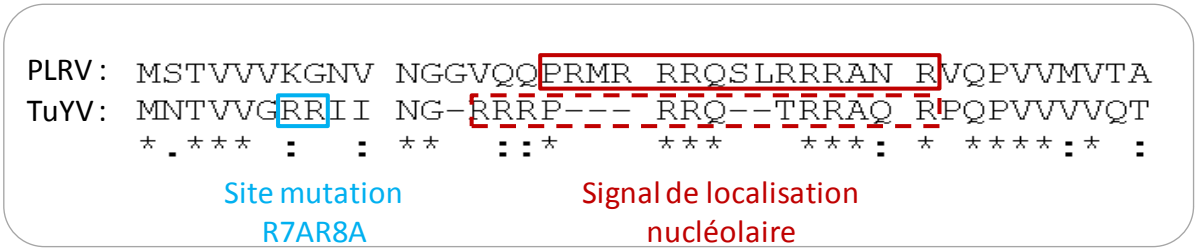


Figure 29 : Comparaison entre les séquences en acides aminés de la CP_{PLRV} et de la CP_{TuYV}. Le signal de la localisation nucléolaire a été positionné sur la séquence de la CP chez le PLRV (Haupt *et al.*, 2005). Ce signal potentiel de localisation nucléolaire chez le TuYV pourrait, par analogie de séquences, se trouver à proximité de la mutation R7AR8A.

Des expériences de localisation subcellulaire par microscopie confocale ont donc été menées avec les protéines du TuYV en utilisant les CP_{WT} et CP_{R7AR8A} fusionnées à l'eGFP dans un vecteur Gateway®. Deux jours après infiltration des constructions dans *N. benthamiana*, les deux protéines CP_{WT}-eGFP et CP_{R7AR8A}-eGFP ont été observées dans le nucléole (**Figure 30**). Ainsi, la mutation R7AR8A, bien que proche du NoLS, n'a pas modifié la localisation subcellulaire de la CP.

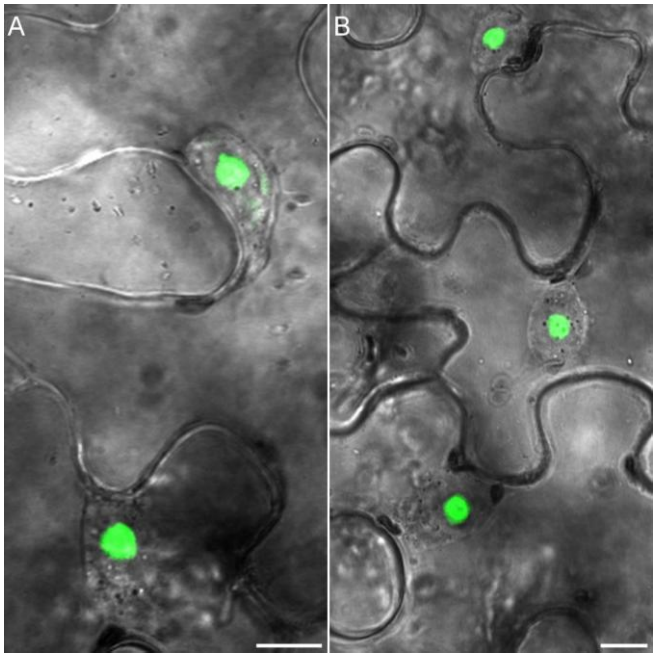


Figure 30 : Localisation subcellulaire des CP_{WT} et CP_{R7AR8A}. Les CP du TuYV-WT **(A)** et du mutant R7AR8A **(B)** fusionnées à l'eGFP ont une localisation nucléolaire dans *N. benthamiana*.

iii) Stabilité des particules virales du R7AR8A

a) Tests de transmission du virus par puceron

La stabilité des virions nécessite un assemblage très spécifique des différentes protéines de capside et permet une protection efficace de l'ARNg viral. Des virions stables sont souvent capables de résister à de grandes variations de conditions physico-chimiques :

pH, température, concentration en sels, ajout d'urée, etc. Une étape du cycle viral nécessitant une stabilité des virions face à des variations importantes de conditions est la transmission par l'insecte vecteur. Il a été montré que la transmission non circulante du CMV par puceron (Ng *et al.*, 2005) et la transmission circulante du TYLCV par aleurode (Caciagli *et al.*, 2009) dépendent de la stabilité des virions. Dans le cas d'une transmission circulante, les virions doivent non seulement faire face aux variations de pH dans l'intestin, mais doivent aussi traverser différentes barrières cellulaires pour rejoindre les glandes salivaires, tout en conservant leur intégrité lors de ces étapes. Dans le puceron *Aphis gossypii* le pH varie tout au long du tube digestif passant de 5-6 dans l'estomac, à 7-8 dans l'intestin moyen pour revenir à un pH plus acide 6-7 au niveau de l'intestin postérieur (Deraison *et al.*, 2004).

Des tests de transmission par puceron du mutant R7AR8A ont donc été réalisés afin d'évaluer la stabilité du virus dans les insectes. Des pucerons *M. persicae* ont été déposés sur des *M. perfoliata* infectées de manière systémique par le TuYV-WT (Valeur de $DO_{405\ nm}$ mesurée en ELISA = 1.2) ou le R7AR8A (Valeur de $DO_{405\ nm}$ mesurée en ELISA = 0.6). Après 24h d'acquisition, ces pucerons, potentiellement virulifères, ont été déposés sur des plantes tests *A. thaliana*. A 15 et 22 dpi, un test ELISA réalisé sur les plantes tests montre que 100 % des plantes sont infectées par le TuYV-WT, alors qu'aucune plante n'est infectée par le R7AR8A (figure non montrée ici).

Afin d'éliminer l'hypothèse que l'absence de transmission soit liée à une faible charge virale dans les plantes infectées par le R7AR8A, le test de transmission a ensuite été reproduit en nourrissant les pucerons sur des purifications de particules virales du TuYV-WT ou du mutant. La concentration des deux purifications, estimée d'après la valeur de DO_{260nm}, a tout d'abord été contrôlée par un western blot. On remarque que les protéines CP et RT* sont détectées de manière similaire dans les extraits purifiés du virus WT et du mutant R7AR8A confirmant la concentration évaluée par spectrométrie (**Figure 31**).

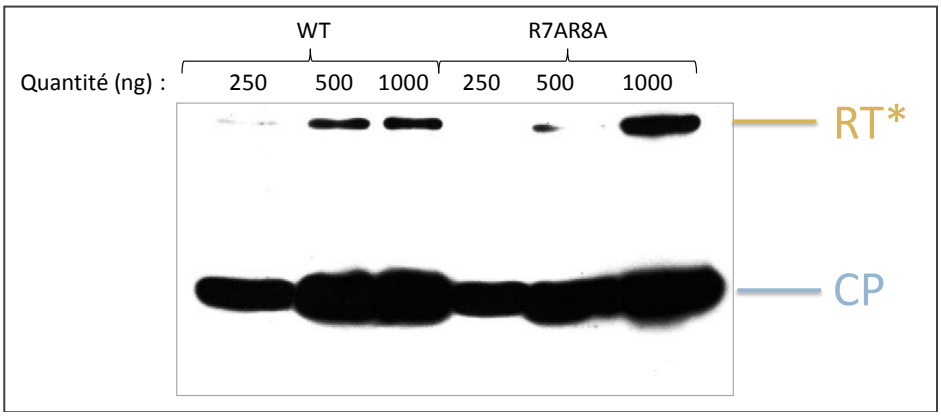


Figure 31 : Analyse de la composition protéique des particules virales purifiées du TuYV-WT et du R7AR8A. Western blot (@CP et @RT) sur des quantités croissantes de virions purifiés.

Après une période d'acquisition de 24 h sur une suspension virale à 75 µg/ml, les pucerons ont été déposés sur des plantes tests *A. thaliana*. A 15 dpi, un test ELISA réalisé sur des plantes tests montre que la totalité des plantes est infectée par le TuYV-WT, alors que 60 et 100 % des plantes sont infectées par le R7AR8A lorsque 10 ou 20 pucerons ont été déposés sur chaque plante test respectivement (**Figure 32**). L'analyse de la descendance virale dans les plantes test montre que la mutation initiale introduite dans la séquence de la CP_{R7AR8A} est toujours présente, et qu'aucune modification supplémentaire n'est apparue. On peut noter

que l'accumulation du mutant dans les plantes tests d'*A. thaliana* est plus faible que celle du TuYV-WT, mais ce résultat est attendu en raison de la faible infectivité du mutant dans ces plantes (**Tableau 5**).
Ce deuxième test de transmission indique que les particules virales du mutant R7AR8A sont suffisamment stables pour être transmises par pucerons.

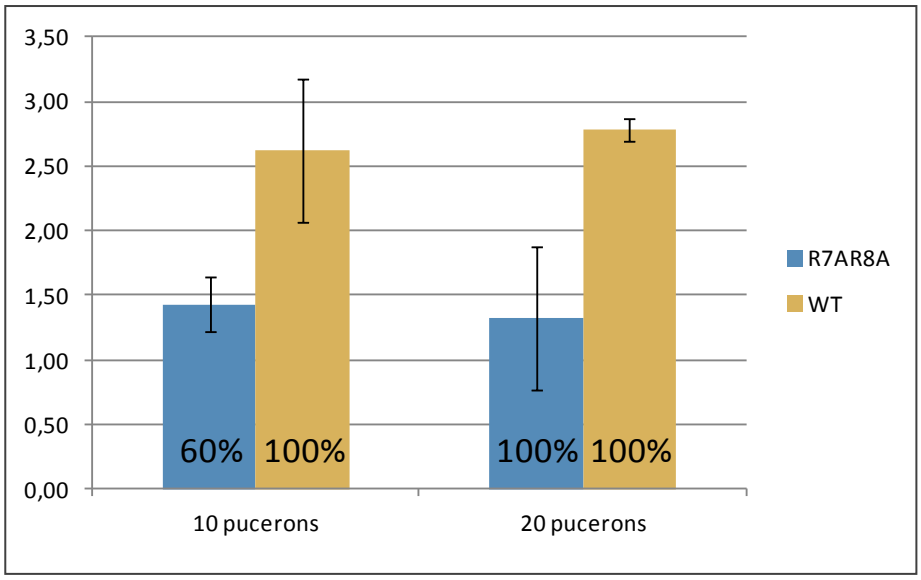


Figure 32 : Test de transmission par pucerons des virions R7AR8A. L'accumulation du virus est mesurée par test ELISA réalisé sur vingt *A. thaliana* par condition quinze jours après avoir déposé 10 ou 20 pucerons nourris au préalable sur des purifications de particules virales du TuYV-WT (WT) ou du R7AR8A. Le pourcentage de plantes infectées pour chaque condition est aussi indiqué dans les barres de l'histogramme.

b) Stabilité aux variations de pH

La stabilité des virions du R7AR8A soumis à différents pH a ensuite été évaluée. En effet, les résultats obtenus lors des tests d'encapsidation à la RNAse A (**Figure 25**) montrent que le mutant R7AR8A est plus facilement détecté par northern blot lorsque l'échantillon est traité à la RNAse A que lorsque l'échantillon ne subit pas un tel traitement. Ce résultat pourrait s'expliquer par la différence de pH existant entre les deux tampons d'extraction. L'extraction des ARN totaux s'effectue dans un tampon à pH 9, contrairement à l'extraction des ARN en présence de RNAse A qui s'effectue à pH 7. L'hypothèse que nous voulions évaluer est une plus grande stabilité des virions R7AR8A à pH 9 comparé aux virions du TuYV-WT, et une plus forte instabilité des virions R7AR8A à pH 7 comparé aux virions du TuYV-WT. Des virions plus stables pourraient en effet conduire à une plus faible extraction des ARN viraux ; les protéines de capside se dissociant plus difficilement ou retenant l'ARN génomique viral.

Pour vérifier cette hypothèse, une quantité identique de particules du TuYV-WT et du mutant R7AR8A a été incubée 1 h dans un tampon PBS 1 X de pH 7 ou 9. Ces virions ont ensuite été observés par ISEM, mais aucune différence de forme ou de nombre de virions n'a été observée (**Figure 33**). Ces résultats suggèrent qu'à pH 7 les virions R7AR8A ne se désintègrent pas et réfutent notre hypothèse initiale. De plus, en réalisant une extraction d'ARN à partir de virions à différents pH (de 6 à 9), aucune différence n'est observable dans la détection des ARNg des virus WT et R7AR8A (figure non présentée). Ces résultats ne nous permettent donc pas de conclure quant à une différence de sensibilité des virions du

R7AR8A face aux variations de pH. Pour poursuivre ces expériences, il serait envisageable de réaliser ces tests de stabilité des virions en faisant varier le pH de manière plus importante (de 4 à 10) , en modulant la température (4°C à 37°C) et la concentration en sels par exemple. Les purifications des particules virales pourraient également être analysées par la technique de *Dynamic Light Scattering* (DLS) exprimant la taille des virions en fonction du pH et de la température (Ausar *et al.*, 2006). De même, la technique de *Far UV Circular Dichroism Spectroscopy* (CD) qui permet d'analyser la stabilité des structures secondaires des virions lors de variations de pH et de températures (Ausar *et al.*, 2006) pourrait être appliquées à nos échantillons de virus purifiés. Ce type de données nous permettrait d'avoir une réponse plus précise quant à la stabilité des virions mutants par rapport aux virions du TuYV-WT.

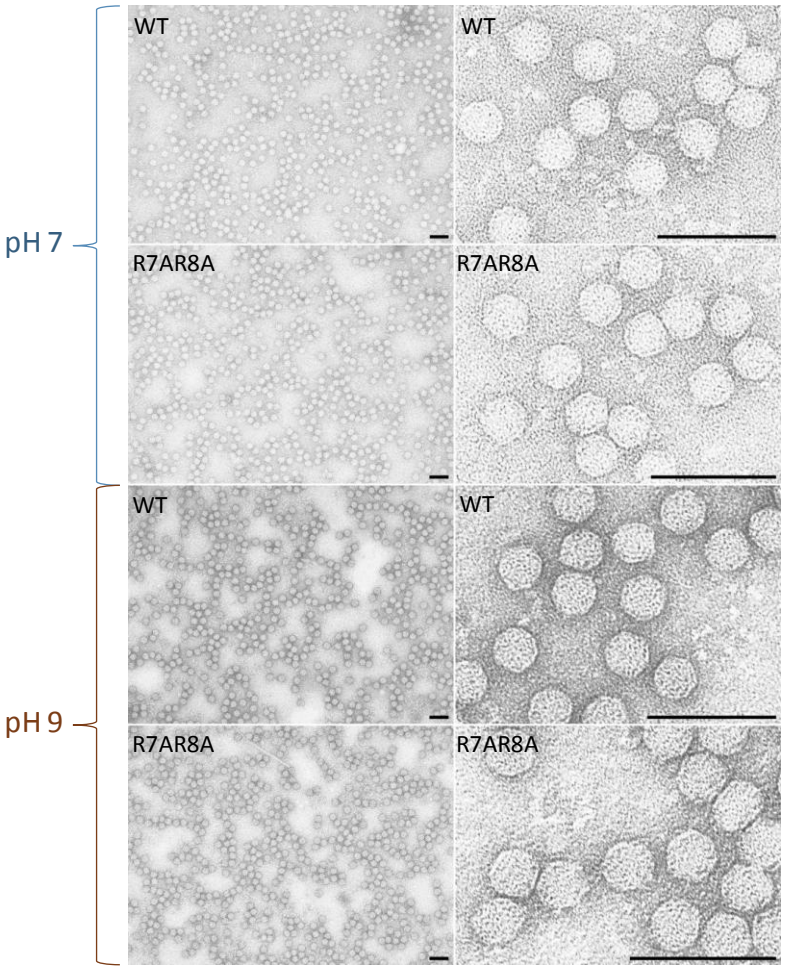


Figure 33 : Vérification de la stabilité des virions du TuYV-WT et du mutant R7AR8A à pH 7 et 9. Avant observation en ISEM, les virions ont été incubés pendant 1 h dans du PBS 1X ajusté à pH 7 ou 9. Les photos de la colonne de droite correspondent à des agrandissements des photos de gauche. Echelles : 60nm

c) Intégrité des ARN présents dans les virions

Une observation attentive des différents northern blot effectués sur les ARN viraux du R7AR8A permet de distinguer deux bandes supplémentaires dans les échantillons de feuilles inoculées : une bande de taille inférieure à l'ARN génomique, et une bande de taille inférieure à l'ARN subgénomique (**Figure 25**). Or, une bande de taille inférieure à l'ARN

génomique avait déjà été observée par northern blot dans des échantillons d'ARN totaux provenant de protoplastes inoculés avec le R7AR8A et traités à la RNAse A (Brault *et al.*, 2003).
Ces bandes supplémentaires sont très probablement des produits de clivage des ARN du R7AR8A dans la cellule. Toujours dans le but de savoir si les particules virales du R7AR8A protègent efficacement l'ARN génomique, nous avons cherché à déterminer si ces clivages ont lieu avant ou après encapsidation. Pour répondre à cette question, de nouvelles extractions d'ARN ont été réalisées à partir de feuilles inoculées par le virus WT et le R7AR8A, ou à partir de virions purifiés. Pour déterminer la position des sites de clivage, cinq sondes couvrant différentes régions du génome viral ont été utilisées en northern blot (**Figure 34**).

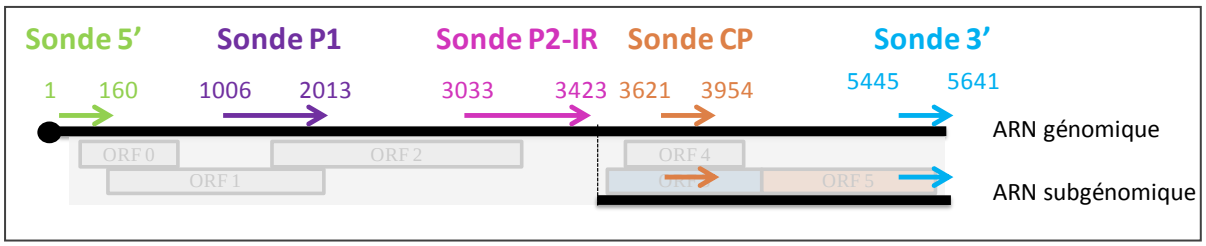


Figure 34 : Ensemble de sondes utilisées en northern blot pour détecter les ARN viraux. Leur position sur la séquence de l'ARN génomique viral est indiquée par des flèches de couleur.

Concernant le TuYV-WT, les cinq sondes permettent de détecter l'ARNg dans les feuilles inoculées et dans les virions. Comme attendu, l'ARNsg est détecté uniquement dans les feuilles inoculées, et jamais dans les virions, avec les sondes couvrant la partie 3' du génome (sondes CP et 3') (**Figure 35**).
Dans le cas du mutant R7AR8A, les ARNg et ARNsg sont détectés de manière équivalente au TuYV-WT dans les échantillons de feuilles inoculées. Cependant, trois bandes supplémentaires, correspondant à des clivages de l'ARN, sont aussi présentes : deux ARN de taille inférieure à l'ARNg, et un ARN plus petit que l'ARNsg (**Figure 35**). Ces trois ARN sont aussi retrouvés dans les virions, où ils semblent être les formes majoritaires encapsidées. En effet, l'ARNg complet n'est détecté dans les virions qu'avec quatre des cinq sondes utilisées, et la bande correspondant à l'ARNg complet apparait minoritaire par rapport aux produits de clivage (**Figure 35**). Il semblerait donc que la majorité des ARN encapsidés soient incomplets et donc défectifs. Ce résultat pourrait expliquer, en lui-même, la faible infectivité du mutant dans les plantes malgré sa capacité à former des particules virales.

Etant donné la reproductibilité de détection des produits de clivage de l'ARNg et le fait que ces produits soient aussi observables dans les extractions d'ARN à partir de virions, il semblerait que ces clivages aient lieu une fois l'ARN encapsidé, et non sur les ARN viraux libres (**Figure 35**). Dans les virions, l'ARNg du R7AR8A possèderait deux régions sensibles aux RNAses cellulaires potentiellement exposées à l'extérieur de la particule virale (**Figure 35**):

- Un site situé dans la région 5' de l'ARN génomique dont le clivage entraine l'obtention d'un ARN un peu plus court que l'ARNg. La petite partie clivée en 5' ne serait pas détectable par northern-blot.
- Un site situé au niveau des ORFs 3 et 4 dont le clivage entraine l'obtention des deux autres produits de clivage.

Cette hypothèse implique cependant une encapsidation similaire des ARNg dans toutes les capsides pour que le clivage se fasse toujours aux mêmes endroits sur l'ARNg encapsidé (**Figure 36**). De manière générale, la formation d'une particule icosaédrique commence par une reconnaissance d'un site spécifique sur l'ARN par la CP. Ce site peut être une séquence particulière ou une région structurée. Après fixation d'une première CP au niveau de ce site, les interactions CP/CP permettent la constitution du virion qui protège au fur et à mesure l'ARN en se fixant séquentiellement à celui-ci. Un tel modèle a été décrit pour le HIV-1 (Jewell & Mansky, 2000) ou encore pour le TCV (Qu & Morris, 1997). Dans le cas du mutant R7AR8A, l'amorçage de l'encapsidation pourrait être altéré soit en raison de la mutation introduite sur l'ARN qui affecterait le site initial de l'encapsidation, soit à cause de la modification portée par la CP qui reconnaitrait moins bien le site d'encapsidation ou qui fixerait moins efficacement l'ARN.

iv) Conclusions et perspectives de l'étude du mutant R7AR8A

Bien que capable de former des particules virales visuellement similaires à celles du TuYV-WT, le mutant R7AR8A se présente dans notre étude comme un cas intéressant puisque ce virus est affecté dans son mouvement à longue distance. En effet, dans les trois hôtes testés, ce mutant infecte une faible proportion de plantes inoculées, et s'accumule plus faiblement dans les plantes infectées comparé au TuYV-WT. L'analyse approfondie de ce mutant a permis, dans un premier temps, de montrer que la mutation située dans le domaine R de la CP n'a pas modifié la localisation nucléolaire de la CP. Une modification de la localisation subcellulaire aurait pu affecter certaines fonctions de la protéine de capside importantes pour le mouvement du virus, telles que le recrutement de facteurs cellulaires, la modification de l'expression de gènes cellulaires, les modifications de la CP par des protéines nucléaires ou nucléolaires, etc. Nos expériences ont montré que l'encapsidation de l'ARN génomique du R7AR8A dans la capside formée des protéines CP mutées était probablement affectée. Bien que la structure des particules virales du mutant R7AR8A permette sa transmission, l'ARN encapsidé semble accessible aux ribonucléases cellulaires, probablement en raison d'une mauvaise interaction entre l'ARN et les protéines de capside mutées. La conséquence de ce clivage est l'encapsidation d'un ARN viral défectif qui, malgré son transport à longue distance, ne peut initier une infection. Une faible proportion de capsides virales contient cependant un ARN viral intact ce qui permet la maintenance du cycle viral, mais avec une efficacité plus faible comparée au TuYV-WT. La mutation R7AR8A n'a donc pas affecté le mouvement à longue distance du virus, mais a plutôt conduit à l'obtention d'un virus partiellement défectif.

Par ailleurs, les clivages de l'ARNg viral semblent toujours s'opérer aux mêmes endroits, ce qui laisse supposer que des régions spécifiques de l'ARNg sont accessibles aux ribonucléases. L'ARN viral adopterait donc le même repliement dans toutes les capsides et des régions identiques seraient accessibles aux ribonucléases (**Figure 36**).

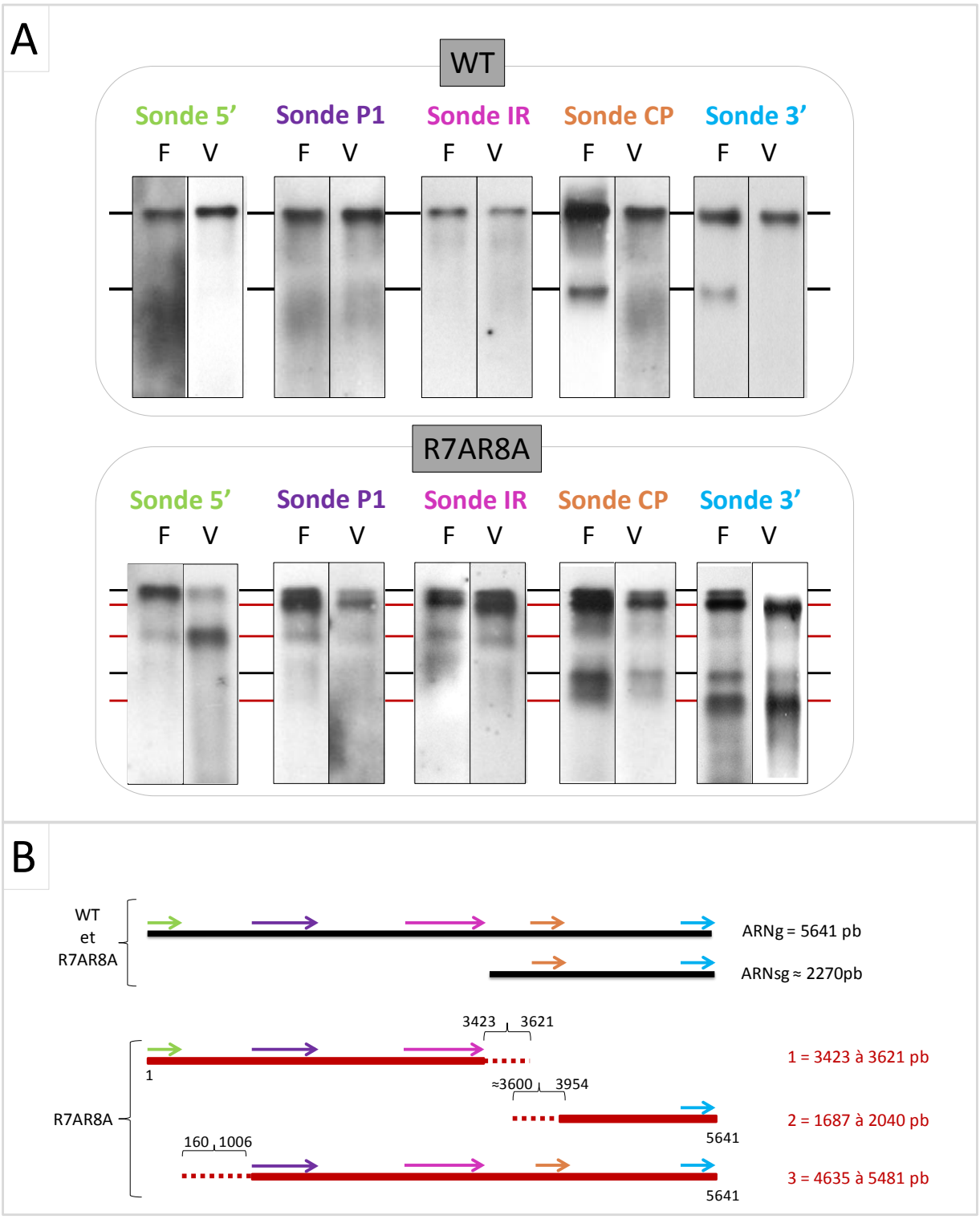


Figure 35 : Clivages de l'ARN génomique du R7AR8A. (A) Northern blot. Utilisation de cinq sondes reconnaissant différentes portions des ARNg et ARNsg du TuYV-WT (WT) ou du R7AR8A. La position des ARN viraux est indiquée par un trait noir, alors que les traits rouges indiquent les produits de clivage observés chez le mutant. Extraction des ARN à partir de feuilles inoculées (F) ou de virions (V). **(B) Représentation schématique des ARN viraux identifiés par northern blot**. La position approximative des sites de clivage est indiquée par une accolade. Les nombres correspondent à la position nucléotidique sur l'ARN génomique. Les tailles des ARN identifiés en northern blot sont indiquées à droite de chaque bande.

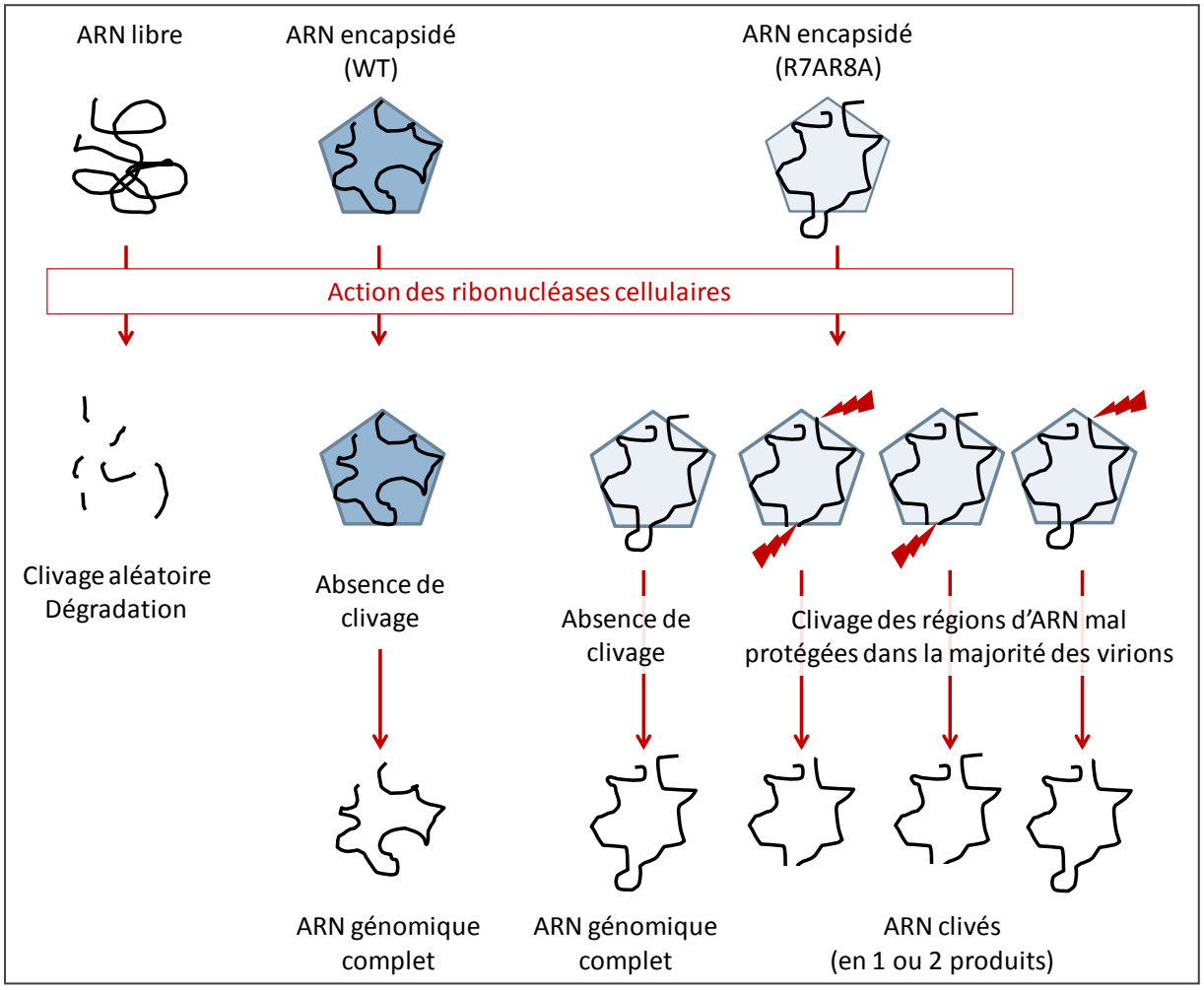


Figure 36 : Schéma hypothétique de clivage de l'ARN génomique du R7AR8A. L'éclair rouge symbolise le site potentiel de clivage des ribonucléases cellulaires.

3.4 Complémentation du mouvement de mutants du TuYV par la CP_{WT}

i) Stratégie expérimentale

Comme nous l'avons vu précédemment, l'incapacité à former des virions a entrainé la perte d'infection systémique dans *M. perfoliata* de mutants touchés dans la CP. Ces résultats nous ont conduits à conclure que les virions seraient la forme virale se déplaçant à longue distance. Néanmoins, sur la base de ces seuls résultats, nous ne pouvons pas écarter l'hypothèse selon laquelle la CP sauvage (CP_{WT}) serait nécessaire à la formation de complexes RNP.

Pour éprouver cette hypothèse, trois mutants (S79R/G80R, W166R et NoCPRT4.3) ont été inoculés à des plants d'*A. thaliana* transgéniques exprimant la protéine CP_{WT}. Comme précédemment, nous avons ensuite analysé leur accumulation dans les feuilles inoculées et non-inoculées, ainsi que leur capacité à former des particules virales. A nouveau, quatre cas hypothétiques pouvaient se présenter dans l'étude (**Figure 37**).

- **Le cas n°1**, où la complémentation par la CP_{WT} permet de restaurer le mouvement à longue distance par encapsidation des ARN viraux mutants, permet d'appuyer la conclusion évoquée précédemment.

- **Les cas n°2 et 4,** où la complémentation par la CP_{WT} ne permet pas de restaurer le mouvement à longue distance, n'apportent pas de nouvelles données.
- **Le cas n°3** où la complémentation par la CP_{WT} permet de restaurer le mouvement à longue distance en absence d'encapsidation des mutants, permet de conclure que ce ne sont pas les virions, mais des complexes RNP impliquant la CP_{WT} totalement fonctionnelle, qui sont responsables, ou participent, au transport du virus dans les TC.

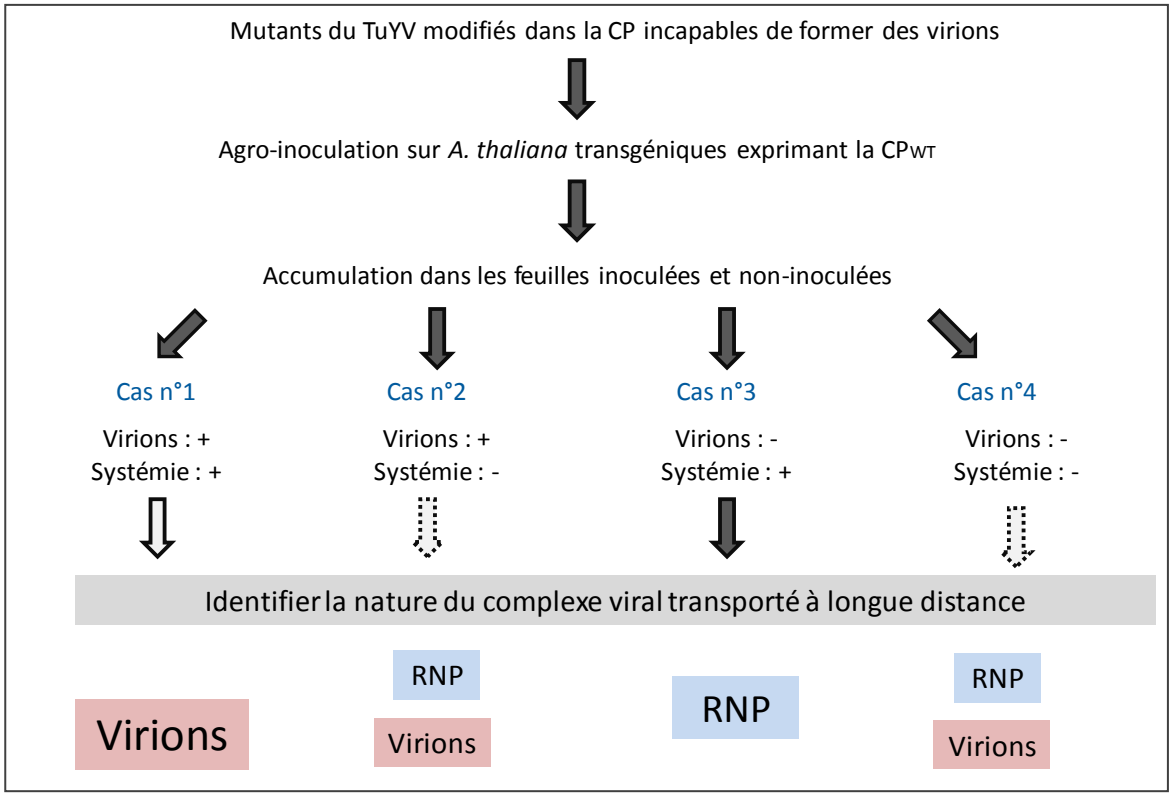


Figure 37 : Stratégie d'expérimentation pour l'étude de la complémentation du mouvement systémique de mutants du TuYV par apport en *trans* de la CP_{WT}.

ii) Présentation des *Arabidopsis* P35S:CP

La protéine CP_{WT} a été apportée en *trans* par expression constitutive dans des *A. thaliana* transgéniques. Des Col-0 ont été transformées par la technique du floral dip (Diane Bortolamiol, IBMP, Strasbourg) avec un plasmide dérivé du pBITC (Erhardt *et al.*, 1999) permettant l'expression constitutive de la CP_{WT} dans la plante. La séquence complète de la CP_{WT} a ainsi été placée sous le contrôle d'un promoteur 35S (P35S) en aval de la séquence oméga du TMV stimulatrice de la traduction (Gallie *et al.*, 1987) (**Figure 38**).

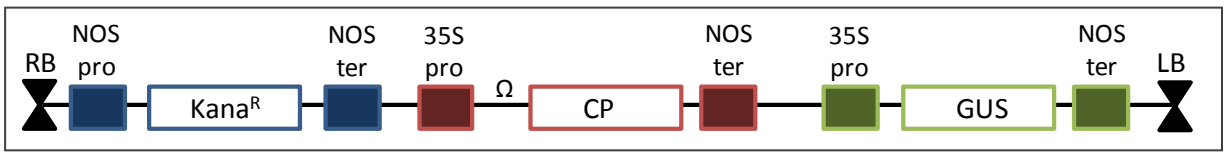


Figure 38 : Organisation du fragment T-DNA permettant l'expression de la CP du TuYV dans les *Arabidopsis* transformées. Les éléments suivants sont présents sur le T-DNA : bordures droite (RB) et gauche (LB) du T-DNA, promoteur (NOS pro) et terminateur (NOS ter) de la nopaline synthase, gène de la neomycine phosphotransférase permettant la résistance à la Kanamycine ($Kana^R$), Promoteur 35 du CaMV (35S pro), gène de la β-glucuronidase (GUS) non utilisé dans nos expérimentations, et séquences *enhancer* de la traduction du TMV (Ω).

A partir des graines issues des plantes transformées, je n'ai obtenu qu'une seule lignée homozygote, nommée ci-après P35S:CP, par semis successifs sur un milieu de nutrition gélosé additionné de kanamycine. Toutes les plantes de cette lignée expriment la CP_{WT}, bien que l'expression soit plus faible par rapport à la quantité de CP s'accumulant dans des Col-0 infectées par le TuYV-WT (**Figure 39**). Aucun phénotype particulier n'est observable pour ces plantes: la croissance et le développement des feuilles et hampes florales ne semblent pas affectés.

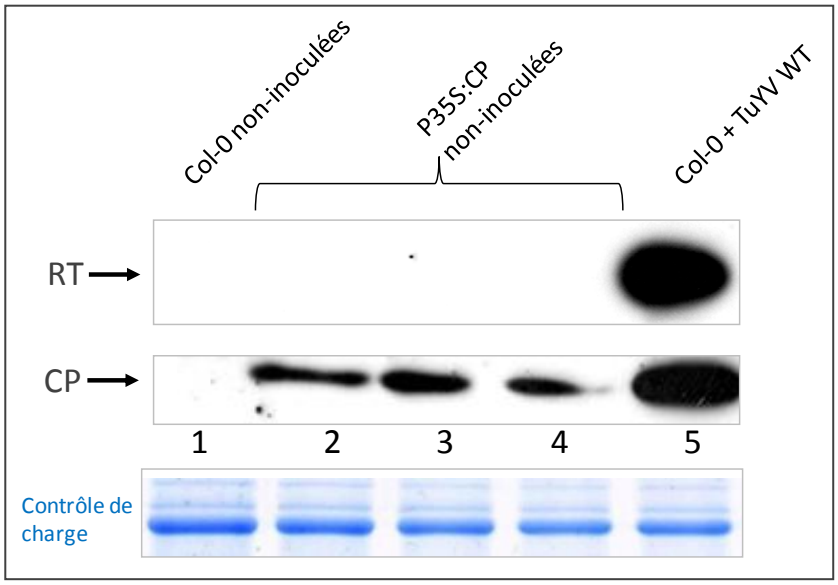


Figure 39 : Détection de la CP du TuYV dans les *Arabidopsis* transgéniques P35S:CP. Extraction de protéines totales à partir de Col-0 (puits 1) ou de P35S:CP (puits 2 à 4) non-inoculées, ou de Col-0 infectées par le TuYV-WT (puits 5). Les protéines ont été séparées sur un gel SDS-PAGE 12%, puis transférées sur une membrane de nitrocellulose avant l'incubation avec des anticorps spécifiques (@CP + @RT). Un gel SDS-PAGE chargé en parallèle a été coloré au bleu de Coomassie pour contrôler la quantité de protéines déposée dans chaque puits du gel.

Malgré l'expression de la CP_{WT} dans les *A. thaliana* P35S:CP, celle-ci n'est pas détectée par ELISA ce qui nous permet d'utiliser cette technique pour détecter les virus dans ces plantes. Nous avons, dans un premier temps, analysé l'accumulation du TuYV-WT, dans les plantes P35S:CP afin de voir si l'expression de la CP_{WT} pouvait conduire à une résistance des plantes au virus. Comme le montre la **Figure 40**, l'accumulation du TuYV-WT dans Col-0 n'est pas statistiquement différente de l'accumulation du virus dans les plantes P35S:CP. Par ailleurs, le pourcentage de plantes, transgéniques ou non, infectées par le TuYV-WT est semblable (70% et 80% pour les *Arabidopsis* P35S:CP et les Col-0 respectivement). Ces plantes transgéniques exprimant la CP_{WT} ne présentent donc aucune résistance à l'infection virale observable par ELISA.

Il faut également signaler qu'aucune *Virus-Like Particle* (VLP) n'est visible lorsqu'on réalise une purification de virions à partir de plantes transgéniques P35S:CP non-inoculées (Figure ci-après dans l'article). Les VLPs sont des particules vides qui peuvent se former par un auto-assemblage des protéines de capside en absence du génome viral, soit après expression des protéines de capside dans des plantes (Zheng *et al.*, 2000), soit dans des cellules d'insectes (Bertioli *et al.*, 1991; Singh *et al.*, 1995). Dans le cas du PLRV, des VLPs ont pu être observées lors de l'expression de la CP en cellules d'insectes. La séquence de la CP insérée dans le génome du *Baculovirus* possède toutefois un tag 6His en N-terminal, dont la présence est requise pour l'assemblage des VLPs (Lamb *et al.*, 1996).

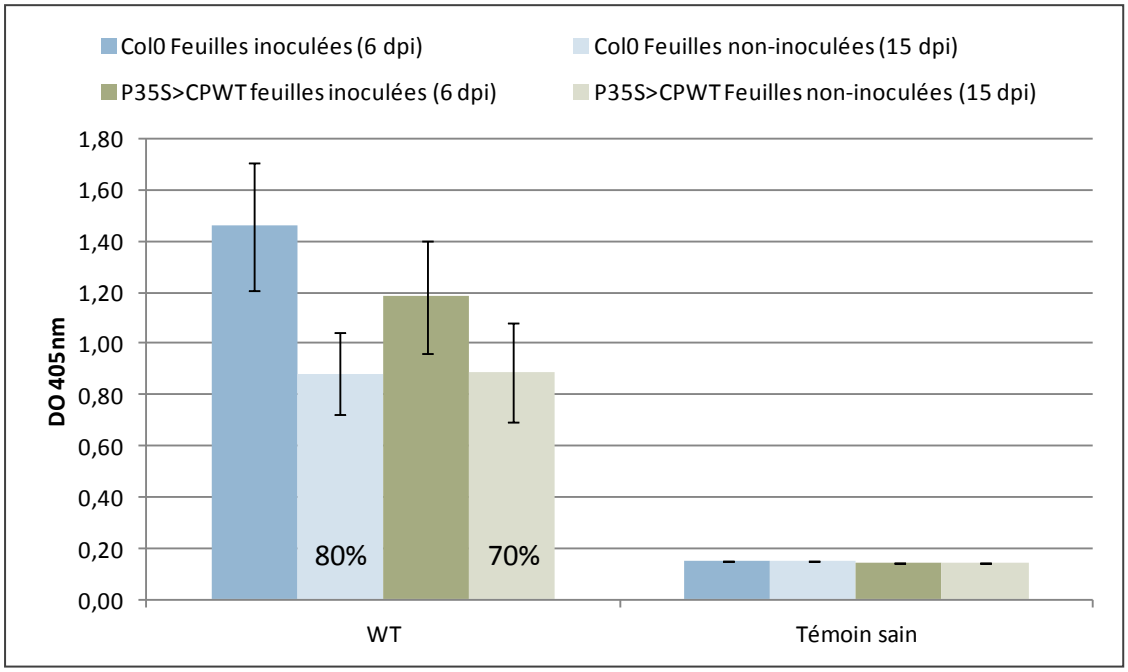


Figure 40 : Accumulation du TuYV-WT dans les feuilles inoculées et non-inoculées d'*A. thaliana* P35S:CP et Col-0. L'accumulation virale dans P35S:CP (en vert) et Col-0 (en bleu) est exprimée en valeur de $DO_{405\ nm}$. Les valeurs données correspondent à la moyenne des mesures de DO obtenues pour les plantes infectées dans les trois expériences indépendantes.

La lignée homozygote P35S:CP a ensuite été inoculée avec trois mutants de la CP du TuYV : NoCPRT4.3 (pour l'absence de protéines de capside), S79R/G80R (pour les mutants de l'épitope 5) et W166R (mutant de l'épitope 10).
Les résultats obtenus avec les mutants NoCPRT4.3 et W166R sont présentés dans l'article inséré ci-dessous. Les résultats complémentaires obtenus avec le mutant S79R/G80R sont présentés séparément et ouvrent de nouvelles perspectives de recherche.

iii) Article : Formation of virions is strictly required for *Turnip yellows virus* long-distance movement in plant

Clémence Hipper[1], Baptiste Monsion[1,2†], Diane Bortolamiol-Bécet[2,3†], Véronique Ziegler-Graff[2], and Véronique Brault[1].

[1]UMR INRA-UDS Virus-Vection group, 28 rue de Herrlisheim Colmar, France.

[2]CNRS, IBMP, UPR 2357, 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg, France.

[3]Sloan-Kettering Institute, Department of Developmental Biology, 1275 York Avenue, Box 252, New York, NY 10065, USA.

[†] Current address.

Corresponding author: Véronique Brault; veronique.brault@colmar.inra.fr; (+33) 3 89224934

Number of words Summary: 192

Number of words Text body (including figure and table legends): 5477

Number of table and figures: 8

Content Category: Standard ('full-length') papers

SUMMARY

Turnip yellows virus (TuYV) is a polerovirus (*Luteoviridae* family) whose viral genomic RNA is protected into virions formed by major (CP) and minor (RT*) capsid proteins. Long-distance transport, commonly used by viruses to systemically infect host plants, occurs in phloem sieve elements, and two viral forms of transport have been described: virions and ribonucleoprotein (RNP) complexes. Concerning poleroviruses, virions have always been presumed to be the long-distance transport device, but the potential role of RNP complexes was never investigated. Here we examined the requirement of virions for polerovirus systemic movement by analyzing CP-targeted mutants that are unable to form viral particles. We confirmed that TuYV mutants that cannot encapsidate into virions are not able to reach systemic leaves. To completely discard the possibility that the introduced mutations in the CP simply block the formation, or the movement of RNP complexes, we tested *in trans* complementation of TuYV CP-mutants by providing the wild-type CP expressed in transgenic plants. Wild-type CP was able to facilitate systemic movement of TuYV CP-mutants and this observation was always correlated with the formation of virions. This clearly demonstrates that virus particles are essential to polerovirus systemic movement.

INTRODUCTION

Poleroviruses belonging to the *Luteoviridae* family are phloem-restricted viruses propagated from plant to plant by aphids. Virus replication occurs in the nucleated companion and phloem parenchyma cells, where virions were observed (Esau & Hoefert, 1972; Mutterer *et al.*, 1999; Shepardson *et al.*, 1980), and cell-to-cell movement should take place between these two types of cell. To initiate new infection sites, the virus is transported to distant tissues through the sieve elements. Long-distance transport, also called systemic movement, is a common step shared by all plant viruses, which use the sap flow to invade the whole plant. Two viral forms of long-distance transport have been described: virions protecting the viral genome in a shell formed by the assembly of capsid protein (CP) subunits, and ribonucleoprotein (RNP) complexes in which the viral genome is associated with viral and/or cellular proteins (for a review see Hipper et al., 2013). While most viruses use only one transport device, some others adopt multiple forms to be transported to non-inoculated tissues. The three genomic RNAs of the *Potato mop-top virus* (PMTV, *Pomovirus*, *Virgaviridae*) are individually transported in the same host using different viral structures: RNA1 and RNA2 can spread as RNP complexes in the absence of the CP, but formation of virions is strictly required for the long-distance movement of RNA3 (McGeachy & Barker, 2000; Savenkov, 2003; Torrance *et al.*, 2009, 2011; Wright *et al.*, 2010). Other viruses seem to use preferentially one of the two viral structures depending on the host. As an example, *Cymbidium ringspot virus* (CymRSV, *Tombusvirus*, *Tombusviridae*) moves in *Nicotiana clevelandii* as virions, but can also be transported in a CP-independent manner in *N. benthamiana* (Dalmay *et al.*, 1992).

Turnip yellows virus (TuYV) is a polerovirus with icosahedral virions of about 25 nm of diameter which encapsidate the viral RNA genome. TuYV virions are composed of the major capsid protein (CP, 23 kDa) and the minor component, the readthrough protein (RT*, about 54 kDa), that arises from a C-terminal cleavage of the native product of 74 kDa (RT). The RT protein is a C-terminal extension of the CP which is produced by a bypass of the CP stop codon. CP, RT* and RT proteins are involved in polerovirus long-distance transport (Brault *et al.*, 2000, 2003; Bruyère *et al.*, 1997; Peter *et al.*, 2008). Poleroviruses also encode a protein of 17 kDa (the P4 protein) which shares biochemical and cellular characteristics of conventional cell-to-cell movement proteins like its ability to bind ssRNA, target

plasmodesmata (PD), increase the size exclusion limit of PD, form homodimers and become phosphorylated (Hofius *et al.*, 2001; Schmitz *et al.*, 1997; Sokolova *et al.*, 1997; Tacke *et al.*, 1993). Although P4 defective PLRV-mutants were, in some hosts, impaired in their ability to reach systemic leaves (Lee *et al.*, 2002), the exact role of P4 protein in polerovirus cycle remains to be determined.

Polerovirus particles were detected in plasmodesmata connecting nucleated phloem cells and sieve elements, suggesting that virions are the long-distance mobile device of poleroviruses (Esau & Hoefert, 1972; Mutterer *et al.*, 1999; Shepardson *et al.*, 1980). Moreover, polerovirus virions were also observed in sap collected from infected plants (Brault, unpublished results) which represents the virus reservoir sampled by aphids that allows virus transmission. Mutations in the CP gene of TuYV that disrupt virion formation also inhibit systemic transport (Brault *et al.*, 2003), reinforcing the hypothesis that virus particles are required in polerovirus long-distance movement. Nevertheless, it is conceivable that RNP complexes may participate, together with virions, to this process. Indeed, accumulation of TuYV-CP mutants in systemic leaves was never evaluated by RT-PCR, leaving the possibility that RNP complexes could migrate to non-inoculated leaves.

Therefore, we re-investigated the requirement of virions for polerovirus systemic movement by generating new CP-targeted mutants unable to form viral particles. Infection of non-inoculated leaves was followed by RT-PCR. We confirmed that TuYV-CP mutants unable to form virus particles are also blocked in their systemic movement. To discard the possibility that the mutations introduced into the capsid protein gene inhibited the formation of RNP complexes, we tested *in trans* complementation of TuYV-CP mutants defective in movement by providing the wild-type CP expressed in transgenic plants. The ectopically expressed CP protein was able to promote systemic movement of the tested TuYV-CP mutants. Moreover, this long-distance transport was always correlated with the formation of virions, which confirms the requirement of virus particle formation for polerovirus systemic movement.

RESULTS

Mutations in the major capsid protein (CP)

All the observations and experiments performed so far are in favor of a role of virions in the long-distance transport device of poleroviruses (Brault *et al.*, 2003; Esau & Hoefert, 1972; Mutterer *et al.*, 1999; Shepardson *et al.*, 1980; Ziegler-Graff *et al.*, 1996). To determine whether ribonucleoprotein (RNP) complexes can also participate to systemic transport of poleroviruses, we introduced point mutations in the CP sequence of TuYV to obtain virus mutants unable to form virus particles, but which could retain their potential to form RNP complexes. Two domains of the TuYV-CP sequence corresponding to surface epitopes on the *Potato leafroll virus* (PLRV)-CP (previously referred to as epitopes 5 and 10: Torrance, 1992; Terradot et al., 2001) were targeted by site-directed mutagenesis. These epitopes are situated in the shell domain (S) forming the capsid structure and located downstream of the N-terminal arginin-rich domain (R). This latter domain is supposed to be oriented towards the inner capsid where it can associate with viral RNA (Chavez *et al.*, 2012; Terradot *et al.*, 2001; Torrance, 1992). The high sequence homology between PLRV- and TuYV-CP (62% amino acid identity) allowed to position these epitopes between amino acids 77-92 and 165-175 on the TuYV-CP sequence (Brault *et al.*, 2003; Mayo & D'Arcy, 1999; Terradot *et al.*, 2001). Seven TuYV-CP mutants bearing one or two amino acid changes in the potential TuYV epitope 5 were obtained (Fig.$_1$). The mutations affect either the overall CP charge (S79R/G80R and D90N/C91R), or modify the aromatic Phenylalanine residue (F84Q/G85W, T83S/F84L, and F84V) or Proline (T83P/P86T) positions. A conservative mutation which does not change the overall charge of the CP was also introduced in one of the mutants (S87G). Additionally, the previously described mutant W166R affecting the putative TuYV-epitope 10 (Brault *et al.*, 2003) was also studied. In the mutant NoCPRT, the expression of capsid proteins was completely abolished by deleting 37 nucleotides in the CP sequence spanning the CP start codon. None of the aforesaid mutations in the ORF3 alter the amino acid sequence of the P4 protein encoded by the overlapping ORF4 (Fig.$_1$).

Effect of the CP mutations on virus accumulation and virion formation

To evaluate the ability of the TuYV-CP mutants to infect plants locally, *Montia perfoliata* leaves were infiltrated with a suspension of *Agrobacterium tumefaciens*

transformed by the corresponding binary plasmids containing the full-length viral mutated sequences. Six days post-infiltration, virus replication and accumulation was assessed by ELISA, northern blot and RT-PCR in the infiltrated leaves. Among all mutants, only mutant S87G was able to infect the infiltrated leaves to a virus titer similar to that of the wild-type TuYV, as measured by ELISA (Table 1). None of the other mutants were detectable by ELISA (Table 1). However, the presence of the viral genomic (gRNA) and subgenomic (sgRNA) RNAs of all the TuYV-CP mutants in the infiltrated leaves was confirmed by northern blot (Fig.2a), indicating that all CP mutants, also detectable by RT-PCR in the infiltrated leaves (Fig.2b, upper panel), were able to replicate. The viral RNAs synthesized by the TuYV-CP mutants accumulated at a much lower level compared to the wild-type virus, except in the case of the S87G mutant for which gRNA and sgRNA accumulation was comparable to those of the wild-type virus (Fig.2a). In addition, replication of the following mutants, S79R/G80R, D90N/C91R, T83P/P86T, F84Q/G85W and W166R, was confirmed by the detection of both CP and RT proteins in transcript-transfected *Chenopodium quinoa* protoplasts (Fig.S_1a). Accumulation of CP and RT in the leaves agro-infiltrated by all CP-mutants confirmed their replication ability, but the detection level varied between experiments as shown for example in the western blot presented in Fig.S_1b.

An unexpected observation was that although the mutated CP and RT proteins synthesized by the different CP-mutants were detected by western blot, they were not detectable by ELISA. As ELISA and western blot analyses were performed using different antibodies (commercial polyclonal antiserum raised against whole virus particles, and polyclonal antisera directed against TuYV-CP or -RT polypeptides respectively), we hypothesized that the different antisera could recognize distinct protein conformations. To address this question, TuYV wild-type virions were disrupted by an SDS-treatment before being assayed by ELISA. As shown in Fig.S_2(a), using the serum raised against virions and similar protein amounts, disassembled CP-subunits gave a lower absorbance than whole virions. Disruption of virions by SDS-treatment was confirmed by ISEM observations (Fig.S_2b), and the quantity of CP proteins in each sample (untreated and treated virions) was evaluated by an SDS-PAGE gel (Fig.S_2c). Therefore, the absence of detection of the CP-mutants in inoculated leaves by ELISA strongly suggested an inability of the mutated virus to form virions. This hypothesis was further evaluated by performing immunosorbent electron microscopy (ISEM) on infiltrated leaf homogenates to observe virions. Typical icosahedral virus particles of about 25 nm in

diameter were observed in leaves infiltrated with the wild-type virus or the S87G mutant, but no virus particles were seen in leaves infiltrated with any of the other TuYV-CP mutants (Fig.3 and data not shown).

Taken together, these results show that all the TuYV-CP mutants were replication-competent in infiltrated leaves and synthesized detectable amounts of mutated CP and RT proteins. However, except for mutant S87G which modified CP could still assemble into virions, none of the CP-mutants formed virus particles.

Effect of the CP mutations on systemic infection

The capacity of the TuYV-CP mutants to reach systemic leaves of *M. perfoliata* was further analyzed by ELISA and RT-PCR at 15 dpi. As in inoculated leaves, S87G mutant was the only one that could be detected by ELISA in systemic leaves (Table 1). The accumulation level was similar to the wild-type virus level as indicated by a Student test. RT-PCR further confirmed the ability of S87G mutant to move to upper leaves (Fig.2b, lower panel). Conversely, none of the other TuYV-CP mutants were detected in the systemic leaves by either of the two methods (Table 1; Fig.2b, lower panel). The stability of the nucleotide substitution introduced into the CP sequence of S87G mutant was investigated in the systemically infected leaves by RT-PCR followed by sequencing of the DNA fragment encompassing the mutation. In the two plants analyzed, the viral population was homogenous and carried the original mutation (data not shown), confirming that the long-distance movement of this mutant was not affected by the modification of the CP sequence. Viral particles of S87G purified from systemic infected leaves were also fully aphid transmissible (data not shown), suggesting that the modified amino acid in the CP sequence does not affect virus acquisition or inoculation by the aphids.

All together, these results showed a strong correlation between viral particle formation and virus long-distance movement, as the only virus mutant able to reach systemic leaves is the sole capable of forming virions.

In trans complementation of movement defective TuYV-CP mutants

We collected from the previous experiments strong evidence that virus particles are the virus moving device of TuYV. However, the possibility that the CP-mutants are unable to form RNP complexes cannot be completely discarded. To address this issue, we expressed the

wild-type TuYV-CP in transgenic *A. thaliana* Col-0 plants using a binary plasmid containing the TuYV-CP sequence under the control of the CaMV 35S promoter. These plants are referred to as P35S:CP. The TuYV-CP protein expressed in the transgenic plants was detected by western blot in the F3 homozygous P35S:CP line (Fig.4), while no signal was obtained by ELISA (Table S_1, mock P35S:CP). The absence of detection by ELISA of the TuYV-CP expressed in the transgenic plants may come from a low accumulation of the ectopically expressed CP or, as discussed previously, from the absence of virions in these CP-expressing plants. We confirmed by ISEM that no virus-like particles were observed in non-inoculated transgenic plant extracts that underwent a virus purification procedure (Fig.7a, P35S:CP mock).

The P35S:CP plants were agroinfiltrated with two CP-mutants, W166R and NoCPRT, or with the wild-type TuYV. The level of virus accumulation was assayed by ELISA at 6 dpi in the infiltrated leaves, or at 12 dpi in the systemic leaves. Wild-type TuYV accumulated at similar levels in P35S:CP and Col-0 plants, whereas no detection of the mutants was observed (Table S_1). The viral genome of both CP-mutants was however detected by RT-PCR (Fig.5a) and northern blot (Fig.6) in the infiltrated leaves. To address whether these mutants were able to move to systemic leaves in the CP-expressing plants, presence of the viral RNA in non-inoculated leaves was evaluated by RT-PCR. W166R viral RNA was detected in 16 out of 51 inoculated plants, and similarly, NoCPRT genome was detected in 4 out of 26 inoculated plants (Fig.5b). Conversely, the viral RNA of the two mutants was never detected by RT-PCR in any of the 26 Col-0 inoculated plants (Fig.5b). The gRNA and sgRNA of both mutants could also be observed by northern blot in the systemic leaves of the P35S:CP plants identified as positive by RT-PCR, but the level of RNA accumulation was however very low compared to that of the wild-type virus (Fig.6). Eighteen days post-inoculation, the viral RNA of both CP-mutants was still detected by RT-PCR in systemic leaves of P35S:CP showing the ability of the mutant to persist in the transgenic plants (data not shown).

To discard the possibility that virus movement arose from a reversion of the mutation introduced in the CP sequence, either from secondary mutations appearing on the CP sequence, or from a recombination event between the CP sequence on the viral genome and the transgene mRNA, the viral progenies present in the P35S:CP systemically infected plants were analyzed by sequencing a RT-PCR amplified DNA-fragment encompassing the CP sequence. At 12 dpi, the introduced W166R mutation was present in the sixteen P35S:CP

plants systemically infected with W166R, and only one of the plant showed the presence of an additional change (S108T) upstream of the introduced mutation (data not shown). Similarly, the deletion introduced in the sequence of NoCPRT mutant was still present in the virus progeny systemically infecting the four P35S:CP plants and no other modification was observed on the analyzed sequence (data not shown).

To finally address whether W166R and NoCPRT long-distance transport in P35S:CP plants was due to formation of virions, or to systemic propagation of RNP complexes containing the wild-type CP expressed in the transgenic plants, viral particles were purified from systemic leaves of W166R or NoCPRT-inoculated plants. Typical virus particles were observed in the purified extracts prepared from W166R- or NoCPRT-infected P35S:CP plants, whereas no such virus particles were present in similar extracts prepared from Col-0 inoculated plants (Fig.$_7$), suggesting that the long-distance movement of the virus mutants was a consequence of virions formation in the transgenic plants. The RNA content of the virions formed in the transgenic plants infected with W166R and NoCPRT was further analysed by RT-PCR and showed that the mutation, or the deletion, introduced into the respective virus mutants were indeed present.

Although the P35S:CP plants can be infected with the wild-type and TuYV-CP mutants showing an absence of pathogen-derived resistance, we cannot completely discard the hypothesis that endogenous CP mRNA is targeted by the RNA silencing mechanism. Such mechanism would interfere with the CP complementation test. To address whether TuYV infection could induce degradation of the CP mRNA, transgene expression was assayed by northern blot on both infiltrated and systemic leaves. While the CP mRNA was detected in the non-inoculated transgenic plants and in plants inoculated with W166R and NoCPRT mutants, it was no longer observed in plants infected with the wild-type virus (Fig.$_6$). This result shows that the virus-triggered RNA silencing mechanism is active on the endogenous CP-mRNA expressed in P35S:CP plants only when the plants are infected by the wild-type virus. Whether the absence of CP mRNA targeting is related to the lower accumulation of the two CP-mutants in the transgenic plants or to another process needs to be further investigated.

DISCUSSION

Poleroviruses are phloem-limited viruses which cycle includes replication in nucleated phloem cells, cell-to-cell movement between the cellular types constituting the phloem (phloem parenchyma cells, companion cells and sieve elements), and long-distance transport in sieve tubes. As polerovirus particles were observed in sap collected from infected plants and in plasmodesmata connecting companion cells and sieve elements, it was generally admitted that poleroviruses move to non-inoculated leaves in the form of virions (Mutterer *et al.*, 1999; Brault, unpublished results). Additionally, TuYV mutants engineered to inhibit the production of the CP, or the formation of virions, were undetectable by ELISA or by northern blot in the systemic leaves of *Nicotiana clevelandii* (Brault *et al.*, 2003; Ziegler-Graff *et al.*, 1996) supporting the hypothesis that encapsidation was essential for TuYV to move beyond the site of inoculation. However, because the presence of the CP mutants in systemic leaves was never evaluated by RT-PCR, the possibility that RNP complexes could migrate to non-inoculated leaves at a level not detectable by ELISA or northern blot, still remained plausible. Furthermore, if RNP complex formation requires a functional CP, these viral structures might not be formed when a mutated CP is synthesized. For these reasons, we addressed the requirement of the CP for TuYV long-distance movement by studying the transport of newly engineered CP punctual mutants unable to form virions and adopted more sensitive techniques to detect the virus mutants in systemic tissues. One epitope, that by homology with the PLRV CP is potentially located on the surface of the TuYV particle, was specifically targeted in the seven engineered mutants. One additional mutant (W166R) displaying an encapsidation defect, and previously described in Brault *et al.*, (2003), was included in the experiment. Among the eight TuYV point mutants studied, only one mutant (S87G) was able to produce virus particles and was fully competent for systemic transport. On the contrary none of the seven other CP-mutants were ever detected by RT-PCR in the systemic leaves of *M. perfoliata* plants, even though they replicated in inoculated leaves and produced the mutated CP and RT proteins. Moreover, their incapability to form particles in inoculated leaves reinforced the hypothesis that virions are necessary for the long-distance transport of TuYV.

To assess whether the mutations in the CP could be detrimental to both formation of virions and RNP complexes, transgenic plants expressing the wild-type CP were generated in order to

perform complementation assays. Strikingly, although the CP was constitutively expressed and easily detected as shown by western blot, no virus-like particles were observed. This suggests either that TuYV RNA is required to initiate virus particle formation, or that the amount of CP subunits is not sufficient to form empty particles. In a former report Lamb *et al.*, (1996) showed that virus-like particles (VLPs) could be formed in insect cells expressing the CP of PLRV, which seems in contradiction with our results. However, the amount of CP synthesized and/or the addition of 17 non-viral amino acids at the N-terminus of the PLRV-CP protein, may explain the formation of particles in these specific heterologous conditions.

When two of the encapsidation-defective mutants (W166R and NoCPRT) were inoculated to these TuYV-CP expressing *A. thaliana*, the TuYV-CP synthesized in the transgenic plants was able to complement the defective movement of the two CP-mutants as confirmed by the detection by RT-PCR of the viral RNAs in the systemic leaves of inoculated plants. This complementation was however poorly efficient, as only 31% and 16% of transgenic plants became systemically infected with W166R and NoCPRT respectively. This gain of movement function of the two mutants was correlated with the formation of particles which contained only the mutated viral genome, as confirmed by the sequence of the viral progeny present in the purified particles. First of all, these data strongly support that TuYV viral RNA is required for virion formation by potentially providing an anchor for the CP assembly. Secondly, the necessity of TuYV to form virus particles to move systemically is heavily reinforced by the complementation experiments. Concerning W166R mutant, whether the particles formed in the transgenic plants are only composed of the wild-type CP expressed by the plant or are hybrid particles formed by a hetero-association of mutated and wild-type CP is not known. Although virion formation restored the long-distance movement of the two CP-mutants, the amount of virions accumulating in infiltrated and systemic leaves was however too low to be detected by ELISA. This might be due to the low amount of CP expressed in the transgenic plants, which is below the level of the protein expressed from the replicating virus (see Fig.4). The absence of virus detection by ELISA may also be due to the lower replication rate of the two CP-mutants which would additionally explain the persistence of the CP-mRNA in the transgenic plants systemically infected with W166R and NoCPRT. On the contrary, the wild-type TuYV induced disappearance of the CP transcript in inoculated transgenic plants. In transgenic *N. benthamiana* expressing the TuYV-RT protein we previously observed a disappearance of the RT-mRNA by RNA silencing after challenging the plants with the wild-

type virus or with other viruses sharing sequence homology with the TuYV-RT sequence (Brault *et al.*, 2002). This silencing mechanism had only a moderate effect on the virus accumulation in the plant probably because of the expression of the RNA silencing suppressor protein, the P0 protein (Pfeffer *et al.*, 2002). The lower accumulation of the two viral mutants (W166R and NoCPRT) in the inoculated and systemic leaves of the transgenic plants could induce the production of lower amount of siRNA targeting the virus and the CP-transgene, therefore resulting in the persistence of the CP-mRNA in the tissues infected with the two CP-mutants.

In conclusion, by investigating the long-distance movement of TuYV-CP mutants, we acquired additional evidence that virions constitute the sole systemic transport device of TuYV as RNP complexes do not seem to participate to this mechanism. However, this statement does not preclude the implication of additional viral and cellular proteins for the long-distance transport of TuYV. In this respect, TuYV is similar to a broad range of plant viruses which require virions formation for long-distance movement (for a review see Hipper et al., 2013), as exemplified by *Tobacco mosaic virus* (TMV, *Tobamovirus*) in *N. tabacum* (Holt & Beachy, 1991; Osbourn *et al.*, 1990; Saito *et al.*, 1990). In addition, as we showed that TuYV virions were required for systemic infection of both *M. perfoliata* and *A. thaliana*, virions seem to be a general transport device of TuYV whatever the host. This is in contrast with CymRSV which only requires CP for long-distance transport in *N. clevelandii*, but not in *N. benthamiana* (Dalmay *et al.*, 1992).

Although we clearly showed in this study that virions are required virus for TuYV long-distance transport in sieve tubes, the question of the role of RNP complexes in cell-to-cell movement remains to be addressed.

METHODS:

Construction of TuYV mutants

The transcription vector BW_0 (Veidt *et al.*, 1992) and the agro-infection vector $pBinBW_0$ (Brault *et al.*, 1995; Leiser *et al.*, 1992) containing full-length TuYV (formerly called *Beet western yellows virus*) cDNA sequence were used as templates for cloning. Construction of W166R was previously described in Brault *et al.*, (2003). The deletion of 37 nucleotides in the NoCPRT mutant sequence encompassing the ORF 3 start codon was obtained by directed mutagenesis on BW_0 using the following primer ($_{5'}$TCTTCCATTGATACGTACGTGTTTGG$_{3'}$) (Reutenauer, 1994). The seven mutants T83P/P86T, S79R/G80R, D90N/C91R, F84Q/G85W, T83S/F84L, F84V and S87G were generated using the QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis kit (Agilent Technologies). Primers were designed according to the manufacturer indications. The mutated full-length sequences of S79R/G80R, D90N/C91R, T83P/P86T and F84Q/G85W were first introduced into BW_0 to perform *in vitro* transcription and protoplasts inoculation. Vectors for agro-infection corresponding to the mutants T83P/P86T, S79R/G80R, D90N/C91R and F84Q/G85W were made by replacing the SpeI-SalI fragment of $pBinBW_0$ with the SpeI-SalI fragment of the mutated sequence. Mutants T83S/F84L, S87G and F84V were directly created from $pBinBW_0$ using the QuikChange® kit. The different constructs were sequenced to confirm the presence of the mutations. pBin-derived constructs were introduced by electroporation into *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1 (Holsters *et al.*, 1980).

In vitro transcription and protoplasts inoculation

Full-length TuYV RNA transcripts were obtained by *in vitro* transcription using the bacteriophage T7 RNA polymerase and SalI-linearized BW_0 WT and mutant vectors (Veidt *et al.*, 1992). Capped transcripts were then used to inoculate *Chenopodium quinoa* protoplasts by electroporation as described in Veidt *et al.*, (1992), using 5 µg of transcripts for 250,000 protoplasts and a pulse of 180 V. Three days post-inoculation, protoplasts were harvested and total proteins were extracted from 125,000 protoplasts as described previously (Reutenauer *et al.*, 1993; Veidt *et al.*, 1992).

Inoculation of plants

A. tumefaciens C58C1 (Holsters *et al.*, 1980) containing pBinBW$_0$ or derived mutant vectors were grown to an optical density of 0.5 at 600 nm before being agro-infiltrated into *Montia perfoliata* and *Arabidopsis thaliana* 3 weeks-old plants. Aphid transmission assay was performed using purified virions (80 ng/µl in MP148 medium) as viral source. Five aphids were then transferred onto *A. thaliana* test plants (Bruyère *et al.*, 1997).

Detection of viral proteins

Plant total proteins were extracted by grinding 100 mg of *A. thaliana* leaves with 100 µL of Laemmli buffer 2X (Laemmli, 1970). Total proteins from plant or protoplasts were denatured 10 min at 100°C before being loaded on a 12% SDS-polyacrylamide gel and transferred onto nitrocellulose. Detection was performed using antisera raised against the CP or raised against the readthrough domain (Bruyère *et al.*, 1997; Reutenauer *et al.*, 1993). The complex protein/antibody was detected by chemiluminescence (Lumi-light^{PLUS} kit, Roche) after addition of a Goat-anti-Rabbit-IgG horseradish peroxidase conjugate (Invitrogen). Double-antibody sandwich (DAS) enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) was performed on infiltrated and systemic leaves as described in Bruyère *et al.*, (1997). TuYV specific antiserum (Loewe), recognizing TuYV virions, was used at the dilution of 1/400 (v/v).

Detection of viral RNA

Detection of both genomic and subgenomic RNAs was performed using reverse transcription (RT) polymerase chain reaction (PCR) on total RNA extracted using a commercial RNA purification kit (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen). Two primers bordering the ORF 3 sequence were used, the forward primer complementary to the intergenic region (3331-GTAAGAGACTTAAGCAAACCC-3351) and the reverse primer corresponding to the ORF 5 sequence (4116-TGGAGAGGGAGAAGGCCCTGG-4136). The amplified cDNA sequences were then visualized on a 1% agarose gel in Tris-Acetate-Ethylenediaminetetraacetic-acid (TAE) buffer 0.5 X after ethidium bromide staining. Viral genomic and subgenomic RNAs were detected by northern blot using a digoxygenin-UTP-labeled RNA probe (Roche) complementary to the 3'-terminal 196 nucleotides of TuYV genomic RNA (Reutenauer *et al.*, 1993) or to the 312 nucleotides complementary to the ORF 3 sequence (position 3632 to 3944).

Virus purification

Virus particles were purified from 300 g of systemically infected *M. perfoliata* as described previously (Van den Heuvel et al., 1991), or from 3 g of systemically infected *A. thaliana* using the same protocol that we adapted for small volumes.

Immunosorbent electron microscopy (ISEM)

Virus particles were visualized by ISEM using a modified protocol described in Reutenauer *et al.*, (1993). TuYV-specific antiserum (Loewe) at a dilution of 1/200 (v/v) in sodium phosphate buffer pH 7 (PBS) was deposited onto the grids for 30 min at 25°C. After washing the grids in PBS, leaf samples, or purified viruses, were loaded onto the grids and incubated for 30 min at 25°C. The grids were washed again in PBS and stained with uranyl acetate 3% during 5 min, before visualization using an electron microscope (EM 208, Philips, operating at 80 kV).

Transformation of *A. thaliana* plants by floral dips

A. thaliana (Col-0) were transformed by floral dip as described by Bechtold & Pelletier, (1998) using recombinant *A. tumefaciens* C58C1. The CP sequence of TuYV was introduced between the left and right borders of the T-DNA into the binary plasmid vector pBITC (Erhardt *et al.*, 1999). The CP sequence was also flanked by a 35S promoter and an omega translation enhancer sequence (Ω enhancer from *Tobacco mosaic virus*) on the 5'-side, and by the nopaline synthase (NOS) termination signal on the 3'-side (Brault *et al.*, 2002). The pBITC vector possesses a neomycin resistance gene ($Kana^R$) under the control of NOS promoter and terminator to select both transformed bacteria and plants. A homozygous line was obtained by successive self-crossings and selection of the transgenic plants on a selective Murashige and Skooge medium containing kanamycin.

SDS treatment on virions

One µg of wild-type TuYV purified virions was treated with SDS 1% or 5% in a total volume of 1 mL. After 1 min of vortex and incubation 10 min at 65°C, the samples were loaded onto a centrifugal filter device Centricon® (Millipore) with a cut-off of 10 kDa to eliminate the SDS. The centrifugation at 5000 g was performed and the final volume (300 µL) was dispatched in a 96 wells plate for the ELISA test. Citrate 1X buffer was used as a negative

430 control. In parallel, similar samples (treated and untreated virions) were centrifuged until the
431 volume reaches 10 µl for ISEM observation of virions.

ACKNOWLEDGMENTS

We greatly thank Ken Richards for the TuYV-CP constructs used for *A. thaliana* transformation, Catherine Reinbold for TEM observations and Danièle Scheidecker for protoplasts isolation. This work was supported in part by a PhD grant from the French Ministry of Research and Higher Education to C.H.

REFERENCES

Bechtold, N. & Pelletier, G. (1998). In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult Arabidopsis thaliana plants by vacuum infiltration. *Method Mol Biol* **82**, 259–66.

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**, 650–9.

Brault, V., Mutterer, J. D., 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**, 1140–8.

Brault, V., Pfeffer, S., Erdinger, M., Mutterer, J. & Ziegler-Graff, V. (2002). Virus-induced gene silencing in transgenic plants expressing the minor capsid protein of Beet western yellows virus. *Mol Plant Micr Interact* **15**, 799–807.

Brault, V., Bergdoll, M., Mutterer, J., Prasad, V., Pfeffer, S., Erdinger, M. & Richards, K. E. (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.

Bruyère, 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**, 323–34.

Chavez, J. D., Cilia, M., Weisbrod, C. R., Ju, H.-J., Eng, J. K., Gray, S. M. & Bruce, J. E. (2012). Cross-linking measurements of the Potato leafroll virus reveal protein interaction topologies required for virion stability, aphid transmission, and virus-plant interactions. *J Proteome Res* **11**, 2968–81.

Dalmay, T., Rubino, L., Burgyan, J. & Russo, M. (1992). Replication and movement of a Coat protein mutant of Cymbidium Ringspot Tombusvirus. *Mol Plant Micr Interact* **5**, 379–383.

Erhardt, M., Herzog, E., Lauber, E., Fritsch, C., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. & Bouzoubaa, S. (1999). Transgenic plants expressing the TGB1 protein of peanut clump virus complement movement of TGB1-defective peanut clump virus but not of TGB1-defective beet necrotic yellow vein virus. *Plant Cell Reports* **18**, 614–619.

Esau, K. & Hoefert, L. L. (1972). Development of infection with beet western yellows virus in the sugarbeet. *Virology* **48**, 724–38.

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.

Hipper, C., Brault, V., Ziegler-Graff, V. & Revers, F. (2013). Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. *Frontiers in plant physiology* **4**, 1–54.

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**, 529–43.

Holsters, M., Silva, B., Van Vliet, F., Genetello, C., De Block, M., Dhaese, P., Depicker, A., Inzé, D., Engler, G. & Villarroel, R. (1980). The functional organization of the nopaline A. tumefaciens plasmid pTiC58. *Plasmid* **3**, 212–30.

Holt, C. A. & Beachy, R. N. (1991). In vivo complementation of infectious transcripts from mutant tobacco mosaic virus cDNAs in transgenic plants. *Virology* **181**, 109–17.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–5.

Lamb, J. W., Duncan, G. H., Reavy, B., Gildow, F. E., Mayo, M. A. & Hay, R. T. (1996). Assembly of virus-like particles in insect cells infected with a baculovirus containing a modified coat protein gene of potato leafroll luteovirus. *J Gen Virol* **77**, 1349–58.

Lee, L., Palukaitis, P. & Gray, S. M. (2002). Host-dependent requirement for the Potato leafroll virus 17-kda protein in virus movement. *Mol Plant Micr Interact* **15**, 1086–94.

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**, 9136–40.

Mayo, M. A. & D'Arcy, C. J. (1999). Family Luteoviridae: A reclassification of Luteoviruses. In *The Luteoviridae*, pp. 15–22. Edited by H. G. Smith & H. Barker.

McGeachy, K. D. & Barker, H. (2000). Potato mop-top virus RNA can move long distance in the absence of coat protein: evidence from resistant, transgenic plants. *Mol Plant Micr Interact* **13**, 125–8.

Mutterer, J. D., Stussi-Garaud, 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**, 2771–8.

Osbourn, J., Sarkar, S. & Wilson, T. (1990). Complementation of coat protein-defective TMV mutants in transgenic tobacco plants expressing TMV coat protein. *Virology* **179**, 921–5.

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**, 2037–45.

Pfeffer, S., Dunoyer, P., Heim, F., Richards, K. E., Jonard, G. & Ziegler-Graff, V. (2002). P0 of Beet Western Yellows Virus Is a Suppressor of Posttranscriptional Gene Silencing. *J Virol* **76**, 6815–6824.

Reutenauer, A. (1994). *Thèse - Etude par mutagenèse et agroinfection des fonctions des protéines codées par le virus de la jaunisse occidentale de la betterave (Thesis - Studies by mutagenesis and agroinfection of proteins's function coded by BWYV)*. Université Louis Pasteur, Strasbourg I.

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**, 692–9.

Saito, T., Yamanaka, K. & Okada, Y. (1990). Long-distance movement and viral assembly of tobacco mosaic virus mutants. *Virology* **176**, 329–36.

Savenkov, E. I. (2003). Potato mop-top virus: the coat protein-encoding RNA and the gene for cysteine-rich protein are dispensable for systemic virus movement in Nicotiana benthamiana. *J Gen Virol* **84**, 1001–1005.

Schmitz, J., Stussi-Garaud, C., Tacke, E., Prüfer, 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**, 311–22.

Shepardson, S., Esau, K. & McCrum, R. (1980). Ultrastructure of potato leaf phloem infected with potato leafroll virus. *Virology* **105**, 379–392.

Sokolova, M., Prüfer, 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 proteine kinase C. *FEBS Lett* **400**, 201–205.

Tacke, E., Schmitz, J., Prüfer, 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**, 274–82.

Terradot, L., Souchet, M., Tran, V. & Giblot Ducray-Bourdin, D. (2001). Analysis of a three-dimensional structure of Potato leafroll virus coat protein obtained by homology modeling. *Virology* **286**, 72–82.

Torrance, L. (1992). Analysis of epitopes on potato leafroll virus capsid protein. *Virology* **191**, 485–9.

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 Micr Interact* **22**, 381–90.

Torrance, L., Wright, K. M., Crutzen, F., Cowan, G. H., Lukhovitskaya, N. I., Bragard, C. & Savenkov, E. I. (2011). Unusual features of pomoviral RNA movement. *Frontiers in microbiology* **2**, 259.

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.

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 Micr Interact* **23**, 1486–97.

Ziegler-Graff, V., Brault, V., Mutterer, J. D., Simonis, M. T., Herrbach, E., Guilley, H., Richards, K. E. & Jonard, G. (1996). The coat protein of Beet western yellows virus is essential for systemic infection but the viral gene products P29 and P19 are dispensable for systemic infection and aphid transmission. *Mol Plant Micr Interact* **9**, 501–510.

FIGURE LEGENDS AND TABLES:

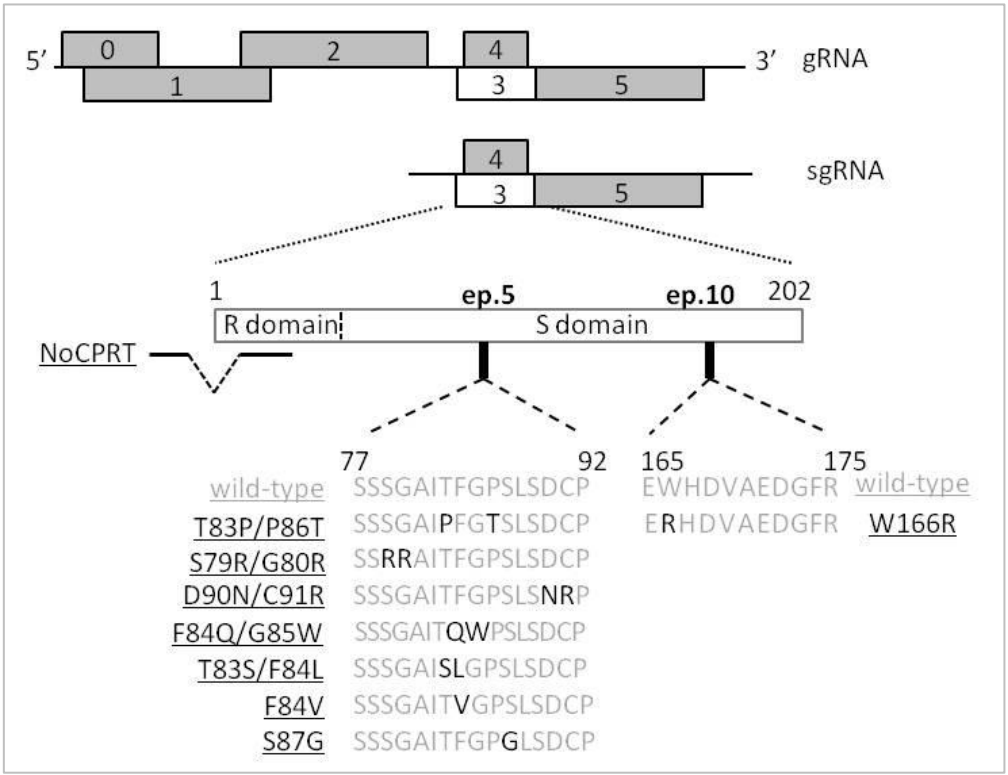


Fig.1: Below the genetic organization of TuYV gRNA and sgRNA, the position of amino acid changes (in black letters) in the TuYV-CP sequence is shown. The CP protein (202 amino acids) is represented by a white rectangle, and the position of the putative epitopes 5 (ep.5) and 10 (ep.10) on the TuYV-CP sequence is indicated. In TuYV mutant XnY, the "X" amino acid in the original sequence is substituted for a "Y" at the position "n". The deletion introduced in NoCPRT mutant, spanning the CP start codon is represented by a discontinuous line. WT: wild-type; R domain: arginine-rich domain; S domain: shell domain.

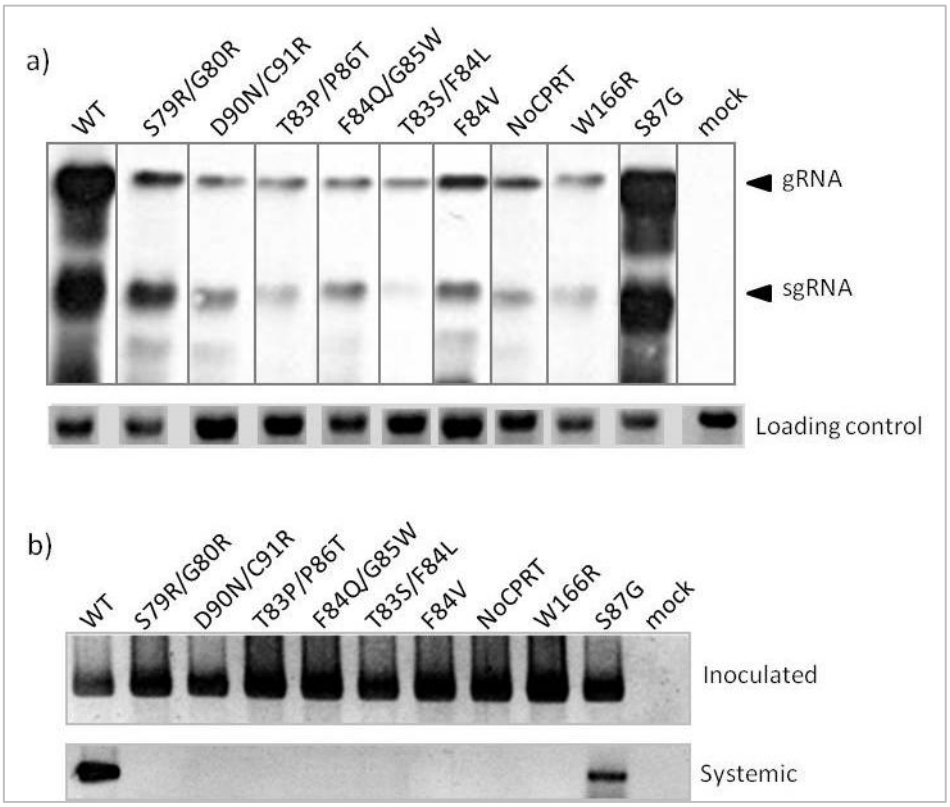


Fig.2: Detection of TuYV-CP mutants in leaves of *M. perfoliata*. a) Total RNA was extracted from infiltrated leaves at 6 dpi. Both gRNA and sgRNA were detected by northern blot using a digoxigenin-labeled probe complementary to the last 3' 196 nucleotides of the TuYV genomic sequence. Ethidium bromide staining of the RNA before the transfer onto the membrane was used as a loading control. b) Total RNA was extracted at 6 dpi from infiltrated leaves and 15 dpi from systemic leaves. The presence of TuYV viral RNA was confirmed by RT-PCR using primers encompassing the CP gene (nucleotides 3331 to 4136). The DNA products were analysed by electrophoresis in 1% agarose gel and were viewed after ethidium bromide staining. WT: wild-type; mock: non-inoculated plants.

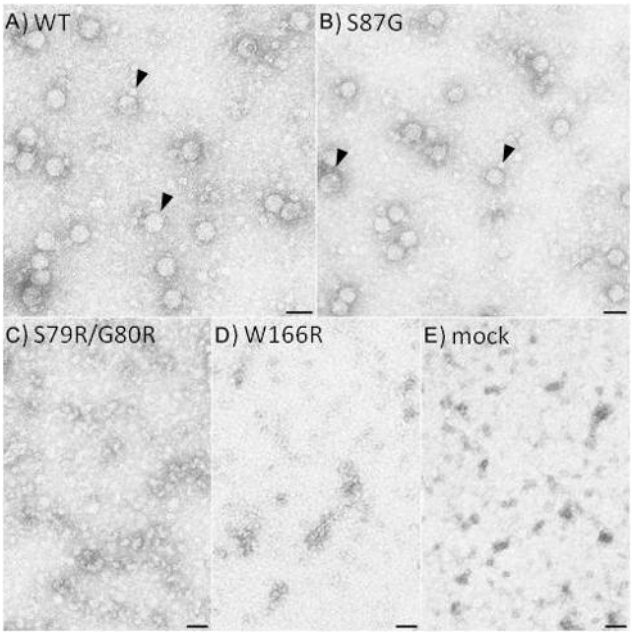


Fig.3: Observation of virus particles in extracts from leaves inoculated with TuYV wild-type (WT) or CP mutants (S87G, S79R/G80R, W166R). Mock-inoculated plants were treated similarly. Infiltrated leaves were ground at 6 dpi, and homogenates were observed by ISEM. Typical virus particles are indicated by arrows. The bar corresponds to 30 nm.

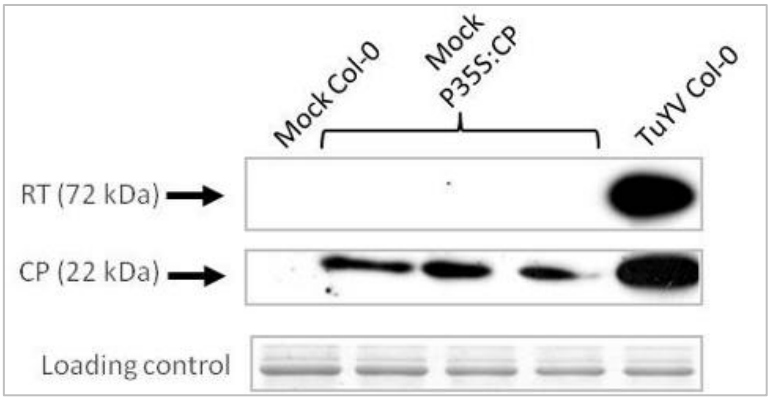


Fig.4: Analysis of the expression of the ectopically expressed TuYV-CP in transgenic *A. thaliana* (P35S:CP) by western blot. The blot was incubated with antibodies raised against the TuYV-CP. Protein extracts were prepared from non-infiltrated Col-0 plants (Mock Col-0), from Col-0 inoculated with wild-type TuYV (TuYV Col-0), or from non-infiltrated P35S:CP plants (Mock P35S:CP). Coomassie blue stained gel serves as a loading control.

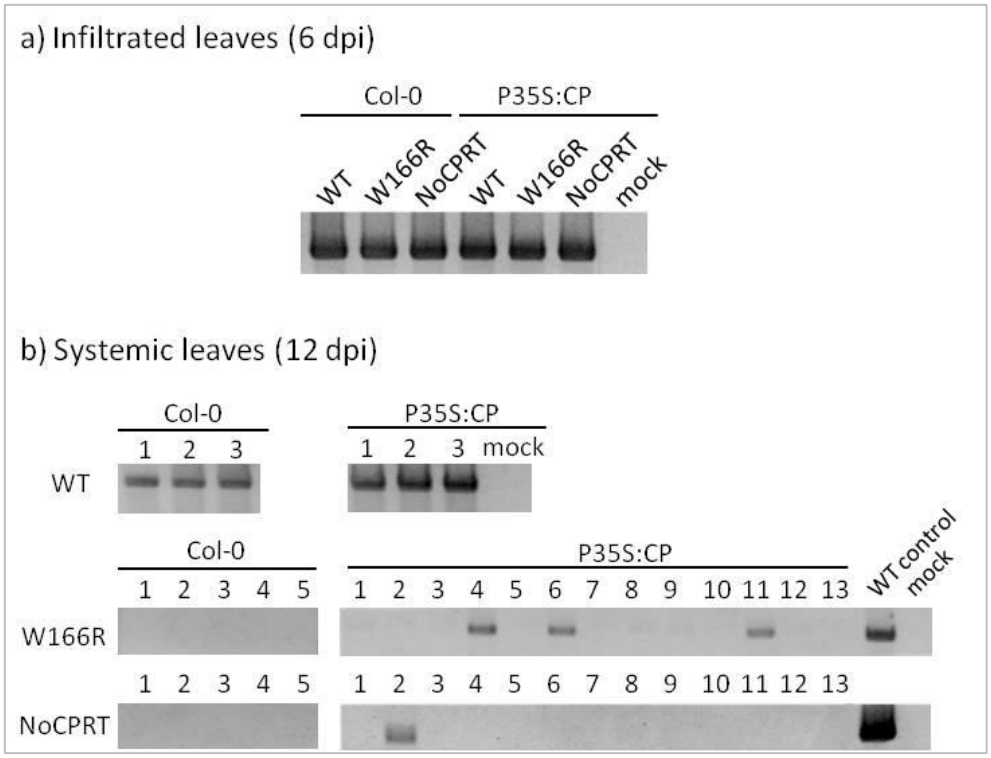


Fig.5: Long-distance movement complementation of TuYV mutants in P35S:CP transgenic plants. Plant total RNA was extracted from (a) infiltrated or (b) systemic leaves of plants inoculated with wild-type TuYV (WT), W166R or NoCPRT mutants. The viral genomic RNA was detected by RT-PCR using primers encompassing the CP gene (nucleotides 3331 to 4136). The DNA products were analysed by electrophoresis in 1% agarose gel and were viewed after ethidium bromide staining. A P35S:CP plant inoculated with TuYV wild-type virus served as a positive control (WT control). mock: non-inoculated P35S:CP plants. The blots shown represent only the analysis of five Col-0 plants and thirteen P35S:CP plants inoculated by each mutant.

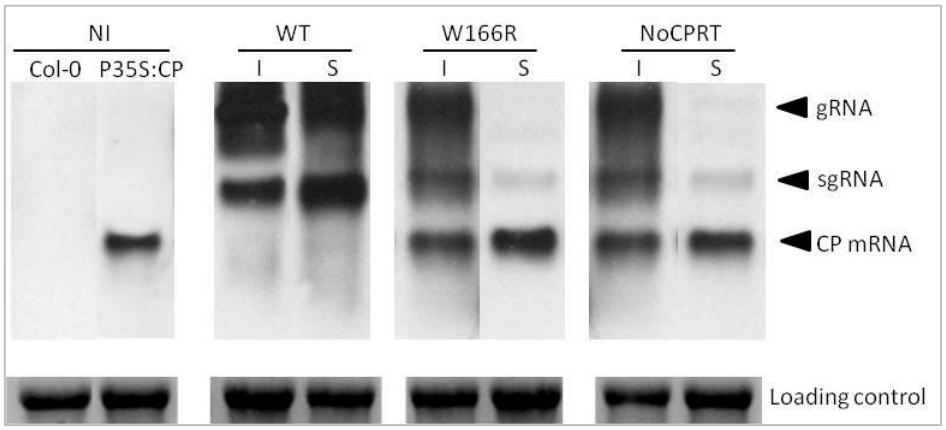


Fig.6: Detection of both viral RNA and CP mRNA in *A. thaliana* P35S:CP plants after infection with wild-type TuYV or CP-mutants. Total RNA was extracted from non-inoculated Col-0 and P35S:CP plants (NI), or from P35S:CP plants infected with wild-type TuYV (WT), W166R or NoCPRT. Both infiltrated (I) and systemic (S) leaves were analysed. Viral gRNA and sgRNA, and transgene CP-mRNA were detected by northern blot using a digoxigenin-labeled probe complementary to 312 nucleotides of the TuYV ORF3 sequence. Ethidium bromide staining of the agarose gel before the transfer onto the membrane is used as a loading control.

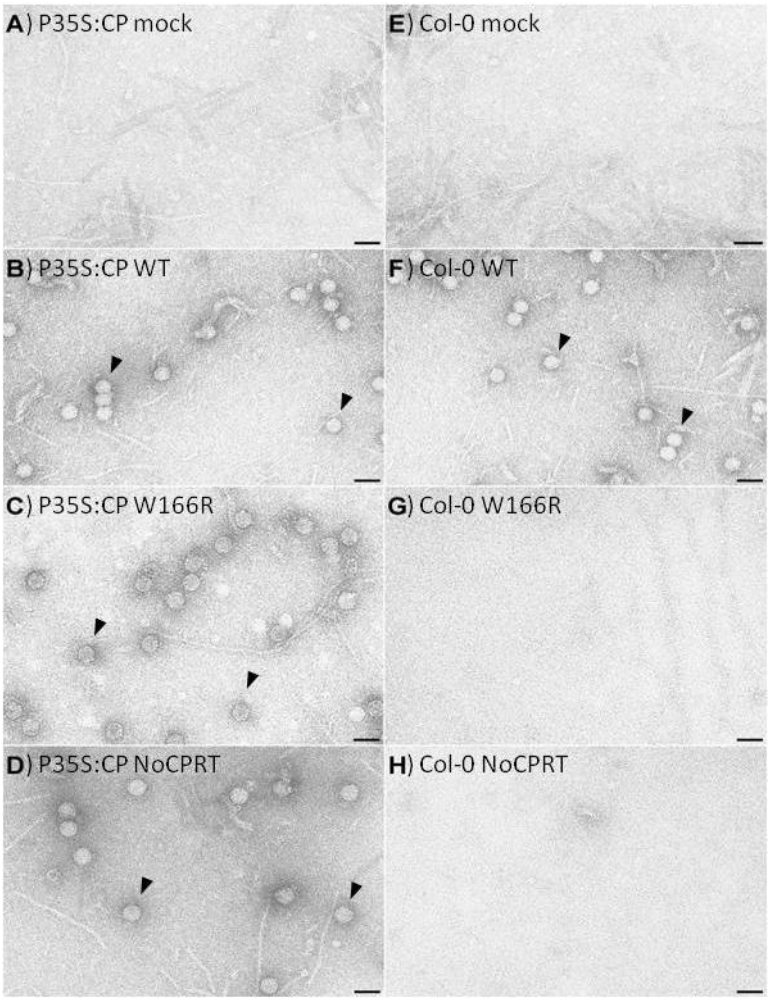


Fig.7: Visualisation by ISEM of virus particles in P35S:CP transgenic plants inoculated with TuYV-CP-mutants. A virus purification procedure was performed on non-inoculated (mock) P35S:CP (A) or Col-0 (E) plants, or on systemic leaves of P35S:CP (B-D) and Col-0 plants (F-H) agro-infiltrated with wild-type TuYV (WT) or CP-mutants (W166R or NoCPRT). Typical virus particles are indicated by arrows. The bar corresponds to 30 nm.

	Infiltrated leaves (6 dpi)		**Systemic leaves (15 dpi)**	
	Nb plants inf./total inoc.†	OD±SD‡	Nb plants inf./total inoc.†	OD±SD‡
WT	31/31	1.53±0,50	25/31	1.07±0,20
NoCPRT	0/21	0.16±0,02	0/21	0.13±0,02
W166R	0/31	0.15±0,01	0/31	0.13±0,02
S79R/G80R	0/21	0.12±0,00	0/21	0.17±0,02
D90N/C91R	0/21	0.12±0,02	0/21	0.17±0,01
T83P/P86T	0/21	0.12±0,00	0/21	0.17±0,02
F84Q/G85W	0/21	0.12±0,00	0/21	0.16±0,02
F84V	0/21	0.12±0,01	0/21	0.17±0,02
T83S/F84L	0/21	0.12±0,00	0/21	0.17±0,01
S87G	21/21	1.55±0,36*	17/21	0.95±0,15*
mock#	0/5	0.17±0,02	0/5	0.16±0,02

Table $_1$:

†Number of plants positive by ELISA/total number of plants agroinoculated with the viral construct.

‡Mean absorbance value at 405 nm of the infected plants after 30 min of substrate incubation ± Standard Deviation.

*The calculated p value (Student test, minitab software) to compare S87G accumulation with the one of TuYV-WT is above 0.05.

#Non-inoculated plants.

SUPPLEMENTARY FILES

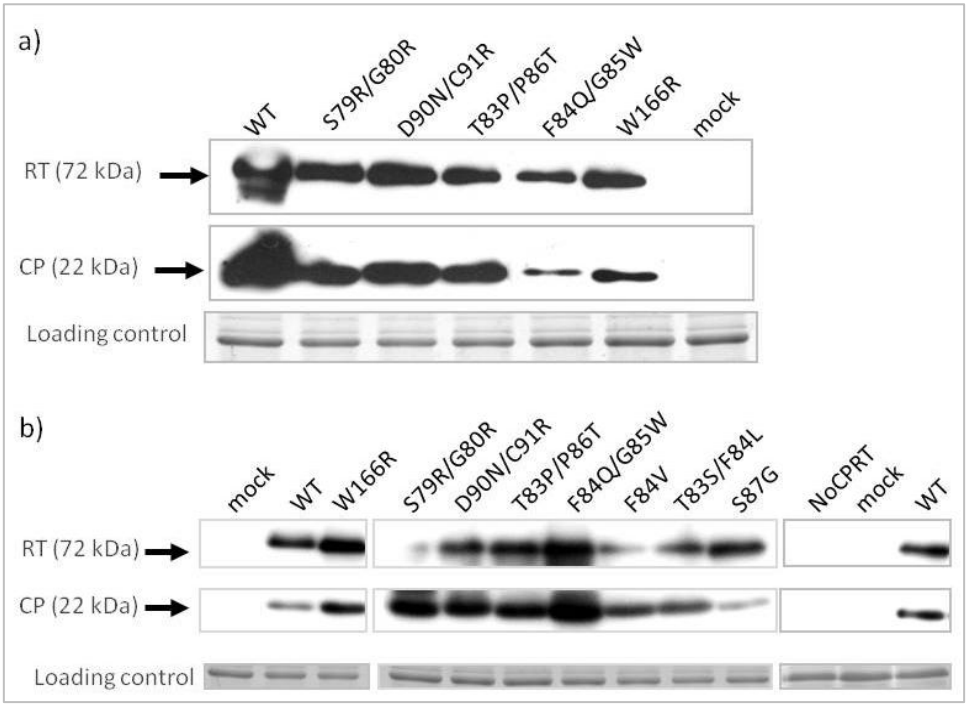


Fig.S$_1$: Detection of the CP and RT proteins by western blot in *C. quinoa* protoplasts transfected with TuYV-CP mutant derived transcripts (a) or in agroinfiltrated leaves inoculated with the TuYV-CP mutants (b). The lower parts of the membranes were incubated with antibodies raised against the TuYV-CP, while the upper parts of the membranes were probed with an antiserum directed against the TuYV readthrough domain. Coomassie blue stained gels serve as loading control. WT: wild-type; mock: water-transfected protoplasts or non-infiltrated leaves.

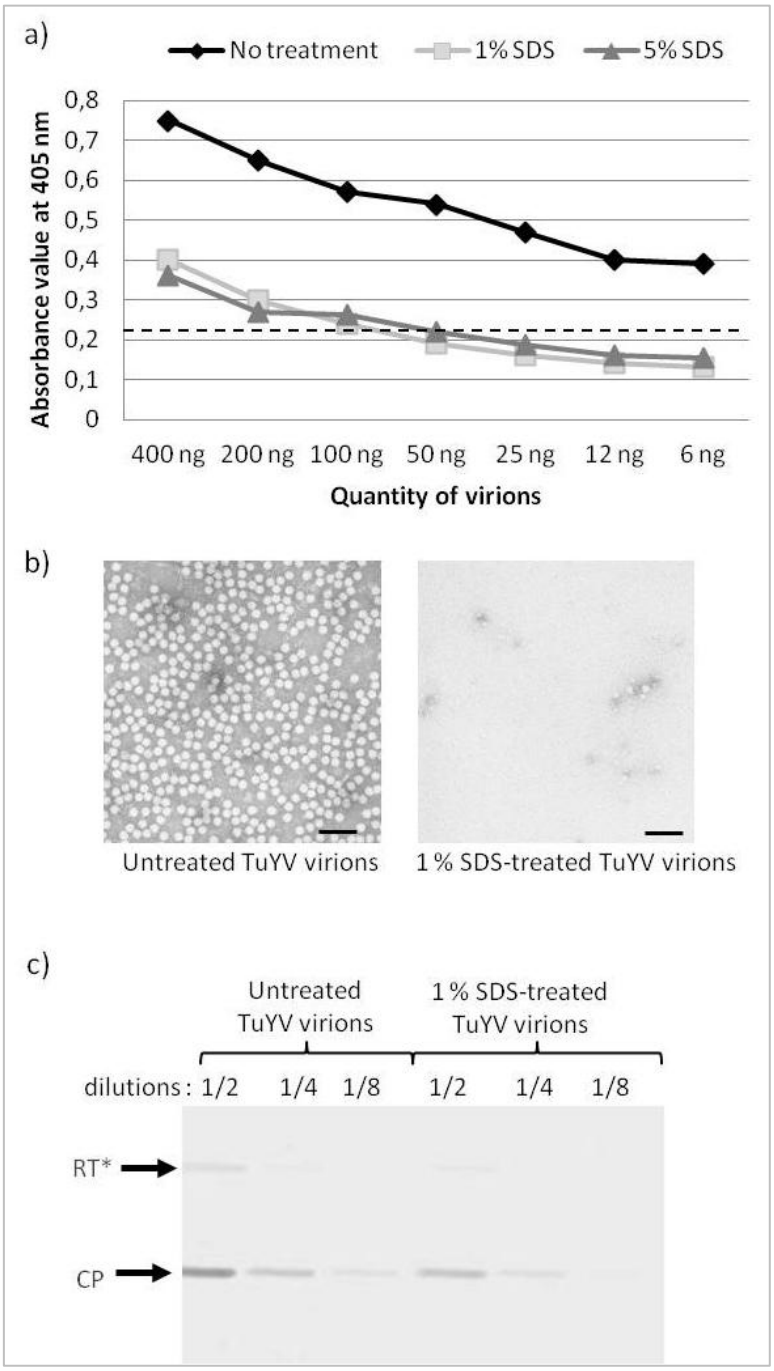


Fig.S2: a) Detection of untreated or SDS-denatured virions by ELISA. Absorbance at 405 nm was measured 25 min after addition of substrate buffer. Citrate buffer 1X, used to resuspend purified virus, served as a negative control. b) ISEM observation of 800 ng of untreated or 1 % SDS-denatured virions. Bar: 100 nm. c) SDS-Page gel stained with Coomassie blue of different amounts of untreated and 1% SDS-treated TuYV virions. These last samples were collected after filtration through the Centricon® device.

		Infiltrated leaves (6 dpi)		**Systemic leaves (12 dpi)**	
		Nb plants inf./total inoc.†	OD±SD ‡	Nb plants inf./total inoc.†	OD±SD ‡
Col-0	WT	5/5	1.36±0,25	19/26	0.88±0,16
	NoCPRT	0/5	0.14±0,00	0/26	0.15±0,01
	W166R	0/5	0.15±0,01	0/26	0.16±0,01
	mock#	0/2	0.15±0,00	0/2	0,15±0,00
P35S :CP	WT	5/5	1.28±0,22	27/37	0.89±0,20
	NoCPRT	0/5	0.14±0,00	0/26	0.18±0,01
	W166R	0/5	0.15±0,00	0/51	0.16±0,01
	mock#	0/2	0.14±0,00	0/2	0.14±0,00

Table S1 :

†Number of plants positive by ELISA/total number of plants agroinfiltrated with the viral construct.

‡Mean absorbance value at 405 nm of the infected plants after 30 min of substrate incubation ± Standard Deviation.

#Non-inoculated plants.

iv) Résultats complémentaires obtenus avec les plantes P35S:CP

a) Inoculation des plantes P35S:CP avec le mutant S79R/G80R

Comme les autres mutants du TuYV affectés dans la séquence de la CP, le S79R/G80R n'a jamais été détecté par ELISA dans les feuilles inoculées et non-inoculées, que ce soit dans les Col-0 ou dans les plantes transgéniques P35S:CP (figure non montrée). Cependant, des RT-PCR réalisées sur les feuilles non-inoculées permettent de détecter le virus dans 80% des plantes P35S:CP inoculées avec ce mutant (**Figure 41**). L'analyse de la descendance virale à partir de dix plantes transgéniques infectées de manière systémique par le mutant S79R/G80R, montre un retour de la mutation introduite dans la séquence de la CP vers la séquence du TuYV-WT. Deux hypothèses sont envisageables pour expliquer ce phénomène :

- Une recombinaison de l'ARN viral avec l'ARNm endogène de la CP_{WT}. Cette hypothèse nécessite un saut de la RdRp depuis la séquence virale vers l'ARNm en amont de la mutation, puis le retour de la RdRp vers la séquence virale après la mutation pour conserver la séquence virale 3' non codante qui n'est pas présente sur l'ARNm du transgène.
- Une réversion de la mutation (CGC CGA) entrainant le retour vers la séquence du TuYV-WT (AGC GGA) avec une modification de deux nucléotides dans la séquence de la CP du virus mutant.

Sur la base des résultats obtenus avec ce mutant, il est difficile de savoir laquelle de ces deux hypothèses est la bonne, surtout qu'il est également envisageable que ces deux phénomènes se produisent simultanément. Néanmoins, si la recombinaison entre l'ARN viral et le transgène est possible, elle devrait, en théorie, pouvoir s'opérer dans toutes les plantes inoculées avec les différents mutants. Nous avons observé deux cas de retour à la séquence du TuYV-WT dans la descendance virale du mutant W166R à 18 dpi, alors qu'aucune modification n'était observée dans les mêmes plantes transgéniques à 12 dpi. De plus, nous n'avons jamais observé de recombinaison entre l'ARN du mutant NoCPRT4.3 et le transgène, ce qui tendrait à favoriser la deuxième hypothèse, à savoir l'apparition de mutations secondaires dans la descendance virale qui conduisent à la production de révertants.

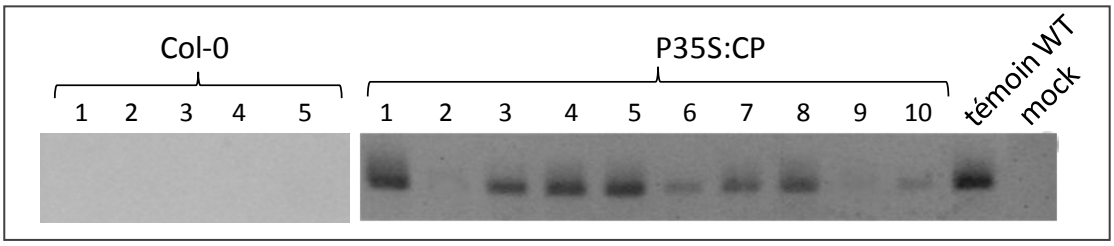


Figure 41 : Détection par RT-PCR de l'ARN viral du mutant S79R/G80R dans les feuilles non-inoculées à 12 dpi. Les ARN totaux ont été extraits des feuilles systémiques 12 jours après inoculation des plantes Col-0 ou P35S:CP avec le mutant S79R/G80R. Les ARN viraux ont été amplifiés par RT-PCR et les produits de réaction analysés sur gel agarose 1%. Une plante P35S:CP infectée par le TuYV-WT (témoin WT) et une plante non-inoculée (mock) ont servi de contrôle à la réaction de RT-PCR.
Les 5 échantillons pour Col-0 et les 10 pour P35S:CP correspondent à une partie des échantillons analysés mais sont représentatifs des résultats obtenus.

Il est cependant surprenant qu'aucun cas de réversion n'ait été observé dans la descendance du mutant S79R/G80R dans les Col-0. Pour expliquer une telle différence entre Col-0 et P35S:CP, l'hypothèse que nous avons émise est que la réplication, ou l'accumulation virale,

est favorisée par la présence de la CP_{WT} dans les plantes transgéniques. Nous avons donc analysé l'accumulation du mutant S79R/G80R et du TuYV-WT dans les *Arabidopsis* Col-0 et P35S:CP.

b) Effet de la CP_{WT} exprimée dans les plantes transgéniques sur l'accumulation ou la réplication du TuYV

Afin d'analyser l'effet de la CP_{WT} exprimée dans les plantes transgéniques sur l'accumulation des ARNs viraux, ceux-ci ont été extraits quatre jours après inoculation des Col-0 et P35S:CP avec le TuYV-WT et le mutant S79RG80R. Le northern blot montre une plus forte quantité d'ARN viraux, que ce soit du mutant S79RG80R ou du TuYV-WT, dans les plantes transgéniques comparées aux Col-0 (**Figure 42**). Ce résultat préliminaire, semble indiquer que l'accumulation virale, et donc potentiellement la réplication, est plus importante dans les plantes transgéniques P35S:CP comparées aux Col0. On peut donc envisager que les protéines CP_{WT}, libérées après dissociation des particules et présentes en début d'infection, jouent un rôle dans les premières étapes du cycle viral. Plusieurs possibilités sont envisageables :

- Les protéines CP_{WT}, issues de la décapsidation ou de la synthèse par l'ARNm endogène dans les plantes transgéniques P35S:CP, protègeraient les ARN viraux de la dégradation par les ribonucléases cellulaires.
- La CP_{WT} favoriserait la traduction des protéines virales exprimées à partir de l'ARN génomique : P0 cruciale pour la protection du virus face aux défenses de l'hôte et/ou P1 et P1-P2 essentielles à la réplication.

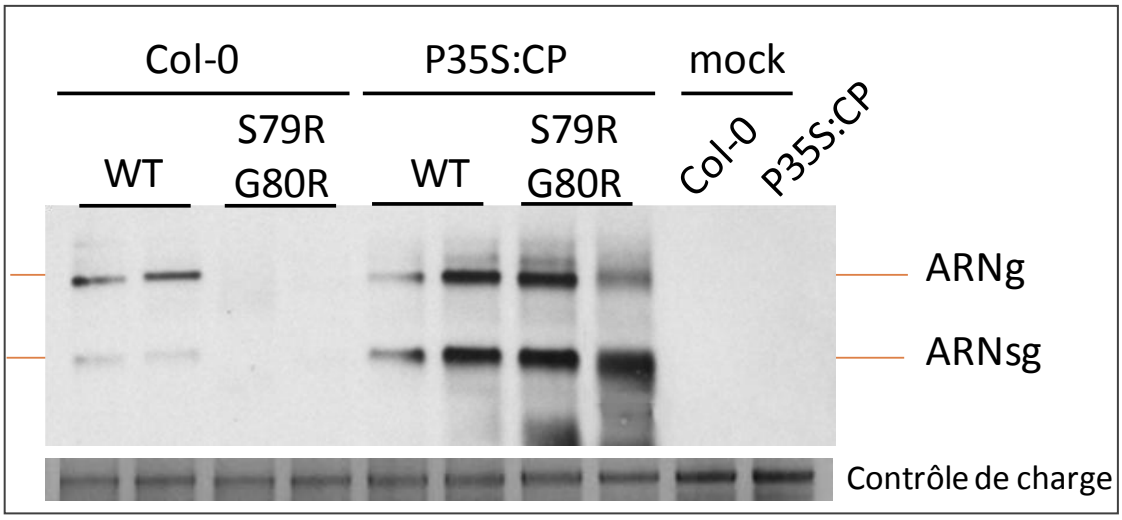


Figure 42 : Accumulation du TuYV-WT et du mutant S79R/G80R dans Col-0 et P35S:CP. 100 mg de feuilles ont été prélevées sur les Col-0 et P35S:CP à 4 dpi, puis, après extraction des ARN totaux, la même quantité d'ARN (1.5 µg) a été déposée sur un gel d'agarose dénaturant (contrôle de charge : coloration au BET du gel avant transfert). Après migration, les ARN ont été transférés sur une membrane de nylon et les ARNg et ARNsg viraux ont été visualisés par northern blot en utilisant une sonde dirigée contre la partie 3' du génome du TuYV. Une plante Col-0 et une P35S:CP non-inoculées sont utilisées comme témoins (mock).

Pour tester la seconde hypothèse, nous avons recherché la protéine P0 dans les plantes transgéniques P35S:CP inoculées avec le TuYV-WT. En effet, cette protéine virale n'a jamais été détectée en western blot dans les plantes infectées, probablement en raison de sa faible expression (**cf. introduction bibliographique**). Si la CP_{WT} favorise l'expression des

protéines localisées en 5' du génome, la détection de la P0 pourrait être possible dans les plantes transgéniques exprimant de manière constitutive la CP_{WT}. Le western blot réalisé sur des extraits de plantes P35S:CP infectées par le TuYV-WT ne permet cependant pas de conclure sans ambiguïté quant à la présence de la P0 dans les extraits protéiques. En effet, un bruit de fond important est généré par l'anticorps dirigé contre la P0. Néanmoins, il est possible de visualiser une bande de taille attendue (29 kDa) dans les extraits protéiques de feuilles de plantes P35S:CP inoculées avec le TuYV-WT, bande qui n'est pas visible dans les échantillons des témoins non-inoculés (**Figure 43**). Ce résultat devra cependant être confirmé en reproduisant l'expérience.

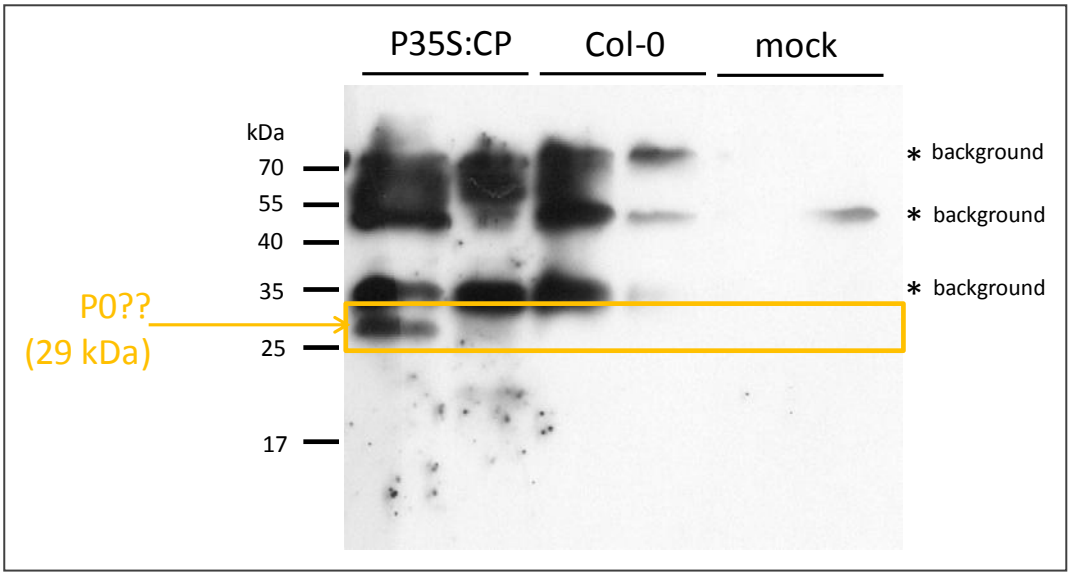


Figure 43 : Recherche de la protéine P0 dans les plantes Col-0 et P35S:CP inoculées avec le TuYV-WT. Après extraction des protéines totales à partir de 100 mg de feuilles inoculées prélevées à 4 dpi, les protéines ont été séparées sur un gel SDS-PAGE 12% puis transférées sur une membrane de nitrocellulose avant incubation avec l'anticorps (@P0). Les témoins (mock) correspondent à une plante Col-0 et une plante transgénique P35S:CP non-inoculées. La taille attendue de la protéine P0 (29 kDa) est indiquée par un cadre jaune. Les bandes correspondant à du bruit de fond sont indiquées par des astérisques.

v) Conclusions des études portant sur la complémentation du mouvement des mutants du TuYV par l'apport en *trans* de la CP_{WT}

Après avoir observé une relation étroite entre la capacité d'encapsidation et le transport à longue distance, et ainsi appuyé l'hypothèse d'un mouvement systémique du TuYV strictement sous forme de virions, il nous était cependant nécessaire de vérifier que la formation ou le mouvement de complexes RNP ne requiert pas la présence de la protéine CP_{WT} totalement fonctionnelle. L'apport de la CP_{WT} en *trans* dans des *A. thaliana* transgéniques nous a permis d'observer une complémentation du mouvement des mutants de la CP, incapables d'être transportés à longue distance dans les Col-0. Cette complémentation, directement liée à formation de virions, est cependant moyennement efficace : 31% et 16% des plantes P35S:CP inoculées sont infectées par les mutants W166R et NoCPRT4.3 respectivement. Ceci est probablement dû à une faible quantité de particules virales formées dans les plantes transgéniques et qui n'ont d'ailleurs jamais pu être détectées par ELISA. Ces résultats renforcent le modèle de mouvement à longue distance du TuYV sous forme de virions, et non de complexes RNP.

Concernant la nature des particules virales qui se forment dans les plantes transgéniques, plusieurs questions restent en suspens. Dans le cas du mutant W166R, les particules virales pourraient être constituées uniquement de la CP sauvage exprimée de manière endogène, ou par un mélange de CP_{WT} et de protéine CP mutante (CP_{W166R}). Par ailleurs, l'incorporation dans la particule virale de la protéine RT* exprimée par le mutant W166R n'a pas pu être confirmée par western blot en raison de la trop faible quantité de virus obtenue à partir des plantes P35S:CP infectées. Si cette quantité de virus peut être augmentée, il est envisageable d'analyser la composition des virions par spectrométrie de masse.

CHAPITRE 2 : ETUDE DE LA PROTEINE DE MOUVEMENT P4 DU TUYV

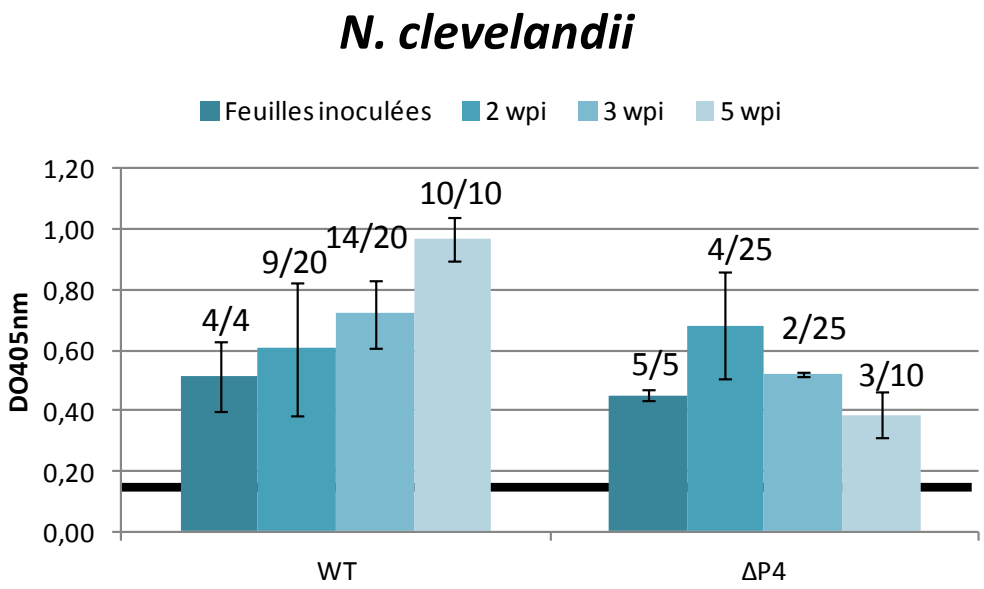
1. Introduction générale au chapitre 2

Comme expliqué dans l'introduction bibliographique, les protéines de mouvement des phytovirus ont un grand rôle à jouer dans le cycle viral, en particulier dans le mouvement des complexes de transport au travers des plasmodesmes.
Dans le cas des polérovirus, la protéine putative de mouvement est la protéine codée par l'ORF4, appelée P4 ou p17 dans la littérature. Bien que celle-ci possède les caractéristiques générales d'une protéine de mouvement de type 30 K, son véritable rôle dans le transport des polérovirus n'a pas encore été élucidé. Etant donné sa capacité à fixer les ARN viraux (Tacke *et al.*, 1991) et sa localisation aux plasmodesmes (De Cilia, 2011; Schmitz *et al.*, 1997), il a été suggéré que cette protéine intervienne dans le mouvement à courte distance entre cellules nucléées du phloème, participant potentiellement au transport de complexes RNP (Ziegler-Graff *et al.*, 1996). Cependant, cette protéine se localise aussi au niveau de vésicules autour du noyau pouvant correspondre à des sites de réplication du virus (Schmitz *et al.*, 1997), et il est envisageable que la fonction de cette protéine ne se restreigne pas au mouvement, mais qu'elle intervienne aussi dans d'autres étapes du cycle comme la réplication. Par ailleurs, et de manière tout à fait singulière, la synthèse de la protéine P4 n'est pas une nécessité dans tous les hôtes. Ainsi, un mutant du PLRV ne synthétisant pas la p17 est incapable d'infecter de manière systémique les hôtes *Solanum tuberosum* et *Physalis floridana*, alors qu'il s'accumule très bien dans les feuilles inoculées de ces hôtes (Lee *et al.*, 2002). A l'inverse, ce même mutant accompli son cycle infectieux complet dans *N. benthamiana* et *N. clevelandii* (Lee *et al.*, 2002). Dans le cas du TuYV, la protéine P4 n'est pas nécessaire à l'infection systémique de *N. clevelandii* (Ziegler-Graff *et al.*, 1996). Ainsi, il pourrait exister un cycle viral P4-dépendant et un cycle P4-indépendant, selon l'hôte du virus.

Dans un premier temps, la gamme d'hôtes d'un mutant du TuYV ne synthétisant pas la P4 a été étudiée. Afin d'assurer sa(ses) fonction(s), il est possible que la P4 interagisse avec différentes protéines cellulaires. L'identification de ses partenaires nous permettrait d'émettre des hypothèses sur ses fonctions dans le cycle viral. En prenant comme modèle le TuYV, nous avons ainsi recherché les protéines cellulaires interagissant avec la P4. Cette recherche a été réalisée par un criblage sans *a priori* de banques d'ADNc d'*A. thaliana* avec la méthode du double hybride dans la levure.

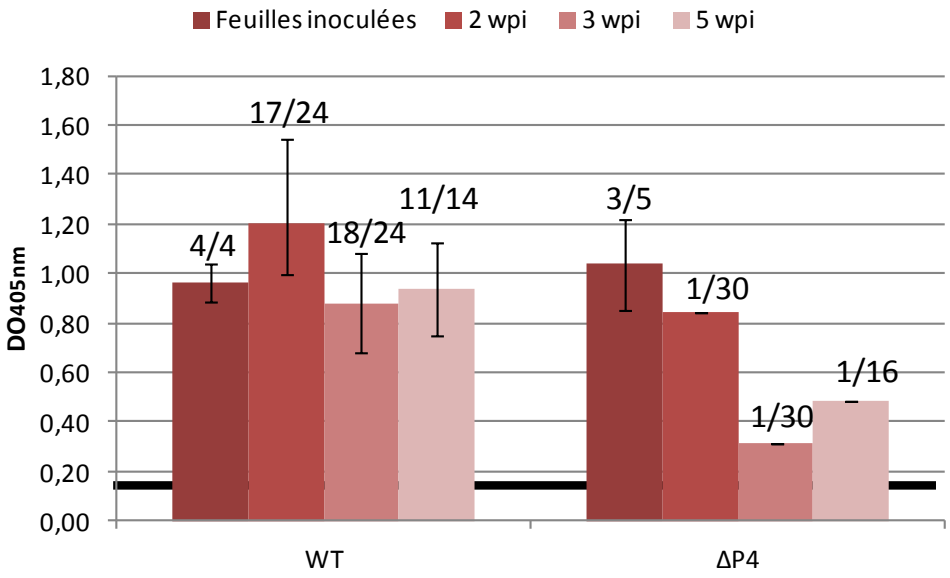
2. Etude du rôle de la P4 dans différents hôtes du TuYV

Dans le cas du TuYV, la P4 n'est pas nécessaire à l'infection systémique de *N. clevelandii* (Ziegler-Graff *et al.*, 1996). Des résultats préliminaires semblaient également indiquer qu'une infection systémique peu efficace pouvait avoir lieu en absence de P4 dans *N. benthamiana*, *A. thaliana* et *M. perfoliata* (Ziegler-Graff V., résultats non publiés).
Afin de confirmer ces résultats, quatre hôtes du TuYV ont été agro-inoculés avec le TuYV-WT ou un mutant ponctuel ne synthétisant pas la protéine P4, car possédant une mutation au niveau du codon d'initiation de l'ORF4 et un ajout de deux codons stop dans la séquence de l'ORF4. Ce mutant, précédemment nommé 5.1845 (Ziegler-Graff *et al.*, 1996), sera ici appelé ΔP4. Les mutations introduites n'affectent pas la séquence en acides aminés de la CP. Trois expériences indépendantes ont été menées, représentant un total de 44 plantes inoculées avec le TuYV-WT et de 50 plantes avec le mutant ΔP4, et ce pour chaque espèce de plantes testées. Un test ELISA a permis d'évaluer l'accumulation du virus dans les feuilles inoculées à 6 dpi, puis dans les feuilles non-inoculées à 2, 3 et 5 wpi. Dans les deux premières expériences, un même lot de plantes a servi à analyser l'accumulation du virus dans les feuilles non-inoculées au cours du temps, alors que dans la troisième expérience, trois lots indépendants de plantes ont été utilisés à chacun des temps de la cinétique. Les résultats d'accumulation du TuYV-WT et du mutant ΔP4 dans les différentes espèces de plantes sont présentés dans les quatre histogrammes ci-dessous avec le nombre de plantes infectées par rapport aux plantes inoculées signalé au-dessus de chaque barre:



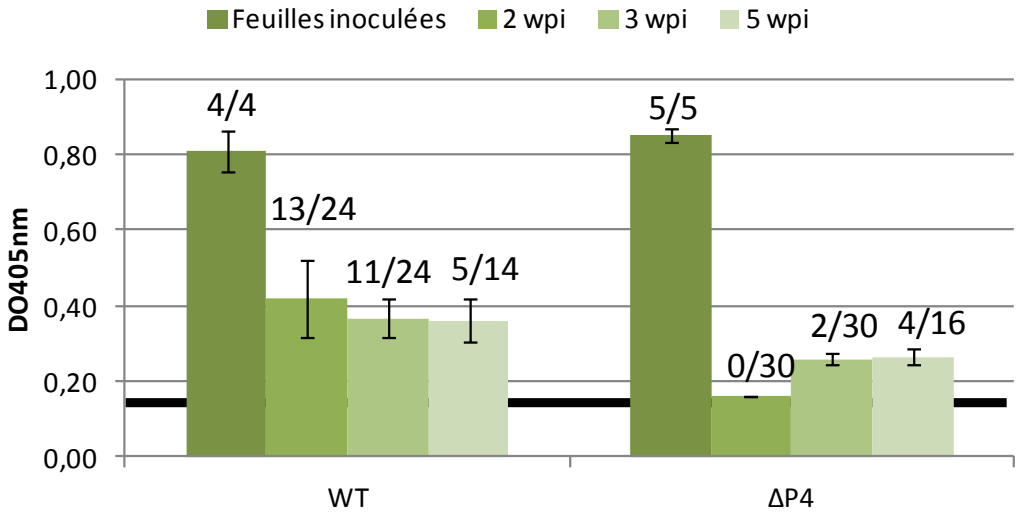
- La proportion de *N. clevelandii* infectées par le TuYV-WT augmente au cours du temps jusqu'à atteindre 100% de plantes infectées à 5 wpi.
- Le mutant ΔP4 est beaucoup moins infectieux que le TuYV-WT dans *N. clevelandii* et conduit à un maximum de 30% de plantes infectées à 5 wpi. Alors que l'accumulation du mutant ΔP4 est proche de celle du TuYV-WT à 2 et 3 wpi, elle chute ensuite à 5 wpi.

M. perfoliata

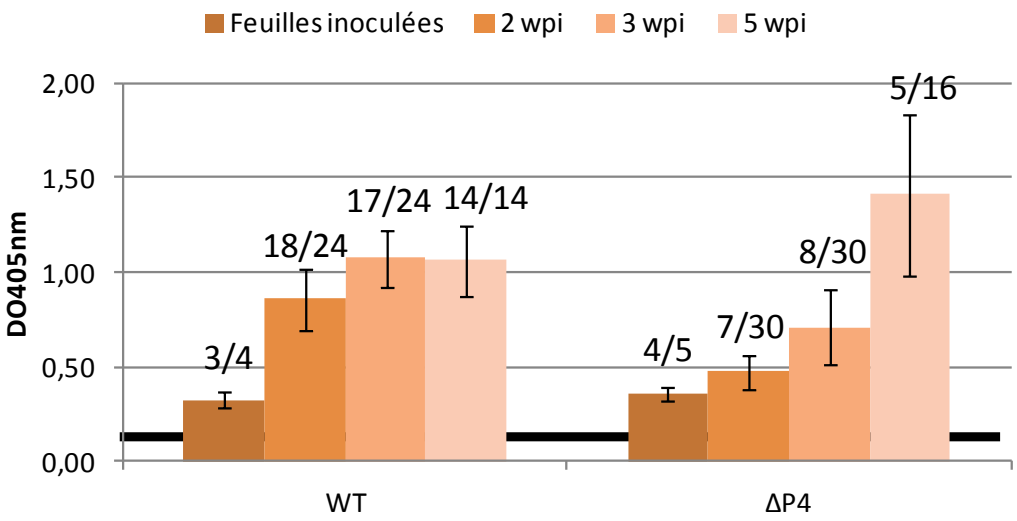


- Le TuYV-WT infecte environ 75% des *M. perfoliata* inoculées.
- Le mutant ΔP4 est très faiblement infectieux dans *M. perfoliata* puisque seules trois plantes sur les cinquante inoculées ont été infectées par ce mutant. L'accumulation du mutant ΔP4 dans les plantes infectées est toujours plus faible que celle du TuYV-WT.

N. benthamiana



- La proportion de *N. benthamiana* infectées par le TuYV-WT a tendance à diminuer au cours du temps, passant de 54% à 34%.
- A l'inverse, le mutant ΔP4 infecte un nombre croissant de plantes au cours du temps. La proportion de plantes infectées à 5 wpi atteint 25%, ce qui est proche de celle du TuYV-WT (34%). L'accumulation du mutant ΔP4 dans les plantes infectées reste toujours plus faible que celle du TuYV-WT.



- La proportion d'*A. thaliana* infectées par le TuYV-WT augmente au cours du temps jusqu'à atteindre 100% de plantes infectées à 5 wpi.
- Le nombre de plantes infectées par le mutant ΔP4 augmente peu au cours du temps (de 23 à 30% de plantes infectées). Tandis que l'accumulation du mutant est plus faible que celle du TuYV-WT en début de cinétique, elle la dépasse ensuite à 5 wpi.

L'expression de la protéine P4 dans ces différentes espèces de plantes a été analysée par western blot dans les feuilles inoculées ou systémiques. Cette protéine est détectée dans tous les échantillons analysés, ce qui montre que les différences d'infection des hôtes par le TuYV-WT ne proviennent pas d'une expression différentielle de la P4 (**Figure 44**).

De manière globale, l'absence de la P4 conduit à une infection peu efficace des plantes, avec un nombre limité de plantes infectées et une faible accumulation du mutant dans les plantes infectées. Ces résultats nous montrent que la synthèse de la P4 n'est pas strictement essentielle à l'infection systémique du TuYV dans ces quatre espèces de plantes utilisées au laboratoire. Néanmoins, sa présence favorise fortement l'accumulation du virus dans les feuilles systémique. Il se pourrait donc que le mouvement à longue distance du virus, ou d'autres étapes du cycle viral telles que la réplication, le mouvement à courte distance ou la protection face aux défenses de l'hôte soient stimulées par la présence de la P4.

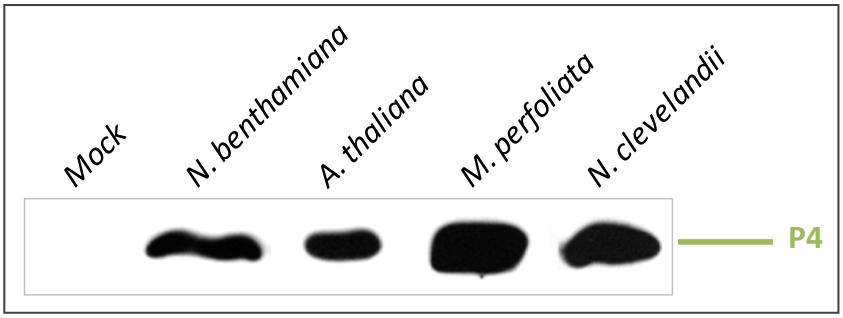


Figure 44 : Expression de la P4 dans les quatre hôtes du TuYV. La protéine P4 (19 kDa) peut être détectée par western blot (@P4) dans les feuilles infiltrées par le TuYV-WT dans les quatre hôtes testés. Un témoin de plante non-inoculée (mock) sert de contrôle négatif.

3. Recherche des partenaires protéiques de la protéine P4 chez *Arabidopsis thaliana*

3.1 Stratégie expérimentale : le criblage d'une banque d'ADNc par double hybride dans la levure

i) Choix de la technique, avantages et inconvénients

La technique du double hybride dans la levure (*Yeast Two Hybrid*, Y2H) a été très largement utilisée ces dernières années pour identifier, sans *a priori*, des interactions entre protéines virales et protéines de plantes. Plusieurs partenaires cellulaires, impliqués dans différentes étapes du cycle viral, ont ainsi été identifiés par cette technique : le facteur 1A d'élongation de la traduction interagissant avec la réplicase RdRp du TMV, mais aussi le facteur d'initiation de la traduction iso4E partenaire de la protéine NIa-VPg des *Potyvirus*. De la même manière, des interactions, importantes pour le mouvement ou l'encapsidation, ont aussi été trouvées en appliquant le système Y2H (revue sur le sujet: Nagy, 2008).
Cette approche, simple à mettre en place et relativement peu couteuse, permet d'obtenir rapidement des candidats. De plus, contrairement aux approches *in vitro*, la levure étant un organisme eucaryote, les mécanismes de modifications post-traductionnelles des protéines sont proches de ceux trouvés chez les espèces végétales. En revanche, l'approche Y2H génère souvent des faux-positifs, à savoir des interactions qui n'ont pas d'existence biologique notamment car les protéines *in vivo* ne se trouvent pas dans le même compartiment cellulaire. Les faux-positifs peuvent aussi correspondre à des protéines activant la transcription des gènes rapporteurs. Il convient donc de toujours confirmer les interactions mises en évidence par Y2H par d'autres techniques *in vitro* ou *in vivo*. Enfin, de nombreux candidats ne peuvent être identifiés par cette technique : il s'agit (i) de protéines ayant de forts signaux d'adressage vers des compartiments cellulaires autres que le noyau, car les protéines doivent être adressées dans le noyau pour que l'interaction ait lieu, (ii) de protéines toxiques pour la levure, et (iii) de protéines non stables dans la levure. De plus, le système Y2H ne permet de trouver que des interactions entre deux protéines, et ne permet pas d'identifier des complexes macromoléculaires impliquant plusieurs protéines différentes, ou contenant des molécules d'ADN ou d'ARN. Les avantages et inconvénients du criblage Y2H, ainsi que les modifications apportées ces dernières années à la technique pour améliorer l'identification de candidats, sont largement décrits dans les revues Causier & Davies (2002) et Nagy (2008).

Le criblage de banque d'ADN par Y2H ayant déjà été utilisé à plusieurs reprises au laboratoire pour identifier les partenaires de protéines des polérovirus, et j'ai ainsi appliqué cette technique pour rechercher des protéines phloémiennes interagissant avec la protéine de mouvement P4 du TuYV et potentiellement impliquées dans le cycle infectieux du virus. Deux banques d'ADNc d'*A. thaliana* ont été criblées: une banque spécifique des cellules compagnes produite dans notre équipe par Caren Rodriguez, ainsi qu'une banque commerciale d'ADNc totaux.

ii) Principe du criblage d'une banque d'ADNc par double hybride dans la levure

Avant d'exposer les résultats obtenus lors de cette recherche de candidats, j'aimerais vous expliquer brièvement le principe du criblage en Y2H, ainsi que les différentes étapes qui composent cette technique (**Figure 45).**

Chez les eucaryotes, les facteurs d'activation de la transcription ont la particularité de posséder deux domaines bien distincts : un domaine de fixation à l'ADN, et un domaine d'activation de la transcription (Causier & Davies, 2002). C'est sur cette propriété qu'est basé le système Y2H. Le facteur de transcription GAL4, provenant de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, possède ces deux domaines distincts, et est capable de reconnaître une séquence promotrice particulière. GAL4 est un régulateur positif des gènes induits par le galactose comme *GAL1*, *GAL2* et *MEL1* ; ces gènes étant importants pour la croissance des levures sur un milieu ne contenant que du galactose (Traven *et al.*, 2006). Une fois fixé à l'ADN, GAL4 recrute des facteurs de transcription de la levure pour l'expression des gènes placés sous le contrôle du promoteur spécifique.

Concernant le criblage d'une banque d'ADN par Y2H, une protéine appât est exprimée en fusion avec le domaine de fixation à l'ADN du facteur de transcription GAL4 (GAL4-BD). D'autre part, le domaine d'activation de la transcription de GAL4 (GAL4-AD) est exprimé en fusion avec une protéine proie provenant de l'expression de la banque d'ADNc (**Figure 45**). Si l'appât et la proie interagissent, le facteur GAL4 est reconstitué et va alors activer la transcription des gènes rapporteurs (**Figure 45**). Ces gènes rapporteurs sont importants pour la croissance de la levure sur un milieu sélectif car ils confèrent la résistance à un antifongique, ou conduisent à la biosynthèse d'un acide aminé ou d'une base.

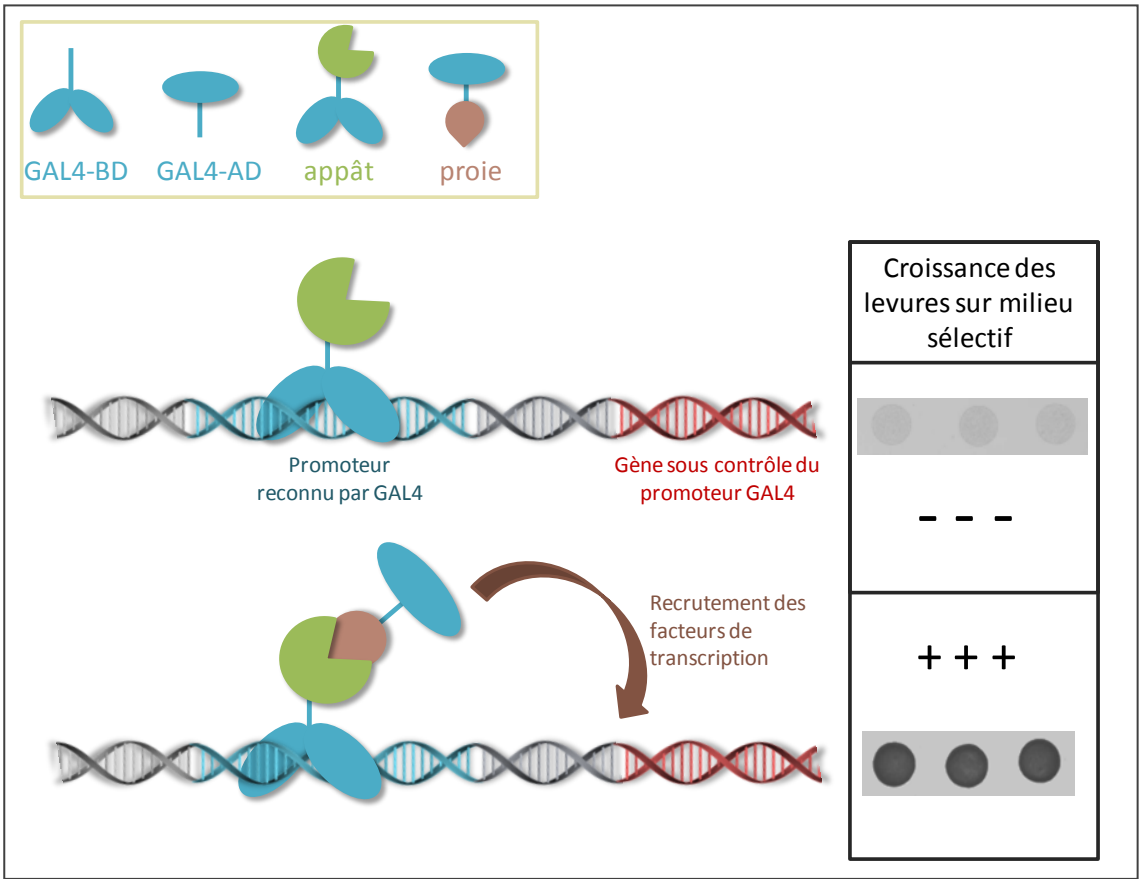


Figure 45 : Principe général test d'interaction entre deux protéines par le système du double hybride dans la levure (Y2H). Le facteur de transcription GAL4 possède un domaine de fixation à l'ADN (GAL4-BD) fusionné à la protéine appât, et un domaine d'activation de la transcription (GAL4-AD) fusionné à la protéine proie. Si l'appât et la proie interagissent, le facteur GAL4 est reconstitué, et les gènes nécessaires à la croissance des levures sur milieu sélectif sont exprimés. On observe alors une croissance des levures sur ce milieu. A l'inverse, si l'appât et la proie n'interagissent pas, les levures sont incapables de pousser sur ce même milieu.

Dans le système Matchmaker™ Y2H Gold (*Clontech*), quatre gènes rapporteurs (**Tableau 6**) sont placés sous le contrôle de trois promoteurs différents répondant tous à l'activation de la transcription par GAL4. Ainsi, différents milieux sélectifs ont pu être utilisés pour sélectionner les levures (détail de ces milieux dans le Matériel et méthodes).

Gène	Fonction du gène rapporteur	Promoteur
AUR1-C	Gène codant pour l'enzyme *inositol phosphoryl ceramide synthase* permettant la résistance à l'antifongique Auréobasidine A (AbA^r).	M1
MEL1	Gène codant pour l'α-Galactosidase qui utilise le substrat chromogène X-α-Gal pour former un produit de couleur bleue.	M1
HIS3	Gène permettant la biosynthèse d'histidine.	G1
ADE2	Gène permettant la biosynthèse d'adénine.	G2

Tableau 6 : Quatre gènes rapporteurs de la levure Y2H Gold. Ces quatre gènes sont placés sous le contrôle de trois promoteurs (M1, G1 et G2) répondant à l'activation par le facteur de transcription GAL4.

iii) Obtention du vecteur appât

Comme indiqué dans l'introduction bibliographique, le domaine N-terminal de la P4 présente trois hélices α impliquées dans la multimérisation de la P4 dans la plante. L'efficacité du criblage en Y2H pouvant être compromise par ce type d'interactions, deux appâts correspondant à deux formes différentes de la P4 du TuYV ont été introduits par clonage classique dans le vecteur pGBKT7 en fusion avec le domaine GAL4-BD.
Ainsi, le vecteur pGBKT7-P4 contient la séquence complète de la P4, alors que le vecteur pGBKT7-P4ΔN contient la séquence de la P4 délétée de son domaine N-terminal (délétions des acides aminés 1 à 44) (**Figure 46**). En utilisant le même protocole de clonage, les vecteurs pGADT7-P4 et pGADT7-P4ΔN (**Figure 46**) ont été obtenus afin de tester l'auto-association de la protéine P4 dans la levure.

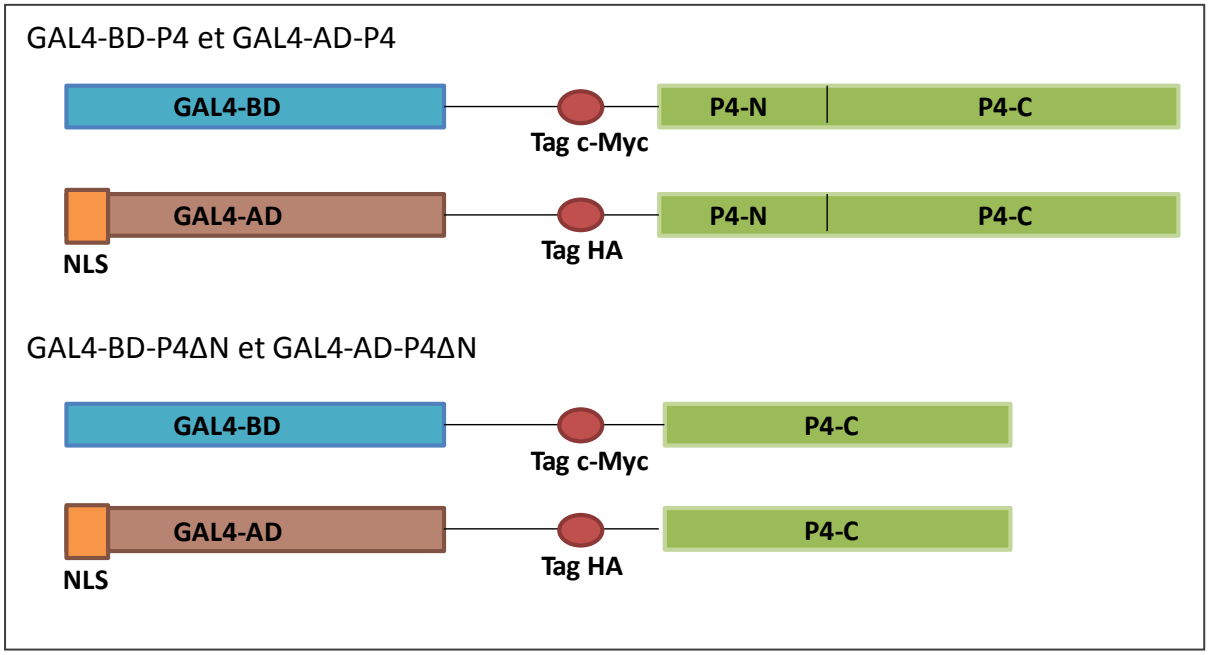


Figure 46 : Schématisation des protéines P4 et P4ΔN en fusion avec les domaines GAL4. Les séquences de la protéine P4 complète (P4) et de la protéine P4 tronquée de son domaine N-terminal (P4ΔN) ont été introduites dans les vecteurs pGBKT7 et pGADT7, respectivement en fusion avec GAL4-BD et GAL4-AD. Les protéines de fusion possèdent aussi un tag c-Myc ou HA, et le signal de localisation nucléaire (NLS) du virus SV40 est ajouté dans le vecteur pGADT7 pour l'adressage de la protéine de fusion au noyau.

3.2 Etapes préliminaires au criblage

i) Vérification de l'expression dans les levures des protéines GAL4-BD-P4 et GAL4-BD-P4ΔN

Les extraits protéiques totaux des levures transformées avec pGBKT7-P4, pGBKT7-P4ΔN ou pGBKT7 seul ont été analysés par western blot en utilisant un anticorps reconnaissant le tag c-Myc. Les deux protéines GAL4-BD-P4 et GAL4-BD-P4ΔN sont bien exprimées et stables dans la levure, car aucun produit de dégradation n'est visible sur le western blot (**Figure 47**). Les bandes supplémentaires qui apparaissent sur le western blot correspondent à des bruits de fond.

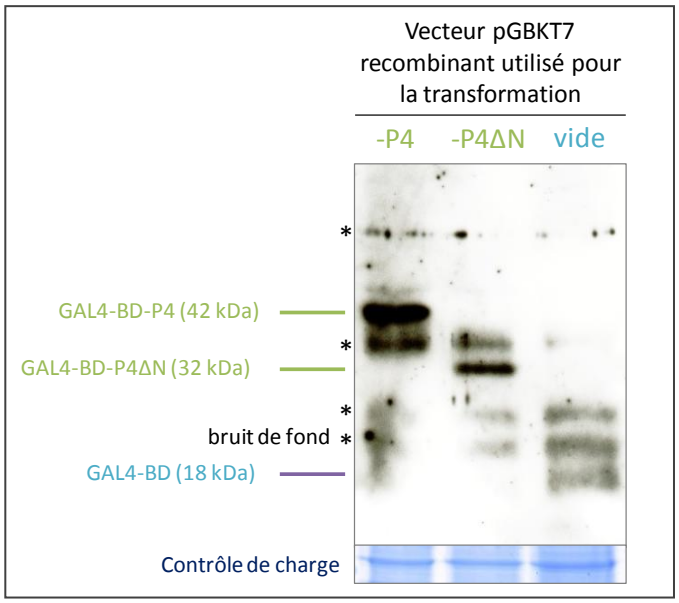


Figure 47 : Analyse par western blot de l'expression dans la levure des protéines P4 et P4ΔN du TuYV. La membrane a été incubée avec un anticorps primaire reconnaissant le tag c-Myc. Les poids moléculaires attendus des protéines de fusion sont indiqués entre parenthèses. Le contrôle de charge est un gel SDS-PAGE réalisé avec les mêmes échantillons, puis coloré au bleu de Coomassie. Les bandes signalées par un astérisque correspondent à des bruits de fond. Certaines de ces bandes n'apparaissent que sur des expositions prolongées de la membrane.

ii) Tests préliminaires pour le choix du vecteur appât

Le domaine N-terminal de la P4 permet la formation d'homodimères, voire de multimères, pouvant potentiellement gêner le criblage en Y2H. Afin de sélectionner le vecteur appât ne permettant pas la formation de multimères dans la levure, j'ai analysé l'auto-association des différentes formes de la P4 (P4 et P4ΔN) dans la levure. Après 72 h de culture des levures transformées avec pGBKT7-P4/pGADT7-P4 ou pGBKT7-P4ΔN /pGADT7-P4ΔN sur les milieux sélectifs SD/-HWL et SD/-AHWL (**Figure 48A**), je n'ai observé aucune croissance des levures, alors que celles-ci se développent sur le milieu de contrôle SD/-WL. Ce résultat indique qu'aucune auto-association entre protéines P4 complètes ou tronquée n'a lieu dans la levure.

Une autre étape préliminaire au criblage consiste à analyser la capacité des protéines appâts à activer seules la transcription des gènes rapporteurs. Après 72 h de culture des levures simplement transformées avec pGBKT7-P4 ou pGBKT7-P4ΔN sur les milieux sélectifs SD/-HW et SD/-AHW (**Figure 48 B**), aucune croissance des levures n'a été observée, indiquant une absence d'auto-activation de la transcription par les protéines appât.

En considérant l'ensemble des résultats obtenus pour les deux protéines de fusion, les criblages en Y2H ont donc été réalisés avec la protéine appât GAL4-BD-P4 qui ne forme pas de dimères dans la levure et n'active pas la transcription des gènes rapporteurs lorsqu'elle est exprimée seule.

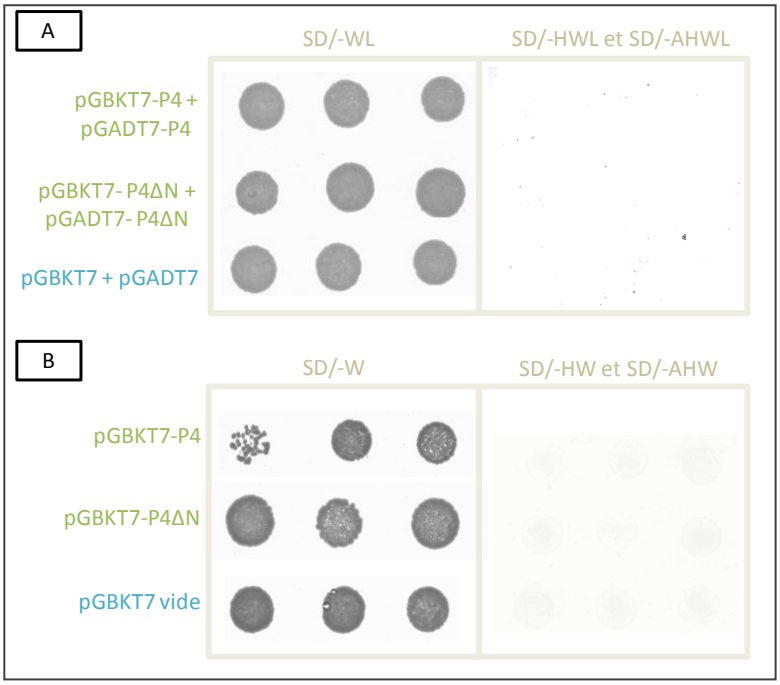


Figure 48 : Tests préliminaires au criblage effectués avec les vecteurs appâts : test d'auto-association (A) et d'activation de la transcription (B). Les levures ont été doublement transformées avec les vecteurs recombinants dérivés de pGBKT7 et de pGADT7 **(A)**, ou simplement transformées avec les vecteurs dérivés de pGBKT7 **(B)**. Les levures ont été cultivées 72 h à 28°C sur les milieux de contrôle de transformation SD/-WL **(A)** ou SD/-W **(B)**, et sur les milieux sélectifs SD/-HWL et SD/-AHWL **(A)**, ou SD/-HW et SD/-AHW **(B)**. Les 3 gouttes correspondent à 3 colonies différentes sélectionnées au hasard comme indiqué dans le Matériel et Méthodes.

3.3 Criblage des banques d'ADNc d'*A. thaliana* en Y2H

Les deux criblages, dont les résultats sont présentés ci-dessous, ont été réalisés en suivant le protocole du système **Mate&Plate Matchmaker™ Y2H Gold** (*Clontech*). Les levures de génotype **MATα** (Y187) contiennent la banque d'ADNc dans le vecteur pGADT7, alors que les levures de génotype **MATa** (Y2H Gold) contiennent le vecteur appât pGBKT7-P4. Le mélange (*mate*) entre ces deux génotypes conduit à la formation de zygotes diploïdes qui auront intégré les deux vecteurs. En étalant (*plate*) et incubant 5 jours à 28°C sur un milieu SD/-HWL, on sélectionne les levures dans lesquelles il y a eu reconstitution de GAL4 par interaction entre l'appât et la proie.

i) Résultats des criblages des banques d'ADNc d'*A. thaliana*

Dans le cas de la banque de cellules compagnes (C. Rodriguez., résultats non publiés), 91 colonies exprimant potentiellement un candidat interagissant avec la P4 ont poussé sur SD/-HWL. Concernant la banque totale d'*A. thaliana*, plus de 1000 colonies ont poussé sur le milieu SD/-HWL. Après repiquage de ces colonies sur les milieux plus sélectifs SD/-AHWL et SD/-AHWL/X/AbA, seulement 22 colonies se sont développées sur SD/-AHWL et 16 sur SD/-AHWL/X/AbA.
Les plasmides pGADT7, provenant de ces 113 colonies au total, ont été extraits des levures. Les colonies de levures présentant uniquement un seul plasmide ont été sélectionnées par

PCR, et les inserts correspondant à des fragments, complets ou partiels, de gènes d'*A. thaliana* ont été séquencés. Ces séquences ont été comparées aux bases de données nucléotidiques (BLASTn) et protéiques (BLASTp). Le **Tableau 7** ci-dessous résume les résultats obtenus par les deux BLAST, et indique les partenaires potentiels de la P4 identifiés lors de ces deux criblages. Sur les 74 séquençages effectués, 54 inserts (72 %) correspondent à des inserts qui ne sont pas en phase avec la séquence de la protéine GAL4-AD. Finalement, 20 inserts (28%) sont en phase avec la séquence de GAL4-AD et correspondent à des séquences d'*A. thaliana* identifiées par BLAST. Les protéines ribosomales ont été éliminées en raison de leur probable capacité à activer seules la transcription des gènes rapporteurs ; et les *Expressed Sequence Tag* (EST) pour lesquelles aucun gène n'a été identifié ont été éliminés car elles ne permettent pas l'identification de protéines candidates. Finalement, 10 candidats correspondant à 13 inserts ont été identifiés au cours de ces deux criblages avec la protéine P4. Entre les deux criblages aucun candidat commun n'a été trouvé.

Nombre de colonies	Identification d'une séquence connue BLASTn et BLASTp	Candidat potentiel
Banque de cellules compagnes d'*A. thaliana*		
29	La séquence insérée dans le vecteur n'est pas en phase avec GAL4-AD.	
4	*Populus EST from leave*	
3	Ribosomal proteins	
1	*A. thaliana* cytidine deaminase 1 **At2g19570**	X
1	*A. thaliana* ferric ion binding **At5g01600**	X
1	*A. thaliana* SWI/SNF complex component SNF12 homolog **At5g14170**	X
1	*A. thaliana* oxidoreductase 2OG-Fe(II) oxygenase family protein **At4g35820**	X
Banque totale d'*A. thaliana*		
25	La séquence insérée dans le vecteur n'est pas en phase avec GAL4-AD.	
1	*A. thaliana* Molecular chaperone DnaJ HSP40 **At2g22360**	X
1	*A. thaliana* Methionyl aminopeptidase 1D **At4g37040**	X
3	*A. thaliana* patellin-3 **At1g72160**	X
1	*A. thaliana* receptor for activated kinase 1C **At3g18130**	X
1	*A. thaliana* RNA-binding KH domain-containing protein **At4g26000**	X
2	*A. thaliana* GHMP kinase family protein **At5g14470**	X
Compilation pour les deux banques		
74		10

Tableau 7 : Résultats des criblages Y2H avec la protéine P4. Les séquences des inserts de 74 plasmides dérivés du pGADT7 ont été comparées par BLAST avec les séquences présentes dans les bases de données. 10 protéines interagissant potentiellement avec la P4 ont ainsi pu être identifiées.

ii) Choix des candidats utilisés pour la suite de l'étude

Comme préalablement signalé, certaines protéines sont capables seules d'activer la transcription des gènes rapporteurs, même sur les milieux les plus sélectifs. Nous avons donc testé la capacité de chacun des candidats à activer la transcription des gènes rapporteurs. Les levures ont été transformées avec les plasmides pGBKT7-vide/pGADT7-candidat et mises en culture sur les différents milieux de sélection. Sur les dix candidats identifiés lors du criblage, cinq possèdent la capacité d'activer la transcription de l'ensemble des gènes rapporteurs, et cinq candidats activent uniquement la transcription du gène permettant la synthèse d'histidine, mais pas des autres gènes rapporteurs (**Figure 49**).

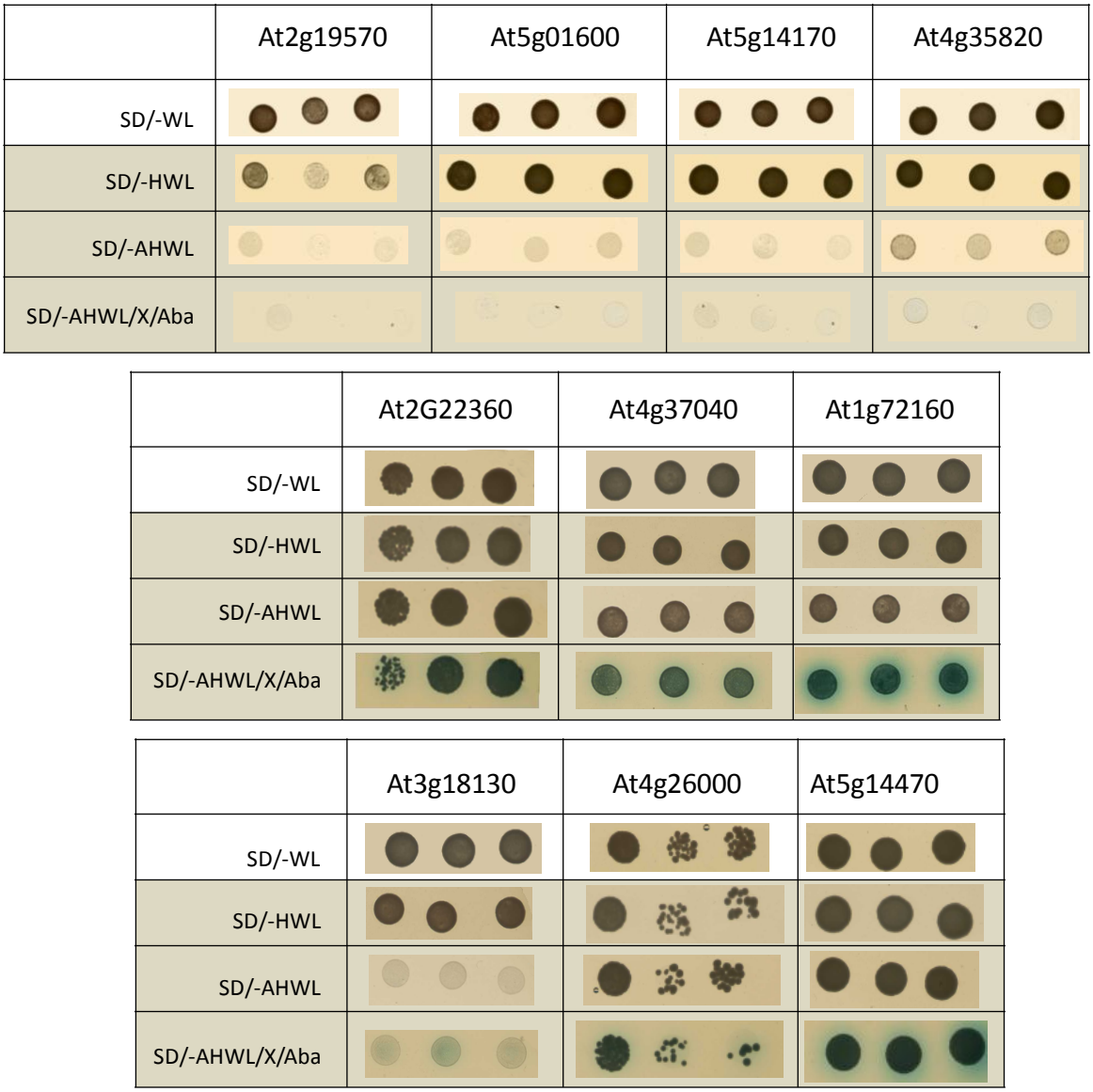


Figure 49 : Tests d'auto-activation de la transcription par les 10 candidats. Les levures transformées avec les différents vecteurs dérivant du pGADT7 et le vecteur pGBKT7-vide ont été mises en croissance 5 jours à 28°C sur le milieu de croissance SD/-WL, puis sur les milieux sélectifs SD/-HWL, SD/-AHWL, et SD/-AHWL/X/AbA. Les 3 gouttes correspondent à 3 colonies différentes sélectionnées au hasard comme indiqué dans le Matériel et Méthodes.

Pour la vérification des interactions en microscopie confocale et la validation fonctionnelle dans les plantes, deux candidats parmi les dix ont été choisis afin de pouvoir réaliser le travail pendant la durée de la thèse. Même si le candidat DnaJ (At2g22360) aurait pu être intéressant à étudier en raison de l'implication de certaines protéines HSP dans le mouvement d'autres espèces virales (Hofius *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2009; Nagy *et al.*, 2011; Shimizu *et al.*, 2009; Soellick *et al.*, 2000), ce candidat possède une forte activité d'activation de la transcription, et j'ai préféré me focaliser sur la protéine At2g19570 (CDA1) qui est le plus faible activateur de la transcription, et sur la protéine At3g18130 (RACK1C) qui potentiellement pouvait intervenir dans le cycle viral.

3.4 Présentation des candidats CDA1 et RACK1C

i) Vérification des interactions avec la P4 en Y2H

Au cours des criblages Y2H, seuls des fragments des gènes CDA1 et RACK1C, et non les gènes complets, étaient présents dans les vecteurs pGADT7-proie (**Figure 50**).
Pour la protéine RACK1C, le domaine identifié permet l'expression d'un peptide de 193 acides aminés correspondant au domaine central de la protéine complète. Quatre motifs de répétition WD (numéros 2 à 5) y sont retrouvés (**Figure 52**).
Pour la protéine CDA1, le domaine identifié permet l'expression d'un peptide de 65 acides aminés positionné dans la partie C-terminale de la protéine.

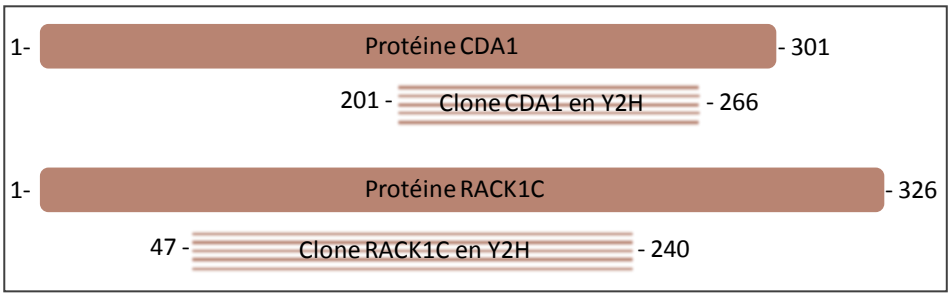


Figure 50 : Présentation schématique des protéines CDA1 et RACK1C. Les protéines CDA1 et RACK1C complètes font 301 et 326 acides aminés respectivement, mais seuls 65 et 193 acides aminés sont exprimés à partir des vecteurs pGADT7-proie sélectionnés lors du criblage en Y2H.

L'interaction entre la protéine P4 et les peptides de RACK1C ou de CDA1 a été vérifiée en transformant les levures avec les différentes combinaisons de plasmides pGBKT7 et pGADT7 contenant les protéines virales ou cellulaires. La croissance des levures a été réalisée 5 jours à 28°C sur le milieu de vérification de la transformation SD/-WL, et sur les trois milieux sélectifs SD/-HWL, SD/-AHWL, et SD/-AHWL/X/AbA. L'absence de croissance des levures sur milieux sélectifs après transformation par pGBKT7-vide/pGADT7-candidat montre que les domaines des protéines CDA1 et RACK1C n'activent pas seuls la transcription des gènes rapporteurs. L'interaction entre ces domaines et la partie P4 a été à nouveau confirmée lors de cette expérience, comme le montre la croissance des levures transformées par les vecteurs pGBKT7-P4/pGADT7-candidat sur les milieux sélectifs (**Figure 51**).
De manière intéressante, les interactions avec les peptides RACK1C et CDA1 n'impliquent pas le domaine N-terminal de la P4 (acides aminés 1 à 44), puisque ces interactions sont maintenues avec l'appât P4ΔN (**Figure 51**). C'est donc le domaine C-terminal de la P4, connu plutôt pour son interaction avec l'ARN, qui est responsable de l'interaction avec les deux peptides.

Afin de tester l'interaction de la protéine CDA1 complète avec la P4, la séquence du gène *CDA1* complet a été clonée dans un vecteur pGADT7.Aucune croissance des levures doublement transformées n'a cependant été observée sur les milieux sélectifs (figure non montrée), ne confirmant pas l'interaction de la P4 avec la protéine CDA1 complète. Il est envisageable que la conformation adoptée par la protéine CDA1 complète fusionnée au GAL4-AD ne soit plus compatible avec son interaction avec la P4.

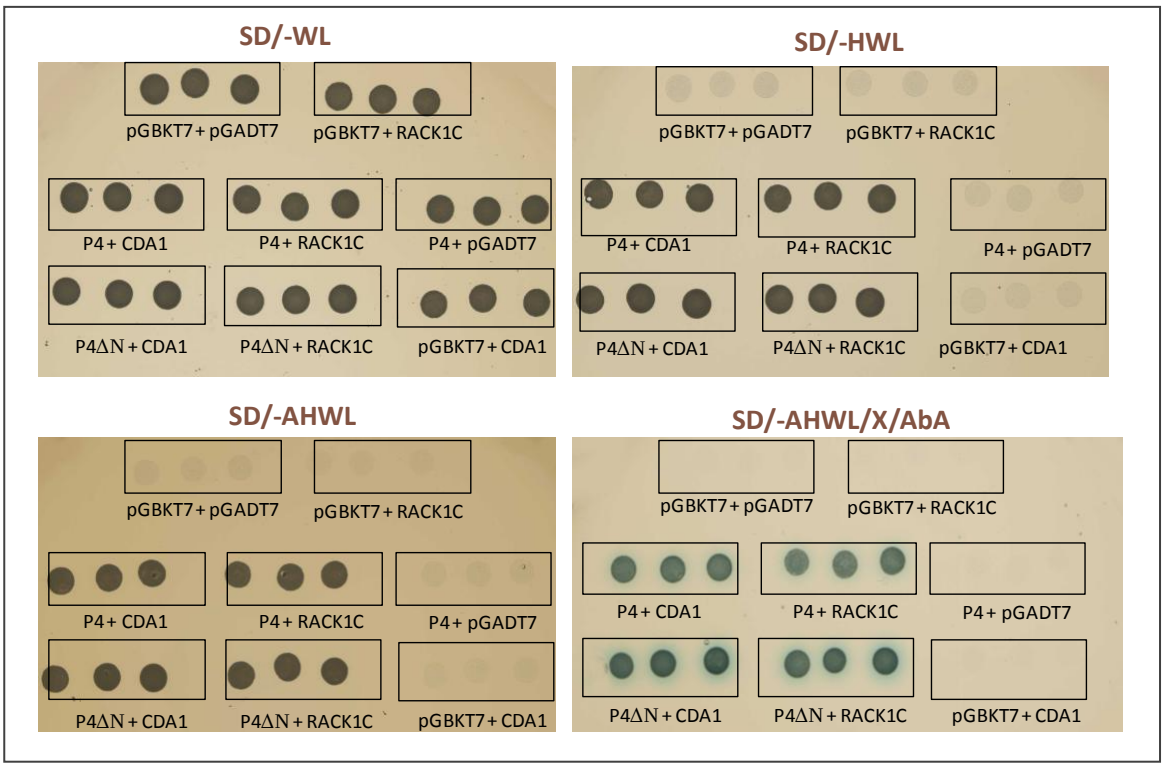


Figure 51 : Test d'interactions entre la protéine P4 ou son domaine C-terminal et les peptides CDA1 et RACK1C. Les levures transformées avec les différentes combinaisons pGBKT7 et pGADT7 ont été mises en culture 5 jours à 28°C sur le milieu de vérification de la transformation SD/-WL, et sur les milieux sélectifs SD/-HWL, SD/-AHWL, et SD/-AHWL/X/AbA.

ii) La protéine RACK1C

La protéine *Receptor for activated kinase 1C* (RACK1) a tout d'abord été identifiée chez les mammifères en tant que partenaire de la protéine kinase C (PKC) active, permettant le transport de PKC entre les différents compartiments cellulaires (Ron *et al.*, 1994). RACK1 possède sept domaines de répétition tryptophane/acide aspartique (WD) de 40 à 60 acides aminés chacun, structurés en sept feuillets β, et appartient ainsi à la famille des *WD repeat G protein beta family* (Guo & Chen, 2008) (**Figure 52 A, B**). Cette famille de protéines est très largement présente chez les procaryotes et eucaryotes (Adams *et al.*, 2011; Ullah *et al.*, 2008). Les protéines RACK1 sont au centre de plusieurs voies de transduction de signal (*scaffold protein*), et interagissent ainsi avec un grand nombre de partenaires protéiques, en plus de la PKC (Guo & Chen, 2008; Kadrmas *et al.*, 2007; Ullah *et al.*, 2008). Par exemple, elles jouent un rôle dans certains processus développementaux, dans des réponses aux stress hormonaux, dans la réponse immunitaire, dans la régulation de la transcription, et dans les réponses neurales des mammifères (Guo & Chen, 2008; Ullah *et al.*, 2008).

La première RACK1 du règne végétal a été clonée à partir de cellules BY-2 de tabac en tant que gène induit par l'auxine, et a tout d'abord été nommée ArcA (Guo & Chen, 2008; Guo

et al., 2009). Par la suite, des protéines RACK1 ont été retrouvées dans un très grand nombre d'espèces végétales. Cependant, les plantes ont la particularité de posséder non pas un gène *RACK1*, mais plusieurs. Ainsi, deux gènes *RACK1* homologues sont trouvés chez le riz *Oryza sativa*, et trois chez *A. thaliana* (Guo & Chen, 2008; Nakashima *et al.*, 2008). Les protéines RACK1 végétales sont structurellement similaires à celles retrouvées chez les mammifères, et la première structure cristallographique a été réalisée avec la protéine RACK1A d'*A. thaliana* (Ullah *et al.*, 2008) (**Figure 52 A**).

La protéine RACK1A d'*A. thaliana* est, à l'heure actuelle, la plus largement étudiée des trois. Elle intervient dans plusieurs réponses hormonales et dans certains processus développementaux, comme la croissance des racines et des feuilles en rosette (Guo & Chen, 2008). Les gènes RACK1B et RACK1C sont des équivalents fonctionnels à RACK1A, bien que la fonction de RACK1A ne puisse pas totalement être complémentée par les deux autres protéines. Un mutant d'*A. thaliana rack1a* possède un défaut de développement des feuilles et un faible nanisme, alors que des simples mutants d'*Arabidopsis rack1b* et *rack1c* ne possèdent pas de phénotype particulier. Dans le cas de doubles mutants *rack1a-rack1b* et *rack1a-rack1c* les défauts de développement sont plus importants que pour le mutant *rack1a*. Enfin, un triple mutant *rack1a-rack1b-rack1c* possède un fort ralentissement de croissance (Guo & Chen, 2008) (**Figure 53**). Les trois protéines possèdent 87 à 93 % d'identité de séquence (**Tableau 8**). Les trois gènes RACK1 sont exprimés dans l'ensemble des tissus végétaux, mais leur niveau d'expression est différent avec une tendance générale allant vers RACK1A>RACK1B>RACK1C (Guo & Chen, 2008).

En ce qui concerne la localisation subcellulaire de ces protéines RACK1, elles sont majoritairement présentes dans le cytosol, parfois associées aux membranes, mais elles sont aussi retrouvées dans le noyau où elles interagissent avec leurs partenaires nucléaires (Adams *et al.*, 2011; Nakashima *et al.*, 2008). L'utilisation du logiciel *Arabidopsis interaction viewer* (Bio-Array Resource, University of Toronto) permet d'identifier 87 protéines interagissant potentiellement avec RACK1C (**Figure 52 C**), et 50 avec RACK1A. Parmi ces protéines, un grand nombre est localisé dans le noyau ou est associé aux membranes. La localisation des protéines RACK1 est donc fortement liée à la localisation de leurs partenaires cellulaires.

De manière intéressante, RACK1 a déjà été identifiée comme protéine intervenant dans le cycle infectieux de différents virus. Lors d'un criblage Y2H utilisant la protéine Nef du *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-1) comme appât, la protéine RACK1 humaine a été identifiée parmi les protéines cellulaires interagissant avec la protéine Nef (Gallina *et al.*, 2001). L'interaction entre RACK1 et Nef augmentant la phosphorylation de Nef par PKC, la protéine RACK1 pourrait donc jouer le rôle d'adaptateur entre la protéine virale et la kinase cellulaire (Gallina *et al.*, 2001). Toujours en utilisant le criblage Y2H, la protéine RACK1 a été trouvée comme partenaire du facteur de transcription BZLF1 de l'*Epstein-Barr virus* (EBV) (Baumann *et al.*, 2000). RACK1 se fixe au domaine d'activation de la transcription de BZFL1, mais cette interaction n'augmente pas la phosphorylation de la protéine virale et ne modifie par sa localisation cellulaire. Le rôle de l'interaction RACK1-BZLF1 reste encore à élucider (Baumann *et al.*, 2000).Il est intéressant de signaler qu'en utilisant la technique de farwestern blot, la protéine RACK1 du puceron *M. persicae* a été trouvée comme interagissant avec les particules virales du TuYV (Seddas *et al.*, 2004). La protéine RACK1 étant membranaire, un rôle potentiel dans la transcytose des virions à travers les cellules épithéliales a été suggéré (Seddas *et al.*, 2004).

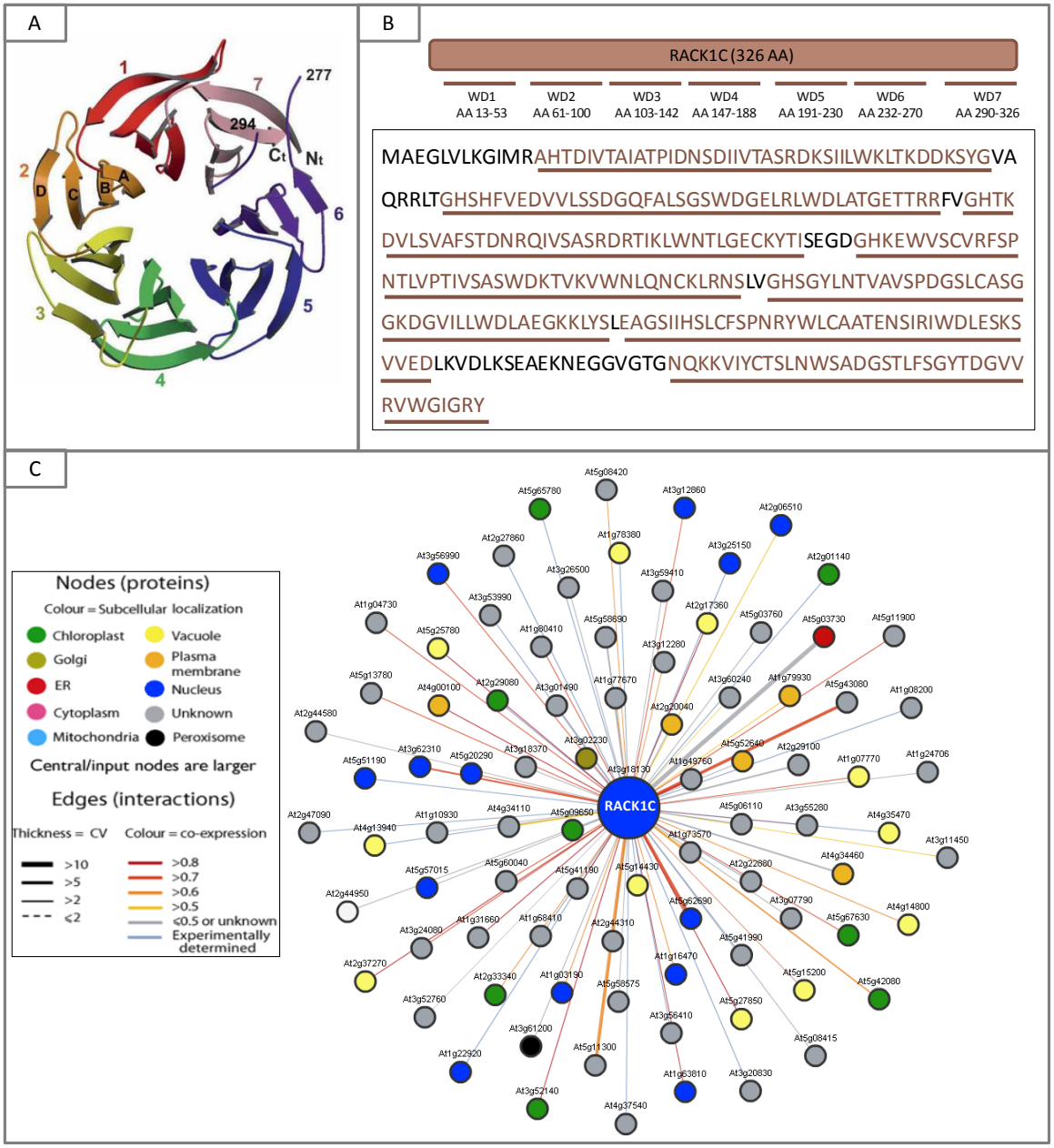


Figure 52 : Caractéristiques générales des protéines RACK1. A) Structure en sept feuillets β de RACK1A d'*A. thaliana*, formés d'une répétition de motifs tryptophane/acide aspartique (WD), entourant un canal central (Ullah *et al.*, 2008). **B)** La séquence en acides aminés des sept domaines WD de RACK1C d'*A. thaliana* est soulignée en brun. **C)** En utilisant le logiciel *Arabidopsis interaction viewer*, 86 protéines sont connectées à la protéine RACK1C utilisée comme nœud central. En dehors des protéines dont la localisation subcellulaire n'est pas définie, la majorité des partenaires potentiels de RACK1C sont localisés dans le noyau, dans les chloroplastes, ou au niveau de la membrane plasmique.

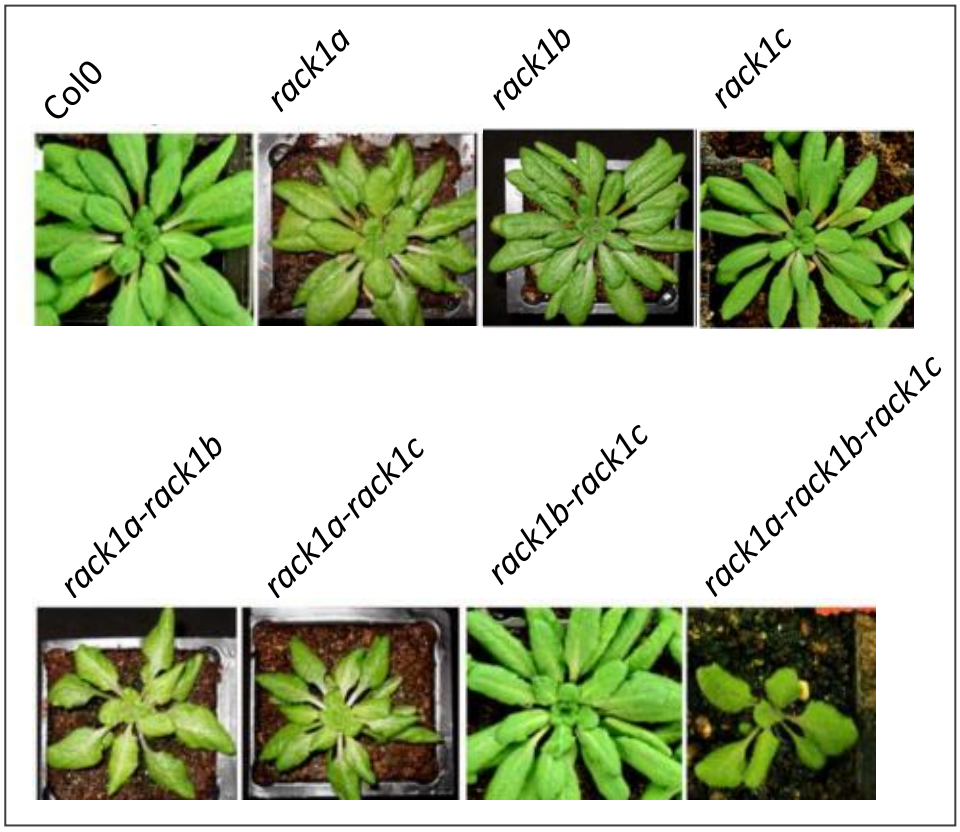


Figure 53 : Phénotype de développement des mutants d'*Arabidopsis* touchés dans les protéines RACK1 (adapté de (Guo & Chen, 2008)). L'ajout des mutations *rack1b* et *rack1c* accroit le phénotype du mutant *rack1a*, alors que, seules, les mutations dans *RACK1B* ou *RACK1C* n'entrainent pas de phénotype particulier au niveau des rosettes.

	RACK1 *H. sapiens*	RACK1A *A. thaliana*	RACK1B *A. thaliana*	RACK1C *A. thaliana*	RACK1A *O. sativa*
RACK1 *H. sapiens*	-	66 %	64 %	67 %	64 %
RACK1A *A. thaliana*	66%	-	87 %	87 %	73 %
RACK1B *A. thaliana*	64 %	87 %	-	93 %	71 %
RACK1C *A. thaliana*	67%	87 %	93 %	-	72 %
RACK1A *O. sativa*	64 %	73 %	71 %	72 %	-

Tableau 8 : Identité des séquences protéiques entre RACK1. Les pourcentages d'identité ont été calculés avec le logiciel « SIM - Alignment Tool for protein sequences » (source : http://web.expasy.org/sim).

Qu'en est-il du rôle potentiel de l'interaction entre la P4 du TuYV et RACK1C d'*A. thaliana* ? Tout comme la protéine Nef du HIV-1, la protéine P4 pourrait utiliser RACK1 comme un adaptateur pour être phosphorylée par une kinase cellulaire équivalente à PKC. En effet, il a été montré que la p17 du PLRV est phosphorylée par une kinase membranaire de type PKC. La phosphorylation de la partie N-terminale de la p17 pourrait être importante pour réguler les fonctions de la p17 (Sokolova *et al.*, 1997).

iii) La protéine CDA1

Les protéines *cytidine deaminase* (CDA, EC 3.5.4.5) sont des enzymes catalysant la réaction de déamination de la cytidine et de la déoxycytidine en uridine et deoxyuridine. Ainsi, une de leur fonction principale est l'édition des ARN. Les modifications apportées par les CDA sur l'ARN entrainent parfois l'insertion d'un codon stop prématuré, et donc la traduction de protéines tronquées. Ce mécanisme est utilisé par certains organismes pour réguler la synthèse de gènes lors de différentes étapes du développement, mais aussi pour se défendre contre des pathogènes comme les virus (Faivre-Nitschke *et al.*, 1999; Schröfelbauer *et al.*, 2004). Concernant leur localisation subcellulaire, les CDA sont trouvées dans le cytosol, mais également dans les mitochondries et les chloroplastes (Kafer & Thornburg, 2000).

L'enzyme d'environ 60 kDa est constituée de plusieurs sous-unités : un homodimère chez les procaryotes (2 x 30 kDa), et un homotétramère chez les eucaryotes (4 x 15 kDa) (Faivre-Nitschke *et al.*, 1999). La structure cristallographique en deux sous-unités de l'enzyme d'*E. coli* a été déterminée (**Figure 54**) (Xiang *et al.*, 1995). Le domaine catalytique de l'enzyme, composé d'un motif C/HXE$(X)_n$PCXXC, fixe un atome de zinc essentiel au fonctionnement de celle-ci (Faivre-Nitschke *et al.*, 1999) (**Figure 54**).

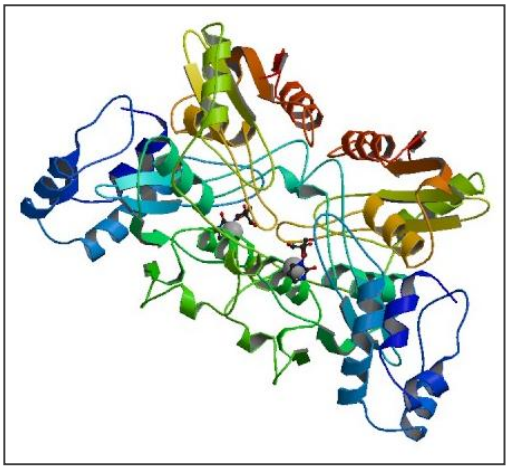


Figure 54 : Structure cristallographique de la protéine CDA d'*E. coli*. L'enzyme est composée de deux sous-unités d'environ 30 kDa, possédant chacune un domaine de liaison à un atome de zinc (Xiang *et al.*, 1995).

La première CDA identifiée dans le règne végétal provient d'*A. thaliana*, et ferait partie des « gènes de ménage ». Huit autres protéines CDA ont ensuite été identifiées chez *A. thaliana* (**Tableau 9**). De manière surprenante, et contrairement aux autres protéines eucaryotiques, la protéine CDA végétale est composée de deux sous-unités de 32.5 kDa chacune (Kafer & Thornburg, 2000; Vincenzetti *et al.*, 1999). Comme indiqué dans le **Tableau 9** ci-dessous, elle possède 36 % d'identité avec l'enzyme d'*E.coli*. L'hypothèse acceptée à l'heure actuelle est que l'enzyme de plante dérive d'une enzyme provenant d'une bactérie symbiotique ou pathogène (Faivre-Nitschke *et al.*, 1999).

	Identité de séquence avec At-CDA1 (At2g19570)
CDA2 (At4g29620)	49 %
CDA3	53 %
CDA4	45 %
CDA5	49 %
CDA6	57 %
CDA7 (At4g29600)	53 %
CDA8	46 %
CDA9	44 %
CDA *E. coli*	36 %
CDA *S.cerevisiae*	32 %
CDA *H. sapiens*	29 %

Tableau 9 : Identité des séquences protéiques entre CDA d'espèces différentes. Les pourcentages d'identité ont été calculés avec le logiciel « SIM - Alignment Tool for protein sequences » (source : http://web.expasy.org/sim).

Le gène *At-CDA1* est exprimé à un faible niveau dans tous les tissus d'*A. thaliana* (Faivre-Nitschke *et al.*, 1999). En ce qui concerne sa localisation subcellulaire, At-CDA1 serait cytosolique, car elle ne possède pas de signal classique d'adressage chloroplastique ou mitochondrial (Faivre-Nitschke *et al.*, 1999). La fonction des enzymes CDA végétales reste encore à élucider. En effet les neuf CDA identifiées chez *A. thaliana* sont incapables d'utiliser l'ARN comme substrat (Faivre-Nitschke *et al.*, 1999; Salone *et al.*, 2007). Elles pourraient être impliquées dans le recyclage des nucléosides, ou dans d'autres fonctions encore inconnues (Faivre-Nitschke *et al.*, 1999).

3.5 Vérification de l'interaction *in planta*

Les interactions P4/CDA1 et P4/RACK1C observées dans la levure ont été ensuite vérifiées *in planta* par l'observation en microscopie confocale de la localisation subcellulaire des protéines fusionnées à des fluorochromes (GFP ou RFP), et pour éventuellement identifier des sites de co-localisation avec la protéine P4.

i) Localisation subcellulaire de CDA1

La protéine CDA1 fusionnée en C-terminal de l'eGFP (eGFP-CDA1) possède une localisation nucléo-cytoplasmique, qui est en réalité celle de l'eGFP seule, car la protéine de fusion est systématiquement clivée après la séquence du fluorochrome (images de microscopie et western blot non montrées ici).
Lorsque l'eGFP est fusionnée en C-terminal de la protéine CDA1 (CDA1-eGFP), la protéine de fusion possède une émission de fluorescence très faible, assez diffuse. La localisation subcellulaire majoritairement observée est nucléo-cytoplasmique (**Figure 55 A**). J'ai aussi observé dans un très faible nombre de cellules une localisation chloroplastique confirmée par une superposition de la fluorescence émise par l'eGFP et celle des chloroplastes (**Figure 55 B-D**). Cette localisation chloroplastique est intéressante puisqu'aucun signal conventionnel d'adressage aux chloroplastes n'a pu être trouvé dans la séquence protéique de CDA1 (Vincenzetti *et al.*, 1999). Lorsque la protéine de fusion est analysée par western-blot, on remarque qu'elle est également clivée et libère de la protéine eGFP dans les cellules

(**Figure 56**). On peut donc supposer que la localisation nucléo-cytoplasmique observée est due à la protéine eGFP, tandis que la localisation chloroplastique serait uniquement celle de CDA1-eGFP, puisque la protéine eGFP seule n'est jamais retrouvée dans les chloroplastes. On ne peut également écarter l'hypothèse que la localisation nucléo-cytoplasmique soit également celle de la protéine CDA1-eGFP.
Afin d'améliorer l'expression et la détection de la protéine fusionnée au fluorochrome, plusieurs conditions d'expériences ont été testées : variation (i) de la température de croissance des plantes après infiltration (18°C et 23°C), et (ii) du temps d'observation après infiltration (24h, 48h et 72h). Dans toutes les conditions testées, la protéine de fusion est toujours clivée ou dégradée, et la fluorescence observée reste très faible. La condition permettant une observation optimale de la protéine fluorescente est obtenue par une croissance des plantes à 23°C et une observation au microscope confocal 72h après infiltration (**Figure 56**). Il est possible d'augmenter la quantité de protéines exprimées par ajout d'un plasmide exprimant le suppresseur de *RNA silencing* P19 des tombusvirus lors de l'infiltration, mais l'ajout de P19 provoque principalement la formation d'agrégats dans la cellule (figure non montrée).

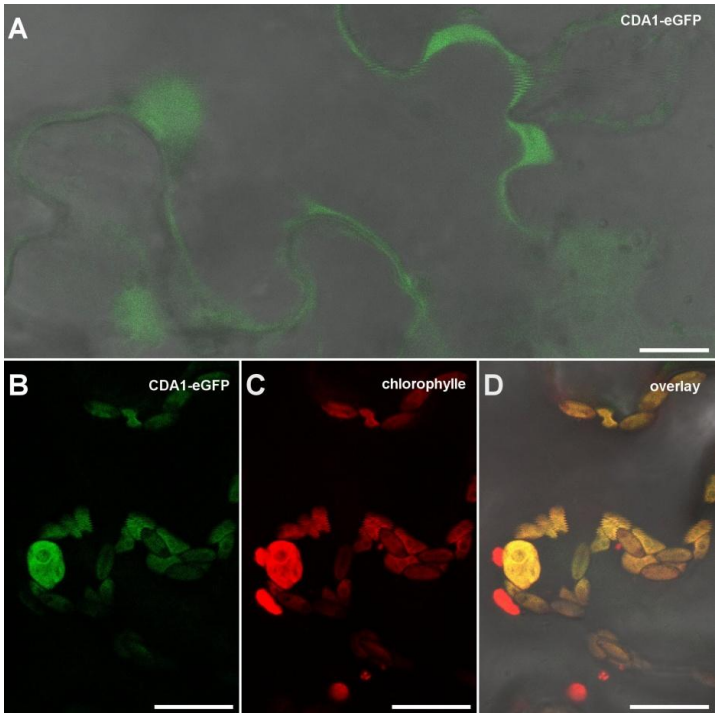


Figure 55 : Localisation subcellulaire de la protéine CDA1-eGFP. La localisation majoritairement observée est nucléo-cytoplasmique, avec une fluorescence verte globalement très faible et diffuse **(A).** Dans de très rares cas, une localisation chloroplastique a été observée **(B-D).** Echelle = 20µm

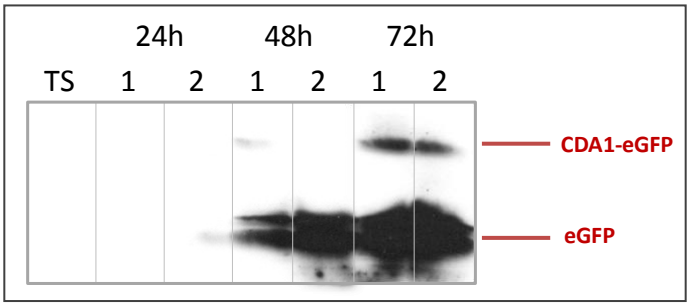


Figure 56 : Evolution de l'expression de la protéine de fusion CDA1-eGFP au cours du temps. Western blot (@eGFP) pour détecter l'expression de la protéine de fusion CDA1-eGFP dans des extraits de *N. benthamiana* 24 h, 48 h et 72 h après infiltration. 1 et 2 : deux extractions protéiques pour une même condition.

ii) Localisation subcellulaire de RACK1C

De la même manière que pour la protéine CDA1, j'ai utilisé la technologie Gateway® pour cloner la totalité de la séquence de RACK1C en fusion N- et C-terminale avec l'eGFP. La fusion eGFP-RACK1C résulte en un clivage systématique de la protéine après le fluorochrome (images western blot et microscopie confocale non montrées). En revanche, la protéine de fusion RACK1C-eGFP montre très peu de clivage ou de dégradation (**Figure 58**), et la localisation subcellulaire nucléo-cytoplasmique observée confirme les résultats obtenus précédemment par différents groupes (Adams *et al.*, 2011; Guo & Chen, 2008; Ullah *et al.*, 2008) (**Figure 57 A**). Il est important de noter que, dans certaines cellules, la localisation est entièrement nucléaire, mais jamais nucléolaire. Enfin, j'ai pu observer à de nombreuses reprises la présence de la fluorescence dans des vésicules mobiles associées à la membrane plasmique (**Figure 57 A**). Comme pour CDA1, plusieurs conditions ont été testées au cours des expériences, mais aucune n'a montré de différence de localisation de la protéine RACK1C. La protéine RACK1C-eGFP est bien exprimée 48 ou 72h après infiltration (**Figure 58**).

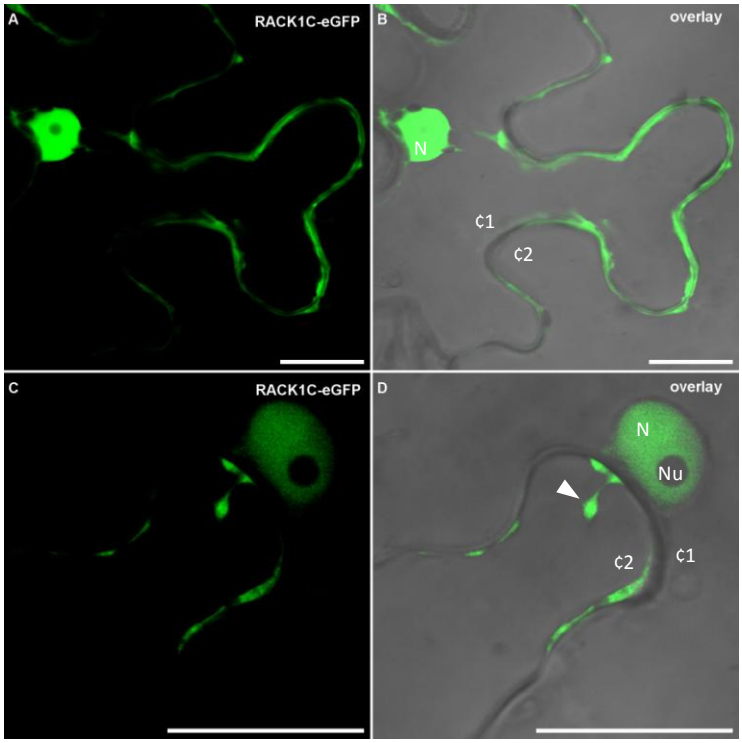


Figure 57 : Localisation subcellulaire de la protéine RACK1C-eGFP. La localisation observée est toujours nucléo-cytoplasmique (A-D). Des vésicules fluorescentes mobiles (flèches) dans la cellule sont visibles à proximité de la membrane plasmique (C-D). N : noyau ; Nu : nucléole ; ¢ : cellule.
Echelles = 20 µM

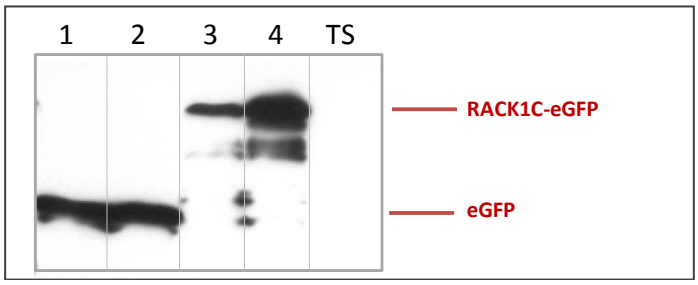


Figure 58 : Expression des protéines eGFP et RACK1C-eGFP. Western blot (@eGFP) pour détecter l'expression de la protéine eGFP seule (puits 1 et 2) et de la protéine de fusion RACK1C-eGFP (puits 3 et 4) dans des extraits de *N. benthamiana* à 48 h (puits 1 et 3) et 72 h (puits 2 et 4) après infiltration.

iii) Localisation de la P4 du TuYV

Le vecteur permettant l'expression de la P4 fusionnée à la RFP en N-terminal a été obtenu par Julia de Cilia (IBMP, Strasbourg) (De Cilia, 2011).
Après infiltration dans *N. benthamiana*, la protéine RFP-P4 est bien exprimée dans les cellules de la plante et ne subit pas de dégradation ou clivage (**Figure 59**). La principale localisation subcellulaire attendue pour cette protéine de mouvement, et déjà décrite dans la littérature (De Cilia, 2011; Schmitz *et al.*, 1997), est la localisation au niveau des plasmodesmes. Une fluorescence au niveau de ponctuations dans la membrane plasmique est ainsi observée dans la majorité des cellules (**Figure 60 A-D**). Une co-localisation de la P4 du TuYV avec les protéines PDLP spécifiquement présentes dans les plasmodesmes avait déjà été visualisée par Julia de Cilia (De Cilia, 2011). Dans certains cas, la localisation observée est cytosolique, toujours proche de la membrane plasmique, mais jamais dans le noyau ou le nucléole (**Figure 60 E-F**). De manière intéressante, j'ai aussi observé la présence de la P4 dans des vésicules associées au noyau (**Figure 60 G-J**). Le nombre de ces vésicules varie grandement d'une cellule à l'autre, de zéro à quelques dizaines entourant le noyau. Ces vésicules sont mobiles entre la périphérie nucléaire et la membrane plasmique (**Figure 60 I-J)**. Au cours de mes différentes observations, j'ai remarqué que plus le nombre de ces vésicules était important, moins la P4 était observée au niveau des plasmodesmes. Il est donc envisageable que la localisation de la P4 change au cours du temps. La présence des vésicules péri-nucléaires a déjà été observée par microscopie électronique dans le cas de la p17 (P4) du PLRV, mais uniquement en contexte d'infection virale. Ces vésicules ont ainsi été décrites comme un lieu probable de la réplication du PLRV (Schmitz *et al.*, 1997). Nos observations montrent que la P4, hors contexte viral, est également susceptible de conduire à la formation de ces vésicules péri-nucléaires.

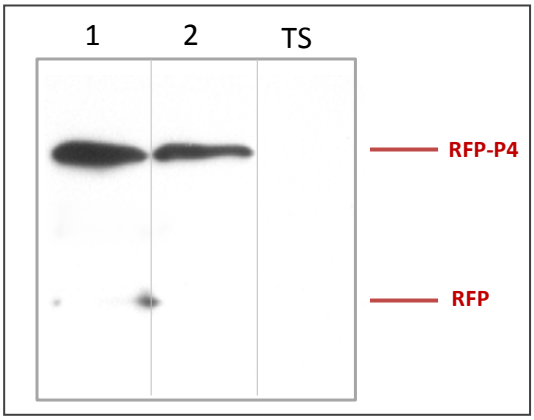


Figure 59 : Expression de la protéine RFP-P4. Western blot (@RFP) pour détecter l'expression de la protéine de fusion RFP-P4 dans des extraits de *N. benthamiana* à 48 h (puits 1) et 72 h (puits 2) après infiltration.

iv) Etude de l'interaction *in planta*

Afin de savoir si les interactions observées en Y2H existent aussi *in planta*, des co-infiltrations de la RFP-P4 avec les protéines candidates fusionnées à l'eGFP ont été réalisées, et, comme précédemment, la localisation cellulaire des protéines a été observée en microscopie confocale.

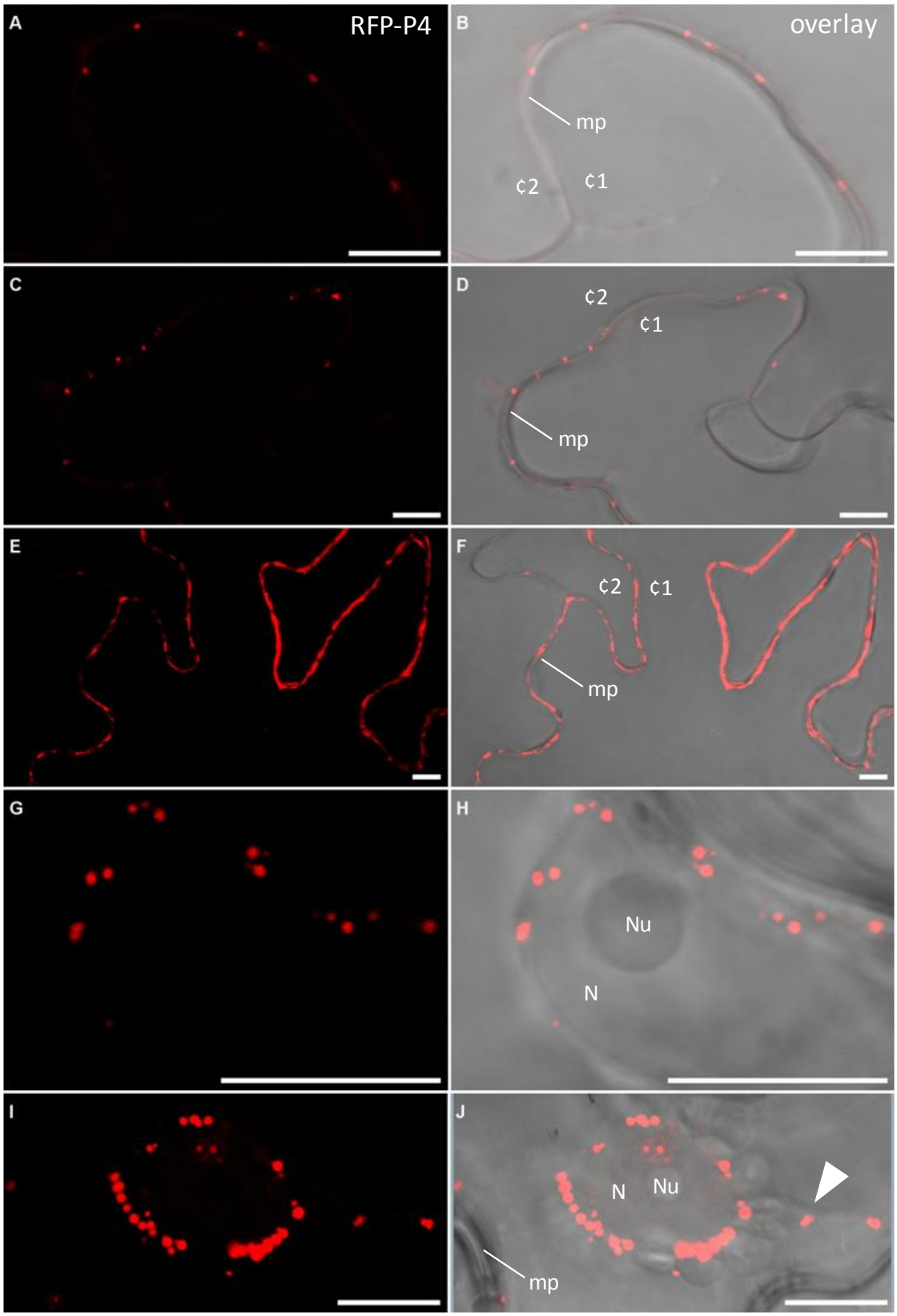


Figure 60 : Localisation subcellulaire de la RFP-P4. La protéine est principalement localisée au niveau de ponctuations dans la membrane plasmique pouvant être des plasmodesmes **(A-D).** Dans de rares cas, la localisation est diffuse dans le cytosol, mais toujours proche de la membrane plasmique **(E-F).** Enfin, la RFP-P4 est aussi présente dans des vésicules proches du noyau **(G-J).** Le nombre de ces vésicules varie fortement d'une cellule à l'autre. Certaines de ces vésicules se déplacent entre la membrane plasmique et la périphérie nucléaire **(flèche I-J).**
N : noyau ; Nu : nucléole ; ¢ : cellule ; mp : membrane plasmique. Echelle = 10 µm

Lorsque la protéine CDA1-eGFP est co-infiltrée avec la RFP-P4, aucune fluorescence de la CDA1-eGFP n'est observée, quelles que soient les conditions d'expérimentation. La RFP-P4 quant à elle est toujours visible au niveau des plasmodesmes ou des vésicules péri-nucléaires (images non montrées ici). Il est probable qu'une compétition s'établisse entre les deux plasmides et que la faible expression de CDA1-eGFP soit complètement inhibée lorsque la RFP-P4 est exprimée dans les mêmes cellules.

Lorsque la protéine RACK1C-eGFP est co-infiltrée avec la RFP-P4, un très grand nombre de cellules présente les deux fluorochromes. Le clivage ou la dégradation des protéines de fusion RFP-P4 et RACK1C-eGFP n'augmente pas lors de la co-infiltration (**Figure 61**). La localisation de RACK1C n'est pas modifiée par la présence de la P4, et est toujours nucléo-cytoplasmique (**Figure 62**). La RFP-P4 est observable au niveau de ponctuations dans la membrane plasmique pouvant être des plasmodesmes, mais aussi dans le cytosol, ou dans les vésicules péri-nucléaires (**Figure 62**). Cependant, au cours de mes différentes observations, j'ai pu remarquer que le nombre de cellules où la P4 est présente dans les plasmodesmes est relativement faible lorsque RACK1C est aussi exprimée. A l'inverse, le nombre de vésicules contenant la RFP-P4 en périphérie du noyau est toujours très important (**Figure 62**). Il est possible que la présence de RACK1C-eGFP retienne la P4 dans ces vésicules, soit par une interaction directe, soit par un mécanisme indirect. Je n'ai cependant jamais observé de co-localisation des deux protéines, sauf dans les très rares cellules où la P4 est cytosolique (**Figure 62**). Il est donc possible qu'une interaction *in planta* existe mais de manière transitoire dans le cytosol.

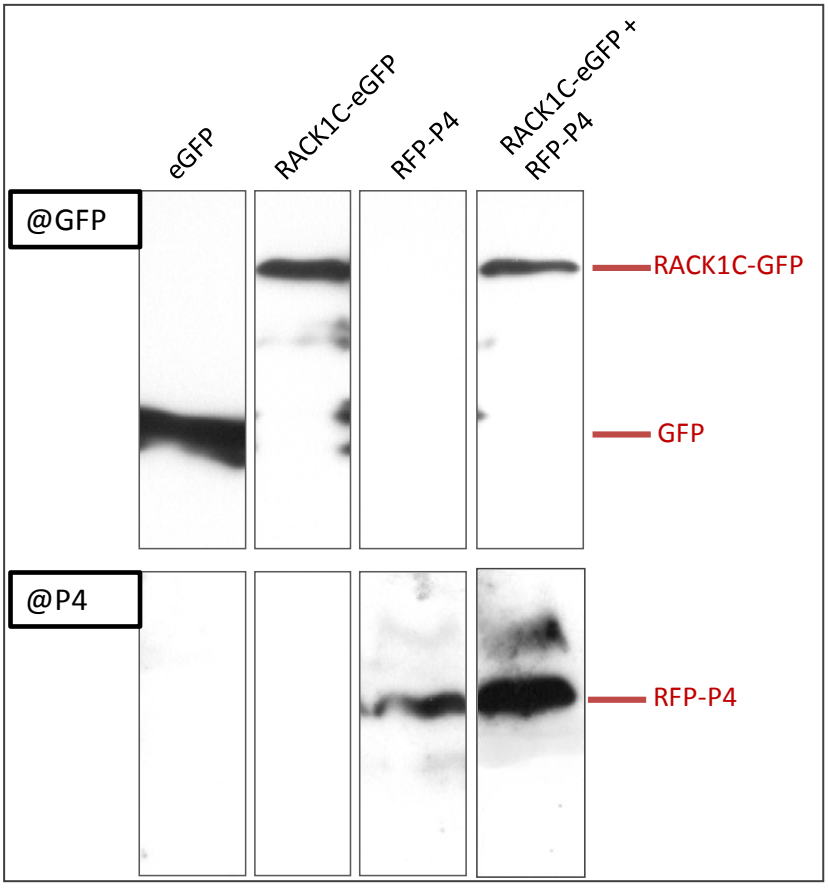


Figure 61 : Expression des protéines eGFP, RACK1C-eGFP, et RFP-P4. Western blot (@eGFP et @P4) pour détecter l'expression de la protéine eGFP, et des protéines de fusion RFP-P4 et RACK1C-eGFP dans des extraits de *N. benthamiana* 48 h après infiltration ou co-infiltration.

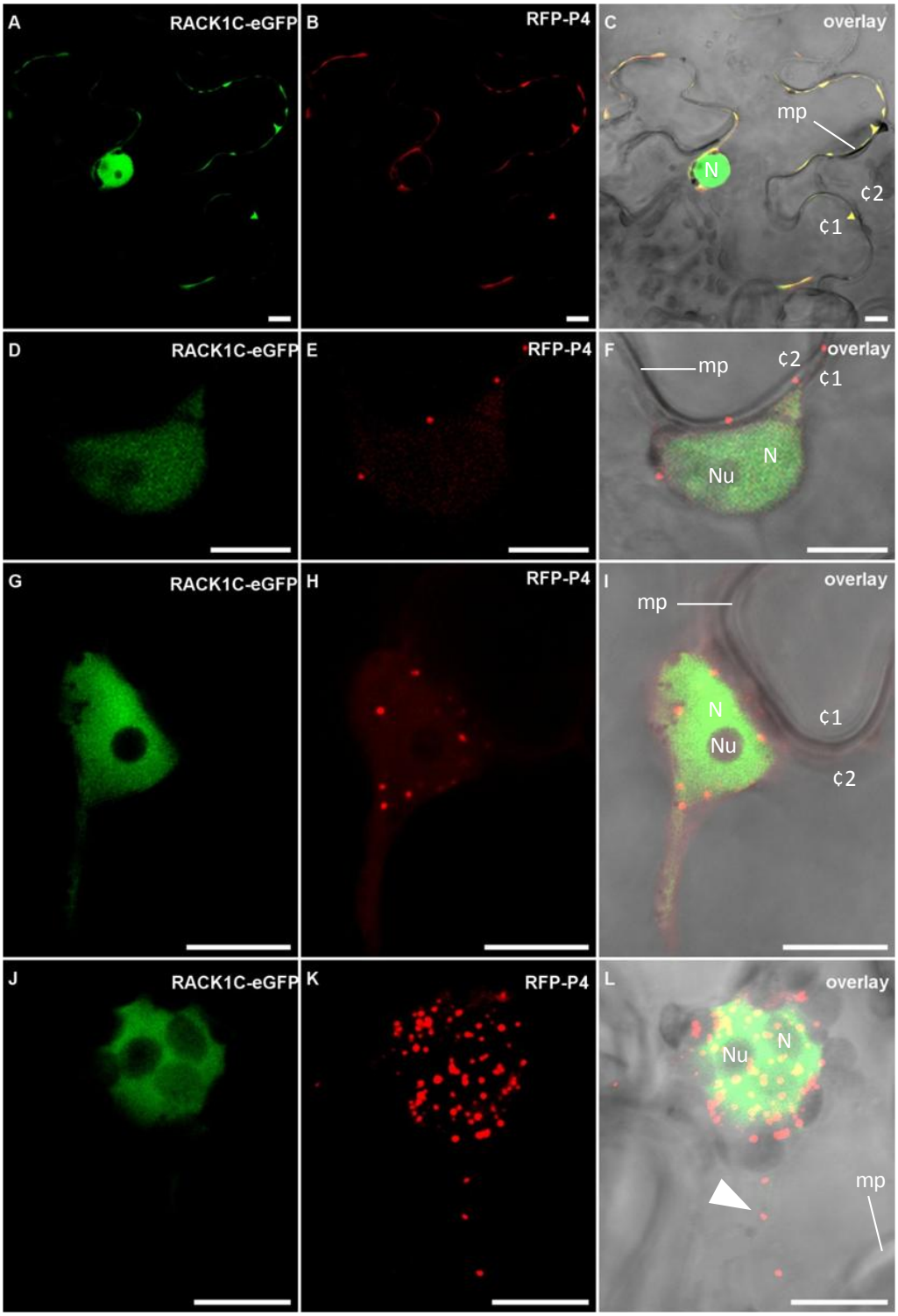


Figure 62 : Observation de la localisation subcellulaire de RFP-P4 et RACK1C-eGFP lors d'une co-infiltration. La protéine RACK1C possède toujours une localisation nucléo-cytoplasmique **(A, D, G, J)**. La protéine P4 est parfois, mais très rarement, présente dans le cytosol où il y a une co-localisation avec RACK1C indiquée par une couleur jaune après superposition des deux images **(B-C).** La P4 est parfois présente dans des ponctuations au niveau de la membrane plasmique qui semblent être des plasmodesmes **(E-F)**, mais la localisation de la RFP-P4 est majoritairement dans les vésicules péri-nucléaires qui sont en très grand nombre, et qui présentent parfois une mobilité (flèche) entre la membrane plasmique et la périphérie nucléaire **(H-I, K-L)**. La couleur jaune de l'image **L** ne provient pas d'une co-localisation mais simplement d'une superposition des vésicules rouges au-dessus du nucléoplasme vert.

N : noyau ; Nu : nucléole ; ¢ : cellule ; mp : membrane plasmique. Echelle = 10 µm

3.6 Accumulation du TuYV dans des mutants d'*A. thaliana* affectés dans l'expression des protéines CDA1, RACK1A, et RACK1C

i) Présentation et caractérisation des lignées KO

L'interaction entre les protéines candidates et la P4 n'a pas pu être vérifiée *in planta* par microscopie confocale, en raison de difficultés techniques rencontrées pour la visualisation de la protéine de fusion CDA1:eGFP, et en raison d'une absence de co-localisation entre la P4 et RACK1C. Néanmoins, l'accumulation du TuYV-WT dans des *A. thaliana* affectées dans l'expression de ces protéines a été analysée.

Trois lignées d'*A. thaliana* ont été sélectionnées dans les banques de mutants via l'*European Arabidopsis Stock Centre*. Le tableau et la **Figure 63** ci-dessous présentent les caractéristiques des trois lignées.

Pour le gène CDA1, la lignée SALK_061765C possède une insertion du T-DNA dans une région couvrant le promoteur et le début du gène. Les lignées SAIL_199_A04 et SAIL_408_D08 possèdent respectivement une insertion dans le gène de RACK1C, ou dans le promoteur et le début de gène de RACK1A. Dans le cas des protéines RACK1, nous avons aussi choisi d'étudier l'accumulation du virus dans les plantes affectées dans l'expression de RACK1A en raison de la redondance de fonction entre les trois protéines et de la prédominance d'expression de RACK1A par rapport aux deux autres (**Figure 53**) (Guo & Chen, 2008).

Gène	Protéine	Lignée	Caractérisation	Position de l'insertion
At2g19570	CDA1	SALK_061765C	Homozygote	Promoteur et début du gène
At3g18130	RACK1C	SAIL_199_A04	Hétérozygote	Milieu de gène
At1g18080	RACK1A	SAIL_408_D08	Hétérozygote	Promoteur et début du gène

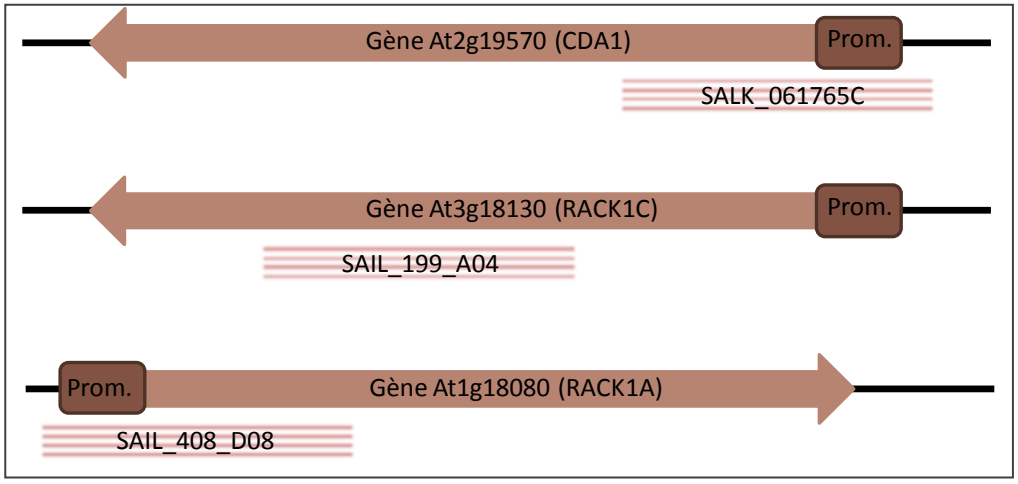


Figure 63 : Présentation schématique de l'insertion du T-DNA dans les lignées SAIL et SALK d'*A. thaliana* affectées dans l'expression des protéines CDA1, RACK1C et RACK1A. Les gènes sont présentés par des flèches brunes dont la direction indique le sens de la transcription. Les promoteurs sont présentés par des carrés bruns. L'insertion du T-DNA est signalée par un rectangle rouge rayé de blanc.

L'insertion du T-DNA dans le gène ciblé se fait dans un seul allèle au moment de la transformation (hétérozygotie). Ainsi, pour avoir une inhibition totale de l'expression d'un gène (mutant Knock-Out ou KO), il faut réaliser des auto-fécondations des plantes mutantes hétérozygotes et sélectionner, dans la descendance, les plantules possédant une insertion du T-DNA dans les deux allèles du gène (homozygotie). En ce qui concerne la lignée SALK_061765C (*cda1*), cette sélection de plantes homozygotes avait été réalisée au préalable. Nous avons juste confirmé l'homozygotie avant d'inoculer ces plantes avec le

TuYV-WT (**Figure 64 A**). En ce qui concerne les lignées SAIL_199_A04 (*rack1c*) et SAIL_408_D08 (*rack1a*), j'ai effectué des autofécondations afin de sélectionner les lignées homozygotes (exemple avec *rack1a* en **Figure 64 B**).

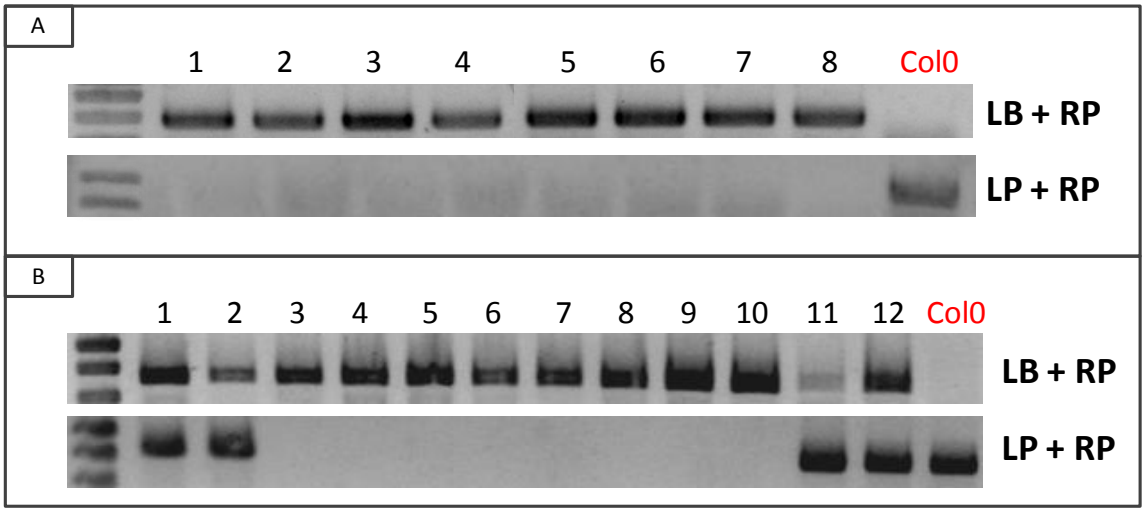


Figure 64 : Caractérisation des lignées d'*A. thaliana* mutées dans les gènes *CDA1* et *RACK1A*. Une PCR avec deux couples d'amorces permet de vérifier si l'insertion du T-DNA est présente ou non dans les deux allèles du gène (voir Matériel et Méthodes). **A) Vérification de la lignée homozygote *cda1***. Contrairement au témoin Col-0, les huit plantes de la lignée *cda1* montrent une amplification du fragment de PCR comprenant une partie de la séquence du T-DNA (couple d'amorces LB+RP) et aucune amplification du gène muté (couple d'amorces LP+RP). Les huit plantes possèdent une insertion dans les deux allèles et sont donc homozygotes. **B) Sélection des plantes homozygotes de la lignée *rack1a***. En suivant un procédé identique à celui ayant permis la caractérisation de la lignée homozygote *cda1*, différents couples d'amorces ont été utilisés pour caractériser des plantules homozygotes *rack1a*. Seules les plantes 3 à 10 sont homozygotes pour l'insertion du T-DNA, et les plantes 1, 2, 11 et 12 sont hétérozygotes. Une étude similaire a été réalisée pour sélectionner les plantes homozygotes *rack1c*.

ii) Accumulation du TuYV dans les mutants *cda1*, *rack1a* et *rack1c*

Les plantes de deux lignées homozygotes *cda1* (*cda1-1 et cda1-2*) ont été inoculées par puceron avec le TuYV-WT. Ces deux lignées ont été obtenues par autofécondation des plantes homozygotes numérotées 1 et 2 dans la **Figure 64**. Les pucerons ont acquis le virus à partir d'une solution virale purifiée puis ont été déposés, à raison de cinq pucerons par plante, sur vingt plantes par lignée homozygote. Des plantes Col-0 ont été inoculées de façon similaire. L'accumulation du virus a ensuite été testée à 12 et 18 dpi par un test ELISA.
Aucune différence significative d'accumulation du virus n'a pu être observée entre les plantes témoins Col-0 et les deux lignées homozygotes *cda1-1* et *cda1-2* à 12 ou 18 jours post-inoculation (**Figure 65**). A 12 dpi, le pourcentage de plantes infectées est de 58% pour Col-0, de 66 % pour *cda1-1* et 50 % pour *cda1-2*. A 18 dpi les deux lignées mutées d'*A. thaliana* ainsi que les Col-0 sont infectées à 90 % par le virus. Ces résultats ne suggèrent pas d'implication de la protéine CDA1 dans le cycle du TuYV.

Concernant les protéines RACK1A et RACK1C, des lignées homozygotes appelées *rack1a* et *rack1c* ont été agro-inoculées avec le TuYV-WT. L'accumulation du virus a ensuite été testée à 12 et 18 dpi par un test ELISA (**Figure 66**). A 12 et 18 dpi, 100% des plantes inoculées sont infectées par le TuYV-WT. Aucune différence significative d'accumulation du virus n'a pu être observée par ELISA entre les plantes témoins Col-0 et les deux lignées homozygotes *rack1c* et *rack1a* à 12 ou 18 jours post-inoculation. Ce résultat a été confirmé

par une RT-PCR quantitative amplifiant un fragment du génome viral et réalisée sur des extractions d'ARN totaux après prélèvement des feuilles à 18 dpi (résultats non montrés).

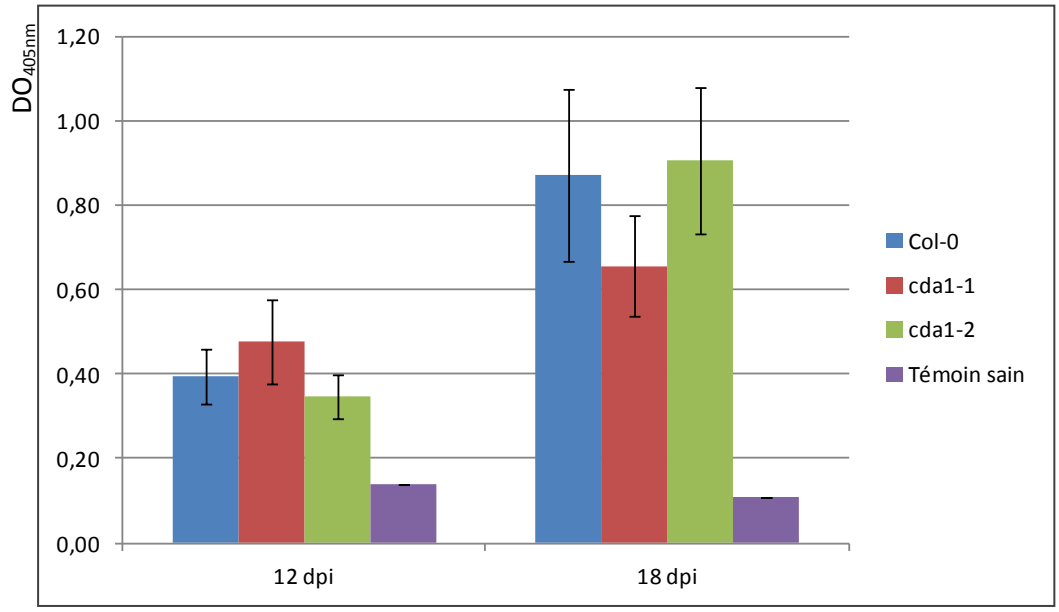


Figure 65 : Accumulation du TuYV-WT dans les lignées *cda1*. Test ELISA effectué à 12 et 18 dpi sur 20 plantes de chaque lignée inoculées par pucerons avec le TuYV-WT. Les valeurs données correspondent à la moyenne de toutes les mesures de DO obtenues, à l'exception des plantes ayant échappé à l'infection par le TuYV-WT.

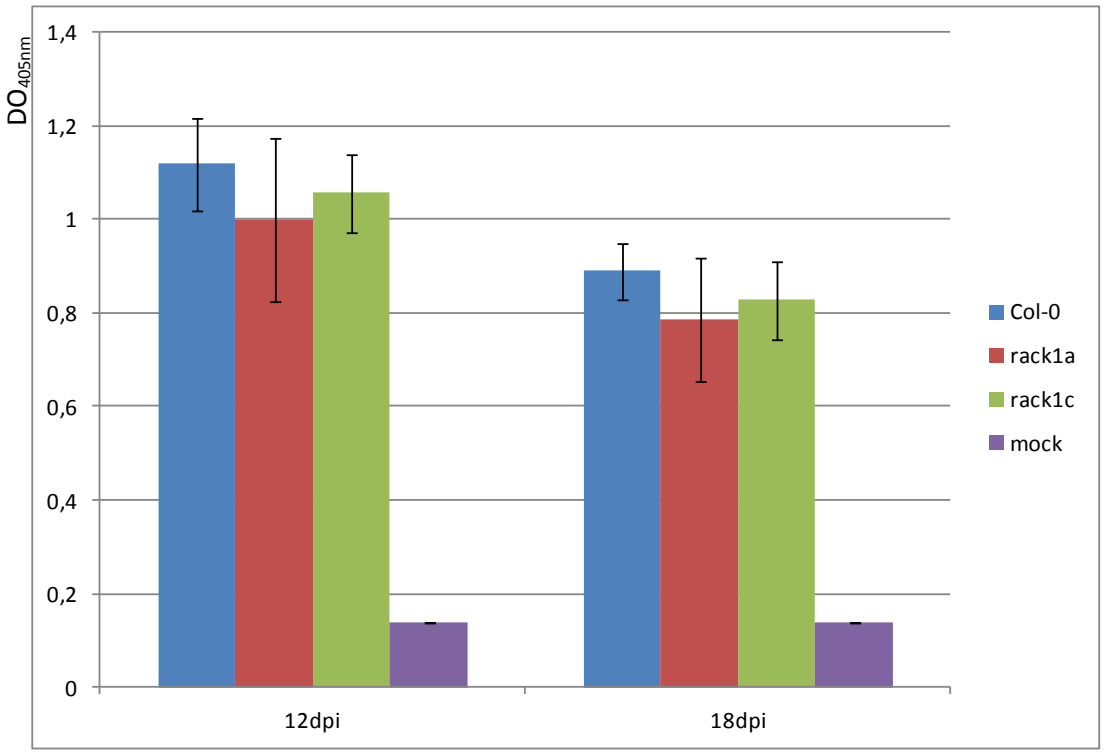


Figure 66 : Accumulation du TuYV-WT dans les lignées *rack1a* et *rack1c*. Test ELISA effectué à 12 et 18 dpi sur 20 plantes de chaque lignée agro-inoculées avec le TuYV-WT. Les valeurs données correspondent à la moyenne de toutes les mesures de DO obtenues, aucune plante n'ayant échappé à l'infection par le virus.

iii) Obtention de plantes doubles mutantes *rack1c-rack1a*

En raison de la forte redondance de fonction entre les trois protéines RACK1 (A, B et C), l'absence d'expression d'une des trois protéines dans les simples mutants d'*A. thaliana* peut être complémentée par l'une des deux restantes. Des croisements entre les lignées homozygotes *rack1a* et *rack1c* ont donc été réalisés afin d'obtenir des doubles homozygotes *rack1a-rack1c*. La caractérisation de ces plantes double-mutant est en cours. Un phénotype particulier de croissance réduite est attendu pour ces plantes doubles homozygotes *rack1a-rack1c* (**Figure 53**). Les plantes mutantes seront ensuite inoculées par pucerons avec le TuYV-WT afin d'analyser si l'absence des deux protéines RACK1A et RACK1C perturbe le cycle viral.

3.7 Accumulation du TuYV dans les plantes sur-exprimant les protéines CDA1 et RACK1C

Pour étudier *in vivo* l'effet des protéines candidates CDA1 et RACK1C sur le cycle viral, il est aussi possible de sur-exprimer ces protéines dans les plantes. En effet, en raison de la redondance de fonction des protéines dans le règne végétal, il est possible que la suppression des protéines n'entraine aucun effet sur l'accumulation du virus puisque d'autres protéines de plantes prennent le relais. A l'inverse, la sur-expression peut permettre la stimulation d'une réaction et peut aboutir à l'observation d'une modification du cycle viral.

Des *A. thaliana* Col-0 ont été transformées par la méthode de floral dip à l'aide du plasmide Gateway® permettant l'expression constitutive d'une protéine fusionnée en C-terminal à un tag HA (pGWB14). Les graines ont été semées sur un milieu nutritif additionné de kanamycine afin de sélectionner les plantules transformées. L'expression des protéines CDA1-HA et RACK1C-HA dans les plantes *CDA1-HA+* et *RACK1C-HA+* a été vérifiée par Western blot (**Figure 67**). Alors que toutes les plantes résistantes à la kanamycine expriment la protéine RACK1C-HA (36 kDa), seules trois des treize plantes transformées résistantes à l'antibiotique expriment la protéine CDA1-HA (32 kDa). L'autofécondation de ces plantes a permis l'obtention de plusieurs lignées sur-exprimant les protéines d'intérêt. L'inoculation de ces plantes transgéniques avec le TuYV-WT sera prochainement réalisée.

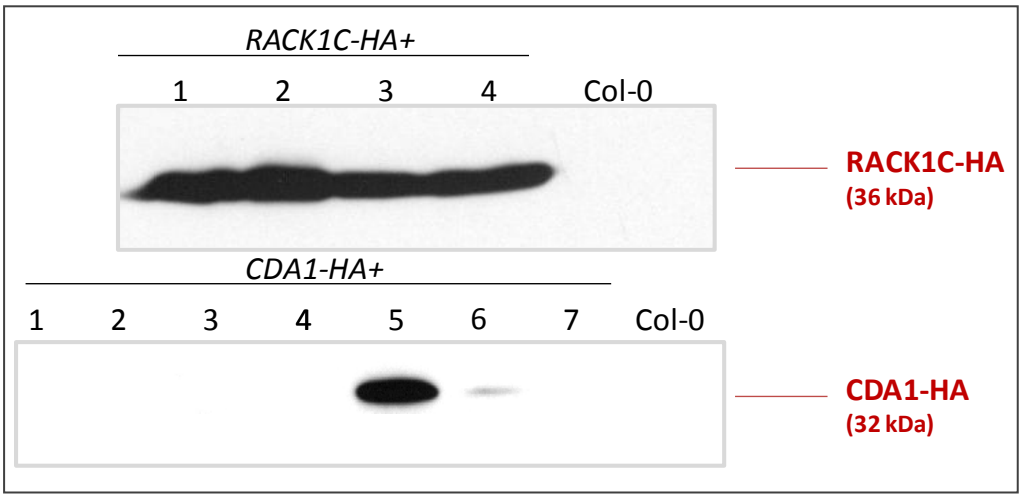


Figure 67 : Expression des protéines de fusion RACK1C-HA et CDA1-HA dans les *A. thaliana* transformées. Western blot (@HA) effectué sur une extraction de protéines totales. Sur les plantules repiquées en terre après sélection sur le milieu de sélection de transformation, 4/4 expriment bien la protéine RACK1C-HA et 3/13 expriment CDA1-HA (seul le résultat de 7 extractions de plantes transformées est présenté).

3.8 Spécificité de l'interaction $P4_{TuYV}$/CDA1 ou $P4_{TuYV}$/RACK1C, et tests d'auto-association de différentes P4 des *Luteoviridae*

Lorsque l'on on analyse les protéines P4 de différentes espèces virales appartenant à la famille des *Luteoviridae*, on observe que les séquences de ces protéines sont remarquablement bien conservées dans un même genre (**Tableau 10**). Nous avons donc étudié l'interaction des P4 du PLRV, du CABYV et du BYDV avec les protéines CDA1 et RACK1C dans le système double hybride dans la levure.

	TuYV	PLRV	CABYV	BYDV-PAV
TuYV	100	54,7	54,7	30,2
PLRV		100	85,5	32,6
CABYV			100	33
BYDV				100

Tableau 10 : Identité des séquences protéiques entre les P4 exprimées par différents membres de la famille des *Luteoviridae*. Le TuYV, le PLRV et le CABYV appartiennent au genre *Polerovirus* et le BYDV au genre *Luteovirus*. Les pourcentages d'identité ont été calculés avec le logiciel « SIM - Alignment Tool for protein sequences » (source : http://web.expasy.org/sim).

Les séquences des protéines P4 des polérovirus TuYV, CABYV, PLRV et du lutéovirus BYDV ont été introduites par clonage classique dans les vecteurs pGBKT7 et pGADT7. Après avoir vérifié la bonne expression de ces protéines dans la levure par western blot (figure non montrée ici), la capacité d'auto-association de ces quatre P4, et leur capacité à activer la transcription, ont été étudiées. Aucune P4 n'est capable d'activer la transcription, et seule la P4 du BYDV s'auto-associe dans la levure (**Figure 68**).

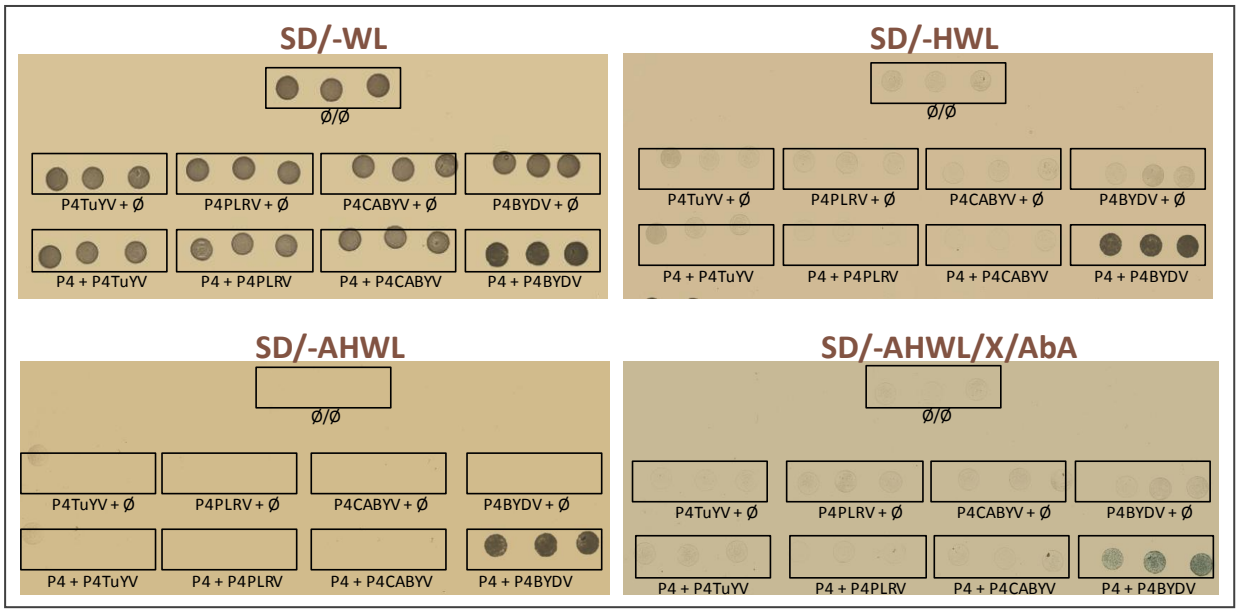


Figure 68 : Tests d'auto-association et d'activation de la transcription des P4 du TuYV, du PLRV, du CABYV et du BYDV. Les levures ont été doublement transformées avec les vecteurs pGBKT7-P4 et pGDAT7-vide (P4 + Ø) pour les tests d'activation de la transcription, et avec les vecteurs pGBKT7-P4 et pGADT7-P4 pour les tests d'auto-association (P4 + P4). Les transformations avec les deux vecteurs vides (Ø/Ø) servent de témoin. Les trois gouttes correspondent à trois colonies prises au hasard comme indiqué dans le Matériel et Méthodes. Les levures ont été cultivées à 28°C pendant 5 jours.

Dans un second temps, l'interaction des trois P4 avec les protéines CDA1 et RACK1C a été testée grâce au système Y2H. Les levures ont été doublement transformées avec les plasmides pGBKT7-P4 et pGADT7-candidats, puis étalées sur les milieux sélectifs. Les

résultats obtenus montrent que la P4 du PLRV interagit fortement avec RACK1C et faiblement avec CDA1. La P4 du BYDV possède la même capacité d'interaction que la P4 du TuYV et se lie aux deux protéines cellulaires. Enfin, la P4 du CABYV n'interagit avec aucune des deux protéines cellulaires (**Figure 69**).

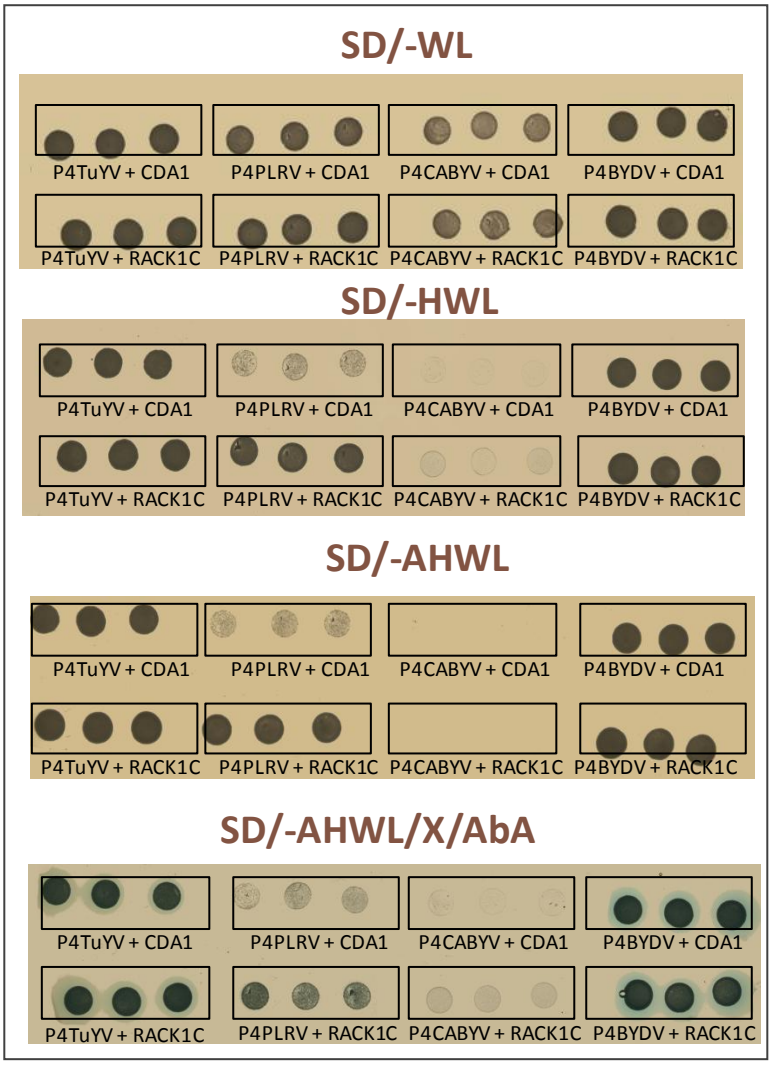


Figure 69 : Tests d'association des P4 du TuYV, du PLRV, du CABYV et du BYDV avec les protéines CDA1 et RACK1C. Les levures ont été doublement transformées avec les vecteurs pGBKT7-P4 et pGADT7-CDA1 ou RACK1C. Les trois gouttes correspondent à trois colonies prises au hasard comme indiqué dans le Matériel et Méthodes. Les levures ont été cultivées à 28°C pendant 5 jours.

3.9 Conclusions et perspectives de la recherche des partenaires cellulaires de la P4

L'objectif de cette étude était de rechercher les partenaires protéiques cellulaires de la protéine de mouvement P4 du TuYV dans le but de mieux comprendre son rôle dans le cycle viral. Par un criblage en double hybride dans la levure de banques d'ADNc d'*A. thaliana*, quatre candidats potentiels ont été identifiés parmi lesquels les protéines CDA1 et RACK1C ont été étudiées plus amplement.

Aucune expérience réalisée au cours de cette thèse n'a pour l'instant permis de confirmer le rôle de CDA1 dans le cycle du TuYV. L'inoculation prochaine des plantes sur-exprimant la protéine CDA1 devrait nous renseigner sur l'implication possible de cette protéine dans le cycle du virus.

Dans le cas de RACK1C, bien qu'aucune co-localisation avec la protéine P4 n'ait pu être observée en microscopie confocale, à l'exception d'une co-localisation observée très rarement dans le cytoplasme, il semble cependant que l'expression de cette protéine entraine une relocalisation de la P4 vers les vésicules autour du noyau. Ce résultat suggère que l'expression de RACK1C perturbe des réactions cellulaires qui modifient la localisation de P4. Il se pourrait également que ces deux protéines interagissent mais à des moments précis du cycle viral (étape précoce ou tardive du cycle) ou de manière très transitoire dans le cytoplasme. D'autre part, les localisations subcellulaires ont été réalisées hors contexte viral et il est envisageable que la localisation des protéines cellulaires soit modifiée par l'infection virale. Les expériences de microscopie confocale devront donc être reproduites en co-infiltrant le TuYV-WT avec les protéines candidates.
Bien que l'inoculation des simples mutants d'*A. thaliana* affectés dans l'expression de RACK1A ou de RACK1C n'ait pas permis de confirmer leur implication dans le cycle viral, ces expériences seront également prochainement poursuivies par l'inoculation des doubles mutants *rack1a-rack1c* et des plantes sur-exprimant RACK1C.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES GENERALES DU TRAVAIL DE THESE

Les résultats présentés dans ce mémoire de thèse concernent principalement le mouvement à longue distance du virus de la jaunisse du navet (*Turnip yellows virus*, TuYV), mais le virus de la jaunisse des cucurbitacées (*Cucurbit aphid-borne yellows virus*, CABYV) étant plus adapté pour répondre à certaines questions biologiques posées au cours de cette thèse, il nous a également servi de modèle d'étude. Le transport vasculaire est une étape du cycle viral essentielle à l'infection systémique de la plante, mais est également crucial pour la dispersion du virus dans la nature, puisque c'est au niveau des tubes criblés que s'effectue l'acquisition du virus par le puceron. Avant d'amorcer ce travail de thèse, plusieurs éléments sur le mouvement à longue distance des polérovirus étaient connus : les particules des polérovirus avaient été observées dans la sève et pouvaient constituer, en plus d'un réservoir de virus pour l'acquisition par les pucerons, l'unique mode de transport du virus à longue distance. La protéine majeure de la capside (CP) semblait être la seule protéine virale essentielle au transport systémique du virus. A l'inverse, ni la protéine mineure de la capside (RT*), ni la protéine conventionnelle de mouvement (P4) ne semblaient strictement nécessaires au mouvement bien que participant au mécanisme. Mon travail de thèse s'est articulé autour de deux grands axes : (i) l'identification de la nature du complexe viral impliqué dans le mouvement à longue distance des polérovirus; et (ii) l'étude du rôle de la protéine P4 du TuYV dans le mouvement du virus par la recherche des partenaires cellulaires de cette protéine.

Trois protéines phloémiennes interagissent avec l'ARN viral du CABYV.

Le premier objectif de mon travail de thèse a été d'identifier des protéines phloémiennes capables de fixer *in vitro* l'ARN génomique viral, puis d'évaluer la possibilité que ces complexes RNP se forment *in vivo* et permettent le mouvement du virus dans les tubes criblés. Deux modèles d'études ont été utilisés : le CABYV pour sa capacité à infecter le concombre *C. sativus* à partir duquel de grandes quantités de sève peuvent être récoltées, et le TuYV qui infecte *A. thaliana*, un hôte de choix pour l'identification des candidats. De cette étude, trois protéines phloémiennes de *C. sativus* ont été identifiées comme des candidats susceptibles d'assurer le transport de complexes RNP viraux dans les tubes criblés. Il s'agit des lectines phloémiennes CsLec17 et CsLec26, et de la serpine. Les outils pour mener la validation fonctionnelle chez *C. sativus* n'étant pas facilement accessibles (mutants KO ou sur-expresseurs, VIGS) nous avons choisi de mener la validation fonctionnelle uniquement sur les orthologues de CsLec26 et CsLec17 chez *A. thaliana*, à savoir les protéines AtPP2-A1 et AtPP2-A2 respectivement. Les expériences faisant appel aux protéines AtPP2-A1 et AtPP2-A2 purifiées n'ont pas permis de confirmer leur rôle dans le cycle viral. On peut donc se questionner sur la signification biologique de l'interaction observée *in vitro* entre l'ARN viral et les lectines. Etant donnée la non-spécificité de l'interaction PP2/ARN (Gomez & Pallás, 2004; Gómez & Pallás, 2001; Owens *et al.*, 2001), il est probable que, dans la cellule, des mécanismes additionnels permettent de moduler à la fois ces interactions et la mobilité des complexes RNP formés. L'absence de régulation de l'interaction PP2/ARN conduirait tous les ARN, y compris les ARN viraux, à interagir avec les protéines PP2 pour former des complexes RNP mobiles, ce qui n'est pas le cas. Des expériences de co-immunoprécipitation de complexes viraux RNP réalisées à partir de sève de *C. sativus* infectés et en utilisant des anticorps dirigés contre les PP2 permettraient de vérifier *in planta* l'existence de tels complexes.

Afin de poursuivre ce travail, les expériences de validation fonctionnelle pourraient aussi être effectuées avec la serpine (CsPS-1), une protéine pour laquelle aucune interaction avec les ARN n'a encore été recherchée. La super-famille des serpines existe aussi chez *A. thaliana*, mais aucun véritable orthologue de CsPS-1 localisé dans le phloème n'a jusqu'à

présent été identifié. La transformation stable en culture *in vitro* de *C. sativus* étant un processus difficile à mettre en œuvre, il serait plus aisé de réaliser la transformation d'*A. thaliana* pour observer l'effet d'une sur-expression de la protéine CsPS-1 sur le cycle viral. Des expériences de co-immunoprécipitation peuvent aussi être envisagées pour capturer des complexes RNP viraux dans la sève de *C. sativus* infectés par le CABYV en utilisant un anticorps polyclonal dirigé contre la serpine BSZx de *Hordeum vulgare* et reconnaissant aussi CsPS-1 (La Cour Petersen *et al.*, 2005).

Les virions constituent l'unique mode de transport à longue distance du TuYV

J'ai poursuivi l'identification du complexe viral impliqué dans le mouvement à longue distance des polérovirus par l'étude du mouvement de mutants du TuYV. L'objectif était d'inhiber la formation de particules virales en introduisant des modifications mineures dans la séquence de la CP, tout en espérant conserver les autres fonctions de cette protéine pour le cycle viral. L'étude de ces mutants viraux devait nous permettre de déterminer si les virions sont effectivement la seule forme de transport du virus à longue distance. Par rapport aux précédents travaux, nous avons utilisé une méthode plus sensible de détection du virus dans les feuilles non-inoculées qu'est la RT-PCR. De plus, étant donnée l'absence de détection par ELISA des mutants viraux ne formant pas de particules virales, l'utilisation de la RT-PCR était nécessaire pour détecter les ARN viraux des mutants dans les feuilles non-inoculées après leur transport sous forme de complexes RNP.

Nous avons observé que certaines modifications d'acides aminés dans la séquence de la CP (S87G et R7AR8A) n'empêchent ni la formation de particules virales ni le transport à longue distance du virus. Cependant, la majorité des mutations qui ont été introduites dans la séquence de la CP bloque la formation de particules virales et restreint les mutants viraux aux seuls tissus inoculés. Ces premières observations nous ont permis de confirmer l'importance de la formation des particules virales dans le transport à longue distance du TuYV.

Afin d'éliminer l'hypothèse que des complexes RNP existent mais requièrent la présence d'une CP sauvage totalement fonctionnelle, la CP a été apportée en *trans* via des *A. thaliana* transgéniques exprimant cette protéine de manière constitutive (P35S:CP). Cet apport exogène de CP a permis de restaurer le transport à longue distance de mutants défectifs, et la restauration du mouvement a coïncidé avec la formation de particules virales constituées, en partie ou entièrement, par la CP exprimée dans les plantes transgéniques. Ces résultats nous permettent de conclure avec confiance que les virions sont donc essentiels et certainement l'unique mode de transport à longue distance des polérovirus. Il existe donc une très forte pression évolutive sur ces virus quant à la formation des particules virales.

Un cycle viral P4-indépendant existe pour le TuYV mais est moins efficace que le cycle P4-dépendant

Le deuxième objectif de mon travail de thèse a été l'étude du rôle de la P4 dans le cycle viral, une protéine prédite comme protéine de mouvement conventionnelle. Les expériences préalables avaient montré qu'en absence de p17, le PLRV peut infecter de manière systémique les hôtes *N. benthamiana* et *N. clevelandii*, mais pas *Solanum tuberosum* et *Physalis floridana* (Lee *et al.*, 2002). Dans le cas du TuYV, la P4 n'est pas nécessaire à l'infection systémique de *N. clevelandii* (Ziegler-Graff *et al.*, 1996). Dans le cas du PLRV, ces résultats suggéraient un rôle hôte-dépendant pour la P4.

En inoculant différentes espèces végétales avec un mutant du TuYV n'exprimant plus la P4, j'ai pu confirmer que la présence de la P4 du TuYV n'est pas strictement essentielle à l'infection systémique de quatre hôtes, *M. perfoliata*, *A. thaliana*, *N. benthamiana*, et *N. clevelandii*. Toutefois, l'infection de ces plantes par le mutant de la P4 reste très limitée

(nombre restreint de plantes infectées, accumulation faible du virus), démontrant que cette protéine favorise l'infection par le virus. Ces résultats appuient l'hypothèse précédemment évoquée de l'existence d'un mouvement systémique efficace du virus qui est dépendant de P4 et un mouvement peu efficace qui est indépendant de P4. Notre étude n'a cependant porté que sur des hôtes de laboratoire, et non les hôtes naturels du virus (laitue, navet), pour lesquels il est envisageable que la P4 soit strictement nécessaire à l'infection du virus. Ceci est notamment le cas du PLRV pour lequel la P4 est nécessaire à l'infection systémique de son hôte naturel *S. tuberosum*.
Les expériences que nous avons menées ne nous permettent pas de conclure avec certitude quant à une implication de la P4 dans le mouvement à longue distance du virus dans ces différentes hôtes. En effet, l'accumulation plus faible du mutant de la P4 dans les feuilles non-inoculées pourrait être lié à une réduction du mouvement à courte distance en absence de la protéine P4.

Identification de deux partenaires potentiels de la P4 du TuYV

Pour tenter de mieux comprendre le rôle de la P4 dans le cycle viral, et en prenant comme modèle le TuYV, nous avons recherché les protéines cellulaires interagissant avec la P4 par un criblage sans *a priori* de banques d'ADNc d'*A. thaliana* avec la méthode du double hybride dans la levure. On peut envisager que les partenaires de la P4 aient une action bénéfique sur le cycle viral, en favorisant le mouvement du virus par exemple ou, au contraire, un effet délétère en inhibant l'action de la P4, agissant alors comme des protéines de défense. Dix candidats ont ainsi été identifiés et deux d'entre eux ont été retenus pour la poursuite de l'étude en raison de l'absence d'activation de la transcription des gènes rapporteurs par ces deux protéines. La Cytidine Déaminase 1 (CDA1) a été identifiée à partir de la banque de cellules compagnes d'*A. thaliana,* et la Sous-unité C du Récepteur pour la Kinase 1C Active (RACK1C) a été identifiée à partir de la banque totale d'*A. thaliana*.

La validation fonctionnelle par l'utilisation de mutants KO d'*A. thaliana* n'a pas permis de confirmer pour l'instant un rôle de RACK1C ou de CDA1 dans le cycle viral du TuYV. La forte redondance de fonction existant dans le règne végétal entre les gènes d'une même famille peut expliquer l'absence d'un effet sur l'accumulation du virus dans les plantes des lignées mutantes. Je rappelle en effet que RACK1C possèdent 2 homologues RACK1A et B, et qu'il existe neuf protéines de la famille des CDA chez *A. thaliana*. Seule l'obtention de plantes affectées dans l'expression de plusieurs gènes de ces familles multigéniques, ou encore de plantes sur-exprimant la protéine candidate, nous permettrait d'analyser le rôle de ces protéines dans le cycle viral.
La seule indication que nous ayons à l'heure actuelle sur l'implication potentielle de RACK1C dans le cycle du TuYV provient des expériences de localisation par microscopie confocale. Bien qu'aucune co-localisation des protéines P4 et RACK1C n'ait pu être visualisée, l'expression de RACK1C entraine une relocalisation quasi-totale de la P4 depuis les plasmodesmes vers les vésicules périnucléaires, suggérant une interaction, même transitoire, de ces deux protéines.

Quels pourraient être les fonctions des protéines CDA1 et RACK1C dans le cycle infectieux des polérovirus?
La protéine CDA1 du règne végétal est assez peu étudiée et la fonction des enzymes CDA végétales reste encore à élucider. Il est cependant connu que son action de déamination des cytidines ne s'effectue pas sur les ARN (Faivre-Nitschke *et al.*, 1999; Salone *et al.*, 2007). On peut ainsi éliminer l'hypothèse d'une action dans la défense antivirale, comme c'est le cas pour les protéines CDA du règne animal qui modifient les ARN pour en inhiber

l'expression (Faivre-Nitschke *et al.*, 1999; Schröfelbauer *et al.*, 2004). La protéine CDA1 pourrait intervenir dans la régulation de voies métaboliques, mais il est difficile d'émettre une hypothèse quant à la fonction de cette protéine dans le cycle viral.
La protéine RACK1 est au centre de plusieurs voies de transduction de signal (*scaffold protein*), et interagit ainsi avec un grand nombre de partenaires protéiques, dont des protéines kinases (Guo & Chen, 2008; Kadrmas *et al.*, 2007; Ullah *et al.*, 2008). Elle pourrait servir d'intermédiaire entre la protéine P4 et une kinase cellulaire, afin de favoriser la phosphorylation de la protéine de mouvement. Il a été montré que la p17 du PLRV est phosphorylée par une kinase membranaire de type PKC (Sokolova *et al.*, 1997). Une telle phosphorylation pourrait modifier la localisation, ou la fonction, de la P4. A titre d'exemple, la phosphorylation de la protéine 30K du TMV permet de moduler ses fonctions selon la position de la cellule infectée dans le front de migration (Haley *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 2005a; Oparka *et al.*, 1997). Un mécanisme similaire pourrait avoir lieu dans le cas des polérovirus.

Bien que notre travail se soit focalisé sur ces deux protéines, il serait intéressant de poursuivre l'étude des huit autres candidats identifiés lors du criblage des banques d'ADNc d'*A. thaliana*. Les six candidats ont été dans un premier temps écartés puisqu'ils activent fortement la transcription des gènes rapporteurs, mais cette caractéristique pourrait masquer des interactions réelles avec la protéine P4. Le rôle de protéines HSP, telle que la protéine DnaJ figurant parmi ces candidats, dans le cycle du *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) (Soellick *et al.*, 2000) et du *Potato virus Y* (Hofius *et al.*, 2007) a déjà été démontré. Il serait donc intéressant de se pencher sur ce candidat particulier. Néanmoins, comme toutes ces protéines appartiennent à des familles multigéniques, nous serions à nouveau confrontés au problème de redondance de fonction qui complique l'étape de validation fonctionnelle des candidats.

Poursuite du travail

Les résultats obtenus avec le mutant R7AR8A nous ont permis d'émettre l'hypothèse que les ARN génomiques encapsidés adoptent le même repliement dans toutes les capsides. Seule la présence d'un signal d'encapsidation unique sur l'ARN viral permet d'expliquer la reproductibilité des clivages de l'ARN encapsidé du mutant R7AR8A. Cette hypothèse d'un signal d'encapsidation présent sur l'ARN viral et nécessaire à la formation des virions est appuyée par les expériences menées avec les *A. thaliana* P35S:CP. Dans ces plantes, malgré l'expression constitutive de protéines CP sauvages, aucune particule virale n'a pu être observée en ISEM. Par contre, dès que l'ARN génomique est présent, les particules virales se forment. Il serait intéressant de localiser sur l'ARN génomique le signal d'encapsidation, encore inconnu chez les *Luteoviridae*. Ce signal n'est pas présent dans la séquence du domaine de RT, car un virus délété de cette partie du génome (mutant 6.4, (Brault *et al.*, 1995; Reutenauer *et al.*, 1993) est capable de former des particules virales. Ce signal n'est pas non plus présent dans la séquence de 37 nucléotides bordant le codon d'initiation de la CP, cette séquence étant supprimée chez le mutant NoCPRT4.3 qui peut être encapsidé par la CP_{WT} dans les plantes P35S:CP. On pourrait supposer que ce signal soit localisé plutôt dans la partie 5' du génome car l'ARN subgénomique, qui couvre la partie 3' de l'ARN viral, n'est à priori pas encapsidé.
Bien que l'ARN viral semble nécessaire à la formation des particules virales, il est cependant intéressant de signaler qu'au cours de leur formation, les particules sont capables d'intégrer des ARN non viraux ou des ARN viraux hétérologues.

- C'est le cas notamment de l'ARN très structuré du *Potato spindle tuber viroïd* (PSTVd) qui peut être encapsidé, et transmis de manière persistante par *M. persicae*, dans le cas

d'une co-infection avec le PLRV qui lui apporte les protéines de capside (Querci *et al.*, 1997). On peut, dans ce cas, envisager qu'une structure secondaire essentielle au démarrage de l'encapsidation soit également présente sur l'ARN du PSTVd. L'autre alternative serait que l'ARN viroïdal soit encapsidé avec l'ARN génomique du PLRV sans posséder de signaux particuliers.

- Ce phénomène de trans-encapsidation est aussi observé chez les virus du genre *Luteovirus* lors d'infections mixtes par différents isolats de BYDV (Wen & Lister, 1991). Comme il existe de fortes homologies de séquences entre ces virus, il est possible qu'ils possèdent le même signal d'encapsidation.
- Enfin, les associations existantes entre différentes espèces d'*Umbravirus* et de *Luteoviridae* peuvent aussi également être mentionnées. Ainsi, le PEMV-2 dépend de l'*Enamovirus* PEMV-1 pour son encapsidation et sa propagation par puceron (Demler *et al.*, 1994; Falk *et al.*, 1999), alors que le GRV est dépendant du *Groundnut rosette assistor virus* (GRAV) (Robinson *et al.*, 1999). Par ailleurs, des ARN satellites peuvent être encapsidés par la protéine de capside d'un virus de la famille des *Luteoviridae*. Il est intéressant de signaler que toutes ces molécules (ARN satellites et ARN génomiques du GRV et du PEMV-2) possèdent des séquences conservées aux extrémités 5' et 3' qui pourraient correspondre aux signaux d'encapsidation (Demler *et al.*, 1996). Les protéines de capside du PEMV-1 peuvent ainsi encapsider l'ARN satellite du GRV (Demler *et al.*, 1996). Par ailleurs, en utilisant différents mutants de l'ARN satellite du GRV, il a été montré que la longueur de la molécule d'ARN et/ou la présence de structures secondaires sont déterminantes pour la formation de virions (Robinson *et al.*, 1999).

Les résultats préliminaires obtenus après inoculation des *A. thaliana* P35S:CP avec le TuYV ouvrent une nouvelle voie de recherche quant au rôle potentiel de la CP lors des étapes précoces de l'infection. En effet, l'accumulation plus importante des ARN viraux dans les plantes P35S:CP suggère que la CP puisse agir au niveau de la réplication, la traduction, ou la stabilité des ARN viraux. Il faut signaler que les seules protéines virales présentes lors des premières étapes de l'infection sont les protéines présentes dans les particules virales à savoir la CP et la RT* qui forment les virions, et la VPg liée à l'extrémité 5' de l'ARN (la VPg du TuYV a récemment été détectée dans les virions : Ziegler-Graff, communication personnelle). Chacune de ces protéines peut donc potentiellement influencer les premières étapes du cycle viral, et la CP qui est la protéine majoritaire dans les virions, est un bon candidat pour assurer une telle fonction. Afin de mieux comprendre le rôle potentiel de la CP lors des étapes précoces de l'infection, des expériences complémentaires devront être réalisées. Pour quantifier de manière plus fine l'effet de la CP sur l'accumulation des ARN viraux, il faudra réaliser des réactions de qRT-PCR sur des extraits préparés à partir des P35S:CP infectées par le TuYV-WT. Pour analyser le rôle de la CP sur la traduction des protéines exprimées à partir de l'ARN génomique, la présence de la P0 et de la VPg (produit de clivage de la P1) pour lesquelles nous disposons d'anticorps, pourra être recherchée dans les plantes transgéniques infectées par le TuYV-WT.

Etude du mouvement à courte distance des polérovirus

Si l'ensemble de ce travail a porté sur l'étude du mouvement à longue distance du virus, de larges zones d'ombre persistent sur le mouvement à courte distance des polérovirus et il serait nécessaire de développer de nouvelles expérimentations pour tenter de mieux comprendre ce mécanisme. En effet, on ne connait toujours pas la nature du complexe viral de transport (virions ou complexes RNP), ni les protéines virales impliquées dans le

mouvement à courte distance. Il est encore difficile de savoir si les protéines CP et P4 sont requises pour ce transport. A l'heure actuelle, les outils nécessaires pour répondre à ces questions ne sont pas disponibles pour les polérovirus.

Il faut tout d'abord rappeler qu'en raison de la restriction de ces virus aux cellules du phloème, le mouvement à courte distance devrait se limiter au passage du virus entre les cellules compagnes et les cellules du parenchyme phloémien. Il est également possible que ces virus ne circulent pas de cellules compagnes à cellules du parenchyme vasculaire et que le mouvement à courte distance soit limité à un rapide transport entre deux cellules compagnes adjacentes ou proches avec un passage du virus dans les tubes criblés. Ce type de transport « de proche en proche » le long des tubes criblés nécessiterait une rétention (un accrochage) des particules le long de la membrane qui borde les cellules des tubes criblés pour que les virions ne soient pas entrainés par le flux de sève. Pour lever les zones d'ombre sur le mécanisme du transport des polérovirus à courte distance, il faut disposer d'outils nous permettant d'avoir accès à ces différents types de cellules. Même si la microscopie confocale n'est pas très adaptée à l'étude du tissu phloémien, l'équipe de Sylvie Dinant (INRA Versailles) a développé une technique de *peeling* des feuilles permettant de suivre la localisation de protéines fluorescentes dans les cellules du phloème (Cayla, 2012). De plus, cette équipe dispose de marqueurs permettant l'identification des cellules du phloème, comme par exemple les protéines de fusion pSUC2:PP2-A2-YFP, pSEOR1:SEOR1-GFP et pRTM1:GFP-RTM1 (Cayla, 2012). Ces outils pourraient être mis à profit pour étudier le cheminement des polérovirus entre les cellules du phloème.

Dans cette optique, il faudrait aussi disposer d'un virus fluorescent, mais à ce jour, et malgré plusieurs tentatives, le génome du TuYV n'a pas pu être modifié de façon à obtenir un virus systémique fluorescent (Ziegler-Graff, communication personnelle). Il est en effet difficile d'ajouter des séquences supplémentaires dans l'ARN des polérovirus, en raison de la contrainte de taille du génome pour la formation des particules virales icosaédriques. Tous les produits des gènes des polérovirus sont également nécessaires pour l'obtention d'une infection efficace des plantes, et il est difficilement envisageable de remplacer un gène, ou une partie, par la séquence d'une protéine fluorescente. De plus, des expériences antérieures ont montré que le gène de la GFP introduit dans le génome du PLRV était systématiquement éliminé de la séquence du virus au cours de la réplication (Nurkiyanova *et al.*, 2000).

Une solution envisageable serait l'obtention de plantes transgéniques exprimant, sous le contrôle d'un promoteur spécifique du phloème, un Chromobody® (*ChromoTek*) reconnaissant spécifiquement un épitope dirigé contre la particule virale, ou contre une protéine virale. Les Nanobody® sont les chaines lourdes d'un anticorps de camélidé reconnaissant un antigène. Ces anticorps de faible poids moléculaire (15 kDa) peuvent être couplés à un marqueur fluorescent tel que l'eGFP et sont alors appelés Chromobody® (42 kDa) (Rothbauer *et al.*, 2006). Cette technologie est déjà développée dans l'équipe pour localiser le virus du court noué (GFLV). Le Chromobody® nucléo-cytoplasmique est relocalisé au niveau de différents organites cellulaires lorsque la cellule est infectée, permettant ainsi d'identifier la localisation du virus ou des protéines virales (Hemmer et Ritzenthaler, communication personnelle). Cet outil puissant pourrait être développé pour suivre le mouvement du virus entre les cellules du phloème.

Afin de suivre finement le mouvement du virus, une solution alternative serait de visualiser directement l'ARN viral dans les cellules. Deux technologies existent à l'heure actuelle. Dans le système MS2, la CP du phage MS2 (CP_{MS2}) reconnaît de manière très spécifique et avec une bonne affinité une boucle d'ARN de 19 nucléotides (LeCuyer *et al.*, 1995). Lorsqu'on ajoute cette séquence dans un ARN cible, et qu'on exprime la protéine CP_{MS2} fusionnée à une protéine fluorescente, il est possible de visualiser l'ARN cible (Bertrand *et al.*, 1998; Zhang & Simon, 2003). Le même principe existe pour le système λN_{22} où un

peptide de 22 acides aminés provenant du phage λ (λN22), et fusionné à une protéine fluorescente, reconnaît de manière spécifique une boucle d'ARN de 15 nucléotides (Daigle & Ellenberg, 2007). Récemment, des vecteurs Gateway® permettant l'application chez les plantes de ces deux technologies ont été créés (Schönberger *et al.*, 2012).

Le petit mot de la fin

Ce travail de thèse a permis de répondre à la question de la nature du complexe viral impliqué dans le mouvement à longue distance des polérovirus, en prenant comme modèle d'étude le TuYV : les virions sont donc la seule entité virale permettant le transport vasculaire du virus. A ce titre, le TuYV est similaire aux *Alfalfa mosaic virus* et *Cucumber mosaic virus*, deux virus transmis par insectes pour lesquels il a été démontré que la formation de particules virales est nécessaire au transport à longue distance du virus (références dans Hipper et al., 2013). On peut se demander donc s'il n'existe pas une forte pression de sélection sur les virus transmis par insectes et plus particulièrement ceux appartenant à la famille des *Luteoviridae* pour conserver la formation des particules puisqu'elles représentent l'unique mode de propagation du virus de plante à plante via les pucerons (à la seule exception du PLRV qui peut aussi être transmis via les tubercules infectés).

Ce travail de thèse avait comme objectif principal d'obtenir des données génériques sur le mouvement à longue distance des polérovirus. On peut à présent se demander dans quelle mesure les résultats obtenus pourraient aider à la lutte contre ces virus transmis par puceron. Cette étude nous a permis de démontrer que seuls les virions et non des complexes RNP sont transportés à longue distance. L'entrée des virions dans les TC est donc une étape cruciale pour le mouvement à longue distance et pour la transmission par puceron. Le fait d'inhiber partiellement, ou totalement, cette étape pourrait servir non seulement à diminuer la charge virale présente dans la plante, mais aussi à limiter la propagation par puceron. Ainsi, cette étape clé du cycle viral pourrait être ciblée pour élaborer de nouvelles techniques de lutte contre le virus. Le fait de connaître les protéines cellulaires nécessaires à l'import des virions dans les TC pourrait être un atout. En effet, la sélection de variétés exprimant peu ou pas ces protéines pourraient être envisagée. Cependant, en raison de la présence presque systématique de familles multigéniques de protéines, il pourrait être plus judicieux d'identifier des protéines cellulaires dont l'expression inhibe l'import des virions dans les TC, comme les protéines codées par les gènes RTM qui bloquent le mouvement à longue distance de différents *Potyvirus* comme le *Tobacco etch virus* et le *Plum pox virus* (Alamillo, 2006; Cosson *et al.*, 2012; Mahajan *et al.*, 1998; Revers *et al.*, 2003). La sélection de variétés exprimant fortement des protéines inhibitrices du cycle viral des virus de la famille des *Luteoviridae* nécessite au préalable d'identifier de tels candidats en utilisant des techniques comme le Y2H ou le criblage de banques de mutants d'*A. thaliana* sur-exprimant des protéines (Marsch-Martinez *et al.*, 2002).

MATERIEL ET METHODES

1. Plantes, Virus et Pucerons

1.1 Matériel végétal

Le concombre (*Cucumis sativus*), de la famille des *Cucurbitaceae*, est un des hôtes naturels du CABYV (**Figure 70 A, B**). La variété « Marketer » a été utilisée pour les infections par le CABYV, ainsi que pour la collecte de sève phloémienne.
Les *Montia perfoliata*, de la famille des *Portulacaceae*, sont un hôte de choix pour le TuYV (**Figure 70 D, E**). En effet, ces petites plantes sont facilement agro-inoculables et montrent des symptômes de rougissement lors d'une infection systémique par le virus. Les *M. perfoliata* possédant rapidement une masse foliaire importante, elles ont également été utilisées pour la purification de particules virales.
Arabidopsis thaliana, de la famille des *Brassicaceae*, est la plante modèle en biologie végétale (**Figure 70 C**). L'écotype Col-0 a été choisi pour certaines expériences d'infection par le TuYV et pour les tests de transmission du virus. En raison de la grande taille de ses feuilles, l'écotype Cvi166 a quant à lui servi à la collecte d'exsudats phloémiens.
Trois lignées, provenant de deux collections de mutants d'insertion de T-DNA dans l'écotype Columbia, ont servi à la validation fonctionnelle des gènes candidats. Ces plantes ont été obtenues via le NASC (*The European Arabidopsis Stock Center*).

- SAIL_199_A04 pour le gène At3g1830 (RACK1C)
- SAIL_408_D08 pour le gène At1g18080 (RACK1A)
- SALK_061765C pour le gène At2g19570 (CDA1)

Nicotiana benthamiana et *Nicotiana clevelandii*, de la famille des *Solanaceae*, ont servi pour certaines expériences d'infection par le TuYV, et *N. benthamiana* (**Figure 70 F**) a également permis les études de localisation subcellulaire par microscopie confocale des protéines fusionnées à un fluorochrome.

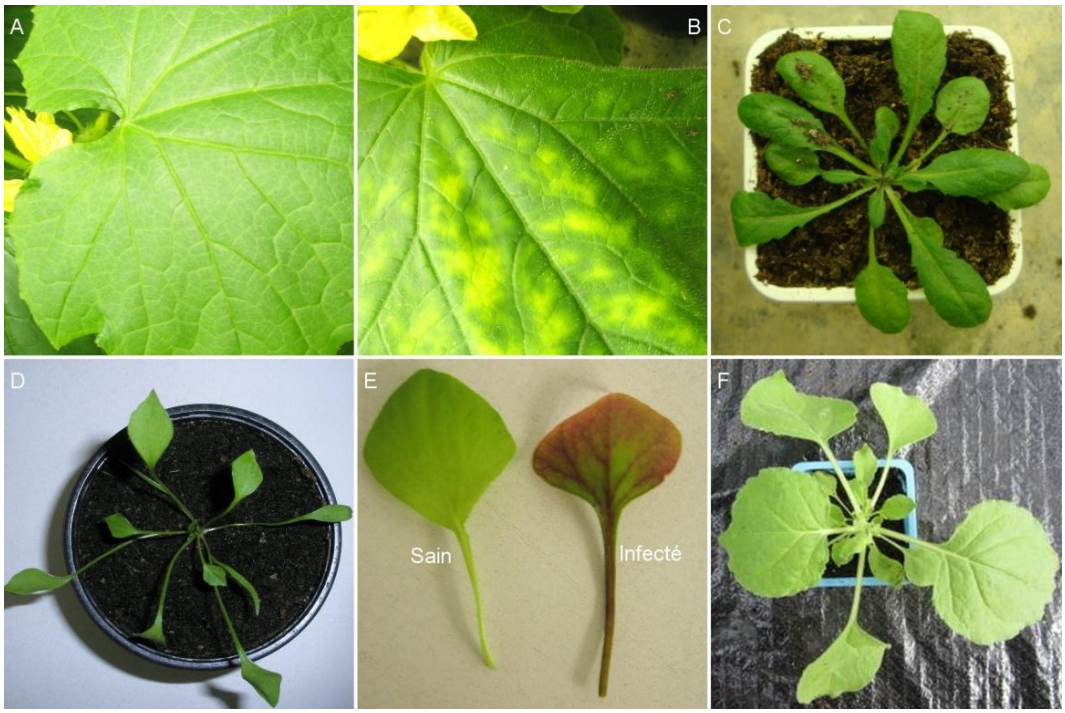


Figure 70 : Photos des plantes utilisées lors de ce travail de thèse. Le concombre *Cucumis sativus* **(A)** est un hôte naturel du CABYV et montre des symptômes de jaunissement lors d'une infection par ce virus **(B)**. Les *Montia perfoliata* **(D)** présentent des symptômes de rougissement lors d'une infection par le TuYV **(E)**. Les *Arabidopsis thaliana* **(C)** et *Nicotiana benthamiana* **(F)** sont des hôtes du TuYV ne présentant pas de symptômes particuliers lors de l'infection.

1.2 Les virus

Le TuYV utilisé lors de cette étude est la souche BWYV-FL1 isolée sur laitue (Veidt *et al.*, 1988, 1992) et renommée TuYV-FL1 par la suite (Mayo, 2002). La souche de CABYV a été isolée en 1989 sur un plant de melon (Lecoq *et al.*, 1992) et a ensuite été entièrement séquencée (Guilley et al., 1994).
Ces deux souches de polérovirus se trouvent sous la forme de clones complets infectieux introduits dans un plasmide binaire adapté à l'agro-inoculation (Brault *et al.*, 1995; Leiser *et al.*, 1992; Prüfer *et al.*, 1995; Veidt *et al.*, 1988).

Certains mutants du TuYV utilisés dans ce travail de thèse ont été précédemment décrits : le R7AR8A (3.140) et le W166R (3.144) dans (Brault *et al.*, 2003) ; les mutants NoCPRT4.2, RTonly (6.26) et ΔP4 (5.1845) dans (Ziegler-Graff *et al.*, 1996), et le mutant NoCPRT4.3 dans (Reutenauer, 1994).
Par ailleurs, la série des MutCoq (mutants de l'épitope 5 de la CP du TuYV) a été créée par Baptiste Monsion en utilisant le kit de clonage QuikChange® Lightning Site-Directed Mutagenesis.

1.3 Les pucerons

Les pucerons sont des insectes de l'ordre *Hemiptera* et de la famille *Aphididae*. Le puceron vert du pêcher *Myzus persicae* (**Figure 71**), élevé sur piments, transmet efficacement le TuYV et le CABYV. Seules les formes aptères, et en particulier les stades larvaires, servent aux tests de transmission des virus.

Figure 71 : Photos du puceron *Myzus persicae*. Une forme ailée accompagnée de larves **(A)** et une colonie avec différents stades larvaires et des adultes aptères **(B).**

2. Méthodes spécifiques aux bactéries et aux clonages

2.1 Souches de bactéries et milieux de culture

Les souches de bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5α et XL10Gold ont servi à l'amplification des plasmides et aux différents clonages.

- **Dh5α** : F^- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ80d*lacZ*ΔM15 Δ(*lacZYA-argF*)U169, hsdR17(r_K^- m_K^+), λ–

- **XL10Gold** : endA1 glnV44 recA1 thi-1 gyrA96 relA1 lac Hte Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 tet^R F'[proAB $lacI^qZ\Delta M15$ Tn10(Tet^R Amy Cm^R)]

Agrobacterium tumefaciens est, à l'origine, une bactérie du sol phytopathogène provoquant la galle du collet (*crown-gall*). Cette bactérie possède naturellement un plasmide Ti portant des gènes *vir* essentiels au transfert dans les cellules de la plante d'une séquence plasmidique nommée T-DNA située sur ce même plasmide Ti. Ce T-DNA contient des gènes importants pour le développement de la bactérie mais provoquant des tumeurs chez la plante infectée (Gelvin, 2010; McCullen & Binns, 2006).
La souche d'agrobactéries C58C1 a été utilisée pour toutes les agro-inoculations de ce travail de thèse. Elle possède un plasmide Ti modifié en plasmide *helper* et ne portant que les gènes *vir*. La séquence d'intérêt à transférer dans les cellules de la plante est portée par un plasmide binaire ou par un vecteur d'expression Gateway®. Ces séquences sont entourées des bordures gauches et droites du T-DNA, et sont situées en aval du promoteur 35S du *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) et en amont d'un terminateur. Ces vecteurs d'expression portent les gènes de résistance à la Kanamycine ($Kana^R$), à l'Hygromycine ($Hygro^R$) ou à la Spectinomycine ($Spectino^R$).

Toutes les souches bactériennes sont cultivées dans le milieu Luria Bertani (LB) Broth (référence Sigma Aldrich – L3022) ou sur le milieu LB Agar (référence Sigma Aldrich – L2897). Le milieu est toujours autoclavé (35 min à 110°C) avant utilisation, puis additionné des antibiotiques adéquats. Les *E. coli* sont cultivées à 37°C, alors que les agrobactéries le sont à 28°C.
La concentration finale en antibiotiques est résumée dans le tableau suivant :

Antibiotiques	En milieu solide (µg/mL)	En milieu liquide (µg/mL)
Ampicilline	50	70
Rifampicine	100	100
Kanamycine	100 (*A. tumefaciens*) 35 (*E. coli*)	250 (*A. tumefaciens*) 50 (*E. coli*)
Gentamycine	20 (*A. tumefaciens*) 10 (*E. coli*)	20 (*A. tumefaciens*) 10 (*E. coli*)
Spectinomycine	100	100
Hygromycine	50	50

2.2 Extractions de plasmides à partir de bactéries

Les plasmides sont extraits d'une culture d'une nuit à 37°C de bactéries *E. coli* ou à 28°C d'*A. tumefaciens*, en utilisant le kit QIAprep Spin miniprep (*Qiagen*) et en suivant les recommandations du fournisseur, ou selon la méthode classique de la « lyse alcaline ».

2.3 Clonages classiques

Pour la réaction de PCR amplifiant la séquence à cloner, des amorces introduisant des bordures avec sites de restriction sont utilisées. Le produit de PCR (nommé insert) et le plasmide de destination (nommé vecteur) sont tous deux digérés avec les mêmes enzymes de restriction. Ces enzymes sont utilisées selon les recommandations des fournisseurs, en augmentant cependant les temps de digestion à 4 h. Les profils de restriction sont ensuite vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose 1 % dans le tampon TAE 0.5 X. Les produits de

digestion sont purifiés sur colonne du kit MSB® Spin PCRapace (*Invitek*) et repris dans 15 µL d'H_2O.
La ligation de l'insert dans le vecteur est réalisée dans le tampon de ligation avec la T4 DNA ligase (*Promega*) pendant 1 nuit à 16°C. Les quantités d'insert et vecteur sont déterminées selon le calcul suivant :

> Taille de l'insert = n
> Taille du vecteur = N
> Différence vecteur / insert = N/n = X
> Pour un ratio 1:5, il faut utiliser 100 ng de vecteur et 500/X ng d'insert.

Après ligation, la transformation par choc thermique d'*E. coli* est réalisée en utilisant la totalité du mélange de ligation pour 100 µl de bactéries DH5α ou XL10Gold thermo-compétentes.

2.4 Clonages Gateway®

Le clonage utilisant la technologie Gateway® (*Invitrogen*) est une méthode basée sur les propriétés de recombinaison site-spécifique du bactériophage lambda (λ). La **Figure 72** explique les principales étapes de ce clonage détaillées ci-dessous.
Dans un premier temps, une réaction de PCR est réalisée pour introduire des sites *att*B autour de la séquence à cloner. Pour la création des amorces, les instructions du manuel d'utilisation ont été suivies. Les produits de cette réaction PCR sont vérifiés sur gel agarose 1% TAE 0.5 X, puis purifiés avec le kit MSB® Spin PCRapace (*Invitek*).
La **réaction BP** est la première étape du clonage : le réactif BP clonase™ contient l'intégrase du phage λ et le facteur d'intégration IHF d'*E. coli*, permettant la recombinaison entre les sites *att*B de l'insert et les sites *att*P du vecteur donneur pDONR.

Réaction BP		
PCR avec sites *attB*	3.5 µL	**4 h à 25°C**
pDONR207	0.5 µL	
BP clonase™	1 µL	
TE buffer 100 X	0.35 µL	
Protéinase K	0.5 µL	**10 min 37°C**

La réaction BP est suivie d'une transformation par choc thermique de 100µL d'*E. coli* DH5α thermocompétentes avec 2 µL de la réaction. Plusieurs plasmides résultant de ce clonage sont séquencés pour sélectionner l'***entry clone***.
La **réaction LR** est la deuxième étape du clonage : le réactif LR clonase™ contient l'intégrase et l'excisionase Xis du phage λ, ainsi que le facteur d'intégration IHF d'*E. coli*. Cette étape permet de créer le vecteur d'expression grâce à la recombinaison entre les sites *att*L de l'*entry clone* et les sites *att*R du vecteur de destination pDEST.

Réaction LR		
entry clone	0.5 µL	**4 h à 25°C**
pDEST	2 µL	
LR clonase™	1 µL	
TE buffer 100 X	0.35 µL	
H2O	1.15 µL	
Protéinase K	0.5 µL	**10 min 37°C**

La réaction LR est suivie d'une transformation par choc thermique de 100 µL d'*E. coli* DH5α thermocompétentes avec 2 µL de la réaction.

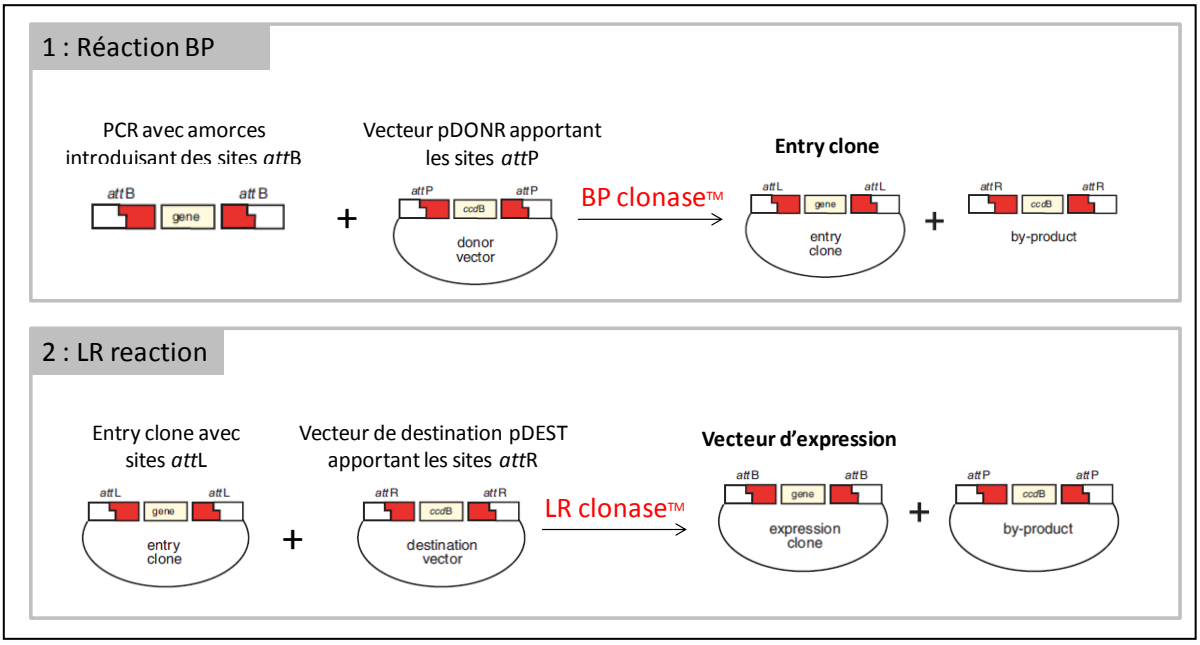


Figure 72 : Etapes du clonage utilisant la technologie Gateway®. Deux étapes de recombinaison site-spécifique réalisées par l'intégrase du phage λ constituent le clonage par la technologie Gateway®. La réaction BP permet la création de l'*entry clone*, plasmide qui sert ensuite à la réaction LR pour former le vecteur d'expression.

Le tableau ci-dessous liste les vecteurs utilisés pour le clonage avec la technologie Gateway® ; les cartes détaillées sont disponibles en **Annexes**.

Vecteur	Fonction	Résistance
pDONR207	Vecteur utilisé pour la réaction BP	Gentamycine
pK7WGF2	Vecteur d'expression. Fusion de eGFP en N-term.	Spectinomycine
pK7FWG2	Vecteur d'expression. Fusion de eGFP en C-term.	Spectinomycine
pH7WGR2	Vecteur d'expression. Fusion de RFP en N-term.	Spectinomycine
pK2GW7	Vecteur d'expression. Aucun tag.	Spectinomycine
pGWB14	Vecteur d'expression. Fusion au tag HA en C-term.	Hygromycine et Kanamycine

2.5 Transformation de bactéries thermo-compétentes

Après incubation à 4°C pendant 30 min, le tube contenant les bactéries et les produits de clonage est incubé 1 min à 42°C puis 2 min à 4°C. Après récupération des bactéries 1 h à 37°C dans 400 µL de LB ou dans 250 µL de SOC medium (*Invitrogen*), une partie de la transformation est étalée sur du milieu LB + agar contenant les antibiotiques appropriés.

2.6 Transformation de bactéries électro-compétentes

Après incubation 10 min à 4°C, 40 µL d'agrobactéries C58C1 sont transformées par choc électrique avec 1 µL de plasmide (Capacitance 50 µF, 1.5 kV). Les bactéries sont immédiatement reprises dans 800 µL de LB liquide et incubées 1 h à 28°C. La totalité du volume de transformation est ensuite étalée sur du milieu LB + agar contenant les antibiotiques appropriés.

3. Méthodes spécifiques aux levures et au criblage en double hybride

3.1 Souches de levures et milieux de culture

Deux souches de levures, auxotrophes pour la leucine et le tryptophane, ont été utilisées pour ce travail de thèse :

- la souche **Y187** (Clontech) de génotype MATα
- la souche **Matchmaker™ Y2H Gold** (Clontech) de génotype MATa

Quatre gènes rapporteurs, détaillés dans le chapitre 2 sont présents dans la souche Y2H Gold : *AUR1*-C, *MEL1*, *HIS3* et *ADE2*.

La croissance des levures s'effectue toujours à 28°C, soit avec agitation en milieu liquide, soit sur milieu solide dans des boites de culture.
Le milieu de culture complet YPDA est composé de peptones, d'extraits de levure, de dextrose et d'adénine dans des concentrations idéales pour la croissance des levures. Le milieu YPDA additionné d'agar permet la croissance de colonies de levures sur boites.
Le milieu synthétique (SD) est un milieu minimum contenant tous les éléments essentiels à la croissance des levures, à l'exception de l'histidine (H), du tryptophane (W), de l'adénine (A) et de la leucine (L). Le milieu SD permet donc la sélection des levures en ajoutant, ou non, les acides aminés manquant. Par ailleurs, l'antifongique Auréobasidine A (AbA) et le substrat chromogène X-α-gal peuvent être ajoutés pour affiner la sélection. La composition des milieux SD utilisés dans ce travail de thèse est résumée dans le tableau ci-dessous :

	Eléments ajoutés	Eléments absents
SD/-L	A, H, W	L
SD/-W	A, H, L	W
SD/-WL	A, H	W, L
SD/-HWL	A	H, W, L
SD/-AHWL	-	A, H, W, L
SD/-AHWL/X/AbA	X-α-gal + AbA	A, H, W, L

3.2 Plasmides pour le criblage en double hybride

Les plasmides utilisés pour la transformation de levures et le criblage en double hybride sont le pGBT9 ($Kana^R$), le pGBKT7 ($Kana^R$) et le pGADT7 (Amp^R). Les cartes de ces plasmides sont disponibles en **Annexes**.

3.3 Banques d'ADNc d'*A. thaliana*

Deux banques d'ADNc d'*A. thaliana*, introduites dans la souche de levures Y187, ont été utilisées pour les criblages en double hybride :

- **Une banque de cellules compagnes**, produite dans le système Matchmaker™ Gold (*Clontech*) par Caren Rodriguez (C. Rodriguez, résultats non publiés).
- **Une banque totale** « Mate & Plate™ Library – Universal Arabidopsis (Normalized) » (*Clontech*), préparée à partir d'ARNm provenant de 11 tissus. Les ADNc ont été normalisés pour réduire la quantité des ADNc abondants et ainsi augmenter la représentativité des ADNc présents en faible quantité dans les cellules.

3.4 Transformation des levures

Le protocole de transformation de levures est adapté du « Yeastmaker™ Transformation System 2 User Manual » (*Clontech*).
Dans un premier temps, il est nécessaire de préparer des levures compétentes pour la transformation (**Figure 73**), et dans un second temps on procède à la transformation avec les vecteurs et à l'étalement des levures sur boites (**Figure 74**).
Pour ces différentes étapes, plusieurs solutions et tampons ont été utilisés. Leur composition est présentée dans le tableau ci-dessous :

Solutions et Tampons	Composition
TE Buffer 10 X	0.1 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 7.5
LiAc buffer 10 X	1 M lithium acetate, pH 7.5
PEG 3350 50%	50% Polyethylene glycol, Sigma Cat No. P-3640
Te/LiAc	TE buffer 1.1 X, LiAc buffer 1.1 X
PEG/LiAc	PEG 3350 40%, TE buffer 1X, LiAc buffer 1 X
YeastMaker carrier DNA	Clontech ref. 630440
DMSO	Dimethyl sulfoxide
NaCl 0.9%	NaCl 0.9 % (w/v)

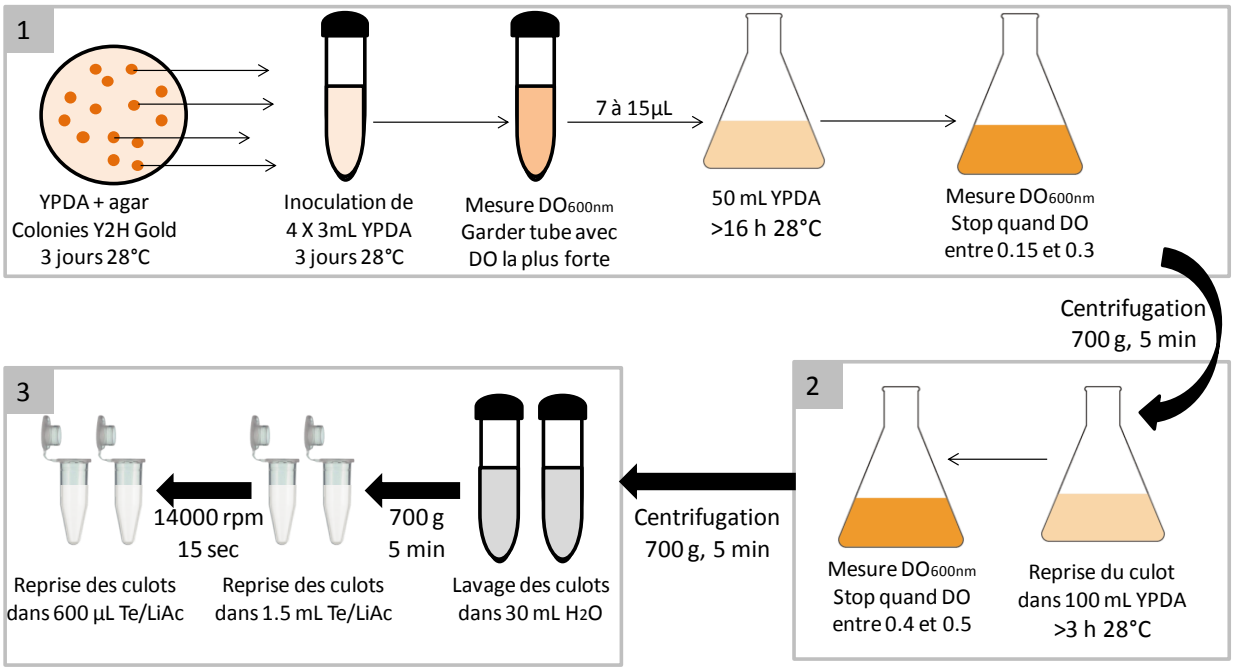


Figure 73 : Préparation des levures Y2H Gold compétentes pour la transformation. Quatre pré-cultures de 3 mL YPDA sont ensemencées avec des levures Y2H Gold provenant de colonies fraiches. Après 3 jours d'incubation à 28°C, la pré-culture possédant la plus forte DO_{600nm} est utilisée pour lancer une première culture de 50 mL YPDA de 16 h. Quand la DO_{600nm} est comprise entre 0.15 et 0.3, la culture est centrifugée puis le culot est repris dans 100 mL YPDA avant d'être à nouveau incubé 3 h environ à 28°C. Lorsque la DO atteint 0.4, la culture est centrifugée. Les culots de levures sont lavés puis finalement repris dans le tampon Te/LiAc.

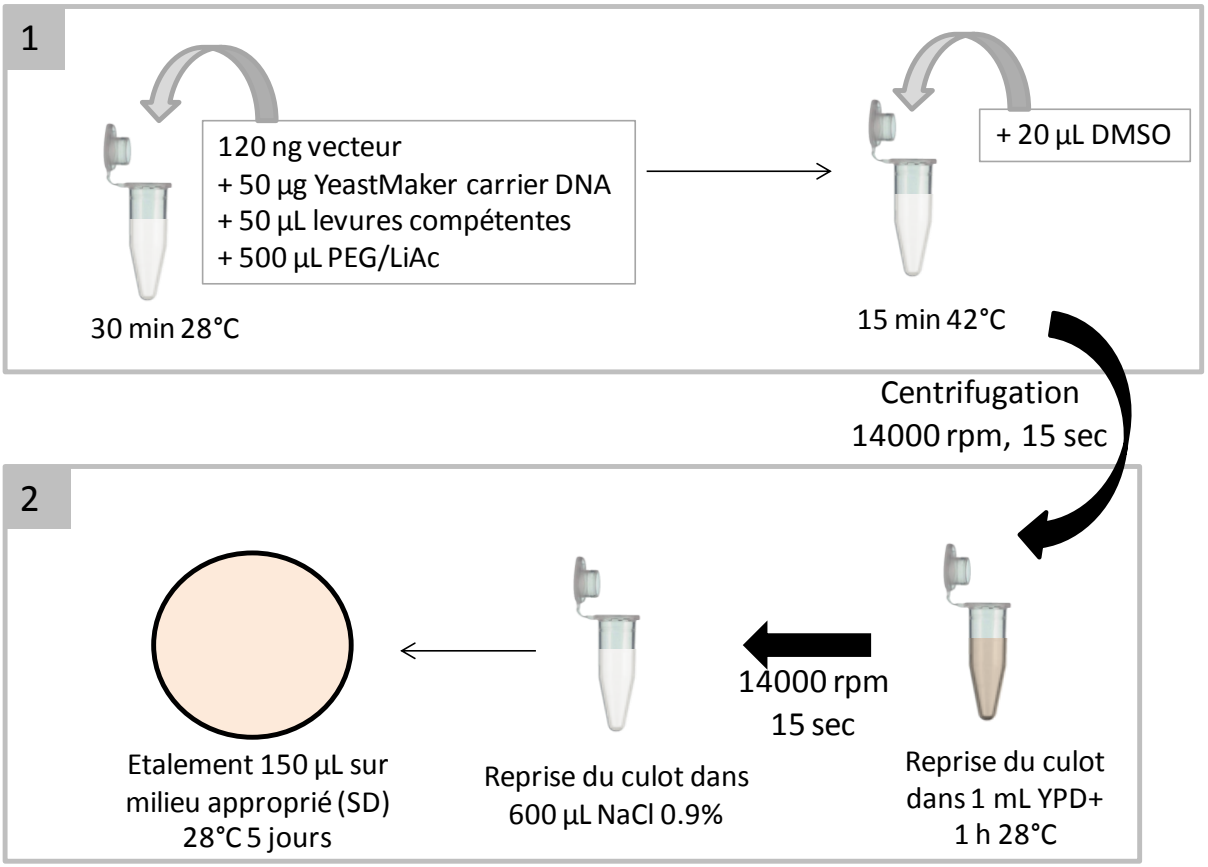


Figure 74 : Transformation des levures Y2H Gold compétentes. Aux levures préparées précédemment sont ajoutés le(s) vecteur(s), le YeastMaker carrier DNA et le tampon PEG/LiAc. Après 30 min d'incubation à 28°C, du DMSO est ajouté pour une nouvelle incubation à 42°C. Enfin, après centrifugation, le culot de levure est repris dans du milieu YPD+ pour une incubation de 1 h à 28°C. Ces levures sont ensuite centrifugées, reprises dans du NaCl 0.9%, puis un étalement est effectué sur le milieu SD approprié.

3.5 Tests en gouttes

Après avoir procédé à la transformation des levures avec les vecteurs adéquats, trois colonies de levures sont délayées chacune dans 20 µl d'eau. Des gouttes de 5 µl sont alors déposées sur le milieu de vérification de la transformation (SD/-W ou SD/-WL) et sur les milieux de sélection pour une incubation de 72 h à 28°C.

3.6 Criblages double hybride

Le protocole « Matchmaker™ Gold Yeast Two-Hybrid system – User Manual » (Clontech) a été suivi pour réaliser les criblages en double hybride des deux banques d'ADNc d'*A. thaliana* avec la protéine P4.

3.7 Extraction de protéines à partir de levures

Une culture de levures de 2 mL YPDA est centrifugée 5 min à 700 g et le culot est lavé avec 700 µL d'EDTA 0.5 M. Après une deuxième centrifugation, le culot est repris dans 200 µL de NaOH 2 M pour une incubation de 10 min dans la glace. Après ajout de 200 µL de TCA 55% et une incubation de 2 h à 4°C, l'échantillon est centrifugé (14000 rpm, 20 min, 4°C). Après lavage du culot dans 200 µL d'acétone froid et une nouvelle centrifugation (14000 rpm, 20 min, 4°C), le culot est finalement repris dans 200 µL de SDS 5% et 200 µL de Laemmli 2X.

3.8 Extraction de plasmides à partir de levures

2 mL de culture de levures dans le milieu YPDA sont centrifugés (1 min, 14000 rpm) et le culot est repris dans 100 µL de tampon de resuspension (KH_2PO_4 67 mM, pH 7.5) par un vortex de 15 sec. Ensuite, 50 U de l'enzyme lyticase (Lyticase from *Arthrobacter luteus*, *Sigma*) sont ajoutées pour une incubation d'1 h à 37°C. La lyse complète des levures est effectuée en ajoutant 200 µL de tampon de lyse (NaOH 0.2 N, SDS 1%) et en incubant la suspension 5 min à température ambiante. Enfin, la lyse est stoppée par ajout de 150 µL de tampon de neutralisation (Acétate de potassium 5 M, Acide acétique glacial). La solution est centrifugée (15 min, 14000 rpm, 4°C) et le surnageant est récupéré dans 2 Vol d'éthanol 100% pour précipiter l'ADN plasmidique à -20°C. Après une nouvelle centrifugation (30 min, 14000 rpm, 4°C) suivie d'un lavage à l'éthanol 75%, le culot d'ADN est repris dans 15 µL d'H_2O.

4. Méthodes d'inoculation de plantes ou de protoplastes

4.1 Agro-infiltration de plantes

Une pré-culture d'agrobactéries C58C1 contenant le pbin ou le vecteur d'expression Gateway® est réalisée dans 2 mL de LB avec les antibiotiques appropriés. A partir de cette pré-culture, une culture de 10 à 50 mL, selon le nombre de plantes à inoculer, est mise sous agitation une nuit à 28°C dans le milieu LB additionné des antibiotiques appropriés, de MES (10 mM) et d'Acétosyringone (20 µM).
La culture est centrifugée (10 min, 5000 rpm, 17°C) et le culot de bactéries est lavé dans un volume identique d'eau. Après une nouvelle centrifugation, le culot est repris dans une solution contenant du MgCl2 (10 mM), du MES (10 mM) et de l'Acétosyringone (150 µM). La suspension bactérienne est ajustée par dilution dans le même tampon à une $DO_{600\ nm}$ de 0.5, puis incubée 1h à température ambiante. La suspension est ensuite infiltrée dans les feuilles grâce à une seringue appliquée au niveau de blessures réalisées avec une aiguille comme illustré dans la **Figure 75** ci-dessous.

Figure 75 : Photo illustrant l'agro-infiltration d'une feuille de *N. benthamiana*. La seringue remplie de la solution d'agrobactéries est appliquée au niveau d'une blessure réalisée au préalable avec une fine aiguille.

4.2 Inoculation de plantes par pucerons virulifères

La méthode comprend une première étape d'acquisition du virus par les pucerons sur un milieu artificiel de nutrition (**Figure 76**). Les pucerons sont déposés dans une boite cylindrique en plastique noir fermée par un Parafilm® étiré. Sur ce Parafilm® on dépose 80 µL de milieu nutritionnel MP148 (Bruyère *et al.*, 1997) mélangé à une suspension de particules virales purifiées, pour obtenir une concentration finale de virus comprise entre 25 et 80 ng/µL. Un deuxième Parafilm® recouvre la suspension virale. Les pucerons se nourrissent alors en insérant leur stylet au travers de la membrane.

Il est aussi possible de réaliser l'acquisition du virus à partir de plantes infectées (**Figure 76**). Si la plante source est *A. thaliana*, les pucerons sont directement déposés sur la plante infectée afin d'acquérir le virus. Si la plante source est *M. perfoliata*, quatre à cinq feuilles avec leurs pétioles sont prélevées et mises en survie dans des boites « bonne maison ». Les pucerons sont alors déposés sur les feuilles détachées pour l'acquisition. Après 24 h d'acquisition pour le TuYV, ou 48 h pour le CABYV, les pucerons sont récupérés et déposés sur les plantes à inoculer pour une période de 5 jours. Un traitement insecticide est ensuite réalisé sur l'ensemble des plantes inoculées.

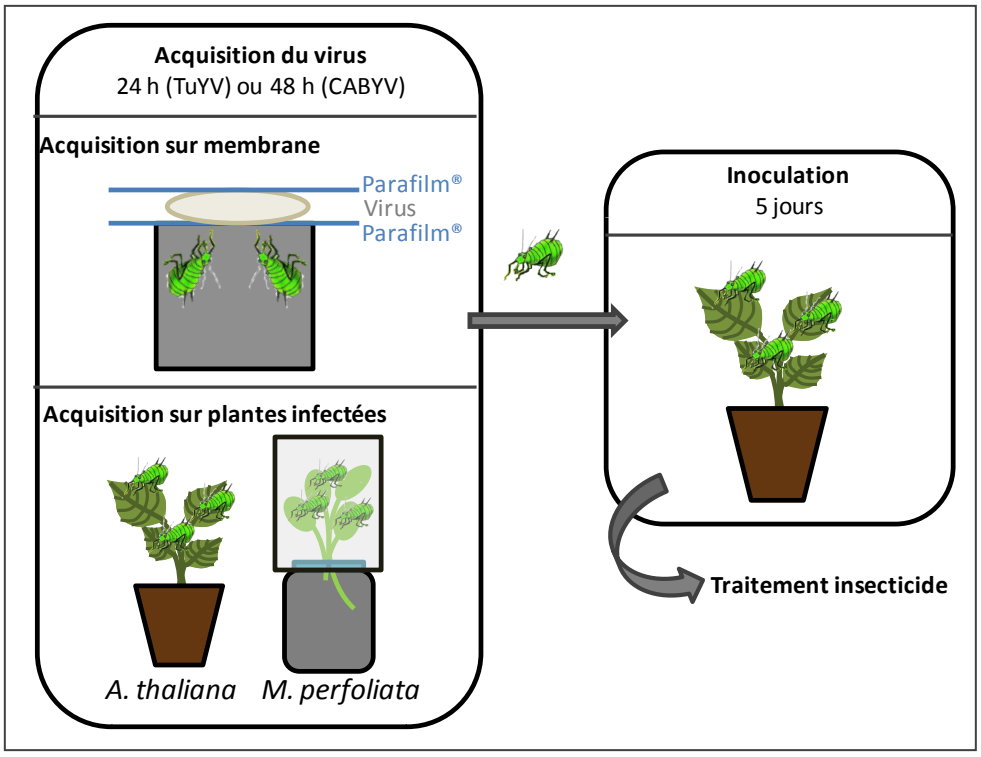


Figure 76 : Méthodes d'acquisition et d'inoculation des plantes par pucerons. Le virus peut être acquis sur membrane (virus purifié) ou sur plantes infectées. La période d'acquisition est de 24 h pour le TuYV et de 48 h pour le CABYV. Les pucerons virulifères sont ensuite transférés sur les plantes à inoculer, et après 5 jours les plantes sont traitées par un insecticide.

4.3 Inoculation de protoplastes de *Chenopodium quinoa*

Les protoplastes de *C. quinoa* transformés avec des transcrits viraux ont servi à vérifier la réplication des mutants du TuYV. Les protoplastes ont été préparés à l'IBMP (Strasbourg) et inoculés avec des transcrits viraux selon un protocole décrit dans (Reutenauer *et al.*, 1993; Veidt *et al.*, 1992).

Pour la transformation, 5 à 10 µg de transcrits viraux obtenus par transcription *in vitro* sont déposés sur le bord d'une cuve d'électroporation dans laquelle on ajoute ensuite 500 µl de protoplastes (200 000 protoplastes/mL) en les faisant glisser le long de la paroi. Après l'électroporation (résistance 100 Ohms, capacitance 125 µF, 180 V), les protoplastes sont rapidement repris dans deux fois 500 µl de mannitol froid. Après 30 min d'incubation dans la glace, les tubes sont centrifugés 2 min à 800 rpm. Le surnageant est jeté et le culot de protoplastes est repris dans 2 fois 750 µL de milieu de Rottier + Carbé à température ambiante. Les protoplastes sont ensuite mis en culture sous une lumière tamisée pendant 48 h à 28°C sur de petites boites de Pétri contenant du milieu de Rottier solide.
La composition des milieux utilisés pour la transformation des protoplastes est indiquée dans le tableau ci-dessous.:

Milieu	Composition
Mannitol	Mannitol 600 mM, $CaCl_2$ 0.1 M, pH 5.6
Milieu de Rottier + Carbé	Mannitol 600 mM, KH_2PO_4 0.2 mM, KNO_3 1 mM, $MgSO_4$ 1 mM, KCl 1 µM, $CaCl_2$ 5mM, $CuSO_4$ 10 mM, Carbécilline 250 µg/mL pH 5.6
Milieu de Rottier solide	Milieu de Rottier sans carbécilline + agarose 1%

Après 3 jours de culture, les protoplastes sont récoltés à la pipette dans des microtubes par fractions de 125 000 ou 250 000 protoplastes. Après une centrifugation 1000 rpm 3 min, le surnageant est retiré délicatement à la pipette, et le culot sec est stocké à -80°C.
L'extraction de protéines à partir de 125 000 protoplastes est réalisée en ajoutant 50 µL de Laemmli2X (Laemmli, 1970) au culot, en vortexant et dénaturant les protéines 10 min à 100°C avant de déposer les échantillons sur un gel SDS-PAGE pour analyse.

5. Méthodes spécifiques aux acides nucléiques

5.1 Extractions d'ARN totaux à partir de feuilles

Les feuilles sont pesées pour prélever 100 mg, puis conservées à -80°C dans des micro-tubes de 1.5 mL.
Dans le cas d'une extraction d'ARN totaux en utilisant le RNeasy Mini kit (*Qiagen*), le broyage est effectué directement dans le micro-tube après l'avoir plongé fermé dans l'azote liquide et en utilisant un pilon adapté. Le protocole « Purification of total RNA from Plant Cells and Tissues » est ensuite suivi jusqu'à la reprise des ARN totaux dans 30 µL d'eau.
Un autre protocole d'extraction d'ARN totaux ne nécessitant pas de kit a aussi été utilisé lors de ces travaux. Les feuilles sont broyées directement dans les micro-tubes et dans un tampon nommé TM en raison de sa composition : Tris-HCl 50 mM et $MgCl_2$ 10 mM. Afin de protéger les ARN de l'action des ribonucléases (RNAses), le pH est ajusté à 9 et le broyage se fait dans la glace. Dans les tests d'encapsidation de l'ARN viral, le pH du tampon TM est ajusté à 7 et les broyats sont incubés 30 min à 37°C afin de favoriser l'action des RNAses de plantes et dégrader les ARN non encapsidés. Après une extraction au phénol/tris (Vol/Vol), puis au phénol/chloroforme-alcool isoamylique (Vol/Vol), et deux extractions au chloroforme-alcool isoamylique (Vol/Vol), les ARN totaux sont précipités la nuit à -20°C avec 2 volumes d'éthanol 100%. Après centrifugation (45 min, 14000 rpm, 4°C), le culot est repris dans 200 µL d'acétate de sodium 3 M pH6, afin de solubiliser l'ADN et les petits ARN. Une nouvelle centrifugation (30 min, 14000 rpm, 4°C) est réalisée, et le culot est repris dans 100 µL d'H_2O et 270 µL d'éthanol 100 % pour la précipitation des

ARN à -20°C pendant 4 h. Enfin, après une autre centrifugation (45 min, 14000 rpm, 4°C), le culot est lavé une fois à l'éthanol 75 %, puis repris dans 30 µL d' H_2O.
Enfin, certains ARN totaux ont été extraits au Trizol (Tri Reagent®, *Sigma*) en suivant le protocole du fournisseur mais en ajoutant une extraction au phénol/chloroforme-alcool isoamylique (Vol/Vol), une extraction au chloroforme-alcool isoamylique (Vol/Vol) avant la précipitation des ARN.
La concentration des ARN totaux est ensuite évaluée par lecture de la $DO_{260\ nm}$ avec un nanodrop en utilisant la formule suivante : 1U DO_{260nm}= 40 µg / mL.

5.2 Extraction d'ARN viraux à partir de virions purifiés

Le protocole « Purification of total RNA from Plant Cells and Tissues » du RNeasy Mini kit (*Qiagen*) est adapté pour l'extraction des ARN à partir de particules virales purifiées. Le tampon RLT + β-mercaptoéthanol du kit est ajouté à la quantité souhaitée de virions purifiés, généralement 2 à 3 µg. Après un vortex de 10 sec, l'éthanol 100 % est ajouté dans le tube pour précipiter les ARN. La solution est ensuite déposée sur les colonnes roses du kit et la suite du protocole est suivie jusqu'à la reprise des ARN viraux dans 30 µL d'eau.
Un autre protocole ne nécessitant pas de kit d'extraction a aussi été utilisé dans ce travail de thèse. Le tampon d'extraction de l'ARN viral est composé de Tris-HCl 100 mM, NaCl 50 mM, SDS 1 %, 2 mg de protéinase K, et le pH est ajusté à 7.5. Un volume identique de Phénol-Tris est ajouté, et le mélange est agité vigoureusement puis chauffé 10 min à 60°C. Après centrifugation (10 min, 14000 rpm, 4°C), des extractions au phénol/chloroforme-alcool isoamylique (Vol/Vol) puis au chloroforme-alcool isoamylique (Vol/Vol) sont réalisées. Les ARN viraux sont précipités la nuit à -20°C en présence de 10 µg de glycogène, d'1/10ème du volume en acétate de sodium 3M et de 1 fois le volume en isopropanol.
La concentration des ARN viraux est ensuite évaluée par lecture de la $DO_{260\ nm}$ avec un nanodrop en utilisant la formule suivante : 1U DO_{260nm}= 40 µg / mL.

5.3 Extraction d'ARN totaux à partir de pucerons

Le protocole « Purification of total RNA from animal tissues » du RNeasy Mini kit (*Qiagen*) est adapté pour l'extraction des ARN totaux à partir de pucerons. Les pucerons sont broyés dans un micro-tube à l'aide d'un pilon adapté avec le tampon RLT + β-mercaptoéthanol du kit. Après un vortex de 15 sec, le broyat est centrifugé (3 min, 14000 rpm, 17°C) et le surnageant est repris dans un nouveau micro-tube. Après ajout de la moitié du volume en éthanol 100 % pour précipiter les ARN, la solution est déposée sur la colonne rose du kit et la suite du protocole est suivie jusqu'à la reprise des ARN viraux dans 30 µL d'eau.
La concentration des ARN totaux est ensuite évaluée par lecture de la $DO_{260\ nm}$ avec un nanodrop en utilisant la formule suivante : 1U DO_{260nm}= 40 µg / mL.

5.4 Reverse transcription (RT) et Polymerase Chain Reaction (PCR)

Les ARN sont chauffés 2 min 30 sec à 80°C en présence de l'amorce antisens, puis incubés 2 min dans la glace. La réaction de polymérisation est réalisée pendant 1 h à 42°C en présence de Dithiothréitol (DTT) 10 mM, de désoxyribonucléotides (dNTPs) 1 mM, de 10 U d'inhibiteur de RNAse et de 4 U de *Moloney-Murine Leukemia Virus - Reverse Transcriptase* (M-MLV RT, *Promega*). A la fin de la réaction, 30 µL d'eau sont ajoutés

dans le milieu réactionnel, et une fraction aliquote de 4 ou 8 µL est utilisée pour la PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

La PCR est réalisée sur l'ADNc obtenu par RT ou à partir d'ADN plasmidique. L'enzyme Taq polymérase Diamond fonctionne dans un tampon contenant 1.5 mM de $MgCl_2$, 0.2 mM de dNTPs et 0.4 µM de chacune des amorces. L'amplification des fragments est réalisée dans un thermocycleur (Mastercycler, *Eppendorf*) par une succession de 20 à 30 cycles comprenant une étape de dénaturation de 45 sec à 95°C, d'une étape d'hybridation de 45 sec à une température correspondant à la température de fusion (Tm) – 2°C des amorces, et d'une étape d'élongation de 1 min à 72°C.

Les fragments de PCR ou de RT-PCR sont ensuite analysés sur un gel d'agarose 1% dans le TAE 0.5X. Après une migration à 100 V, le gel est ensuite coloré au bromure d'éthidium (BET à 0.5 µg/mL) et les fragments d'ADN sont visualisés sous lumière ultra-violet (UV) sur un trans-illuminateur (GelDoc, *Biorad*).

5.5 Amorces utilisées

i) Vérification de l'homozygotie des mutants d'*A. thaliana*

Nom de l'amorce	Gène	Séquences de 5' en 3'
LB1.3	SALK T-DNA	ATTTTGCCGATTTCGGAAC
SAILB1	SAIL T-DNA	GCCTTTTCAGAAATGGATAAATAGCCTTGCTTCC
LP-CDA1	CDA1 At2g19570	TGTTGAGATTGGAGTTTTCGG
RP-CDA1		AAATTGAGATGACGTTCACCG
LP-RACK1C	RACK1C At3g18130	CAGGGAGATGCTTTTGTTGAG
RP-RACK1C		TGGTTGTGTGCTGCTACTGAG
LP-RACK1A	RACK1A At1g18080	TTCGGATTGGCTTATTTGATG
RP-RACK1A		TTGTCGTCCTTGGTGAGTTTC

ii) Amorces utilisées pour les clonages

Nom de l'amorce	Séquences de 5' en 3'
Clonage de la protéine RACK1C dans un vecteur gateway (fusion N-term)	
attB1-RACK1C-N	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCACAAAGGACGATAAGTCT
attB2-RACK1C-N	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTACCAGTATCTGTTAGGACT
Clonage de la protéine CDA1 dans un vecteur gateway (fusion N-term)	
attB1-CDA1-N	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCGATAAGCCAAGCTTCGTA
attB2-CDA1-N	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTAAGCTTCATAGCAATG
Clonage de la protéine RACK1C dans un vecteur gateway (fusion C-term)	
attB1-RACK1C-C	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGCCGAGGGACTCGTATTG
attB2-RACK1C-C	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCGTAACGACCAATACCCCAGAC
Clonage de la protéine CDA1 dans un vecteur gateway (fusion C-term)	
attB1-CDA1-C	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGGATAAGCCAAGCTTCGTA

attB2-CDA1-C	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAGCTTCATAGCAATGAAACAC
Clonage du gène complet de CDA1 dans pGADT7	
Fw-CDA1+NdeI	CATATGGATAAGCCAAGCTTC
Rv-CDA1+BamHI	GGATCCCTAAGCTTCATAGCA
Clonage de la protéine CP_{WT} ou CP_{R7AR8A} dans un vecteur gateway (fusion C-term)	
attB1-CPWT-C	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAATACGGTCGTGGGTAGGAGAATT
attB1-CPR7A-C	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAATACGGTCGTGGGTGCGGCAATT
attB2-CP-C	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTTTGGGGTTGTGGAATTGACACTT
Clonage de la protéine CP_{WT} ou CP_{R7AR8A} dans un vecteur gateway (aucun tag)	
attB1-CPWT	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAATACGGTCGTGGGTAGGAGAATT
attB1-CPR7A	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGAATACGGTCGTGGGTGCGGCAATT
attB2-CP-C	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTATTTGGGGTTGTGGAATTGACACTT
Clonage des protéines P4 dans le vecteur pGBKT7	
P4-TuYV-EcoRI–Rv	AAT-AAT-GAA-TTC-TCG-ATG-AAG-AAC-CAT-TGC-CTT-TG
P4-TuYV-NdeI–Fw	AAT-AAT-CAT-ATG-GAA-GAA-GAC-GAC-CAC-GCA-G
P4ΔN-TuYV-NdeI-Fw	AAT-AAT-CAT-ATG-CTA-CCA-GAG-GAG-CAG-GTT-CGA-G
P4-CABYV-EcoRI–Rv	AAT-AAT-GAA-TTC-CTA-CCT-ATT-TCG-GGT-TCT
P4-CABYV-NdeI–Fw	AAT-AAT-CAT-ATG-CAG-GGA-GGC-GAA-GGC-GAA
P4-PLRV-EcoRI–Rv	AAT-AAT-GAA-TTC-TCA-TCC-GCG-CTT-GAT-AAG
P4-PLRV-NdeI–Fw	AAT-AAT-CAT-ATG-TCA-ATG-GTG-GTG-TAC-AAC
P4-BYDV-EcoRI–Rv	AAT-AAT-GAA-TTC-CTA-TCG-TTG-ATT-CCT-GGA
P4-BYV-NdeI–Fw	AAT-AAT-CAT-ATG-GCA-CAA-GAA-GGA-GGC-GCC

iii) Amorces utilisées pour l'amplification de séquences du TuYV et du CABYV

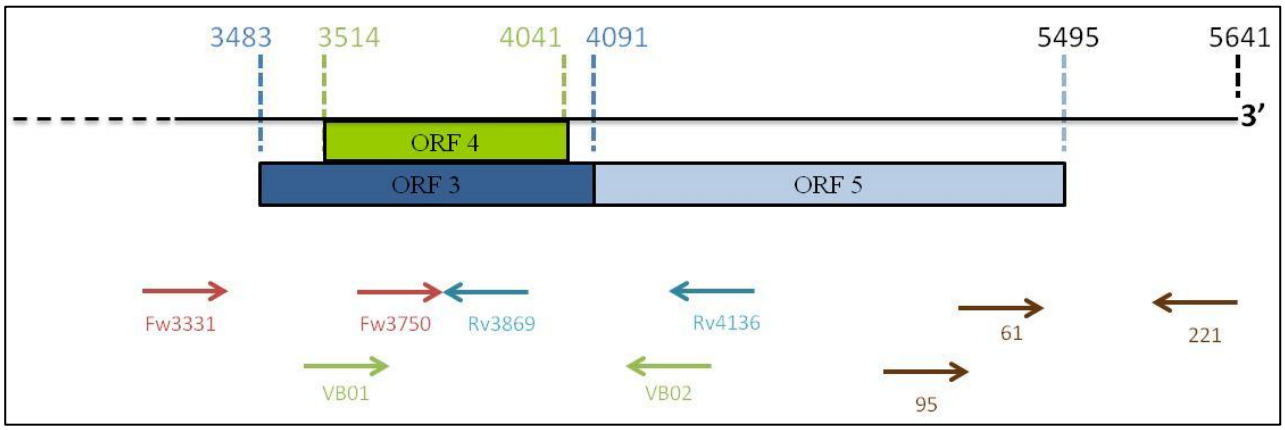


Figure 77 : Positions des amorces utilisées pour la détection par RT-PCR du TuYV. Les ORF 3, 4 et 5 sont positionnés sur l'ARN génomique du TuYV de 5641 pb. La position des codons start et stop de chaque ORF est indiqué en haut de la figure. Les flèches dans le bas de la figure indiquent le sens et la position des amorces utilisées pour les différentes RT-PCR.

Le tableau ci-dessous indique les amorces utilisées pour les RT-PCR sur le TuYV et le CABYV, en précisant le sens de l'amorce (sens : Fw ; antisens : Rv) et la séquence.

Nom de l'amorce	Sens	Position de début	Position de fin	Séquences de 5' en 3'
Amorces TuYV				
Fw3331	Fw	3331	3351	GTAAGAGACTTAAGCAAACCC
Fw3750	Fw	3750	3770	CTCGTAAGCGATGGAACCGGA
Rv3869	Rv	3849	3869	CTCGTAAGCGATGGAACCGGA
Rv4136	Rv	4116	4136	TGGAGAGGGAGAAGGCCCTGG
VB01	Fw	3563	3578	ACGAAGCTTGCCAGTGGTTGTGGTC
VB02	Rv	4091	4107	GCAGAATTCGGGTTCCTCGTCTACC
95	Fw	4818	4834	CACTCCATGGCAGTCTC
61	Fw	5308	5326	GTTCCTCCTTGGCTTCCTC
221	Rv	5621	5641	ACACCGAAGTGCCGTAGGGA
qPCRb-Fw	Fw	1814	1833	GAAGTACCAACCTCCCCACG
qPCRb-Rv	Rv	2009	1990	GTCGCAGGCTCTTCAGTTCT
Amorces CABYV				
CA106	Fw	5497	5514	TTTGGATCCAACTCTTTAGGAGGTTTT
CA107	Rv	4890	4904	TATGAATTCCAAAGACAAGACTT

5.6 Traitement à la DNAse des extractions d'ARN

Dans le cas des extractions des ARN totaux pour détecter la présence de virus par RT-PCRdans les feuilles inoculées, il est nécessaire de réaliser un traitement à la DNAse sur l'échantillon d'ARN, afin d'éliminer la présence éventuelle de plasmide binaire dans les feuilles infiltrées.

Le traitement à la DNAse est réalisé en ajoutant 1 µL de DNAse RQ1 RNase free à 1 U/µL dans les 30 µL d'échantillon d'ARN. Après 15 min à 37°C, la réaction est stoppée par ajout de 1 µL d'EDTA à 0.5 M. La RT-PCR est ensuite réalisée en ajoutant 0.5 mM de $MgCl_2$ dans la réaction de RT et en augmentant à 0.8 mM la concentration de $MgCl_2$ dans la réaction de PCR. Une PCR peut être réalisée directement sur l'échantillon d'ARN pour vérifier l'absence d'amplification après ce traitement à la DNAse.

5.7 Transcription *in vitro*

Le plasmide est tout d'abord linéarisé par une enzyme de restriction coupant en aval de la séquence à transcrire. De manière générale, la digestion enzymatique est réalisée dans un tampon approprié pour l'enzyme additionné de 0.1 mg/mL de BSA et a lieu pendant 3 h à 37°C. Le plasmide linéarisé est ensuite purifié en utilisant le kit MSB® Spin PCRapace (Invitek).

Des plasmides dérivés du pUC19 (Amp^R), nommés pCA_0WT et pBW-WTcco, contiennent l'ADNc complet du CABYV ou du TuYV sous le contrôle d'un promoteur T7 et permettent la transcription de l'ARN génomique viral complet.

Pour obtenir des transcrits complets du TuYV ou du CABYV, la transcription *in vitro* est réalisée sur 1 µg de plasmide linéarisé grâce au kit Ribomax (Promega), en utilisant l'ARN polymérase du bactériophage T7 et selon les recommandations du fournisseur. Après transcription, le mélange réactionnel est incubé 15 min à 37°C avec 1 U/µg de DNAse RQ1 RNAse free. Des extractions au phénol/chloroforme-alcool isoamylique (Vol/Vol) puis au

chloroforme-alcool isoamylique (Vol/Vol) sont réalisées, et enfin les transcrits sont précipités la nuit à -20°C en présence de 10 µg de glycogène, d'un volume d'acétate d'ammonium 4M et de 2 volumes d'éthanol 100%. Après centrifugation (45 min, 14000 rpm, 4°C), les culots sont lavés dans 600 µL d'éthanol 70%, puis repris dans 30 µL d'eau. La quantité de transcrits est estimée sur un gel dénaturant à 1% d'agarose (MOPS 1X, formaldéhyde 6%). L'échantillon est préalablement dénaturé 10 min à 65°C dans un tampon de dénaturation (MOPS 1X, formamide 50%, formaldéhyde 8%, BET 0.2 µg). Les transcrits sont ensuite stockés à -20°C

Pour obtenir des sondes marquées à la digoxygénine (DIG), la transcription *in vitro* s'effectue en suivant le protocole du DIG RNA labeling Mix (Roche). Aux 1 µg de plasmides linéarisés est ajouté un mix de rNTPS contenant la DIG-UTP et l'ARN polymérase du bactériophage T7 ou T3. Une fois la digestion avec la DNAse RQ1 réalisée, la sonde est directement stockée à -20°C sans étape de purification supplémentaire.

5.8 Northern blot

Les échantillons d'ARN sont au préalable dénaturés 10 min à 65°C dans un tampon de dénaturation (MOPS 1X, formamide 50%, formaldéhyde 8%, BET 0.2 µg). La migration des échantillons s'effectue dans un gel dénaturant à 1% d'agarose (MOPS 1X, formaldéhyde 6%) pendant 3 h à 50 V.

Les ARN sont ensuite transférés sur une membrane de nylon chargée positivement (Roche) et dans le tampon SSC 20 X (NaCl 3M, Citrate de sodium 300 mM, pH 7). Après le transfert pendant la nuit, les ARN sont fixés à la membrane par UV-crosslinking. La membrane est ensuite pré-hybridée pendant 3 h à 68°C dans 10 mL de tampon DIG Easy Hyb (Roche), puis hybridée dans le même tampon avec 2 µL de sonde marquée à la DIG et dénaturée 5 min à 99°C. Après plusieurs lavages, la membrane est incubée 1 h dans une solution de blocage 1X (Blocking reagent – Roche), puis 1 h dans le même tampon avec l'anticorps @DIG couplé à la phosphatase alkalyne et dilué au 1/10 000ème (Roche). Enfin, la révélation de la membrane se fait en utilisant le substrat chimioluminescent contenu dans le kit CDP Star (Roche).

6. Méthodes spécifiques aux protéines

6.1 Test ELISA

La technique immuno-enzymatique « Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay » (DAS-ELISA) permet de détecter un antigène fixé en sandwich entre deux anticorps. Dans notre cas, la technique du Test ELISA permet de détecter la présence de virus dans les broyats de feuilles, comme expliqué dans la **Figure 78** ci-après.

Le tableau suivant indique la composition des différents tampons:

Tampon	Composition
Tampon de broyage (PBST PVP)	PBS 1X, Tween 0.05%, Polyvinylpyrrolidone 2%
Tampon coating	15 mM Na_2CO_3, 35 mM $NaHCO_3$, pH 9.6
Tampon de lavage (PBST)	PBS 1X, Tween 0.05%
Tampon conjugué	PBST PVP + 0.2 % d'ovalbumine
Tampon substrat	0.1M diéthanolamine, pH 9.8

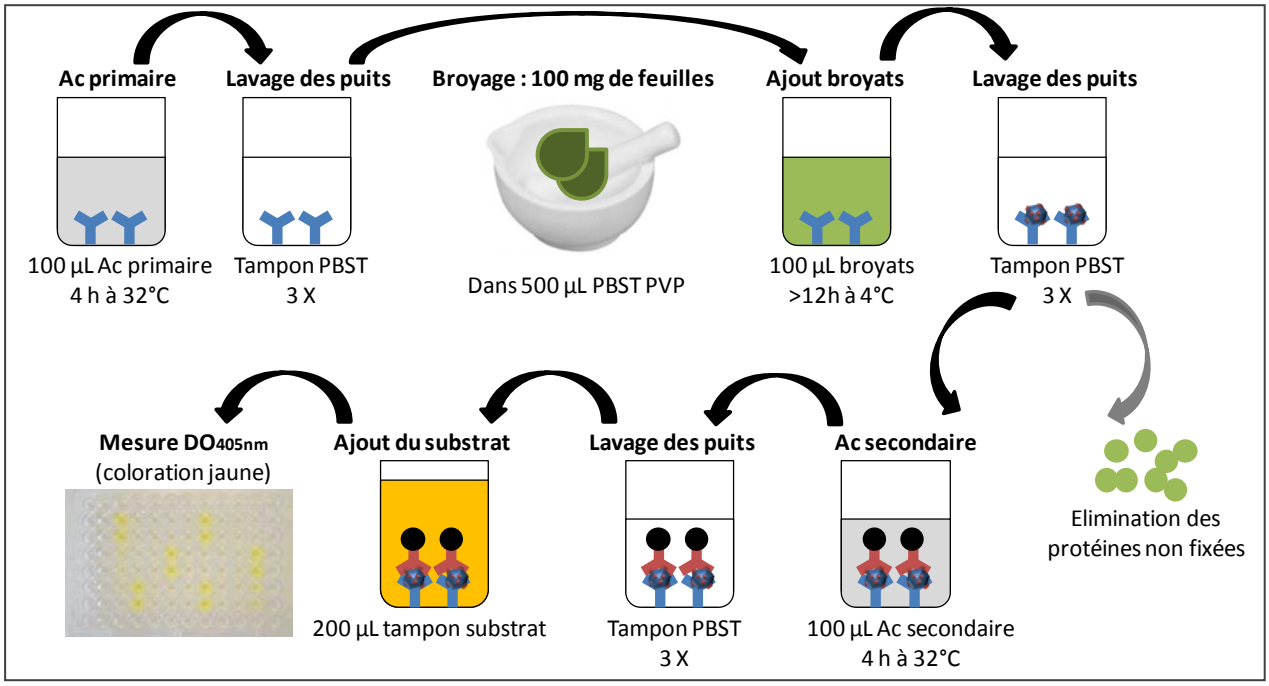


Figure 78 : Protocole du Test ELISA pour détecter le TuYV dans les broyats de feuilles. Les puits de la plaque sont incubés 4 h à 32°C avec 100 µL d'Anticorps primaire dilué au 1/400ème. Après trois lavages, les puits sont incubés une nuit à 4°C avec 100 µL de broyat de feuilles. Après trois lavages et une incubation de 4 h à 32°C avec 100 µL d'Anticorps secondaire dilué au 1/400ème, le substrat p-nitrophényl-phosphate (PNPP) à la concentration de 0.1% dans le tampon substrat est ajouté dans les puits et la DO_{405nm} est mesurée. La coloration jaune provient de l'hydrolyse du substrat p-nitrophényl-phosphate par la phosphatase alcaline.

6.2 Extraction des protéines avec le tampon Laemmli

100 mg de feuilles sont broyés dans un micro-tube à l'aide d'un pilon adapté et dans 100 µL de tampon PBS pH 7. Après ajout de 100 µL de tampon Laemmli 2X (25 mM Tris, 0.5% SDS, 0.012% β-mercaptoéthanol, 15% glycérol, 0.012% Bleu de bromophénol, pH 6.8) (Laemmli, 1970), le broyat est mélangé par un vortex de 15 sec puis chauffé 10 min à 100°C. Une centrifugation à basse vitesse (1 min 6000 rpm) permet de retenir les débris cellulaires dans le culot.

6.3 Gel SDS-PAGE

Les échantillons de protéines dénaturées sont déposés dans un gel SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis) composé d'une phase de concentration des protéines et d'une phase de séparation correspondant à un gel à 12% d'acrylamide. L'électrophorèse s'effectue dans un tampon Tris-glycine-SDS (25 mM Tris, 200 mM Glycine, 0.1% SDS).

	Gel de concentration	Gel de séparation
Eau	3.2mL	3.1mL
Tris HCl 0.5M pH6.8	1.25mL	/
Tris HCl 1.5M pH8.8	/	2.5mL
SDS 10%	50µL	125µL
Acrylamide/Bis-acrylamide 29 :1 (40%)	490µL	2.4mL
Ammonium Persulfate 10% (APS)	25µL	62.5µL
Temed	5µL	6.25µL

6.4 Western blot

Après leur séparation sur un gel SDS-PAGE, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose dans le tampon de transfert (25 mM Tris, 200 mM Glycine, 19.2% éthanol, pH 8.0) pendant 2 h à 60 V. La membrane est ensuite saturée avec le tampon PBST-lait (PBS 1X, Tween 1%, Lait 5%) pendant une heure. L'incubation une nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dans le PBST-lait est suivie de trois lavages dans le tampon PBST (PBS 1X, Tween 1%), puis d'une incubation de 4 h à 4°C avec un anticorps secondaire dans le PBST-lait. Le complexe « protéine - anticorps primaire - anticorps secondaire» est révélé avec le kit Lumi-light^{PLUS} (*Roche*).

Les dilutions des anticorps primaires et secondaires utilisées lors de ce travail de thèse sont indiquées dans ce tableau :

Anticorps	Dilution finale
@CP TuYV (Cherekan)	1/15000ème
@RT TuYV (IgG-RT)	1/8000ème
@P4 TuYV (Simba)	1/10000ème
@P0 TuYV (Barcelone)	1/30000ème
@6His	1/5000ème
@HA	1/10000ème
@RFP (sérum polyclonal) - *Ozyme*	1/1000ème
@GFP (sérum polyclonal)	1/10000ème
@c-myc (sérum monoclonal) - *Clontech*	1/5000ème
Goat anti rabbit IgG HRP conjugate (GAR perox) – *Invitrogen*	1/5000ème
Goat anti Mouse HRP conjugate (GAM perox)	1/5000ème

6.5 Colorations des gels SDS-PAGE

Après migration, le gel peut être coloré au bleu de Coomassie (acide acétique 10%, isopropanol 25%, bleu de Coomassie R250 0.5%) comme expliqué sur la **Figure 79** ci-dessous :

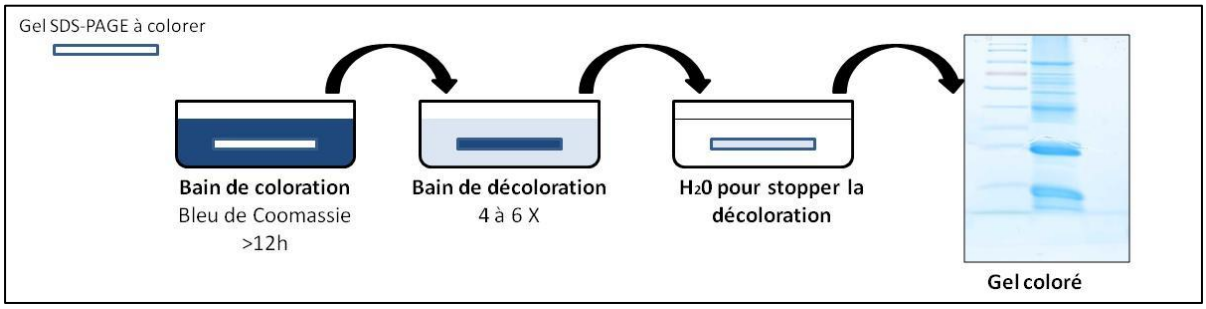


Figure 79 : Coloration des gels au bleu de Coomassie. Le gel est incubé dans un bain de coloration jusqu'à l'apparition des bandes de protéines. Le surplus de colorant est éliminé par des bains de décoloration successifs (acide acétique 10%, isopropanol 25%) puis le gel est stocké dans l'eau.

Pour la détection des protéines dans l'exsudat d'*Arabidopsis*, la coloration à l'argent a été choisie en raison de sa meilleure sensibilité. La coloration est effectuée comme indiqué dans la **Figure 80** ci-dessous :

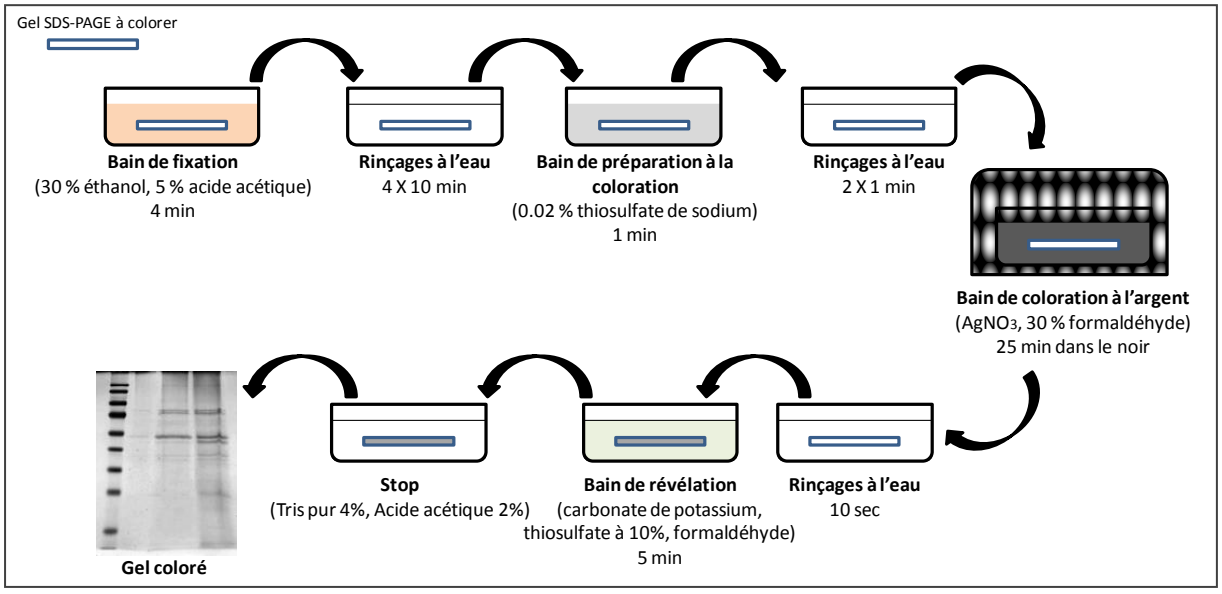


Figure 80 : Coloration des gels à l'argent. Le gel est incubé dans une série de bains permettant la coloration des bandes à l'argent.

7. Méthodes spécifiques d'analyse des exsudats de sève phloémienne

7.1 Collecte de sève à partir de concombres

La sève phloémienne exsude sous forme de gouttelettes à partir de plants de concombres coupés au niveau des pétioles ou des tiges. L'exsudat est récupéré à la pipette dans un volume de tampon (100 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA, 5 mM EGTA, 10% glycérol, 1% β-Mercaptoéthanol) et conservé sur la glace ou stocké à -20°C avant utilisation. Pour éviter la contamination de la sève par le contenu des cellules non phloémiennes coupées, la première goutte d'exsudat est éliminée.

7.2 Collecte de sève à partir d'*Arabidopsis thaliana*

Les *A. thaliana* n'étant pas des plantes qui exsudent naturellement comme le concombre, il faut utiliser la technique d'exsudation à l'EDTA pour récupérer la sève phloémienne (King & Zeevaart, 1974). La croissance des plantes se fait pendant 6 semaines avec une photopériode 16h/8h. Les feuilles matures d'*A. thaliana* écotype Cvi166 sont coupées à la base du pétiole à l'aide d'un scalpel. La base du pétiole est une nouvelle fois coupée dans le tampon d'exsudation (potassium phosphate 50 mM, EDTA 10 mM, pH 7.6), et les feuilles coupées sont gardés 30 sec dans le tampon d'exsudation avant d'être transférées deux par deux dans des micro-tubes de 2 mL contenant 80 µL de tampon d'exsudation (**Figure 81**).
Les micro-tubes sont ensuite placés dans une boite fermée contenant du papier humide pour éviter la transpiration des feuilles et l'évaporation du tampon. La boite est placée à l'obscurité et l'exsudation dure de 2 à 6 h. Les échantillons sont ensuite rassemblés pour atteindre un volume final d'environ 4 mL pour 100 feuilles.

Figure 81 : Exsudation de sève phloémienne d'*A. thaliana*. Après avoir coupé les pétioles dans le tampon d'exsudation, les feuilles sont placées deux par deux dans des micro-tubes de 2 mL. La base des pétioles trempe dans 80 µL de tampon d'exsudation. Les micro-tubes sont ensuite placés dans une boite humide et à l'obscurité pendant 2 à 6 h.

7.3 Concentration des protéines de sève d'*A. thaliana*

Les exsudats de sève sont concentrés sur des colonnes Centricon (Millipore) possédant une membrane filtrante de 3 kDa (**Figure 82**).

Dans un premier temps, pour éviter la rétention de l'échantillon sur les parois du réservoir de filtration de la colonne, le réservoir est incubé 1 nuit avec du PEG 6000 5%. Le réservoir est ensuite rincé à l'eau MilliQ, puis une centrifugation permet d'enlever les résidus d'eau du réservoir.

La figure ci-dessous est une adaptation du protocole « Centricon – User guide » et indique les étapes suivies pour concentrer l'échantillon d'exsudat d'*Arabidopsis*.

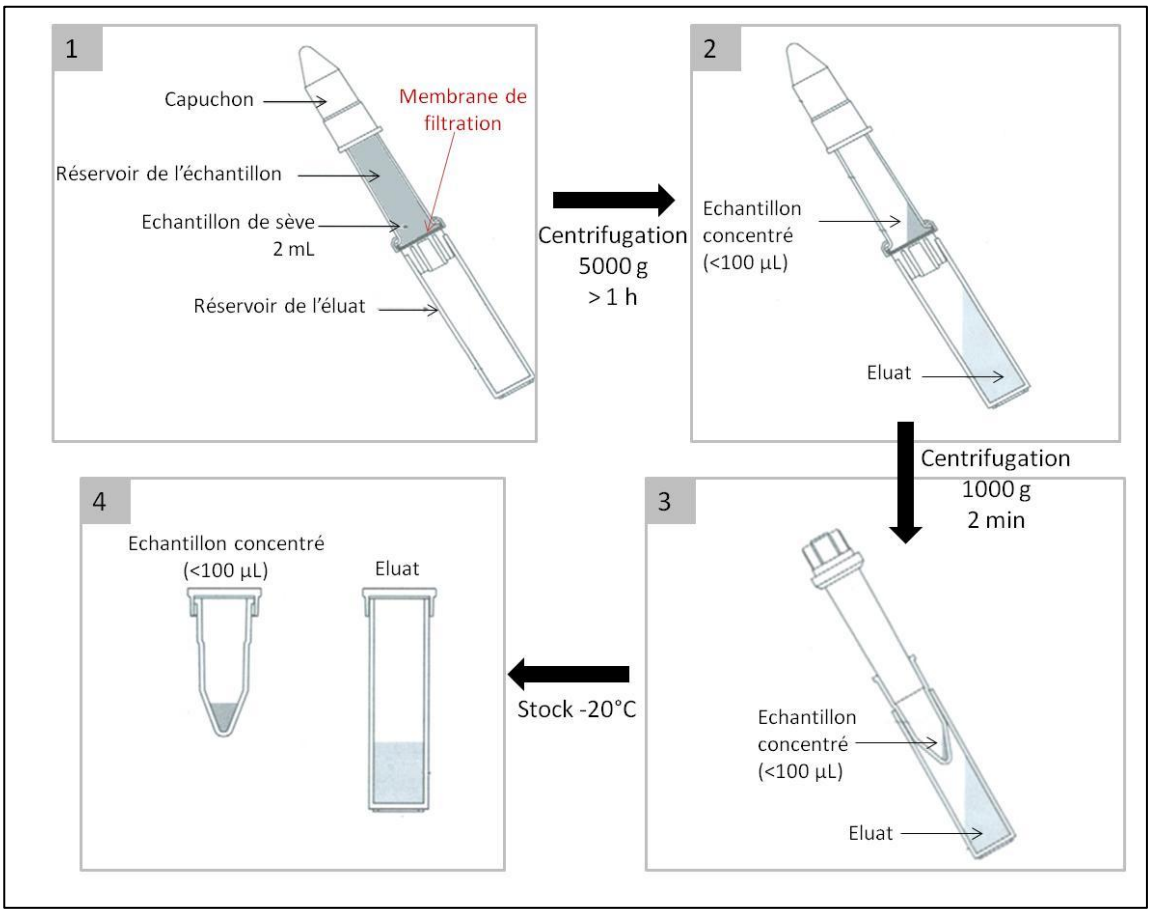


Figure 82 : Protocole de concentration dans les colonnes Centricon (Milipore). Une première centrifugation permet de concentrer l'échantillon dans le réservoir supérieur de la colonne. L'échantillon est ensuite récupéré dans le tube servant de capuchon par une deuxième centrifugation après avoir inversé la position du réservoir dans la colonne.

7.4 Dosage des protéines

La méthode Bradford est un dosage colorimétrique des protéines basé sur la fixation du colorant bleu de Coomassie sur les protéines. La forme brune libre du colorant absorbe à 470 nm et 650 nm, alors que la forme bleue fixée aux protéines absorbe à 595 nm. Le réactif de Bradford (P*rotein assay dye reagent, BioRad*) est ainsi ajouté à chacun des échantillons à analyser.
Pour connaître la quantité de protéine dans un échantillon, il est nécessaire d'utiliser une gamme étalon obtenue avec une protéine de concentration connue. Une gamme de BSA (*bovine serum albumine*) de concentrations finales allant de 0 à 20 µg/mL est donc réalisée, et les valeurs de $DO_{595\ nm}$ sont reportées sur un graphique pour avoir la correspondance entre une $DO_{595\ nm}$ et une concentration en µg/mL.
Ensuite, l'échantillon à doser est dilué au 1/100ème, 1/200ème et 1/1000ème et la $DO_{595\ nm}$ est reportée sur la gamme étalon afin de connaitre la concentration en protéines de l'échantillon.

7.5 Vérification de la qualité de la sève phloémienne

La sève phloémienne récoltée est de bonne qualité, sous-entendu non contaminée par de la sève brute du xylème ou par du contenu cellulaire, si la quantité de glucose et fructose est plus faible que celle en sucrose.
Le dosage des sucres est effectué en utilisant le kit Enzytec^{TM} D-Glucose/D-fructose/Sucrose (*R-biopharm*). Le principe de ce kit est de réaliser une série de réactions enzymatiques propre à chaque sucre, puis de mesurer la quantité de NADPH formée par ces réactions (mesure UV_{340nm}). Le protocole du fournisseur est suivi afin de calculer la concentration de chaque sucre.

7.6 Filtration d'échantillons protéiques sur colonnes Amicon®

Lors de ce travail de thèse, les colonnes Amicon® Ultra-4 Centrifugal Filter Device (*Millipore*) ont été utilisées pour séparer les composants de différents échantillons contenant des protéines et/ou des ARN.
L'échantillon est déposé dans la partie supérieure d'une colonne Amicon® composée de deux parties dissociables séparées par un filtre exclusif de 10, 30 ou 50 kDa (**Figure 83**). Après centrifugation de 45 min à 4000 g, le volume restant dans la partie supérieure, nommé le retenu (R), est principalement concentré en macromolécules dont le poids moléculaire (PM) en kDA est supérieur à celui du filtre de la membrane. La suspension se trouvant dans la partie inférieure est nommée l'éluât (E).

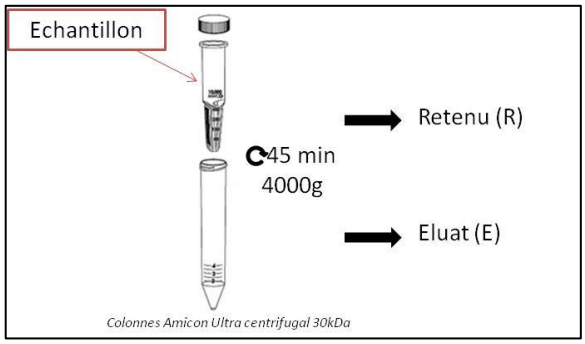


Figure 83 : Filtration des échantillons dans les colonnes Amicon. L'échantillon est déposé dans la partie supérieure de la colonne. Après centrifugation 45 min à 4000 g, le retenu (R) est concentré en macromolécules dont le poids moléculaire (PM) en kDA est supérieur à celui du filtre de la membrane.

8. Etudes des interactions entre protéines et ARN

8.1 Gel retard (EMSA)

La technique du gel retard, aussi appelée *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA), permet de détecter des composants interagissant avec les ARN dans un échantillon.
Une concentration croissante d'échantillon protéique est ainsi incubée 30 min dans la glace avec les transcrits complets du TuYV ou du CABYV marqués à la DIG. Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel d'agarose 1% non dénaturant et un protocole identique à celui du Northern blot est suivi jusqu'à l'incubation dans le tampon de blocage 1 X. L'anticorps Ac@DIG couplé à la phosphatase alcaline (Roche) est dilué au 1/1000ème dans le tampon de blocage 1X puis incubé avec la membrane pendant 1 heure. Après 2 lavages de 15 min, la révélation se fait grâce au substrat chimioluminescent de la phosphatase alcaline (CDP-STAR, Roche). S'il existe une interaction, la migration des ARN est ralentie sur le gel.

8.2 Northwestern blot

La technique du Northwestern blot permet d'identifier des protéines interagissant avec des ARN marqués à la DIG.
Les échantillons protéiques sont dénaturés dans le tampon Laemmli 2 X pendant 10 min à 95°C, avant d'être séparés sur un gel SDS-PAGE 12%. Après un transfert liquide (60 V, 2 h) des protéines sur une membrane de nitrocellulose, la membrane est incubée dans un tampon de renaturation (10 mM Tris-HCl pH7.5, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,05% Triton X-100, 1X Denhardt's reagent) la nuit à 4°C, puis dans le même tampon 3 h à 4°C avec les transcrits complets du TuYV ou du CABYV marqués à la DIG. Après 3 lavages dans le tampon de renaturation, la membrane est incubée pendant 1 h à température ambiante avec les anticorps @DIG couplés à la phosphatase alcaline (*Roche*). La révélation se déroule comme décrit dans le paragraphe précédent.
Une coloration au bleu colloïdal ($SO_4N_2H_8$ 17%, acide acétique 0.5%, méthanol 34%, Serva Blue G 0.1%), suivie d'une décoloration dans plusieurs bains d'eau, d'un gel SDS-PAGE réalisé avec les mêmes échantillons permet de visualiser puis de prélever les protéines se fixant à l'ARN viral avant analyse par spectrométrie de masse (MALDI-TOF et LC-ms/ms).

9. Transformation et caractérisation des lignées mutantes d'*A. thaliana*

9.1 Transformation par la méthode du floral dip

La transformation stable des *A. thaliana* Col-0 a été réalisée en utilisant la méthode du floral dip décrite par (Bechtold & Pelletier, 1998). Une culture d'*A. tumefaciens* contenant le plasmide binaire servant à l'insertion du gène dans la plante est agitée à 28°C jusqu'à obtenir une DO_{600nm} de 1,5. Les bactéries sont ensuite reprises dans un milieu Murashige & Skoog 0.5 X additionné de 200 µM d'Acétosyringone, de 5% de saccharose et d'un adjuvent, le Silwet L-77 à 250 mg/mL.
Les bourgeons floraux sont plongés 30 sec dans ce milieu pour permettre l'introduction du transgène dans les cellules embryonnaires. Les plantes sont ensuite placées 24 h à l'obscurité dans une boite fermée pour maintenir l'humidité. Jusqu'à la récolte des graines 2

à 3 semaines plus tard, les hampes florales nouvellement formées sont éliminées au fur et à mesure.

9.2 Caractérisation d'*A. thaliana* transformées par floral dip

Les graines sont stérilisées pendant 10 min dans une solution de stérilisation (Ethanol 90%, Javel 10%, 1 goutte de tween), puis rincées deux fois dans l'éthanol 95%. Après séchage complet des graines par évaporation de l'éthanol, celles-ci sont déposées sur le milieu de culture Murashige & Skoog (MS) additionné de Kanamycine à 50 µg/mL :

MS medium M0222	4.4 g/L
MES	0.5 g/L
Sucrose	1%
PPM (Plant Preservative Mixture, Kalys Biotechnologies)	2 mL/L
Agar	8 g/L
pH ajusté à 5,7	
Autoclave 30 min 100°C	
Kanamycine	50 µg/mL

Les boites sont incubées dans une chambre de culture (jours courts 8h/16h et 22°C/18°C) pendant plusieurs semaines. Toutes les graines germent, mais seules les plantules possédant le gène de résistance à la Kanamycine, donc les plantules transformées, survivent sur la boite. Les autres finissent par blanchir et dépérir (**Figure 84**A et B).
Les plantules sont ensuite repiquées en terre et les pots sont installés en mini-serres pour garder une forte humidité pendant 2 semaines (**Figure 84** C). Lors d'un premier semis des graines après transformation, il y a un mélange de plantes non transformées et de plantes portant l'insertion du transgène sur un seul allèle (hétérozygotes). Les plantules non transformées dépérissent sur le milieu de sélection, et on réalise une autofécondation sur les plantules hétérozygotes de cette lignée qu'on appelle T1. Le semis de la descendance de T1 (lignée T2) est un mélange de plantes sauvages, hétérozygotes et homozygotes : certaines plantes dépérissent encore sur le milieu de sélection. C'est seulement à partir de la lignée T3 qu'il est possible d'obtenir une lignée homozygote pure où 100% des plantules survivent sur le milieu sélectif.

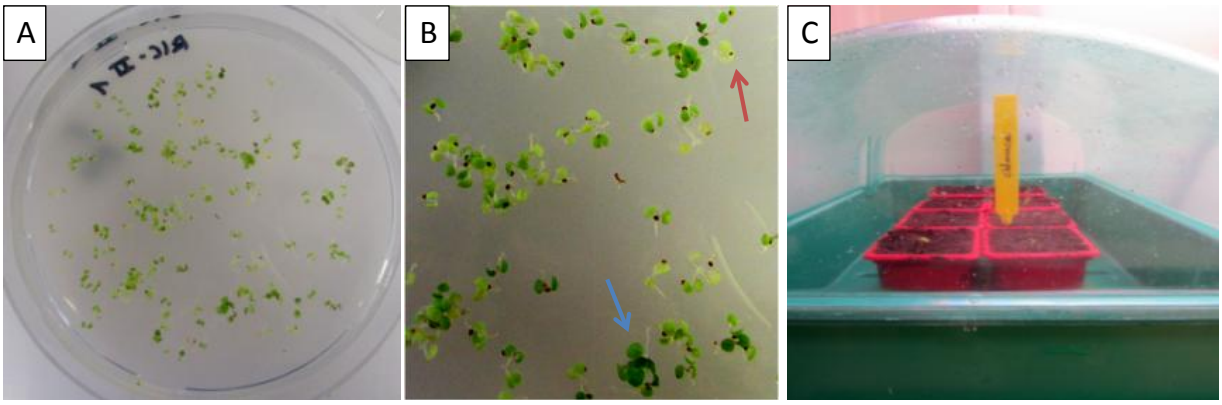


Figure 84 : Sélection sur boites des *A. thaliana* transformées. Les graines sont semées sur un milieu gélosé Murashige & Skoog contenant de la Kanamycine pour la sélection des transformants **(A).** Toutes les graines germent, mais après environ 10 jours, les plantules non transformées commencent à dépérir et blanchissent (flèche rouge, **B**), alors que les plantules transformées continuent leur croissance normale (flèche bleu, **B**). Les plantules sont alors repiquées en terre et maintenues dans des mini-serres pendant 2 semaines pour préserver l'humidité **(C).**

9.3 Caractérisation des lignées SAIL et SALK

L'homozygotie ou l'hétérozygotie des lignées SAIL et SALK est vérifiée par PCR en utilisant trois amorces différentes comme indiqué dans la **Figure 85** ci-dessous.

Deux PCR par plante sont réalisées en utilisant le KAPA3G Plant PCR kit (KapaBiosystems) et en suivant les recommandations du fournisseur. Afin d'utiliser le même échantillon de feuille pour les deux PCR, un fragment de feuille est au préalable broyé dans 40 µL de tampon de dilution (Tris-HCl 50 mM, EDTA 0.1 mM, KAPA Plant PCR Enhancer 0.2X, pH 8) et 4 µl de ce broyat est utilisé pour chaque réaction de PCR.

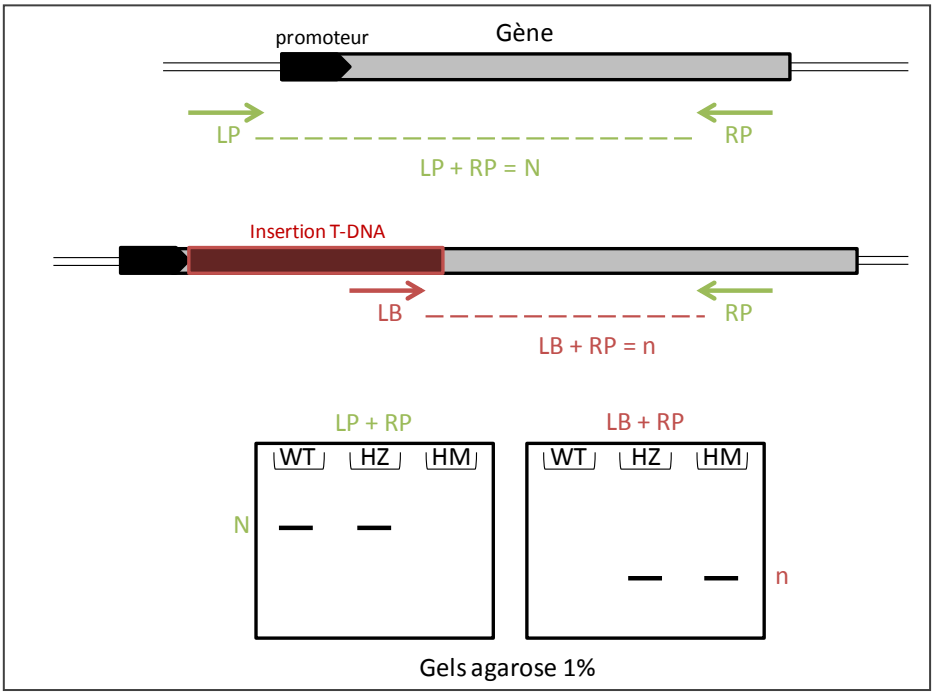


Figure 85 : PCR permettant la caractérisation des lignées SALK et SAIL. Le couple d'amorces LP + RP permet d'amplifier un fragment de taille N au niveau du gène d'intérêt. L'amorce LB complémentaire à une région du T-DNA permet, lorsqu'elle est associée à l'amorce RP, d'amplifier un fragment plus petit de taille n. Le fragment de taille N ne pouvant pas être amplifié en cas d'insertion du T-DNA dans le gène, il est possible de faire la différence entre une plante sauvage sans insert (WT), une plante hétérozygote avec l'insert dans un seul allèle du gène (HZ) et une plante homozygote possédant l'insert dans les deux allèles du gène (HM).

9.4 Obtention de doubles mutants d'*A. thaliana*

A partir de deux lignées homozygotes pour deux gènes différents, il est possible de réaliser des croisements pour l'obtention des doubles homozygotes.
Des jeunes bourgerons floraux d'*A. thaliana* encore fermés sont délicatement ouverts sous une loupe binoculaire, et les étamines sont retirées avec des pinces fines pour éviter l'autofécondation. Seul le pistil est conservé. Tous les autres bourgerons floraux non utilisés sont éliminés. Le pistil est alors pollinisé par tapotement de fleurs fraichement écloses provenant d'une autre plante. Jusqu'à la récolte des graines 2 à 3 semaines plus tard, les hampes florales nouvellement formées sont éliminées au fur et à mesure.

10. Méthodes diverses

10.1 Purification de particules virales

300 g de feuilles de *M. perfoliata* infectées sont conservées à -80°C pour la purification de particules virales. Les feuilles sont tout d'abord broyées dans le tampon citrate (citrate de sodium 0.1 M pH 6, 0.5% d'éthanol). Une incubation de 4 h à température ambiante en présence de 0.5 % de cellulase, 0.5% de macérozyme et 0.1 % d'acide thioglycolique permet la digestion des parois cellulaires tout en inhibant l'action des protéases libérées lors de la lyse. Après ajout de chloroforme/n-butanol (1 :1), la suspension est mise sous agitation vigoureuse pendant 10 min. La phase aqueuse, récupérée par une centrifugation (15 min, 10000 rpm, 17°C), est mise sous agitation pendant 30 min avec 0.5 % de triton X-100, puis 1 h avec 2.33 % de NaCl et 8 % de PEG 6000. Le mélange est ensuite incubé une nuit à température ambiante pour floculation. Les culots obtenus par une centrifugation (20 min, 12000 rpm) sont repris dans du tampon citrate contenant 5 % d'éthanol. Après 1 h d'incubation, la suspension est centrifugée (17 min, 9000 rpm). Le surnageant est déposé sur un coussin de saccharose à 30 %. Les culots récupérés après ultracentrifugation (2 h 30, 35000 rpm) sont repris dans le tampon citrate contenant 0.5 % d'éthanol. L'échantillon est déposé sur un gradient de saccharose de 60 % à 20 % afin de séparer les composés selon leur profil de sédimentation. Après une ultracentrifugation (4 h, 30000 rpm), les différentes fractions sont récoltées à l'aide d'une pompe péristaltique (1 mL/min) puis analysées par lecture de l'absorbance à 260 nm et à 280 nm. Les fractions contenant le virus sont aliquotées puis congelées à -80°C après avoir déterminé leur concentration.

Virus	Coefficient d'extinction spécifique	Rapport 260/280
CABYV	8.5	Entre 1,7 et 1,9
TuYV	8.6	Entre 1,5 et 1,7

10.2 Mini-purification de particules virales

Le protocole de la purification de particules virales a été adapté pour un matériel végétal de 5 g, soit un poids réduit de 60 x par rapport à la méthode habituelle.

5 g de feuilles sont conservées dans du papier aluminium à -80°C. Les feuilles sont tout d'abord broyées dans l'azote liquide dans un grand mortier sur la glace. La poudre est récupérée dans un tube Falcon 50 mL contenant 8,5 mL de tampon citrate, puis une incubation de 2 h est réalisée en présence de 50 mg de cellulase, 50 mg de macérozyme et 10 µL d'acide thioglycolique. Le mélange de chloroforme/n-butanol (1 :1) est ensuite ajouté pour une agitation de 15 min. Après centrifugation (20 min, 9000 rpm, 17°C) dans le rotor JA18, la phase aqueuse est mise sous agitation pendant 30 minutes avec 0.5% de triton X-100, puis 1 h avec 2.33 % de NaCl et 8 % de PEG 6000. Le mélange est ensuite séparé dans deux tubes Corex en verre de 15 mL pour une incubation d'une nuit à température ambiante, puis est centrifugé (20 min, 12000 rpm, 17°C) dans le rotor JA18. Les culots sont repris dans 1 mL de tampon citrate contenant 5% d'éthanol. Après une incubation d'une heure, la suspension est centrifugée (17 min, 10800 rpm, 17°C) dans la centrifugeuse eppendorf 30 tubes. Le surnageant est ensuite déposé sur un coussin de saccharose à 30% avant une ultra-centrifugation (2 h 30, 58000 rpm, 17°C) dans le rotor TLA-100. Les culots sont repris dans 20 µL de tampon citrate contenant 0.5% d'éthanol.

10.3 *Immunosorbent electron microscopy* (ISEM)

Les purifications de particules virales et les broyats de feuilles inoculées sont observées par ISEM selon le protocole suivant. Des grilles de formvar/carbone 300 mesh sont incubées 30 min à température ambiante avec une solution d'anticorps reconnaissant les virions du TuYV et diluée au 1/200ème (@BMYV utilisé pour les tests ELISA). Après 3 lavages dans des gouttes de tampon sodium phosphate 0.1 M pH 7 (PBS), les grilles sont incubées 30 min avec l'échantillon à observer. Les échantillons sont dilués dans du tampon PBS. Les grilles sont ensuite colorées négativement à l'acétate d'uranyle 3% pendant 5 min, puis observées au microscope électronique à transmission EM 208 *Philips* (80kV).

10.4 Observations au microscope confocal

Pour chaque plante à observer, trois disques foliaires sont prélevés et montés entre lame et lamelle dans de l'eau. Après avoir fait le vide dans l'échantillon, les lames sont observées au microscope confocal LSM700 (*Zeiss*) disponible à l'IBMP (Strasbourg), avec un objectif à eau C-apo-chromat (63X/1.2W Korr). Les images sont ensuite traitées avec le logiciel Zen 2011 Edition (*Zeiss*).

10.5 Tests statistiques

Les tests statistiques sur les valeurs de DO_{405nm} mesurées en ELISA ont été effectués avec le logiciel Minitab®15 disponible via l'Université de Strasbourg.

Le test statistique de Student (Test t à 2 échantillons) permet de déterminer si les moyennes de deux populations diffèrent de manière significative. Cette procédure utilise l'hypothèse nulle que la différence entre deux moyennes de la population est égale à une valeur hypothétisée ($H_0 : \mu_1 - \mu 2 = \mu 0$) et la teste par rapport à une hypothèse alternative, qui peut être unilatérale à gauche ($\mu 1 - \mu 2 < \mu 0$), unilatérale à droite ($\mu 1 - \mu 2 > \mu 0$) ou bilatérale ($\mu 1 - \mu 2 \neq \mu 0$). Si la valeur de p du test est inférieure au niveau de signification choisi (0.05), on rejette l'hypothèse nulle: les moyennes sont différentes.

Cette procédure est fondée sur la loi de distribution t. Dans le cas de petits échantillons, elle offre de meilleurs résultats lorsque les données sont extraites d'une distribution normale ou la plus normale possible. Plus l'effectif des échantillons est important, plus les résultats sont fiables. Avant d'effectuer un test de Student, j'ai donc toujours vérifié la normalité de mes données.

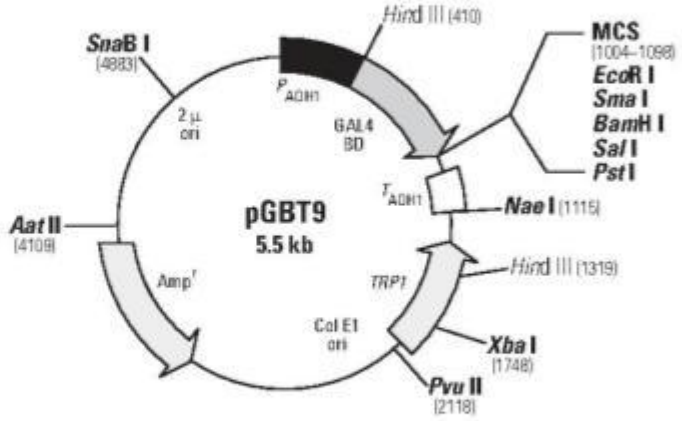
ANNEXES

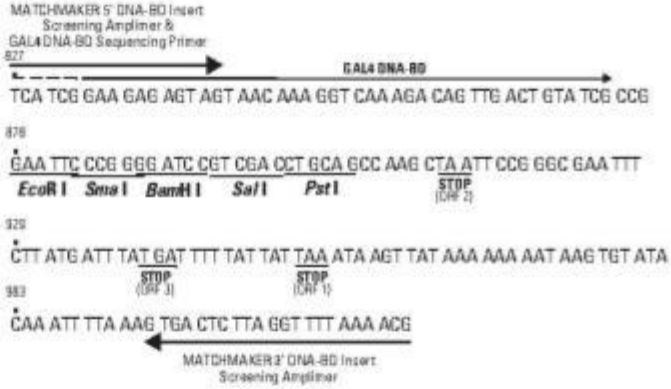
1. Carte du plasmide pGBT9

Vector Information

pGBT9 DNA-BD Vector Information PT1021-5

GenBank Accession #: U07646 Catalog #K1605-A





Restriction map and multiple cloning site (MCS) of ppGBT9 DNA-BD Vector. Unique restriction sites are in bold.

Description:

pGBT9 generates a hybrid protein that contains the sequences for the GAL4 DNA-binding domain (DNA-BD; a.a. 1–147). For the construction of a hybrid protein, the gene encoding the protein of interest is ligated into the MCS in the correct orientation and in the correct reading frame such that a fusion protein is generated. The fusion protein is expressed in yeast host cells from the constitutive *ADH1* promoter; transcription is terminated at the *ADH1* transcription termination signal. The hybrid protein is targeted to the yeast nucleus by nuclear localization sequences that are an intrinsic part of the GAL4 DNA-BD (2). pGBT9 is a shuttle vector that replicates autonomously in both *E. coli* and *S. cerevisiae*. It carries the *bla* gene (for ampicillin resistance in *E. coli*) and the *TRP1* nutritional marker that allow yeast auxotrophs carrying pGBT9 to grow on limiting synthetic medium lacking Trp.

Clontech

United States/Canada
800.662.2566
Asia Pacific
+1.650.919.7300
Europe
+33.(0)1.3904.6880
Japan
+81.(0)77543.6116

Clontech Laboratories, Inc.
A Takara Bio Company
1290 Terra Bella Ave.
Mountain View, CA 94043
Technical Support (US)
E-mail: tech@clontech.com
www.clontech.com

(PR81583)

Location of features

- Promoter
  Fragment containing the *S. cerevisiae ADH1* promoter: 10–406
- GAL4 DNA-binding domain polypeptide
  Start codon: 434–436; stop codon: 953–955
  GAL4 codons 1–147: 434–874
- Multiple cloning site: 878–905
- Transcription termination signal
  Fragment carrying the *S. cerevisiae ADH1* terminator: 921–1112
- *TRP1* coding sequence
  Start codon: 1835–1833; stop codon: 1163–1161
- Col E1 origin of plasmid replication: 2322–2965
- Ampicillin resistance gene
  Promoter: –35 region: 4043–4038; –10 region: 4020–4015
  Transcription start point: 4008
  Ribosome binding site: 3985–3981
  β-lactamase coding sequences
  Start codon: 3973–3971; stop codon: 3115–3113
  Signal peptide: 3973–3905
  Mature protein: 3904–3116
- Fragment containing the 2 μ origin of replication: 1–1348

Primer locations:

- MATCHMAKER DNA-BD 5' Insert Screening Amplimer (#5417-1) or GAL4 BD Sequencing Primer (#6474-1): 827—843
- MATCHMAKER DNA-BD 3' Insert Screening Amplimer (#5417-1): 1015–994

Propagation in *E. coli*

- Suitable host strains: DH5α and other general purpose strains.
- Selectable marker: plasmid confers resistance to ampicillin (50 μg/ml) to *E. coli* hosts.
- *E. coli* replication origin: Col E1
- Copy number: 15–20

Propagation in *S. cerevisiae*

- Suitable host strains: Y187(α), Y190(a), HF7c(a), CG1945(a), PJ69-2A, PJ69-4A, and SFY526(a)
- Selectable marker: *TRP1*
- *S. cerevisiae* replication origin: 2 μ
- Copy number: multiple copy

References

1. Bartel, P. L., *et al.* (1993) In *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach* (Oxford University Press, Oxford) pp. 135–179.
2. Silver, P. A., *et al.* (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:5951–5955.

Note: The attached sequence file has been compiled from information in the sequence databases, published literature, and other sources, together with partial sequences obtained by CLONTECH. This vector has not been completely sequenced.

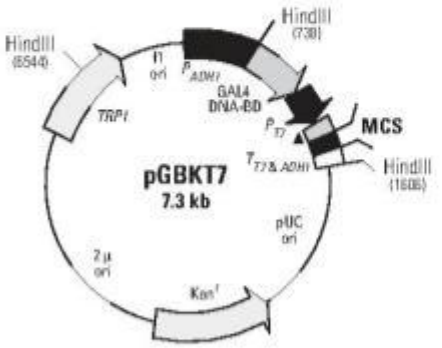
© 1998, CLONTECH Laboratories, Inc.

2. Carte du plasmide pGBKT7

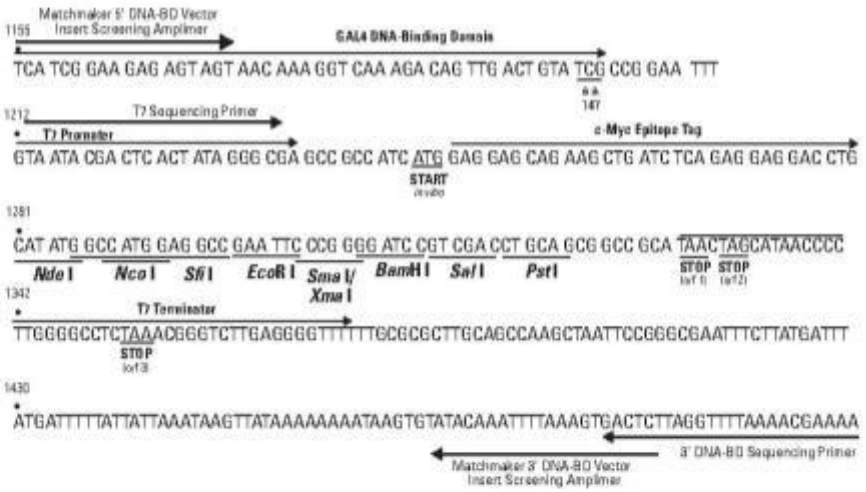
Vector Information

pGBKT7 Vector Information PT3248-5

Cat. No. 630489
630443



▲ c-Myc epitope tag



Restriction Map and Multiple Cloning Site (MCS) of pGBKT7. Unique restriction sites are in bold.

Description:
The pGBKT7 vector expresses proteins fused to amino acids 1–147 of the GAL4 DNA binding domain (DNA-BD). In yeast, fusion proteins are expressed at high levels from the constitutive *ADH1* promoter (P_{ADH1}); transcription is terminated by the T7 and *ADH1* transcription termination signals ($T_{T7 \& ADH1}$). pGBKT7 also contains the T7 promoter, a c-Myc epitope tag, and a MCS. pGBKT7 replicates autonomously in both *E. coli* and *S. cerevisiae* from the pUC and 2µ ori, respectively. The vector carries the Kan^r for selection in *E. coli* and the *TRP1* nutritional marker for selection in yeast. Yeast strains containing pGBKT7 exhibit a higher transformation efficiency than strains carrying other DNA-BD domain vectors (1).

(PR8Y2643; published 5 Dec 2008)

Clontech

United States/Canada
800.662.2566
Asia Pacific
+1.650.919.7300
Europe
+33.(0)1.3904.6880
Japan
+81.(0)77.543.6116

Clontech Laboratories, Inc.
A Takara Bio Company
1290 Terra Bella Ave.
Mountain View, CA 94043
Technical Support (US)
E-mail: tech@clontech.com
www.clontech.com

Use:
pGBKT7 is the DNA-BD Vector included with Clontech's Matchmaker™ Systems. The MCS of pGBKT7 contains unique restriction sites in frame with the 3' end of the GAL4 DNA-BD for constructing fusion proteins with a bait protein. The bait protein is also expressed as a fusion to a c-Myc epitope tag. c-Myc tagged proteins can be identified with antibodies raised to this common epitope, eliminating the need to generate specific antibodies to new proteins. The T7 promoter is used for *in vitro* transcription and translation of the epitope tagged fusion protein. Note that the DNA-BD is not expressed during the *in vitro* transcription and translation reactions.

The MCS in pGBKT7 is compatible with those in pMyc-CMV and pHA-CMV, Clontech's epitope tagged mammalian expression vector set (Cat. No. 631604). As a result, the target gene can be shuttled into these vectors in order to confirm protein interactions *in vivo*.

Location of features:

- Truncated *S. cerevisiae ADH1* promoter (P_{ADH1}): 30–736
- GAL4 DNA binding domain (DNA-BD) polypeptide amino acids 1–147: 762–1202
- T7 RNA polymerase promoter: 1212–1235
- c-Myc epitope tag: 1248–1280
- Multiple Cloning Site: 1281–1334
- Transcription termination signals
  - T7 terminator: 1335–1381
  - *ADH1* terminator: 1414–1610
- pUC plasmid replication origin: 1838–2636
- Kanamycin resistance gene: 4144–3222
- Yeast 2 µ replication origin: 4148–5493
- *TRP1* coding sequences
  - promoter: 5559–6755
  - gene: 6031–6705
- f1 bacteriophage origin of replication: 6756–29

Location of primers:

- T7 Sequencing Primer: 1213–1233
- 3' DNA-BD Sequencing Primer: 1510–1487

Propagation in *E. coli*:

- Suitable host strains: DH5α, DH10 & other general purpose strains
- Selectable marker: plasmid confers resistance to kanamycin (50 µg/ml) in *E. coli* hosts
- *E. coli* replication origin: pUC
- Copy number: ~500
- Plasmid incompatibility group: pMB1/Col E1

Propagation in *S. cerevisiae*:

- Suitable host strains: AH109(*MAT***a**), Y187(*MAT*α), Y190(*MAT***a**), SFY526(*MAT***a**), CG1945(*MAT***a**), HF7c(*MAT***a**)
- Selectable marker: *TRP1*
- *S. cerevisiae* origin: 2 µ

Note: The attached sequence file has been compiled from information in the sequence databases, published literature, and other sources, together with partial sequences obtained by Clontech. This vector has not been completely sequenced.

Reference:

1. Louret, O. F., *et al.* (1997) *BioTechniques* **23**: 816–819.

Notice to Purchaser

Clontech products are to be used for research purposes only. They may not be used for any other purpose, including, but not limited to, use in drugs, in vitro diagnostic purposes, therapeutics, or in humans. Clontech products may not be transferred to third parties, resold, modified for resale, or used to manufacture commercial products or to provide a service to third parties without written approval of Clontech Laboratories, Inc. .

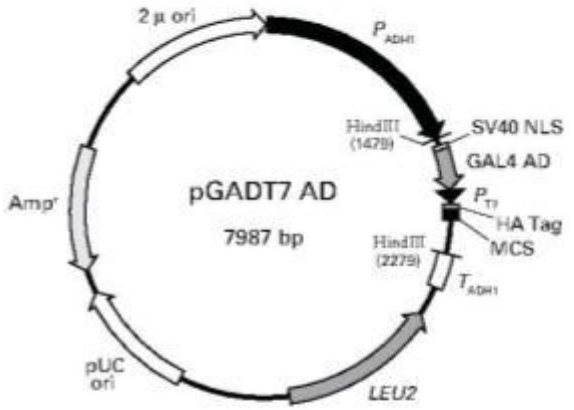
Clontech, Clontech Logo and all other trademarks are the property of Clontech Laboratories, Inc., unless noted otherwise. Clontech is a Takara Bio Company. ©2008 Clontech Laboratories, Inc.

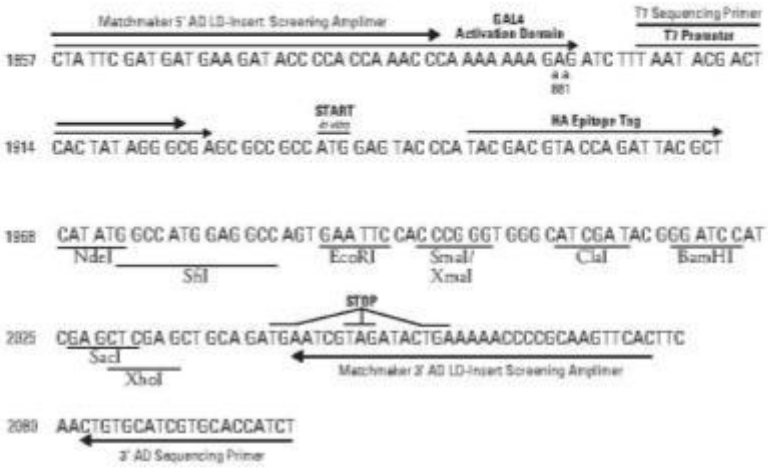
3. Carte du plasmide pGADT7

Vector Information

pGADT7 AD Vector Information PT3249-5

Cat. Nos. 630442
630489
630491





pGADT7 AD Vector Map and Multiple Cloning Site (MCS).

Description

pGADT7 AD is a yeast expression vector that is designed to express a protein of interest fused to a GAL4 activation domain (AD; amino acids 768–881). Transcription of the GAL4 AD fusion is driven by the constitutively active *ADH1* promoter (P_{ADH1}), and is terminated at the *ADH1* transcription termination signal (T_{ADH1}). The GAL4 AD fusion contains an N-terminal SV40 nuclear localization signal (SV40 NLS; 1) that targets the protein to the yeast nucleus, and a hemagglutinin epitope tag (HA Tag), located between the GAL4 AD and the protein of interest, that allows the protein to be easily detected with HA-tag antibodies.

The T7 promoter (P_{T7}), located just upstream of the HA tag sequence, allows *in vitro* transcription and translation of the HA-tagged protein of interest (without the GAL4 AD and the SV40 NLS). pGADT7 AD replicates autonomously in both *E. coli* and *S. cerevisiae* from the pUC and 2 µ ori, respectively. The vector also contains an ampicillin resistance gene (Amp^r) for selection in *E. coli* and a *LEU2* nutritional marker for selection in yeast.

(010312)

Clontech

United States/Canada
800.662.2566
Asia Pacific
+1.650.919.7300
Europe
+33.(0)1.3904.6880
Japan
+81.(0)77543.6116

Clontech Laboratories, Inc.
A Takara Bio Company
1290 Terra Bella Ave.
Mountain View, CA 94043
Technical Support (US)
E-mail: tech@clontech.com
www.clontech.com

Use

pGADT7 AD is the AD Cloning Vector provided in Clontech's Matchmaker™ Gold Yeast One- and Two-Hybrid Screening Systems (Cat. Nos. 630491 and 630489, respectively). The vector allows the generation of GAL4 AD fusion proteins from either a gene of interest or a cDNA library. **Important:** Genes must be cloned into the MCS so that they are in-frame with the GAL4 AD and HA tag coding sequences. The vector can also be used as a negative "prey" control for the One-Hybrid System.

GAL4 AD/HA-tagged fusion proteins expressed by the vector can be detected with either our GAL4 AD Monoclonal Antibody (Cat. No. 630402) or our HA-Tag Polyclonal Antibody (Cat. No. 631207). Note: *In vitro* transcription/translation from the T7 promoter, located between the GAL4 AD and HA tag sequences, produces an HA-tagged protein that lacks the GAL4 AD. Such proteins can be detected by the HA-Tag Polyclonal Antibody, but not the GAL4 AD Monoclonal Antibody.

Location of features

- P_{ADH1} (full-length *S. cerevisiae ADH1* promoter): 7–1478
- GAL4 AD (GAL4 activation domain with SV40 Nuclear Localization Signal [NLS])
  - SV40 NLS: 1500–1556
  - GAL4 (amino acids 768–881): 1560–1898
- P_{T7} (T7 RNA polymerase promoter): 1904–1926
- HA Tag (hemagglutinin epitope tag): 1941–1967
- MCS (multiple cloning site): 1968–2040
- T_{ADH1} (*S. cerevisiae ADH1* Terminator): 22879–2604
- *LEU2* coding sequences: 2722–3813 (complementary)
- pUC ori (pUC replication origin): 4580–5417
- Amp' (ampicillin resistance gene): 5573–6433 (complementary)
- 2 µ ori (Yeast 2 µ replication origin): 6997–7987

Location of primers

- T7 Sequencing Primer: 1904–1924
- 3' AD Sequencing Primer: 2101–2082
- Matchmaker 5' AD LD-Insert Screening Amplimer (Cat. No. 630433): 1857–1888
- Matchmaker 3' AD LD-Insert Screening Amplimer (Cat. No. 630433): 2077–2045

Propagation in *E. coli*

- Suitable host strains: DH5α, DH10 & other general purpose strains
- Selectable marker: plasmid confers resistance to ampicillin (100 µg/ml) to *E. coli* hosts
- *E. coli* replication origin: pUC
- Copy number: ~500
- Plasmid incompatibility group: pMB1/Col E1

Propagation in *S. cerevisiae*

- Suitable host strains: Y1HGold, Y2HGold, AH109(*MAT***a**), Y187(*MAT*α), Y190(*MAT***a**), SFY526(*MAT***a**), CG1945(*MAT***a**), HF7c(*MAT***a**)
- Selectable marker: *LEU2*
- *S. cerevisiae* origin: 2 µ

Reference

1. Chien, C.T., Bartel, P. L., Sternglanz, R. & Fields, S. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**:9578–9582.

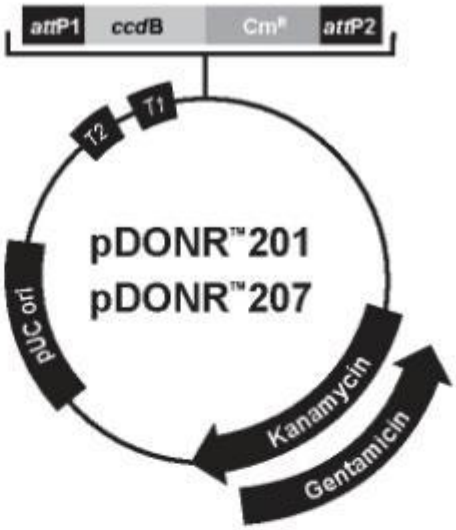
Note: The vector sequence was compiled from information in the sequence databases, published literature, and other sources, together with partial sequences obtained by Clontech. This vector has not been completely sequenced.

Notice to Purchaser

Clontech products are to be used for research purposes only. They may not be used for any other purpose, including, but not limited to, use in drugs, in vitro diagnostic purposes, therapeutics, or in humans. Clontech products may not be transferred to third parties, resold, modified for resale, or used to manufacture commercial products or to provide a service to third parties without written approval of Clontech Laboratories, Inc.

Clontech, Clontech Logo and all other trademarks are the property of Clontech Laboratories, Inc., unless noted otherwise. Clontech is a Takara Bio Company. ©2012 Clontech Laboratories, Inc.

4. Carte du plasmide pDONR 207

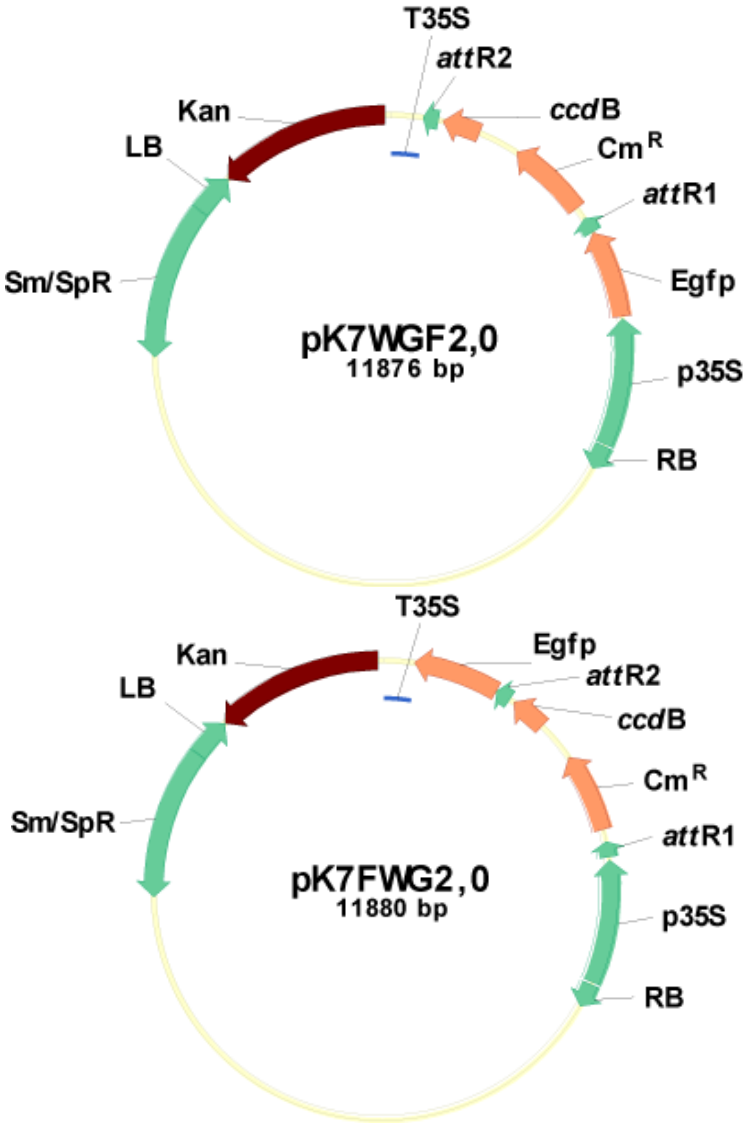


Comments for:	pDONR™201 4470 nucleotides	pDONR™207 5585 nucleotides
*rrn*B T2 transcription termination sequence (c):	73-100	73-100
rrnB T1 transcription termination sequence (c):	232-275	232-275
Recommended forward priming site:	300-324	300-324
*att*P1:	332-563	332-563
*ccd*B gene (c):	959-1264	959-1264
Chloramphenicol resistance gene (c):	1606-2265	1606-2265
*att*P2 (c):	2513-2744	2513-2744
Recommended reverse priming site:	2769-2792	2769-2792
Kanamycin resistance gene:	2868-3677	---
Gentamicin resistance gene (c):	---	3528-4061
pUC origin:	3794-4467	4909-5582

(c) = complementary strand

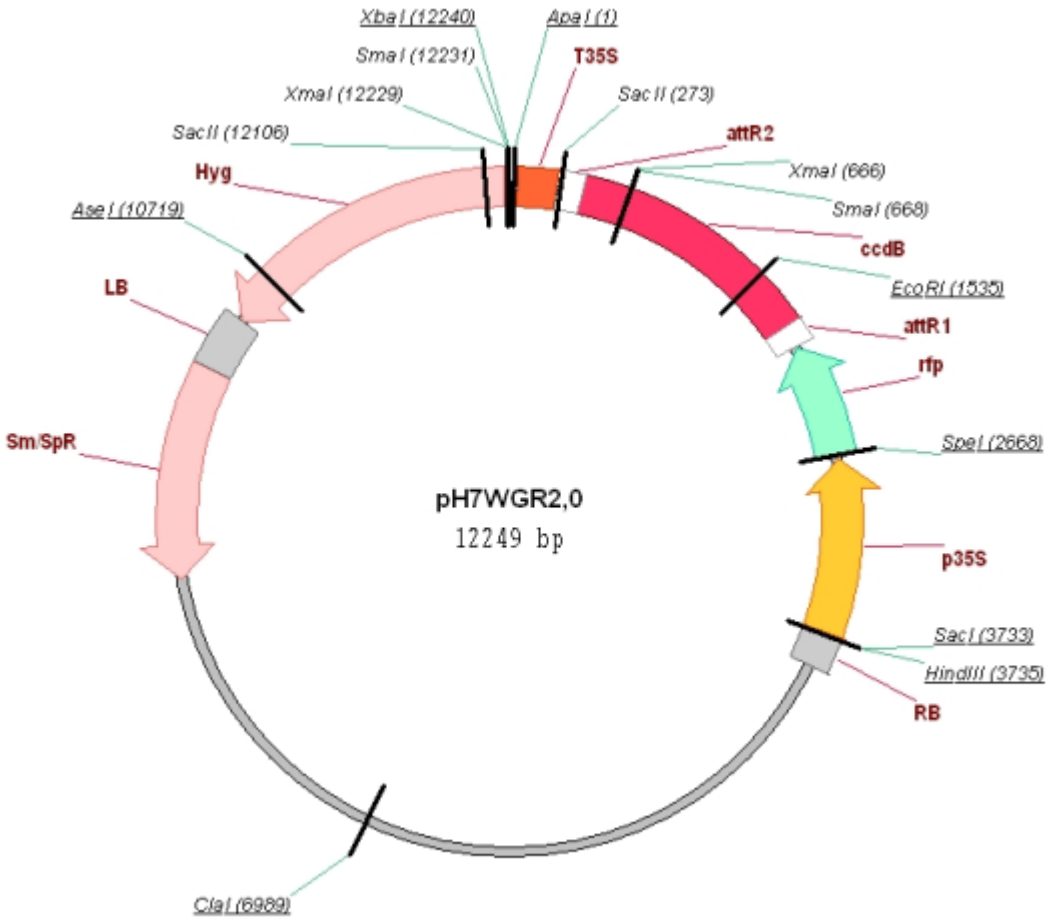
Invitrogen™
life technologies

5. Carte des plasmides pK7FWG2 et pK7WGF2



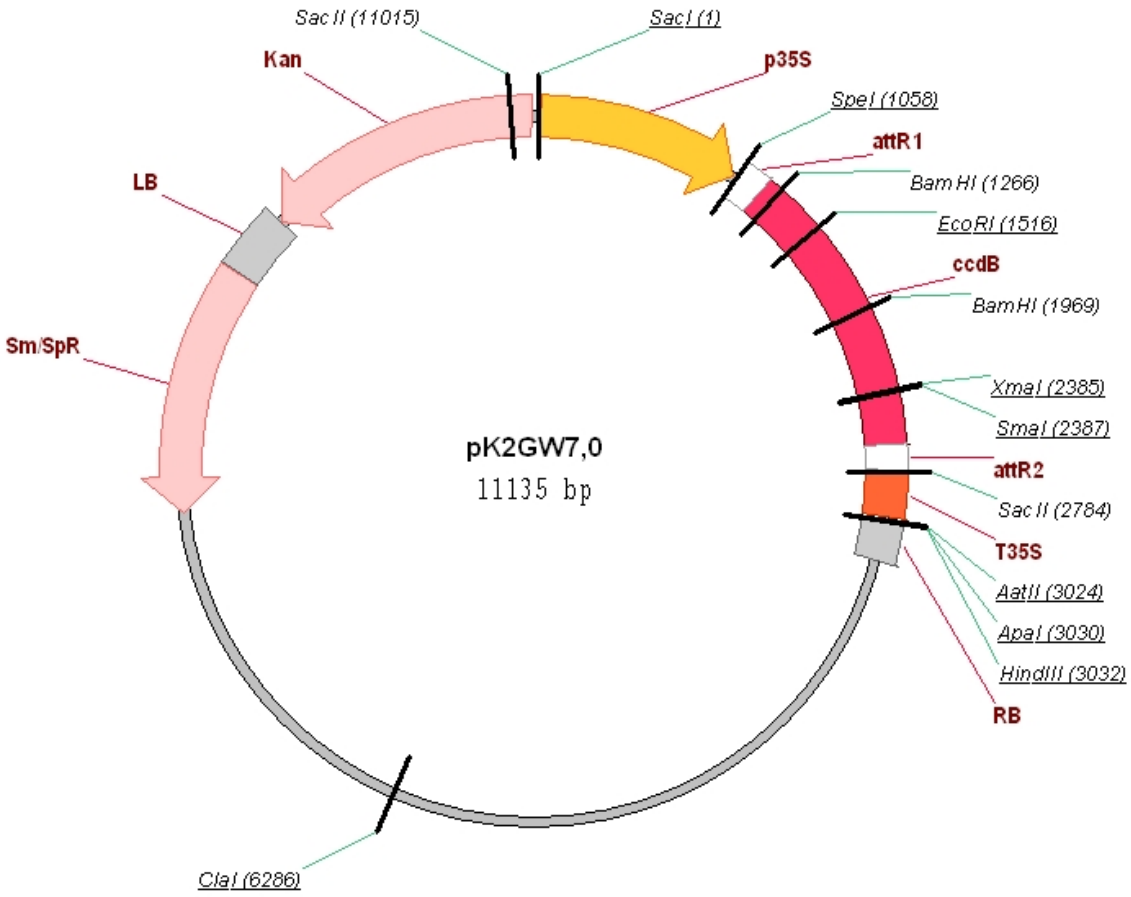
pK7WGF2 pK7FWG2	Rôle
P35S	Promoteur 35S
T3S	Terminateur 35S
attR1 et attR2	Sites de recombinaison pour le clonage Gateway®
Kan et Sm/Sp^R	Résistance à la Kanamycine et à la Spectinomycine
LB et RB	Bordures droites et gauches du T-DNA
Egfp	Gène de la eGFP pour une fusion en N-terminal (pK7WGF2) ou C-terminal (pK7FWG2)

6. Carte du plasmide pH7WGR2



pH7WGR2	Rôle
P35S	Promoteur 35S
T3S	Terminateur 35S
attR1 et attR2	Sites de recombinaison pour le clonage Gateway®
Hyg et Sm/Sp^R	Résistance à l'Hygromycine et à la Spectinomycine
LB et RB	Bordures droites et gauches du T-DNA
rfp	Gène de la RFP pour une fusion en N-terminal

7. Carte du plasmide pK2GW7



pK2GW7	Rôle
P35S	Promoteur 35S
T3S	Terminateur 35S
attR1 et attR2	Sites de recombinaison pour le clonage Gateway®
Kan et Sm/Sp^R	Résistance à la Kanamycine et à la Spectinomycine
LB et RB	Bordures droites et gauches du T-DNA

8. Carte du plasmide pGWB14

pGWB7, 8, 10, 11, 13, 14, 16, 17, 19, 20, 22, 23

(no promoter or 35S promoter, C-tag)

No promoter --- 7, 10, 13, 16, 19, 22

35S promoter --- 8, 11, 14, 17, 20, 23

(AAGCTT) -- (no promoter or 35S promoter) --//

(TCTAGA) GTTA TCA ACA AGT TTG TAC AAA AAA --(CmR, ccdB)--TTC TTG TAC AAA GTG GTT GAT AAC AGC tag GCT TA(G AGCTC)

(1) The *Hin*dIII (AAGCTT), *Xba*I (TCTAGA) and *Sac*I (GAGCTC) sites are shown.

(2) The *att*R1-CmR-*ccd*B-*att*R2 cassette is underlined.

(3) The sequence upstream of the *Xba*I site is the same as in pBI101 or pBI121.

(4) The sequence of each tag is indicated in the "Tags" section.

BIBLIOGRAPHIE

-A-

Adams, D. R., Ron, D. & Kiely, P. A. (2011). RACK1, A Multifaceted Scaffolding Protein: Structure and Function. *Cell communication and signaling* **9**, 22. BioMed Central Ltd.

Aki, T., Shigyo, M., Nakano, R., Yoneyama, T. & Yanagisawa, S. (2008). Nano scale proteomics revealed the presence of regulatory proteins including three FT-Like proteins in phloem and xylem saps from rice. *Plant Cell Physiol* **49**, 767–90.

Alamillo, J. M. (2006). Multiple resistance traits control Plum pox virus infection in Arabidopsis thaliana. *Mol Plant Micr Interact* **19**, 541–9.

Amari, K., Lerich, A., Schmitt-Keichinger, C., Dolja, V. V & Ritzenthaler, C. (2011). Tubule-guided cell-to-cell movement of a plant virus requires class XI myosin motors. *PLoS Pathog* **7**, e1002327.

Aoki, K., Suzui, N., Fujimaki, S., Dohmae, N., Yonekura-Sakakibara, K., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yamaya, T. & Sakakibara, H. (2005). Destination-selective long-distance movement of phloem proteins. *The Plant Cell* **17**, 1801. Am Soc Plant Biol.

Ashoub, A., Rohde, W., Prüfer, D. & Prufer, D. (1998). In planta transcription of a second subgenomic RNA increases the complexity of the subgroup 2 luteovirus genome. *Nucleic Acid Res* **26**, 420–6.

Atkins, C. A., Smith, P. M. C. & Rodriguez-Medina, C. (2010). Macromolecules in phloem exudates-a review. *Protoplasma*.

Atkins, D., Hull, R., Wells, B., Roberts, K., Moore, P. & Beachy, R. N. (1991). The tobacco mosaic virus 30K movement protein in transgenic tobacco plants is localized to plasmodesmata. *J Gen Virol* **72**, 209–11.

Ausar, S. F., Foubert, T. R., Hudson, M. H., Vedvick, T. S. & Middaugh, C. R. (2006). Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles. Effect of pH and temperature. *J Biol Chem* **281**, 19478–88.

-B-

Barker, H. (1987). Invasion of Non-phloem Tissue in Nicotiana clevelandii by Potato Leafroll Luteovirus Is Enhanced in Plants also Infected with Potato Y Potyvirus. *Journal of General Virology* **68**, 1223–1227.

Barker, H., McGeachy, K. D., Ryabov, E. V, Commandeur, U., Mayo, M. A. & Taliansky, M. (2001). Evidence for RNA-mediated defence effects on the accumulation of Potato leafroll virus. *J Gen Virol* **82**, 3099–106.

Batailler, B., Lemaître, T., Vilaine, F., Sanchez, C., Renard, D., Cayla, T., Beneteau, J. & Dinant, S. (2012). Soluble and filamentous proteins in Arabidopsis sieve elements. *Plant Cell Environ* **35**, 1258–73.

Baumann, M., Gires, O., Kolch, W., Mischak, H., Zeidler, R., Pich, D. & Hammerschmidt, W. (2000). The PKC targeting protein RACK1 interacts with the Epstein-Barr virus activator protein BZLF1. *European journal of biochemistry* **267**, 3891–901.

Baumberger, N., Tsai, C., Lie, M. & Havecker, E. (2007). The Polerovirus Silencing Suppressor P0 Targets ARGONAUTE Proteins for Degradation. *Curr Biol* **17**, 1609–1614.

Bechtold, N. & Pelletier, G. (1998). In planta Agrobacterium-mediated transformation of adult Arabidopsis thaliana plants by vacuum infiltration. *Method Mol Biol* **82**, 259–66.

Beneteau, J. (2008). *Structure et fonction des protéines phloiémiennes II (PP2) chez Arabidopsis thaliana*. Sciences du végétal: du gène à l'écosystème (Paris Sud XI).

Beneteau, J., Renard, D., Marché, L., Douville, E., Lavenant, L., Rahbé, Y., Dupont, D., Vilaine, F. & Dinant, S. (2010). Binding properties of the N-acetylglucosamine and high-mannose N-glycan PP2-A1 phloem lectin in Arabidopsis. *Plant Physiol* **153**, 1345–61.

Benitez-Alfonso, Y., Faulkner, C., Ritzenthaler, C. & Maule, A. J. (2010). Plasmodesmata: Gateways to Local and Systemic Virus Infection. *Mol Plant Micr Interact* **23**, 1403–1412.

Bertioli, D. J., Harris, R. D., Edwards, M. L., Cooper, J. I. & Hawes, W. S. (1991). Transgenic plants and insect cells expressing the coat protein of arabis mosaic virus produce empty virus-like particles. *J Gen Virol* **72**, 1801–9.

Bertrand, E., Chartrand, P., Schaefer, M., Shenoy, S. M., Singer, R. H. & Long, R. M. (1998). Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Molecular cell* **2**, 437–45.

Boissinot, S. (2013). *Partenaires et rôle dans le cycle viral des différentes formes de la protéine RT du Cucurbit aphid-borne yellows virus*. Université de Strasbourg.

Bortolamiol, D., Pazhouhandeh, M., Marrocco, K. & Genschik, P. (2007). The Polerovirus F Box Protein P0 Targets ARGONAUTE1 to Suppress RNA Silencing. *Curr Biol* **17**, 1615–1621.

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**, 650–9.

Brault, V., Mutterer, J. D., 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**, 1140–8.

Brault, V., Bergdoll, M., Mutterer, J., Prasad, V., Pfeffer, S., Erdinger, M. & Richards, K. E. (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. (2007a). Electron microscopy studies on luteovirid transmission by aphids. *Micron* **38**, 302–312. Elsevier.

Brault, V., Herrbach, E., Hauser, S. & Lemaire, O. (2001). Les Luteoviridae: propriétés biologiques et évolution. *Virologie* **5**, 9–21.

Brault, V., Blanc, S. & Jacquot, E. (2007b). Comment les pucerons transmettent des maladies virales aux plantes? *Biofutur* **279**.

Brault, V., Uzest, M., Monsion, B., Jacquot, E. & Blanc, S. (2010). Aphids as transport devices for plant viruses. *Comptes rendus biologies* **333**, 524–38.

Brill, L. M., Dechongkit, S., DeLaBarre, B., Stroebel, J., Beachy, R. N. & Yeager, M. (2004). Dimerization of recombinant tobacco mosaic virus movement protein. *J Virol* **78**, 3372–7.

Bruyère, 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**, 323–34.

Burch-smith, T. M. & Zambryski, P. C. (2012). Plasmodesmata Paradigm Shift: Regulation from Without Versus Within. *Ann rev Plant Biol* **63**, 239–262.

Burgyán, J. & Havelda, Z. (2011). Viral suppressors of RNA silencing. *Trends Plant Sci* **16**, 1–8.

-C-

Caciagli, P., Medina Piles, V., Marian, D., Vecchiati, M., Masenga, V., Mason, G., Falcioni, T. & Noris, E. (2009). Virion stability is important for the circulative transmission of tomato yellow leaf curl sardinia virus by Bemisia tabaci, but virion access to salivary glands does not guarantee transmissibility. *J Virol* **83**, 5784–95.

Canetta, E., Kim, S. H., Kalinina, N. O., Shaw, J., Adya, A. K., Gillespie, T., Brown, J. W. S., Taliansky, M. & Dd, D. (2008). A plant virus movement protein forms ringlike complexes with the major nucleolar protein , fibrillarin, in vitro. *J Mol Biol* **376**, 932–937.

Carrington, J. C., Jensen, P. E. & Schaad, M. C. (1998). Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *Plant J* **14**, 393–400.

Causier, B. & Davies, B. (2002). Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. *Plant Mol Biol* **50**, 855–70.

Cavener, D. R. & Ray, S. C. (1991). Eukaryotic start and stop translation sites. *Nucleic Acid Res* **19**, 3185–92.

Cayla, T. (2012). *Organisation du phloème et analyse fonctionnelle des protéines PP2*. Université Paris-Sud.

Chavez, J. D., Cilia, M., Weisbrod, C. R., Ju, H.-J., Eng, J. K., Gray, S. M. & Bruce, J. E. (2012). Cross-linking measurements of the Potato leafroll virus reveal protein interaction topologies required for virion stability, aphid transmission, and virus-plant interactions. *J Proteome Res* **11**, 2968–81.

Chen, B. & Francki, R. I. B. (1990). Cucumovirus transmission by the aphid Myzus persicae is determined solely by the viral coat protein. *Journal of general virology* **71**, 939–944.

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 1. *Plant Physiol* **127**, 1667–1675.

De Cilia, J. (2011). *Poleroviruses: functional analysis of the P0 silencing suppressor protein and investigation of the phloem-restricted tropism in transgenic plants*. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg.

Citovsky, V., Knorr, D. A., Schuster, G. & Zambryski, P. (1990). The P30 movement protein of tobacco mosaic virus is a single-strand nucleic acid binding protein. *Cell* **60**, 637–47.

Citovsky, V., Wong, M. L., Shaw, A. L., Prasad, B. V & Zambryski, P. (1992). Visualization and characterization of tobacco mosaic virus movement protein binding to single-stranded nucleic acids. *Plant Cell* **4**, 397–411.

Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L. & other authors. (2007). FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of Arabidopsis. *Science* **316**, 1030–3.

Cosson, P., Sofer, L., Le, Q. H., Léger, V., Schurdi-Levraud, V., Whitham, S. A., Yamamoto, M. L., Gopalan, S., Le Gall, O. & other authors. (2010). RTM3, which controls long-distance movement of potyviruses, is a member of a new plant gene family encoding a meprin and TRAF homology domain-containing protein. *Plant Physiol* **154**, 222–32.

Cosson, P., Schurdi-Levraud, V., Le, Q. H., Sicard, O., Caballero, M., Roux, F., Le Gall, O., Candresse, T. & Revers, F. (2012). The RTM resistance to potyviruses in Arabidopsis thaliana: natural variation of the RTM genes and evidence for the implication of additional genes. *PloS one* **7**, e39169.

La Cour Petersen, M., Hejgaard, J., Thompson, G. A. & Schulz, A. (2005). Cucurbit phloem serpins are graft-transmissible and appear to be resistant to turnover in the sieve element-companion cell complex. *J Exp Bot* **56**, 3111–20.

Cronin, S., Verchot, J., Haldeman-Cahill, R., Schaad, M. C. & Carrington, J. C. (1995). Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* **7**, 549–59.

Csorba, T., Lózsa, R., Hutvágner, G. & Burgyán, J. (2010). Polerovirus protein P0 prevents the assembly of small RNA-containing RISC complexes and leads to degradation of ARGONAUTE1. *Plant J* **62**, 463–72.

-D-

D'Arcy, C. J. & De Zoeten, G. A. (1979). Beet western yellows virus in phloem tissue of Thlaspi arvense. *Phytopathology* **69**, 1194–1198.

Daigle, N. & Ellenberg, J. (2007). LambdaN-GFP: an RNA reporter system for live-cell imaging. *Nature methods* **4**, 633–6.

Dalmay, T., Rubino, L., Burgyan, J. & Russo, M. (1992). Replication and movement of a Coat protein mutant of Cymbidium Ringspot Tombusvirus. *Mol Plant Micr Interact* **5**, 379–383.

Deeken, R., Ache, P., Kajahn, I., Klinkenberg, J., Bringmann, G. & Hedrich, R. (2008). Identification of Arabidopsis thaliana phloem RNAs provides a search criterion for phloem-based transcripts hidden in complex datasets of microarray experiments. *Plant J* **55**, 746–59.

Demler, S. A., Borkhsenious, O. N., Rucker, D. G. & De Zoeten, G. A. (1994). Assessment of the autonomy of replicative and structural functions encoded by the luteo-phase of pea enation mosaic virus. *J Gen Virol* **75**, 997–1007.

Demler, S. A., Rucker, D. G., De Zoeten, G. A., Ziegler, A., Robinson, D. J. & Murant, A. F. (1996). The satellite RNAs associated with the groundnut rosette disease complex and pea enation mosaic virus: sequence similarities and ability of each other's helper virus to support their replication. *Journal of General Virology* **77**, 2847–2855.

Deom, C. M., Oliver, M. J. & Beachy, R. N. (1987). The 30-kilodalton gene product of tobacco mosaic virus potentiates virus movement. *Science* **237**, 389–94.

Deraison, C., Darboux, I., Duportets, L., Gorojankina, T., Rahbé, Y. & Jouanin, L. (2004). Cloning and characterization of a gut-specific cathepsin L from the aphid Aphis gossypii. *Insect molecular biology* **13**, 165–77.

Dinant, S., Clark, A. M., Zhu, Y., Vilaine, F., Palauqui, J. C., Kusiak, C. & Thompson, G. A. (2003). Diversity of the superfamily of phloem lectins (phloem protein 2) in angiosperms. *Plant Physiol* **131**, 114. Am Soc Plant Biol.

Dinant, S. (2008). Phloème, transport interorgane et signalisation à longue distance. *Comptes rendus biologies* **331**, 334–346. Elsevier.

Dinant, S. & Lemoine, R. (2010). The phloem pathway: new issues and old debates. *Comptes rendus biologies* **333**, 307–19. Academie des sciences.

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**, 711–22.

Ding, B., Haudenshield, J. S., Hull, R. J., Wolf, S., Beachy, R. N. & Lucas, W. J. (1992a). Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* **4**, 915–28.

Ding, B., Turgeon, R. & Parthasarathy, M. V. (1992b). Substructure of freeze-substituted plasmodesmata. *Protoplasma* **169**, 28–41.

Ding, B., Kwon, M. & Warnberg, L. (1996). Evidence that actin filaments are involved in controlling the permeability of plasmodesmata in tobacco mesophyll. *Plant J* **10**, 157–164.

Doering-Saad, C., Newbury, H. J., Bale, J. S. & Pritchard, J. (2002). Use of aphid stylectomy and RT-PCR for the detection of transporter mRNAs in sieve elements. *J Exp Bot* **53**, 631–637.

Dolja, V. V & Koonin, E. V. (1991). Phylogeny of capsid proteins of small icosahedral RNA plant viruses. *J Gen Virol* **72**, 1481–6.

Dolja, V. V., Haldeman, R., Robertson, N. L., Dougherty, W. G. & Carrington, J. C. (1994). Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO J* **13**, 1482–91.

Dolja, V. V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A. E., Vandenbosch, K. A. & Carrington, J. C. (1995). Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long-distance movement of Tobacco Etch Potyvirus. *Virology* **206**, 1007–1016.

-E-

Erhardt, M., Herzog, E., Lauber, E., Fritsch, C., Guilley, H., Jonard, G., Richards, K. & Bouzoubaa, S. (1999). Transgenic plants expressing the TGB1 protein of peanut clump virus complement movement of TGB1-defective peanut clump virus but not of TGB1-defective beet necrotic yellow vein virus. *Plant Cell Reports* **18**, 614–619.

Ernst, A. M., Jekat, S. B., Zielonka, S., Müller, B., Neumann, U., Rüping, B., Twyman, R. M., Krzyzanek, V., Prüfer, D. & Noll, G. A. (2012). Sieve element occlusion (SEO) genes encode

structural phloem proteins involved in wound sealing of the phloem. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E1980–9.

Esau, K. & Hoefert, L. L. (1972). Development of infection with beet western yellows virus in the sugarbeet. *Virology* **48**, 724–38.

Esau, K. & Cheadle, V. I. (1958). Size of pores and their contents in sieve elements of dicotyledons. *Proc Natl Acad Sci U S A* **45**, 156–162.

-F-

Faivre-Nitschke, S. E., Grienenberger, J. M. & Gualberto, J. M. (1999). A prokaryotic-type cytidine deaminase from Arabidopsis thaliana gene expression and functional characterization. *European journal of biochemistry* **263**, 896–903.

Falk, B. W., Tian, T. & Yeh, H. . (1999). Luteovirus-associated viruses and subviral RNAs. In *Satellites and Defective Viral RNAs*, Springer., pp. 159–175. Edited by P. K. Vogt & A. O. Jackson.

Faulkner, C. & Maule, A. (2010). Opportunities and successes in the search for plasmodesmal proteins. *Protoplasma* **248**, 27–38.

Fisher, D. B. & Frame, J. M. (1984). A guide to the use of the exuding-stylet technique in phloem physiology. *Planta* **161**, 385–393.

Flasinski, S. & Cassidy, B. G. (1998). Potyvirus aphid transmission requires helper component and homologous coat protein for maximal efficiency. *Arch of Vir* **143**, 2159–72.

Franco-Lara, L. F., McGeachy, K. D., Commandeur, U., Martin, R. R., Mayo, M. A. & Barker, H. (1999). Transformation of tobacco and potato with cDNA encoding the full-length genome of potato leafroll virus: evidence for a novel virus distribution and host effects on virus multiplication. *J Gen Virol* **80**, 2813–22.

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 Micr Interact* **16**, 132–40.

Fujiki, M., Kawakami, S., Kim, R. W. & Beachy, R. N. (2006). Domains of tobacco mosaic virus movement protein essential for its membrane association. *J Gen Virol* **87**, 2699–707.

Fusaro, A. F., Correa, R. L., Nakasugi, K., Jackson, C., Kawchuk, L., Vaslin, M. F. S. & Waterhouse, P. M. (2012). The Enamovirus P0 protein is a silencing suppressor which inhibits local and systemic RNA silencing through AGO1 degradation. *Virology* **426**, 178–87. Elsevier Inc.

-G-

Gallie, D. R., Sleat, D. E., Watts, J. W., Turner, P. C. & Wilson, T. M. (1987). The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts in vitro and in vivo. *Nucleic Acid Res* **15**, 3257–73.

Gallina, A., Rossi, F. & Milanesi, G. (2001). Rack1 binds HIV-1 Nef and can act as a Nef-protein kinase C adaptor. *Virology* **283**, 7–18.

Gaupels, F., Knauer, T. & Van Bel, A. J. E. (2008). A combinatory approach for analysis of protein sets in barley sieve-tube samples using EDTA-facilitated exudation and aphid stylectomy. *Plant Physiol* **165**, 95–103.

Gelvin, S. B. (2010). Plant Proteins Involved in Agrobacterium-Mediated Genetic Transformation. *Ann Rev Phytopath* 1–24.

Gildow, F. E. (1999). Luteovirus transmission and mechanisms regulating vector specificity. In *The Luteoviridae*, CAB Intern., pp. 88–113. Edited by H. G. Smith & H. Barker.

Gómez de Cedrón, M., Osaba, L., López, L. & García, J. A. (2006). Genetic analysis of the function of the plum pox virus CI RNA helicase in virus movement. *Vir Res* **116**, 136–45.

Gomez, G., Torres, H. & Pallas, V. (2005). Identification of translocatable RNA-binding phloem proteins from melon, potential components of the long-distance RNA transport system. *Plant J* **41**, 107–116.

Gomez, G. & Pallás, V. (2004). A Long-Distance Translocatable Phloem Protein from Cucumber Forms a Ribonucleoprotein Complex In Vivo with Hop Stunt Viroid RNA. *J Virol* **78**, 10104–10110.

Gómez, G. & Pallás, V. (2001). Identification of an In Vitro Ribonucleoprotein Complex Between a Viroid RNA and a Phloem Protein from Cucumber Plants. *Mol Plant Micr Interact* **14**, 910–913.

Görlich, D. & Krutay, U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annual review of cell and developmental biology* **15**, 607–660.

Guilley, H., Wipf-Scheibel, C., Richards, K., Lecoq, H. & Jonard, G. (1994). Nucleotide sequence of cucurbit aphid-borne yellows luteovirus. *Virology* **202**, 1012–7.

Guo, J. & Chen, J.-G. (2008). RACK1 genes regulate plant development with unequal genetic redundancy in Arabidopsis. *BMC Plant Biol* **8**.

Guo, J., Wang, J., Xi, L., Huang, W.-D., Liang, J. & Chen, J.-G. (2009). RACK1 is a negative regulator of ABA responses in Arabidopsis. *J Exp Bot* **60**, 3819–33.

-H-

Habili, N. & Symons, R. H. (1989). Evolutionary relationship between luteoviruses and other RNA plant viruses based on sequence motifs in their putative RNA polymerases and nucleic acid helicases. *Nucleic Acid Res* **17**, 9543–55.

Haley, A., Hunter, T., Kiberstis, P. & Zimmern, D. (1995). Multiple serine phosphorylation sites on the 30 kDa TMV cell-to-cell movement protein synthesized in tobacco protoplasts. *Plant J* **8**, 715–24.

Ham, B.-K., Brandom, J. L., Xoconostle-Cázares, B., Ringgold, V., Lough, T. J. & Lucas, W. J. (2009). A polypyrimidine tract binding protein, pumpkin RBP50, forms the basis of a phloem-mobile ribonucleoprotein complex. *Plant Cell* **21**, 197–215.

Hannapel, D. J. (2010). A model system of development regulated by the long-distance transport of mRNA. *J Integr Plant Biol* **52**, 40–52.

Harada, T. (2010). Grafting and RNA transport via phloem tissue in horticultural plants. *Scientia Horticulturae* **125**, 545–550. Elsevier.

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 Micr Interact* **23**, 1381–93.

Haupt, S., Stroganova, T., Ryabov, E., Kim, S. H., Fraser, G., Duncan, G., Mayo, M. A., Barker, H. & Taliansky, M. (2005). Nucleolar localization of potato leafroll virus capsid proteins. *J Gen Virol* **86**, 2891–6.

Havelda, Z., Hornyik, C., Crescenzi, A. & Burgyán, J. (2003). In situ characterization of Cymbidium Ringspot Tombusvirus infection-induced posttranscriptional gene silencing in Nicotiana benthamiana. *J Virol* **77**, 6082–6086.

Herranz, M. C., Pallas, V. & Aparicio, F. (2012). Multifunctional roles for the N-terminal basic motif of Alfalfa mosaic virus coat protein: nucleolar/cytoplasmic shuttling, modulation of RNA-binding activity, and virion formation. *Mol Plant Micr Interact* **25**, 1093–103.

Van Den Heuvel, J. F., De Blank, C. M., Peters, D. & Van Lent, J. W. M. (1995). Localization of potato leafroll virus in leaves of secondarily-infected potato plants. *European journal of plant pathology* **101**, 567–571.

Hipper, C., Brault, V., Ziegler-Graff, V. & Revers, F. (2013). Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. *Frontiers in plant physiology* **4**, 1–54.

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**, 529–43.

Hofius, D., Maier, A. T., Dietrich, C., Jungkunz, I., Börnke, 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**, 11870–80.

-I-

Iskra-Caruana, M.-L., Lheureux, F. & Teycheney, P.-Y. (2003). Les pararétrovirus endogènes (EPRV), voie nouvelle de transmission des virus de plantes. *Virologie* **7**, 255–265.

Iskra-Caruana, M.-L., Baurens, F.-C., Gayral, P. & Chabannes, M. (2010). A Four-Partner Plant-Virus Interaction: Enemies Can Also Come from Within. *Mol Plant Micr Interact* **23**, 1394–402.

-J-

Jaag, H. M., Kawchuk, L., Rohde, W., Fischer, R., Emans, N. & Prüfer, 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**, 8939–44.

Jekat, S. B., Ernst, A. M., Von Bohl, A., Zielonka, S., Twyman, R. M., Noll, G. A. & Prüfer, D. (2013). P-proteins in Arabidopsis are heteromeric structures involved in rapid sieve tube sealing. *Frontiers in plant science* **4**.

Jewell, N. A. & Mansky, L. M. (2000). In the beginning: genome recognition, RNA encapsidation and the initiation of complex retrovirus assembly. *J Gen Virol* **81**, 1889–1899.

Jin, H., Li, S. & Villegas, A. J. (2006). Down-regulation of the 26S proteasome subunit RPN9 inhibits viral systemic transport and alters plant vascular development. *Plant Physiol* **142**, 651–661.

Jockusch, H. (1968). Two mutants of tobacco mosaic virus temperature-sensitive in two different functions. *Virology* **35**, 94–101.

Jones, J. D. G. & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature* **444**, 323–9.

-K-

Kadrmas, J. L., Smith, M. a, Pronovost, S. M. & Beckerle, M. C. (2007). Characterization of RACK1 function in Drosophila development. *Dev Dynam* **236**, 2207–15.

Kafer, C. & Thornburg, R. W. (2000). Arabidopsis thaliana Cytidine Deaminase 1 shows more similarity to prokaryotic enzymes than to eukaryotik enzymes. *J Plant Biol* **43**, 162–170.

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**, 1821–30.

Kehr, J. & Buhtz, A. (2007). Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *J Exp Bot* **59**, 85–92. Soc Experiment Biol.

Kim, S. H., Macfarlane, S., Kalinina, N. O., Rakitina, D. V, Ryabov, E. V, Gillespie, T., Haupt, S., Brown, J. W. S. & 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. S. & Taliansky, M. (2007b). Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. *EMBO J* **26**, 2169. Nature Publishing Group.

King, R. W. & Zeevaart, J. A. (1974). Enhancement of Phloem exudation from cut petioles by chelating agents. *Plant Physiol* **53**, 96–103.

Kiselyova, O. I., Yaminsky, I. V, Karger, E. M., Frolova, O. Y., Dorokhov, Y. L. & Atabekov, J. G. (2001). Visualization by atomic force microscopy of tobacco mosaic virus movement protein-RNA complexes formed in vitro. *J Gen Virol* **82**, 1503–8.

Knoblauch, M. & Mullendore, D. (2013). Sieve element occlusion. In *Phloem: Molecular Cell Biology, Systemic Communication, Biotic Interactions*, Wiley-Blac., pp. 141–153. Edited by G. A. Thompson & A. J. E. van Bel.

Kozlowska-Makulska, A., Guilley, H., Szyndel, M. S., Beuve, M., Lemaire, O., Herrbach, E. & Bouzoubaa, S. (2010). P0 proteins of European beet-infecting poleroviruses display variable RNA silencing suppression activity. *J Gen Virol* **91**, 1082–91.

Kragler, F. (2010). RNA in the phloem: A crisis or a return on investment? *Plant Science* **178**, 99–104.

Krichevsky, A., Kozlovsky, S. V, Gafni, Y. & Citovsky, V. (2006). Nuclear import and export of plant virus proteins and genomes. *Mol Plant Pathol* **7**, 131–146.

Kühn, C. (2013). Regulation of sucrose carrier activities. In *Phloem: Molecular Cell Biology, Systemic Communication, Biotic Interactions*, Wiley-Blac., pp. 102–121. Edited by G. A. Thompson & A. J. E. van Bel.

-L-

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680–5.

Laliberté, J.-F. & Sanfaçon, H. (2010). Cellular remodeling during plant virus infection. *Ann Rev Phytopath* **48**, 69–91.

Lalonde, S. (2001). Companion Cells. *Encyclopedia of life sciences*.

Lamb, J. W., Duncan, G. H., Reavy, B., Gildow, F. E., Mayo, M. A. & Hay, R. T. (1996). Assembly of virus-like particles in insect cells infected with a baculovirus containing a modified coat protein gene of potato leafroll luteovirus. *J Gen Virol* **77**, 1349–58.

Lazarowitz, S. G. & Beachy, R. N. (1999). Viral Movement Proteins as Probes for Intracellular and Intercellular Trafficking in Plants. *Plant Cell* **11**, 535–548.

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.

LeCuyer, K. A., Behlen, L. S. & Uhlenbeck, O. C. (1995). Mutants of the bacteriophage MS2 coat protein that alter its cooperative binding to RNA. *Biochem* **34**, 10600–6.

Lee, J.-Y., Taoka, K., Yoo, B.-C., Ben-Nissan, G., Kim, D.-J. & Lucas, W. J. (2005a). Plasmodesmal-associated protein kinase in tobacco and Arabidopsis recognizes a subset of non-cell-autonomous proteins. *Plant Cell* **17**, 2817–31.

Lee, L., Palukaitis, P. & Gray, S. M. (2002). Host-dependent requirement for the Potato leafroll virus 17-kda protein in virus movement. *Mol Plant Micr Interact* **15**, 1086–94.

Lee, L., Kaplan, I. B., Ripoll, D. R., Liang, D., Palukaitis, P. & Gray, S. M. (2005b). A surface loop of the potato leafroll virus coat protein is involved in virion assembly, systemic movement, and aphid transmission. *J Virol* **79**, 1207–14.

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**, 9136–40.

Leonard, D. A. & Zaitlin, M. (1982). A temperature-sensitive strain of tobacco mosaic virus defective in cell-to-cell movement generates an altered viral-coded protein. *Virology* **117**, 416–24.

Levy, A., Erlanger, M., Rosenthal, M. & Epel, B. L. (2007). A plasmodesmata-associated beta-1,3-glucanase in Arabidopsis. *Plant J* **49**, 669–82.

Li, X., Ryan, M. D. & Lamb, J. W. (2000). Potato leafroll virus protein P1 contains a serine proteinase domain. *Journal of General Virology* **81**, 1857–1864.

Lin, M.-K., Belanger, H., Lee, Y.-J., Varkonyi-Gasic, E., Taoka, K.-I., Miura, E., Xoconostle-Cázares, B., Gendler, K., Jorgensen, R. A. & other authors. (2007). FLOWERING LOCUS T protein may act as the long-distance florigenic signal in the cucurbits. *Plant Cell* **19**, 1488–506.

Lin, M.-K., Lee, Y.-J., Lough, T. J., Phinney, B. S. & Lucas, W. J. (2009). Analysis of the pumpkin phloem proteome provides insights into angiosperm sieve tube function. *Mol Cell Proteomics* **8**, 343–56.

Liu, C. & Nelson, R. S. (2013). The cell biology of Tobacco mosaic virus replication and movement. *Frontiers in plant science* **4**, 12.

Liu, H., Boulton, M. I. & Davies, J. W. (1997). Maize streak virus coat protein binds single- and double-stranded DNA in vitro. *J Gen Virol* **78**, 1265–70.

Liu, H., Boulton, M. I., Thomas, C. L., Prior, D. A., Oparka, K. J. & Davies, J. W. (1999). Maize streak virus coat protein is karyophyllic and facilitates nuclear transport of viral DNA. *Mol Plant Micr Interact* **12**, 894–900.

Liu, H., Boulton, M. I., Oparka, K. J. & Davies, J. W. (2001). Interaction of the movement and coat proteins of Maize streak virus: implications for the transport of viral DNA. *J Gen Virol* **82**, 35–44.

Liu, K., Xia, Z., Zhang, Y., Wen, Y., Wang, D., Brandenburg, K., Harris, F. & Phoenix, D. A. (2005). 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. & Lucas, W. J. (2006). Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking. *Ann Rev Phytopath* **57**, 203–232. Annual Reviews.

Louis, J., Singh, V. & Shah, J. (2012). Arabidopsis thaliana-Aphid Interaction. *The Arabidopsis book* **10**, e0159.

Lu, L., Du, Z., Qin, M., Wang, P., Lan, H., Niu, X., Jia, D., Xie, L., Lin, Q. & other authors. **(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**, 320–7.

Lucas, W. J. (2006). Plant viral movement proteins: agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* **344**, 169–184. Elsevier.

Lucas, W. J., Yoo, B. C. & Kragler, F. (2001). RNA as a long-distance information macromolecule in plants. *Nat Rev Mol Cell Bio* **2**, 849–857. Nature Publishing Group.

-M-

Ma, Y., Miura, E., Ham, B.-K., Cheng, H.-W., Lee, Y.-J. & Lucas, W. J. (2010). Pumpkin eIF5A isoforms interact with components of the translational machinery in the cucurbit sieve tube system. *Plant J* **64**, 536–50.

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**, 177–86.

Marsch-Martinez, N., Greco, R., Van Arkel, G., Herrera-Estrella, L. & Pereira, A. (2002). Activation tagging using the En-I maize transposon system in Arabidopsis. *Plant Physiol* **129**, 1544–56.

Maule, A., Faulkner, C. & Benitez-Alfonso, Y. (2012). Plasmodesmata “in Communicado”. *Frontiers in plant science* **3**, 30.

Mayo, M., Ryabov, E., Fraser, G. & Taliansky, M. (2000). Mechanical transmission of Potato leafroll virus. *J Gen Virol* **81**, 2791–5.

Mayo, M. A. (2002). ICTV at the Paris ICV: Results of the Plenary Session and the Binomial Ballot. *Arch of Vir* **147**, 2254–2260.

Mayo, M. A. & Ziegler-Graff, V. (1996). Molecular biology of luteoviruses. *Adv Vir Res* **46**, 413–60.

Mayo, M. A., Barker, H., Robinson, D. J., Tamada, T. & Harrison, B. D. (1982). Evidence that Potato leafroll virus RNA is positive-stranded, is linked to a small protein and does not contain polyadenylate. *Journal of general virology* **59**, 163–167.

McCullen, C. A. & Binns, A. N. (2006). Agrobacterium tumefaciens and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annual review of cell and developmental biology* **22**, 101–127.

McGeachy, K. D. & Barker, H. (2000). Potato mop-top virus RNA can move long distance in the absence of coat protein: evidence from resistant, transgenic plants. *Mol Plant Micr Interact* **13**, 125–8.

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**, 2557–63.

Mewis, I., Tokuhisa, J. G., Schultz, J. C., Appel, H. M., Ulrichs, C. & Gershenzon, J. (2006). Gene expression and glucosinolate accumulation in Arabidopsis thaliana in response to generalist and specialist herbivores of different feeding guilds and the role of defense signaling pathways. *Phytochemistry* **67**, 2450–62.

Miller, W. A., Dinesh-Kumar, S. P. & Paul, C. P. (1995). Luteovirus Gene Expression. *Critical Reviews in Plant Sciences* **14**, 179–211. Taylor & Francis.

Moreno, A., Garzo, E., Fernandez-Mata, G., Kassem, M., Aranda, M. A. & Fereres, A. (2011). Aphids secrete watery saliva into plant tissues from the onset of stylet penetration. *Entomol Exp Appl* **139**, 145–153.

Mutterer, J. D., Stussi-Garaud, 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**, 2771–8.

-N-

Nagy, P. D., Wang, R. Y., Pogany, J., Hafren, A. & Makinen, K. (2011). Emerging picture of host chaperone and cyclophilin roles in RNA virus replication. *Virology* **411**, 374–82. Elsevier B.V.

Nagy, P. D. (2008). Yeast as a model host to explore plant virus-host interactions. *Ann Rev Phytopath* **46**, 217–42.

Nakashima, A., Chen, L., Thao, N. P., Fujiwara, M., Wong, H. L., Kuwano, M., Umemura, K., Shirasu, K., Kawasaki, T. & Shimamoto, K. (2008). RACK1 functions in rice innate immunity by interacting with the Rac1 immune complex. *Plant Cell* **20**, 2265–79.

Netherton, C., Moffat, K., Brooks, E. & Wileman, T. (2007). A guide to viral inclusions, membrane rearrangements, factories, and viroplasm produced during virus replication. *Adv Vir Res* **70**, 101–82.

Ng, J. C. K. & Perry, K. L. (2004). Transmission of plant viruses by aphid vectors. *Mol Plant Pathol* **5**, 505–511.

Ng, J. C. K., Josefsson, C., Clark, A. J., Franz, A. W. E. & Perry, K. L. (2005). Virion stability and aphid vector transmissibility of Cucumber mosaic virus mutants. *Virology* **332**, 397–405.

Niehl, A. & Heinlein, M. (2010). Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma* **248**, 75–99.

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**, 617–26.

-O-

Olszewski, N., Hagen, G. & Guilfoyle, T. J. (1982). A transcriptionally active, covalently closed minichromosome of cauliflower mosaic virus DNA isolated from infected turnip leaves. *Cell* **29**, 395–402. Elsevier.

Oparka, K. J., Prior, D. A., Santa Cruz, S., Padgett, H. S. & Beachy, R. N. (1997). Gating of epidermal plasmodesmata is restricted to the leading edge of expanding infection sites of tobacco mosaic virus (TMV). *Plant J* **12**, 781–9.

Oparka, K. J. & Turgeon, R. (1999). Sieve Elements and Companion Cells — Traffic Control Centers of the Phloem. *The plant cell* **11**, 739–750.

Owens, R. A., Blackburn, M. & Ding, B. (2001). Possible involvement of the phloem lectin in long-distance viroid movement. *Mol Plant Micr Interact* **14**, 905–9.

-P-

Pallas, V. & García, J. A. (2011). How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *J Gen Virol* **92**, 2691–705.

Pallas, V. & Gómez, G. (2013). Phloem RNA-binding proteins as potential components of the long-distance RNA transport system. *Frontiers in plant science* **4**, 130.

Pascal, E., Sanderfoot, A. A., Ward, B. M., Medville, R., Turgeon, R. & Lazarowitz, S. G. (1994). The geminivirus BR1 movement protein binds single-stranded DNA and localizes to the cell nucleus. *Plant Cell* **6**, 995–1006.

Patrick, J. W. J. W. (2013). Fundamentals of Phloem Transport Physiology. In *Phloem: Molecular Cell Biology, Systemic Communication, Biotic Interactions*, Wiley-Blac., pp. 30–59. Edited by G. A. Thompson & A. J. E. van Bel.

Pazhouhandeh, M., Dieterle, M., Marrocco, K., Lechner, E., Berry, B., Hemmer, O., Kretsch, T., Richards, K. E. & Genschik, P. (2006). F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 25–28.

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**, 2037–45.

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. *J Virol* **83**, 5419–29.

Pfeffer, S., Dunoyer, P., Heim, F., Richards, K. E., Jonard, G. & Ziegler-Graff, V. (2002). P0 of Beet Western Yellows Virus Is a Suppressor of Posttranscriptional Gene Silencing. *J Virol* **76**, 6815–6824.

Pink, D. A. C., Walkey, D. G. A. & Mc Clement, S. J. (1991). Genetics of resistance to beet western yellows virus in lettuce. *Plant Pathology* **40**, 542–545.

Plisson, C., Uzest, M., Drucker, M., Froissart, R., Dumas, C., Conway, J., Thomas, D., Blanc, S. & Bron, P. (2005). Structure of the mature P3-virus particle complex of Cauliflower mosaic virus revealed by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol* **346**, 267–77.

Prüfer, 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.

Prüfer, 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 Acid Res* **27**, 421–5.

-Q-

Qu, F. & Morris, T. J. (1997). Encapsidation of turnip crinkle virus is defined by a specific packaging signal and RNA size. *J Virol* **71**, 1428–35.

Querci, M., Owens, R. A., Bartolini, I., Lazarte, V. & Salazar, L. F. (1997). Evidence for heterologous encapsidation of potato spindle tuber viroid in particles of potato leafroll virus. *J Gen Virol* **78**, 1207–11.

-R-

Reed, J. C., Kasschau, K. D., Prokhnevsky, A. I., Gopinath, K., Pogue, G. P., Carrington, J. C. & Dolja, V. V. (2003). Suppressor of RNA silencing encoded by Beet yellows virus. *Virology* **306**, 203–209.

Reinbold, C., Gildow, F. E., Herrbach, E., Ziegler-Graff, V., Gonçalves, 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.

Reutenauer, A. (1994). *Thèse - Etude par mutagenèse et agroinfection des fonctions des protéines codées par le virus de la jaunisse occidentale de la betterave (Thesis - Studies by mutagenesis and agroinfection of proteins's function coded by BWYV)*. Université Louis Pasteur, Strasbourg I.

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**, 692–9.

Revers, F., Guiraud, T., Houvenaghel, M.-C., Mauduit, T., Le Gall, O. & Candresse, T. (2003). Multiple resistance phenotypes to Lettuce mosaic virus among Arabidopsis thaliana accessions. *Mol Plant Micr Interact* **16**, 608–16.

Revollon, S. (2010). *Rôle des modifications post-traductionnelles des particules virales du CABYV dans la transmission par puceron*. Thèse de doctorat, Université de Strasbourg.

Revollon, S., Strub, J. M., Fitchette, A.-C., Wiss, L., Gomord, V., Van Dorsselaer, 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**, 303–14. Elsevier Inc.

Roberts, I. M., Wang, D., Findlay, K. & Maule, A. J. (1998). Ultrastructural and temporal observations of the potyvirus cylindrical inclusions (Cls) show that the Cl protein acts transiently in aiding virus movement. *Virology* **245**, 173–81.

Robinson, D. J., Ryabov, E. V, Raj, S. K., Roberts, I. M. & Taliansky, M. E. (1999). Satellite RNA is essential for encapsidation of groundnut rosette umbravirus RNA by groundnut rosette assistor luteovirus coat protein. *Virology* **254**, 105–14.

Rodriguez-Medina, C., Atkins, C. A., Mann, A. J., Jordan, M. E. & Smith, P. M. (2011). Macromolecular composition of phloem exudate from white lupin (Lupinus albus L.). *BMC Plant Biol* **11**, 36.

Rojas, M. R., Zerbini, F. M., Allison, R. F., Gilbertson, R. L. & Lucas, W. J. (1997). Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* **237**, 283–95.

Rojas, M. R., Noueiry, A. O., Lucas, W. J. & Gilbertson, R. L. (1998). Bean Dwarf mosaic geminivirus movement proteins recognize DNA in a form- and size-specific manner. *Cell* **95**, 105–13.

Rojas, M. R., Jiang, H., Salati, R., Xoconostle-Cázares, B., Sudarshana, M. R., Lucas, W. J. & Gilbertson, R. L. (2001). Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, Tomato yellow leaf curl virus. *Virology* **291**, 110–25.

Ron, D., Chen, C. H., Caldwell, J., Jamieson, L., Orr, E. & Mochly-Rosen, D. (1994). Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 839–43.

Rothbauer, U., Zolghadr, K., Tillib, S., Nowak, D., Schermelleh, L., Gahl, A., Backmann, N., Conrath, K., Muyldermans, S. & other authors. **(2006).** Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nature methods* **3**, 887–9. Nature Publishing Group.

Ryabov, E. V, Fraser, G., Mayo, M. A., Barker, H. & Taliansky, M. (2001). Umbravirus gene expression helps potato leafroll virus to invade mesophyll tissues and to be transmitted mechanically between plants. *Virology* **286**, 363–72.

Ryabov, E. V, Kim, S. H. & Taliansky, M. (2004). Identification of a nuclear localization signal and nuclear export signal of the umbraviral long-distance RNA movement protein. *J Gen Virol* **85**, 1329–1333.

-S-

Sadowy, E., Maasen, A., Juszczuk, M., David, C., Zagórski-Ostoja, W., Gronenborn, B. & Hulanicka, M. D. (2001). The ORFO product of Potato leafroll virus is indispensable for virus accumulation. *J Gen Virol* **82**, 1529–32.

Salone, V., Rüdinger, M., Polsakiewicz, M., Hoffmann, B., Groth-Malonek, M., Szurek, B., Small, I., Knoop, V. & Lurin, C. (2007). A hypothesis on the identification of the editing enzyme in plant organelles. *FEBS letters* **581**, 4132–8.

Sanderfoot, A. A., Ingham, D. J. & Lazarowitz, S. G. (1996). A viral movement protein as a nuclear shuttle. The geminivirus BR1 movement protein contains domains essential for interaction with BL1 and nuclear localization. *Plant Physiol* **110**, 23–33.

Sanderfoot, A. A. & Lazarowitz, S. G. (1995). Cooperation in Viral Movement: The Geminivirus BL1 Movement Protein Interacts with BR1 and Redirects It from the Nucleus to the Cell Periphery. *Plant Cell* **7**, 1185–1194.

Sasaki, T., Chino, M., Hayashi, H. & Fujiwara, T. (1998). Detection of several mRNA species in rice phloem sap. *Plant Cell Physiol* **39**, 895–897.

Savenkov, E. I. (2003). Potato mop-top virus: the coat protein-encoding RNA and the gene for cysteine-rich protein are dispensable for systemic virus movement in Nicotiana benthamiana. *J Gen Virol* **84**, 1001–1005.

Schmitz, J., Stussi-Garaud, C., Tacke, E., Prüfer, 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**, 311–22.

Schobert, C., Grossmann, P., Gottschalk, M., Komor, E., Pecsvaradi, A. & Zur Nieden, U. (1995). Sieve-tube exudate from Ricinus communis L . seedlings contains ubiquitin and chaperones. *Planta* **196**, 205–210.

Schoelz, J. E., Harries, P. A. & Nelson, R. S. (2011). Intracellular transport of plant viruses: finding the door out of the cell. *Mol Plant Pathol* **4**, 813–831.

Schönberger, J., Hammes, U. Z. & Dresselhaus, T. (2012). In vivo visualization of RNA in plants cells using the λN22 system and a GATEWAY-compatible vector series for candidate RNAs. *Plant J* **71**, 173–81.

Schröfelbauer, B., Chen, D. & Landau, N. R. (2004). A single amino acid of APOBEC3G controls its species-specific interaction with virion infectivity factor (Vif). *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 3927–32.

Schulz, A. & Thompson, G. A. (2009). Phloem Structure and Function. *Encyclopedia of life sciences*.

Seddas, P., Boissinot, S., Strub, J.-M., Van Dorsselaer, 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.

Shepardson, S., Esau, K. & McCrum, R. (1980). Ultrastructure of potato leaf phloem infected with potato leafroll virus. *Virology* **105**, 379–392.

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 of Vir* **154**, 959–67.

Singh, S., Rothnagel, R., Prasad, B. V & Buckley, B. (1995). Expression of tobacco ringspot virus capsid protein and satellite RNA in insect cells and three-dimensional structure of tobacco ringspot virus-like particles. *Virology* **213**, 472–81.

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**, 2373–8.

Sokolova, M., Prüfer, 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 proteine kinase C. *FEBS Lett* **400**, 201–205.

Stadler, R., Wright, K. M., Lauterbach, C., Amon, G., Gahrtz, M., Feuerstein, A., Oparka, K. J. & Sauer, N. (2005). Expression of GFP-fusions in Arabidopsis companion cells reveals non-specific protein trafficking into sieve elements and identifies a novel post-phloem domain in roots. *Plant J* **41**, 319–31.

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**, 1373–87.

Sylvester, E. S. (1980). Circulative and propagative virus transmission by aphids. *Ann Rev Entomol* **25**, 257–286.

-T-

Tacke, E., Prüfer, D., Schmitz, J. & Rohde, W. (1991). The potato leafroll luteovirus 17K protein is a single-stranded nucleic acid-binding protein. *J Gen Virol* **72**, 2035–8.

Tacke, E., Schmitz, J., Prüfer, 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**, 274–82.

Taliansky, M. & Torrance, L. (2008). Plant Virus Movement. *Encyclopedia of life sciences*.

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. E. & Barker, H. (1999). Movement of luteoviruses in infected plants. In *The Luteoviridae*, pp. 69–81. Edited by H. . Smith & H. Barker.

Taoka, K.-I., Ham, B.-K., Xoconostle-Cázares, B., Rojas, M. R. & Lucas, W. J. (2007). Reciprocal phosphorylation and glycosylation recognition motifs control NCAPP1 interaction with pumpkin phloem proteins and their cell-to-cell movement. *Plant Cell* **19**, 1866–84.

Terradot, L., Souchet, M., Tran, V. & Giblot Ducray-Bourdin, D. (2001). Analysis of a three-dimensional structure of Potato leafroll virus coat protein obtained by homology modeling. *Virology* **286**, 72–82.

Thompson, G. A. & Schulz, A. (1999). Macromolecular trafficking in the phloem. *Trends Plant Sci* **4**, 354–360. Elsevier.

Thompson, G. A. & Van Bel, A. J. E. (Eds.). **(2013).** *Phloem. Molecular cell biology, systemic communication, biotic interactions.*, Wiley-Blac.

Tjallingii, W. F. (2006). Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. *J Exp Bot* **57**, 739–45.

Tomenius, K., Clapham, D. & Meshi, T. (1987). Localization by immunogold cytochemistry of the virus-coded 30K protein in plasmodesmata of leaves infected with tobacco mosaic virus. *Virology* **160**, 363–71.

Torrance, L. (1992). Analysis of epitopes on potato leafroll virus capsid protein. *Virology* **191**, 485–9.

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 Micr Interact* **22**, 381–90.

Torrance, L., Wright, K. M., Crutzen, F., Cowan, G. H., Lukhovitskaya, N. I., Bragard, C. & Savenkov, E. I. (2011). Unusual features of pomoviral RNA movement. *Frontiers in microbiology* **2**, 259.

Traven, A., Jelicic, B. & Sopta, M. (2006). Yeast Gal4: a transcriptional paradigm revisited. *EMBO rep* **7**, 496–9.

Turgeon, R. & Oparka, K. (2010). The secret phloem of pumpkins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 13201–2.

Turgeon, R. & Wolf, S. (2009). Phloem transport: cellular pathways and molecular trafficking. *Ann rev Plant Biol* **60**, 207–221. Annual Reviews.

-U-

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**, 1001201 (B. Ding, Ed.).

Ullah, H., Scappini, E. L., Moon, A. F., Williams, L. V. & Armstrong, D. L. (2008). Structure of a signal transduction regulator , RACK1 , from Arabidopsis thaliana. *Protein science* **17**, 1771–1780.

-V-

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 Acid Res* **16**, 9917–9932.

Verchot-Lubicz, J., Torrance, L., Solovyev, A. G., Morozov, S. Y., Jackson, A. O. & Gilmer, D. (2010). Varied movement strategies employed by triple gene block-encoding viruses. *Mol Plant Micr Interact* **23**, 1231–47.

Villada, E. S., González, E. G., López-Sesé, A. I., Castiel, A. F. & Gómez-Guillamón, M. L. (2009). Hypersensitive response to Aphis gossypii Glover in melon genotypes carrying the Vat gene. *J Exp Bot* **60**, 3269–77.

Vincenzetti, S., Cambi, A., Neuhard, J., Schnorr, K., Grelloni, M. & Vita, A. (1999). Cloning, expression, and purification of cytidine deaminase from Arabidopsis thaliana. *Protein expression and purification* **15**, 8–15.

Vogel, F., Hofius, D. & Sonnewald, U. (2007). Intracellular trafficking of Potato leafroll virus movement protein in transgenic Arabidopsis. *Traffic* **8**, 1205–14.

-W-

Walz, C., Giavalisco, P., Schad, M., Juenger, M., Klose, J. & Kehr, J. (2004). Proteomics of curcurbit phloem exudate reveals a network of defence proteins. *Phytochemistry* **65**, 1795–804.

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.

Wen, F. & Lister, R. M. (1991). Heterologous encapsidation in mixed infections among four isolates of barley yellow dwarf virus. *J Gen Virol* **72**, 2217–23.

Van der Wilk, F., Verbeek, M., Dullemans, A. M. & Van den Heuvel, J. F. (1997). The genome-linked protein of potato leafroll virus is located downstream of the putative protease domain of the ORF1 product. *Virology* **234**, 300–3.

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**, 377–9.

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 Micr Interact* **23**, 1486–97.

-X-

Xiang, S., Short, S. A., Wolfenden, R. & Carter, C. W. (1995). Transition-state selectivity for a single hydroxyl group during catalysis by cytidine deaminase. *Biochem* **34**, 4516–23.

-Y-

Yoo, B. C., Aoki, K., Xiang, Y., Campbell, L. R., Hull, R. J., Xoconostle-Cázares, B., Monzer, J., Lee, J. Y., Ullman, D. E. & Lucas, W. J. (2000). Characterization of cucurbita maxima phloem serpin-1 (CmPS-1). A developmentally regulated elastase inhibitor. *J Biol Chem* **275**, 35122–8.

Yu, Y., Lashbrook, C. C., Hannepel, D. J. & Hannapel, D. J. (2007). Tissue integrity and RNA quality of laser microdissected phloem of potato. *Planta* **226**, 797–803.

-Z-

Zhang, B., Tolstikov, V., Turnbull, C., Hicks, L. M. & Fiehn, O. (2010). Divergent metabolome and proteome suggest functional independence of dual phloem transport systems in cucurbits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 13532–7.

Zhang, F. & Simon, A. E. (2003). A novel procedure for the localization of viral RNAs in protoplasts and whole plants. *Plant J* **35**, 665–73.

Zheng, H., Yu, L., Wei, C., Hu, D., Shen, Y., Chen, Z. & Li, Y. (2000). Assembly of Double-Shelled, Virus-Like Particles in Transgenic Rice Plants Expressing Two Major Structural Proteins of Rice Dwarf Virus. *J Virol* **74**, 9808–9810.

Ziegler-Graff, V., Brault, V., Mutterer, J. D., Simonis, M. T., Herrbach, E., Guilley, H., Richards, K. E. & Jonard, G. (1996). The coat protein of Beet western yellows virus is essential for systemic infection but the viral gene products P29 and P19 are dispensable for systemic infection and aphid transmission. *Mol Plant Micr Interact* **9**, 501–510.