

## Contribution à l'étude du mouvement systémique de deux phytovirus : analyse comparative du transcriptome de cellules compagnes infectées et saines

Sophie Chapuis

#### ► To cite this version:

Sophie Chapuis. Contribution à l'étude du mouvement systémique de deux phytovirus : analyse comparative du transcriptome de cellules compagnes infectées et saines. Virologie. Université de Strasbourg, 2014. Français. NNT : 2014STRAJ041 . tel-01372196

## HAL Id: tel-01372196 https://theses.hal.science/tel-01372196

Submitted on 27 Sep 2016

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



**UNIVERSITÉ DE STRASBOURG** 



## ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ IBMP - UPR 2357

## THÈSE

présentée par :

## Sophie CHAPUIS

soutenue le : 26 septembre 2014

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

Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Contribution à l'étude du mouvement

systémique de deux phytovirus : analyse

## comparative du transcriptome de cellules

compagnes infectées et saines

THÈSE dirigée par : Dr. ZIEGLER-GRAFF Véronique

Directeur de recherches, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS EXTERNES : Dr. DINANT Sylvie Dr. FAVERY Bruno

EXAMINATEUR INTERNE Dr. HUGUENEY Philippe Directeur de recherches, Institut Jean-Pierre Bourgin Directeur de recherches, Institut Sophia Agrobiotech

Directeur de recherches, INRA de Colmar







#### Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Véronique Ziegler-Graff, ma directrice de thèse pour m'avoir donné l'opportunité de travailler sur ce projet. Merci pour la patience dont tu as fait preuve, surtout ces deux dernières années.

Je remercie également les membres du jury d'avoir accepté de juger mon travail de thèse et d'échanger avec moi sur ce sujet afin de me faire progresser.

Merci également aux deux autres chefs du projet Viromouv, Véronique Brault et Frédéric Revers, avec qui j'ai vraiment apprécié travailler. Merci également à leur équipe : Sylvaine, Clémence, Luc et surtout Caren avec qui j'ai passé de bonnes mais aussi très très longues journées.

Un merci tout particulier à Corinne Keichinger pour ses conseils, sa gentillesse et son soutien. Merci également au reste de la team d'enseignants de viro qui sont vraiment des bons vecteurs de transmission de savoir mais aussi de sympathie ! Merci Mario, Maria, Salah et the big boss David, toujours de bons conseils et bourré de nouvelles idées.

Ces années à l'IBMP ont été remplies de rires mais aussi de moments difficiles. Merci les supers copines du 409 et du 309 d'avoir toujours été présentes pour moi: Elo toujours là et enfin récompensée, Claire, Julia, Diane, Danièle et Alyssa, vous êtes des petits coeurs. Et il y a bien sûr l'irremplaçable Mister Bibiche, Kamal ainsi que Kinda, toujours prêts à rendre service. Merci aussi aux membres et anciens du labo 412 pour tous les moments partagés : Manu, Fanny, Dalya, Annette, Khalid, Eduardo. Je n'oublie pas les « satellites » : Baptiste, Léa, Shahinez, Clément, Jordane et ma petite Laura que je suis bien contente d'avoir rencontrée. Merci aux autres membres du département de virologie, aux serristes, aux bioinformaticiens, aux microscopistes, à Laurence, Martine, Lisiane, Danièle et tous ceux que j'oublie certainement qui ont tous et toutes contribués de près ou de loin à ce travail de thèse. J'ai une pensée spéciale et émue envers ma famille, ce soutien sans faille depuis toujours. Merci Papa pour tout ce que tu as fait pour moi. Merci Maman, c'est grâce à toi que j'en suis là aujourd'hui et je suis bien triste de ne pouvoir partager ce moment avec toi. Merci aussi aux « boubous » Catherine et Christian.

Je ne peux finir ces remerciements sans citer la personne la plus chère à mes yeux, devenu spécialiste malgré lui en systématique des phytovirus, qui m'a soutenu avec une patience sans borne et motivé jour après jour pour que je ne baisse pas les bras. Merci Geoffrey d'avoir été présent pendant ces dernières années et de l'être encore aujourd'hui, je te dois énormément dans la réalisation et la réussite de ce projet.

## Sommaire

Sommaire	1
Virus	7
Abréviations	8
Introduction générale	11
Partie 1: Système vasculaire des Angiospermes	13
I. Anatomie et fonctions des tissus vasculaires	16
1. Le xylème	16
2. Le phloème	17
II. Transport et mouvement au sein du système vasculaire	19
1. Transport et mouvement au sein du xylème (Satoh, 2006)	19
2. Transport et mouvement au sein du phloème	22
a. Sucres	22
b. Acides aminés	23
c. Sels minéraux	23
d. Protéines	24
e. ARN	25
f. Autres molécules	27
g. Virus, viroïdes et autres pathogènes	27
• Virus	27
• Viroïdes	29
• Autres pathogènes	29
Partie 2: Caractéristiques générales et présentation des virus étudiés	31
I. Cycle infectieux des phytovirus à ARN simple brin, de polarité positive	31
1. Entrée du virus dans la cellule et décapsidation	31
2. Traduction	32
a. Maturation d'une polyprotéine	33
b. Traduction à partir d'un ARN subgénomique (ARNsg)	34
c. « Leaky scanning »	34
d. Décalage de cadre de lecture ou « frameshift »	34
e. Translecture ou « Readthrough »	34
3. Réplication	35
4. Mouvement de cellule à cellule	36
5. Mouvement systémique	39

a. Facteurs cellulaires facilitant le mouvement viral dans le phloème	39
b. Facteurs cellulaires inhibant le mouvement viral dans le phloème	40
6. Transmission à un autre hôte	41
II. Le virus des jaunisses du navet ou Turnip yellows virus (TuYV): famille Luteovirida	е,
genre Polerovirus	42
1. Gamme d'hôtes et symptômes	43
2. Cycle viral des <i>Polerovirus</i>	44
a. Inoculation naturelle et transmission par pucerons	45
b. Organisation génomique des Polerovirus et expression des gènes	47
Organisation génomique	47
Mécanisme de traduction des protéines du TuYV	47
c. Réplication	50
d. Encapsidation	50
e. Mouvement du virus dans la plante	51
f. Suppression de RNA silencing	52
3. Inoculation des Polerovirus en laboratoire	54
III. Le virus de la mosaïque de la laitue ou <i>Lettuce mosaic virus</i> (LMV): famille	
<i>Potyviridae</i> , genre <i>Potyvirus</i>	55
1. Gamme d'hôtes et symptômes	56
2. Cycle viral du LMV	56
a. Inoculation naturelle et transmission	56
b. Organisation génomique (Urcuqui-Inchima et al., 2001) et traduction	57
c. Réplication des <i>Potyvirus</i>	60
d. Mouvement des Potyvirus dans la plante	61
• Mouvement de cellule à cellule	61
Mouvement à longue distance	63
e. Suppression de « RNA silencing »	64
3. Transmission du LMV en laboratoire	64
Partie 3: Etudes transcriptomiques de tissus phloémiens ou de plantes virosées	66
I. Etudes transcriptomiques de tissus phloémiens	66
1. Différentes méthodes d'isolement de tissus spécifiques.	66
a. Prélèvement du contenu cytosolique par aspiration grâce à des micro-capillaires	66
b. Immunoprécipitation de sous-unités ribosomales	67
c. Isolement de noyaux marqués de cellules spécifiques : système INTACT (Isolation of	
nuclei tagged in specific cell types)	68
d. Préparation de protoplastes et tri par FACS (Fluorescent activated cell sorting)	70
2. Etudes transcriptomiques de tissus phloémiens d'A. thaliana	70
II. Analyses différentielles entre plantes virosées et saines	76

Résultats	79
Chapitre 1 : Etudes transcriptomiques de cellules compagnes d'Arabidopsis thali	ana
infectés par le LMV ou le TuYV	79
I. Mise au point de la méthode d'isolement de cellules phloémiennes d'Arabidopsis	
thaliana	79
1. Microdissection et capture laser	80
2. Protoplastes enrichis en CC d' <i>A. thaliana</i> sucGFP et tri par FACS	87
a. Mise au point de la préparation de protoplastes enrichis en CC	88
b. Mise au point du tri par FACS	89
3. Validation de l'efficacité du tri cellulaire par PCR quantitative	91
II. Etude transcriptomique de cellules compagnes infectées par le LMV ou par le TuY	W 97
1. Introduction	97
a. Description de l'expérience biologique (Figure 30)	97
b. Séquençage à haut-débit	101
c. Puces CATMA	103
d. Critères d'analyse des données de transcriptomiques	104
2. Etude transcriptomique de cellules compagnes de plantes infectées par le LMV	106
a. Analyse par RNAseq des expériences d'infections par le LMV	106
<ul> <li>Comparaison des expériences analysées individuellement</li> </ul>	106
<ul> <li>Analyse de la moyenne des valeurs obtenues lors des expériences de RNAseq</li> </ul>	106
b. Analyse par puces CATMA des expériences d'infections par le LMV	108
<ul> <li>Comparaison des expériences analysées individuellement</li> </ul>	108
Analyse de la moyenne des valeurs obtenues lors des expériences sur puces CATM	Α
	108
c. Comparaison des résultats obtenus par les deux technologies	111
<ul> <li>Comparaison des expériences analysées individuellement</li> </ul>	111
Comparaison des gènes dérégulés identifiés par les deux technologies	111
d. Analyse de l'enrichissement en termes d'ontologie des échantillons infectés par le LM	ΛV
	112
• RNAseq	112
• Puces CATMA	113
• Comparaison des enrichissements en termes de GO obtenus après analyse par RNA	Aseq
et par puces CATMA	113
e. Validation de la dérégulation de certains gènes candidats par la technique de qPCR	114
f. Etude des gènes dérégulés par le LMV et discussion	121
Implication du LMV dans le métabolisme du soufre ?	121
Résistance systémique acquise (SAR): un mécanisme de défense induit par le LMV	?127
<ul> <li>Protéines de stress réprimées par le LMV</li> </ul>	130

Comparaison avec d'autres études portant sur le phloème	131
3. Etude transcriptomique de cellules compagnes de plantes infectées par le TuYV	133
a. Analyse par RNAseq des expériences d'infection par le TuYV	133
Comparaison des expériences analysées individuellement	133
Analyse de la moyenne des valeurs obtenues lors des expériences de RNAseq	133
b. Analyse par puces CATMA des expériences d'infections par le TuYV	134
Comparaison des expériences analysées individuellement	134
• Analyse de la moyenne des valeurs obtenues lors des expériences de puces CAT	MA 135
c. Comparaison des résultats obtenus par les deux technologies	137
Comparaison des expériences analysées individuellement	137
• Analyse de la moyenne des deux technologies	137
d. Analyse de l'enrichissement en termes d'ontologie des échantillons infectés par le	TuYV
	137
• RNAseq	137
• Puces CATMA	138
• Comparaison des enrichissements en termes de GO obtenus par analyse par RN	Aseq et
par puces CATMA	138
e. Validation de la dérégulation de certains gènes candidats par qPCR	139
f. Etude des gènes dérégulés par le TuYV et discussion	144
• Activation de la voie des glucosinolates en réponse à l'infection par le TuYV ?	144
<ul> <li>Induction de certains gènes de stress</li> </ul>	150
Comparaison avec d'autres études (Tableau 19)	151
4. Comparaison des résultats obtenus pour le LMV et le TuYV	151
a. Comparaison directe sur puces CATMA	152
b. Comparaison listes LMV/TuYV	153
5. Discussion générale	154
a. Considérations techniques	155
a. Analyse globale des résultats de transcriptomique	159
b. Dérégulations spécifiques identifiées dans les CC de plantes infectées par le LMV o	ou par le
TuYV	161
• Infection par le LMV	161
• Infection par le TuYV	162
Chapitre 2 : Identification d'un partenaire protéique de la protéine RT du TuY	V par
un crible double-hybride dans la levure	163
Chapitre 3 : Etude des gènes <i>RTM</i> dans le mouvement viral systémique	207
I. Gènes de résistance <i>RTM</i> et <i>Potyvirus</i>	207
II. Etude de l'action des gènes RTM sur l'infection par des Polerovirus	208

III. Etude du mouvement à longue distance du LMV par extinction du gène de résis	tance
RTM1 par VIGS	210
1. Extinction de gènes par la technique de VIGS (virus-induced gene silencing)	210
2. Stratégie développée avec le TuYV	212
3. Résultats	214
Conclusion générale	239
• Etudes transcriptomiques de protoplastes de CC infectés par le LMV ou le TuYV	239
• Etude de l'interaction de la protéine CYPK7 avec la protéine RT du TuYV dans le	
mouvement à longue distance du virus	242
• Etude des gènes RTM dans le mouvement systémique du TuYV et du LMV	242
Matériel et méthodes	245
1. Matériel	245
I. Milieux de culture	245
1. Milieu LB (Lysogeny broth)	245
II. Bactéries	245
1. Agrobacterium tumefaciens	245
III. Virus	246
1. Turnip yellows virus (TuYV)	246
2. Cucurbit aphid-borne yellow virus (CABYV)	246
3. Lettuce mosaic virus (LMV)	246
IV. Plantes	246
1. Lactuca sativa	246
2. Arabidopsis thaliana	246
2. Méthodes	247
I. Inoculations virales et analyse de l'infection	247
1. Agro-infection pour le TuYV	247
2. Inoculation mécanique pour le LMV	248
3. Détection virale par immuno-empreintes de pétioles	248
4. Détection virale par ELISA	248
II. Préparation de protoplastes enrichis en cellules compagnes d'A. thaliana	249
III. Techniques histologiques	250
1. Préparations des échantillons utilisés en microdissection	250
a. Fixation	250
• Fixation Ethanol/ Acide acétique (EA)	250
<ul> <li>Fixation formaldéhyde/éthanol/acide acétique (FEA)</li> </ul>	250
• Fixation « Methacarn » (Balestrini et al., 2007)	250
b. Inclusion	251

Annexes	277
Bibliographie	259
• Transfert sur membrane	258
• Gel de polyacrylamide	258
b. Analyse des protéines par Western-blot	258
a. Extraction	258
2. Extraction et analyse de protéines	258
Hybridation	257
Synthèse de sondes ADN aléatoires	257
• Transfert sur membrane	257
• Gel	257
g. Analyse des ARN par Northern blot	257
f. PCR quantitative en temps réel	254
e. Rétrotranscription	254
d. Analyses des ARN au Bioanalyzer	254
c. Extraction avec un kit PicoPure (Arcturus)	253
b. Extraction avec un kit RNeasy mini plant (Qiagen)	253
a. Extraction au trizol	253
1. Extraction et analyses d'ARN	253
IV. Analyses moléculaires	253
b. Microscopie confocale	252
a. Microscopie à épifluorescence	252
3. Microscopie	252
2. Microdissection et capture laser (LCM)	252
Inclusion pour coupe au cryostat	252
• Inclusion « Steedman wax »	251
Inclusion paraffine	251

## Virus

AMV:	Alfalfa mosaic virus (Bromoviridae, Alfamovirus)
BChV:	Beet chlorosis virus (Luteoviridae, Polerovirus)
BMV:	Brome mosaic virus (Bromoviridae, Bromovirus)
BMYV:	Beet mild yellowing virus (Luteoviridae, Polerovirus)
BNYVV:	Beet necrotic yellow vein virus (Unassigned, Benyvirus)
BWYV:	Beet western yellows virus (Luteoviridae, Polerovirus)
BYDV:	Barley yellow dwarf virus (Luteoviridae, Luteovirus)
CABYV:	Cucurbit aphid borne yellows virus (Luteoviridae, Polerovirus)
CaLCuV:	Cabbage Leaf Curl Virus (Geminiviridae, Geminivirus)
CaMV:	Cauliflower mosaic virus (Caulimoviridae, Caulimovirus)
CGMMV:	Cucumber green mottle mosaic virus (Virgaviridae, Tobamovirus)
CIYVV:	Clover yellow vein virus (Potyviridae, Potyvirus)
CLRDV:	Cotton leafroll dwarf virus (Luteoviridae, Polerovirus)
CMV:	Cucumber mosaic virus (Bromoviridae, Cucumovirus)
CPMV:	Cowpea mosaic virus (Secoviridae, Comovirus)
CtRLV:	Carrot red leaf virus (Luteoviridae, Polerovirus)
CVYV:	Cucumber vein yellowing virus (Potyviridae, Ipomovirus)
CYDV:	Cereal Yellow Dwarf Virus (Luteoviridae, Polerovirus)
GFLV:	Grapevine fanleaf virus (Secoviridae, Nepovirus)
GLRaV:	Grapevine leafroll-associated virus (Closteroviridae, Closterovirus)
GRV:	Groundnut rosette virus (Unassigned, Umbravirus)
LMV:	Lettuce mosaic virus (Potyviridae, Potyvirus)
ORMV:	Oilseed rape mosaic virus ( <i>Virgaviridae, Tobamovirus</i> )
PEMV-1:	Pea enation mosaic virus-1 (Luteoviridae, Enamovirus)
PepMoV:	Pepper mottle virus ( <i>Potyviridae, Potyvirus</i> )
PLRV:	Potato leafroll virus (Luteoviridae, Polerovirus)
PPV:	Plum pox virus (Potyviridae, Potyvirus)
PSbMV:	Pea Seed-borne Mosaic Virus ( <i>Potyviridae, Potyvirus</i> )
PVX:	Potato virus X (Alphaflexiviridae, Potexvirus)
PVY:	Potato virus Y ( <i>Potyviridae, Potyvirus</i> )
SBWMV:	Soil-borne wheat mosaic virus ( <i>Virgaviridae, Furovirus</i> )
SCYLV:	Sugarcane yellow leaf virus (Luteoviridae, Polerovirus)
SMV:	Soybean mosaic virus ( <i>Potyviridae, Potyvirus</i> )
TBSV:	Tomato bushy stunt virus ( <i>Tombusviridae, Tombusvirus</i> )
TCV:	Turnip crinkle virus (Tombusviridae, Carmovirus)
TEV:	Tobacco etch virus (Potyviridae, Potyvirus)
TMV:	Tobacco mosaic virus (Virgaviridae, Tobamovirus)
TRV:	Tobacco rattle virus (Virgaviridae, Tobravirus)
TSWV:	Tomato spotted wilt virus (Bunyaviridae, Tospovirus)
TuMV:	Turnip mosaic virus (Potyviridae, Potyvirus)
TuYV:	Turnip yellows virus (Luteoviridae, Polerovirus)
TVCV:	Turnip vein clearing virus (Virgaviridae, Tobamovirus)
TVMV:	Tobacco vein mottling virus (Potyviridae, Potyvirus)
TYMV:	Turnip yellow mosaic virus ( <i>Tymoviridae, Tymovirus</i> )
ZYMV:	Zucchini yellow mosaic virus (Potyviridae, Potyvirus)

## Abréviations

°C	degré celsius	DHAR	dehydroascorbate reductase
AAP	amino acid permease	DHCA	acide dihydrocamaléxique
		DIN	dark inducible
ABP	auxin binding protein	dNTP	désoxyribonucléotide
ADN	acide désoxyribonucléique	DO	densité optique
ADN-T	ADN de transfert	Dof	DNA binding with one finger
ADNc	ADN complémentaire	DSTM	delayed systemic tobamovirus movement
AGO	ARGONAUTE	dT	deoxythymidylic acid residues
AHA	H+-ATPase		
AHP2	arabidospsis HOP2 homologue protein	DTT	dithiothréitol
AIA	acide indole-3-acétique	EA	éthanol/acide acétique
АКТ	potassium transporter	EDS	enhanced disease susceptibility
AOP	alkenyl hydroxalkyl producing	EDTA	éthylène diamine tétra acétique
APC	amino acid, polyamine and choline	EF	elongation factor
АРК	APS kinase	eIF	eukaryotic translation initiation factor
APL	altered phloem development	EIN	ethylene insensitive
APR	5'-adenylylsulfate reductase	ELISA	, enzyme-linked immunosorbent assay
APS	ATP sulfurvlase	EMS	ethyl methanesulfonate
ARF	auxin response factor	Exp	expérience
ARN	acide ribonucléique	FACS	fluorescent activated cell sorting
ARNC	ARN complémentaire	FAD	flavine adénine dinucléotide
ARNm	ARN messager	FDR	false discovery rate
ARNr	ARN ribosomique	FFA	formaldéhyde/éthanol/acide acétique
ARNso	ARN subgénomique	FU	
ARN+	ARN de transfert	EW/EB	familywise error rate
ATE	amino acid transporter	σ σ	gramme
ΔΤΡ	adénosine trinhosnhate	б Сарри	glycáraldéhyde-3-nhosnhate
RAC	BCI -2-associated athanogene	UADI II	déshydrogénase
	branched chain aminetransferase	GFP	green fluorescent protein
	5 bromo 4 chloro 2' indolynhocrahato n		8 p
DCIF	toluidine salt	GO	gene ontology
DCI	hota 1.2 glucanaco	GRP	glycine-rich protein
DGL	Deta-1,5-glucaliase	GS	glucosinolate
	biotin operon repressor	GST	gene-specific sequence tags
	biotin ligase recognition peptide	GSTU	glutathione S-transferase Tau
DKI		НА	hemagglutinin
DC 4	have the answer allower to	HC-Pro	helper component-proteinase
BSA	bovine serum albumin	HEDES	acide $4_{-}(2_{-}$ bydroxyéthyl)-1_ninérazine
	basic leucine zipper	TILF LS	éthane sulfonique
CAIMA	complete Arabidopsis transcriptome		host shock transcription factor
CC	microarray collulo compagno	HSPA2	heat shock protoin
	magnacium chalataca		indolo 2 acotonitrilo
	avlindrical inclusion		2 isopropulmoloto suptoso
	cylinarical inclusion		2-isopi opyimalate synthase
CIPK	calcineurin B-like protein interacting	IUAX	indole-3-acetaldoxime
Col	Colombia		
CP	protéine de canside	IRES	Internal ribosome entry site
Cv	cvanine	KU 1	
CYP	cytochrome P450	I	nure
Da	dalton	LB	iysogeny protn
	dicer-like		chromatographie en phase liquide couplée
	diáthanolamine	1015/1015	
	alethallolallille	LCM	microdissection et capture laser

LHCA	light harvesting complex
LS	linker scanning
LSU	low sulfur
LTP	lipid transfer protein
m	mètre
Μ	molaire
MAM	methylthioalkylmalate synthase
MAP	microtubule-associated protein
MATH	meprin and TRAF homology
MES	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
miARN	micro-ARN
MP	protéine de mouvement
MYB	myeloblastosis
NACP	NAC (NAM, ATAF1/2 and CUC2) domain
	protein
NAM	no apical meristem
NBT	nitro-blue tetrazolium chloride
NI	nuclear inclusion
NIM	non-inducible immunity
NPR	nonexpresser of PR genes
NS	non structural
NTF	nuclear targeting fusion
ORF	open reading frame
PABP	polyA binding protein
PAD	phytoalexin deficient
PAPS	3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate
PAZ	piwi, argonaut and zwille
pb	paire de base
pBin	plasmide binaire
PBS	phosphate buffered saline
PCaP	plasma membrane-associated cation
	binding protein
PCC	pathogen and circadian controlled
PCR	polymerase chain reaction
PCR	cadmium resistance protein
PDS	phytoène désaturase
PEG	polyéthylène glycol
PIPO	pretty interesting potyviridae ORF
PNP-A	plant natriuretic peptide A
polyA	polyadénylé
POX	péroxydase
PP2	phloem protein 2
PPU	pore-plasmodesmata units
PR	pathogenesis-related
pSUC2	promoteur du gène SUC2
PTGS	post-transcriptional gene silencing
PUP	purine permease

PVIP	potyvirus VPg-interacting protein
PVP	polyvinylpyrrolidone
qPCR	PCR quantitative
RACK	receptor for activated kinase
RanGAP	Ran GTPase-activating protein
Rar	required for MLA12 resistance
RAV	regulator of the (H+)-ATPase of the
	vacuolar and endosomal membranes
RIL	recombinant inbred line
RIN	RNA integrity number
RISC	RNA induced silencing complex
RNApol	ARN polymérase
RNP	ribonucléoprotéique
RPL18	ribosomal protein L18
rpm	rotation per minute
RT	readthrough
RTM	restricted Tobacco etch virus Movement
RuBisCO	ribulose-1,5-bisphosphate
	carboxylase/oxygénase
S	svedberg
SAR	systemic acquired resistance
SCF	SKP-cullin-Fbox protein
SDI	sulfur deficiency-induced
SDS	sodium dodecyl sulfate
SEL	seuil d'exlusion limite
sHSP	small HSP
SKP	S-phase kinase-related protein
SNARE	soluble N-ethylmaleimide sensitive factor
	attachment receptor
SSC	saline-sodium citrate
SUC2	sucrose transporter
Т-	témoin négatif
тс	tube criblé
тсн	touch
TE	translational enhancer
TGG	thioglucoside glucohydrolase
TGS	transcriptional gene silencing
Ti	tumour inducing
UV	ultraviolet
V	volt
VIGS	virus-induced gene silencing
VPg	viral protein genome-linked
VSM	virus systemic movement
VSR	viral suppressor of RNA silencing
WRKY	worky
XSP	xylem sap protein

# Introduction générale

## Introduction générale

Le transport des virus à longue distance dans une plante est une étape cruciale à l'établissement d'une infection complète. En effet, après l'inoculation initiale, en général par un insecte vecteur, le virus se réplique au point d'inoculation, puis transite dans les cellules voisines par les plasmodesmes modifiés par l'action d'une ou plusieurs protéines de mouvement (MP). Après l'infection locale, l'enjeu majeur est d'assurer sa survie au delà de la plante infectée. Ceci nécessite d'envahir et de se multiplier dans toute la plante pour augmenter ses chances d'être acquis par un nouveau vecteur. L'invasion systémique d'une plante par un phytovirus nécessite un « TGV », un transport à grande vitesse qui va emprunter les voies de communication à distance de la plante, à savoir principalement, le phloème. Contrairement au mouvement à courte distance qui a bénéficié d'avancées importantes après la découverte des protéines de mouvement (Schoelz et al., 2011), le transport à longue distance reste peu connu (Hipper et al., 2013). Ce retard s'explique en partie par la difficulté liée à l'étude des tissus vasculaires, situés en profondeur.

C'est pour pallier en partie à ce déficit de connaissances, que le projet ANR « VIROMOUV » a vu le jour, une collaboration entre les équipes des Drs. Véronique Ziegler-Graff à l'IBMP, Véronique Brault de l'INRA de Colmar et Frédéric Revers de l'INRA de Bordeaux. L'objectif était de mieux comprendre le transport viral systémique en identifiant (1) de nouvelles protéines cellulaires participant à ce processus, et (2) de caractériser à l'échelle du génome, les gènes dérégulés par l'infection, spécifiquement dans les tissus vasculaires.

Mon projet de thèse s'inscrit dans cette thématique et avec comme mission première l'isolement de cellules compagnes d'*Arabidopsis thaliana*, à partir desquelles seront extraits les précieux ARN. Ce verrou technique levé, j'ai pu réaliser l'étude transcriptomique différentielle afin d'identifier des gènes exprimés dans le phloème qui présentent une dérégulation suite à une infection virale. Ces dérégulations peuvent être induites soit par la plante suite à l'infection pour lutter contre les virus, soit directement par les virus. Dans ce cas, ces changements pourraient aider au développement ou à la propagation de l'infection lors de la réplication, de la traduction ou dans le cas qui nous intéresse le plus, dans leur mouvement.

Les virus étudiés sont les *Polerovirus* et les *Potyvirus* dont l'impact économique est important en raison de leur large gamme d'hôtes. Ces deux genres viraux présentent de nombreuses différences quant à leur morphologie, leur organisation génomique ou leur tropisme cellulaire. Par exemple, l'infection des *Polerovirus* est restreinte aux cellules phloémiennes alors que celle des *Potyvirus* touche toutes les cellules. Malgré ces différences, ils utilisent tous deux le phloème pour se mouvoir dans leur hôte sur de longues distances et donc envahir la plante entière. De par cette différence de tropisme cellulaire, une étude comparative des gènes dérégulés dans les cellules phloémiennes de plantes saines et infectées pourrait permettre d'appréhender certains des mécanismes moléculaires qui sous-tendent le transport viral systémique et mettre en évidence une spécificité selon la famille virale.

Grâce à la mise au point de l'isolement d'ARN à partir de cellules compagnes d'*A. thaliana*, j'ai pu participer à la construction d'une banque spécifique d'ADNc de ces cellules, banque qui a ensuite été utilisée dans un crible de double hybride dans la levure afin d'identifier des partenaires de plusieurs protéines virales (en collaboration avec le Dr Caren Rodriguez, post-doctorante à INRA de Colmar).

Enfin, durant ma thèse, je me suis également intéressée au rôle de gènes spécifiques du phloème, les gènes *RTM* connus pour restreindre le mouvement à longue distance de certains *Potyvirus*.

#### Partie 1: Système vasculaire des Angiospermes

Pour la rédaction de ce chapitre, je me suis largement inspirée des trois revues et livres suivants : (Roland et al., 2008, Mauseth & Bowes, 2012).

Les plantes supérieures ont développé un réseau symplastique de transport et de communication permettant les échanges de nutriments et d'informations entre cellules et organes (Kehr, 2009). Les cellules sont ainsi reliées entre elles par des connexions, les plasmodesmes, qui permettent de franchir la paroi végétale entourant chaque cellule et créent ainsi une continuité cytoplasmique, endoplasmique et membranaire entre une cellule et les cellules attenantes. Le transfert d'information entre organes distants se fait quant à lui par le système vasculaire de la plante et plus particulièrement par le phloème. Ces deux réseaux, local et à longue distance, sont indispensables pour le développement et la croissance de la plante.

Même si le transport de macro-molécules se fait principalement par ce réseau, un certain nombre de molécules, de nutriments et de signaux circulent également par la voie apoplasmique.

Le tissu vasculaire des angiospermes (plantes à fleurs) forme des faisceaux qui parcourent la plante entière. Il est constitué de tissus conducteurs (nervures) associés à d'autres types cellulaires. Je vais me focaliser plus particulièrement sur l'anatomie des structures aériennes des angiospermes car ce sont ces structures que nous avons utilisées dans cette étude.

Dans les tissus primaires des feuilles et tiges, produits par le méristème caulinaire, les tissus conducteurs qui se différencient à partir des cellules précambiales sont accompagnés par trois autres tissus structurellement et fonctionnellement distincts :

- le parenchyme qui constitue le tissu le plus représenté,
- les tissus de soutien (collenchyme, et sclérenchyme),
- l'épiderme qui assure le contact avec l'atmosphère.

Les systèmes conducteurs sont organisés de manière différente chez les Monocotylédones et chez les Dicotylédones. En effet, dans les feuilles des Monocotylédones (herbes et graminées), les faisceaux vasculaires principaux sont généralement parallèles à leur axe. Ils sont reliés entre eux par de petits faisceaux secondaires non ramifiés. Chez les Dicotylédones, les faisceaux vasculaires des feuilles forment un véritable réseau à partir d'une nervure principale qui est centrale. Des voies secondaires suivent une disposition réticulée de part et d'autre de la voie principale. Elles sont reliées entre elles par des petites nervures transversales.

Dans les tiges de Monocotylédones, les nombreux faisceaux regroupant xylème et phloème sont éparpillés sur le plan transversal (Figure 1A) alors que chez les Dicotylédones, les faisceaux présents dans les tiges sont moins nombreux mais sont placés en cercle autour de l'axe central de la tige (Figure 1B). Dans ce cas, le xylème est toujours placé du côté interne du faisceau, au plus proche de l'axe de la tige. Chez les Cucurbitacées et les Solanacées, le phloème est présent sous deux structures : le phloème interne et le phloème externe. Dans cette situation, c'est le phloème interne qui se trouve en position plus centrale.



**Figure 1: Coupes transversales de tiges.** (A) Tige d'*Asparagus officinalis* (Monocotylédone). Coloration à la safranine pour les parties lignifiées et au vert intense pour la cellulose et le cytoplasme. Les faisceaux vasculaires sont éparpillées sur la coupe.

Source :http://www.microscopie.ch/articles/asparagus/asparagu s.php)

(B) Tige de renoncule (Dicotylédone). Coloration au carmino vert de Mirande. Les faisceaux vasculaires sont situés le long d'un cercle, en périphérie.

(http://www.bcpst.eu/spip.php?article13)

Dans les tissus plus éloignés des méristèmes, les structures sont plus différenciées ce qui permet de distinguer d'une part le protoxylème et le métaxylème et d'autre part le protophloème et le métaphloème. Le protoxylème et le protophloème sont les premières structures à se différencier à partir du procambium. Le protoxylème est généralement composé d'éléments conducteurs annelés ou spiralés. Le protophloème est quant à lui composé uniquement de tubes criblés. Ces deux structures seront écrasées au cours de la croissance au profit du métaxylème et du métaphloème qui vont se différencier à partir du moment où l'organe qui les contient a cessé de s'allonger. Les éléments conducteurs du métaxylème sont fortement lignifiés et sont généralement scalariformes (en forme d'échelle), réticulés ou ponctués. Ce sont les dernières structures primaires formées. Dans les tiges et feuilles, la différenciation du xylème primaire est dit centrifuge car le protoxylème occupe une position plus interne au métaxylème. La différentiation du phloème se déroule à l'opposé de celle du xylème, c'est à dire qu'elle est centripète.

Chez les Dicotylédones comme *Arabidopsis thaliana*, le phloème et le xylème sont superposés, séparés l'un de l'autre par le cambium fasciculaire qui dérive du procambium (couche de cellules embryonnaires non différenciées) (Figure 2).

Dans les racines, les éléments du phloème et du xylème sont distincts et forment des pôles phloémiens et xylémiens, disposés de façon alterne; la différenciation du phloème et du xylème est centripète. Chez les Monocotylédones, on observe habituellement de nombreux pôles xylémiens situés autour d'une moelle centrale en alternance avec des pôles phloémiens plus externes. La répartition des pôles vasculaires est différente chez les Dicotylédones : on n'observe pas de moelle au centre de la racine mais une colonne centrale de xylème, le plus souvent en forme de croix ou d'étoile dont les branches s'insinuent entre les pôles phloémiens.

Les tissus conducteurs secondaires sont produits à partir du cambium vasculaire, qui est un méristème secondaire. Il provient de la différenciation des cellules précambiales qui ne se sont différenciées ni en xylème ni en phloème. Le cambium produit donc du xylème secondaire (bois) et du phloème secondaire (liber).



**Figure 2 : Coupe transversale d'une hampe florale d'***A. thaliana.* (A) Cette coupe permet d'observer l'organisation circulaire des faisceaux vasculaires dans une tige. (B) Agrandissement d'un faisceau vasculaire avec les petites cellules du phloème (ph) séparées des cellules du xylème par le procambium (pc). Les cellules du xylème sont de deux sortes : le métaxylème (mmx) ou vaisseaux et le protoxylème (px) ou trachéides (Turner & Sieburth, 2002).

#### I. Anatomie et fonctions des tissus vasculaires

#### 1. Le xylème

Le xylème est un tissu complexe dont le rôle principal est de transporter l'eau des racines aux parties supérieures de la plante, via ses éléments conducteurs. De part la rigidité des structures qui le composent, il procure aussi à la plante un soutien mécanique. La sève brute qui circule dans ces vaisseaux conducteurs est composée d'eau et de sels minéraux. Elle monte dans la plante notamment grâce à l'aspiration engendrée par le flux transpiratoire issus des feuilles mais aussi grâce à la poussée racinaire.

Chez presque tous les Angiospermes, les éléments conducteurs sont composés de vaisseaux et de trachéides (Figure 2) et sont entourés de cellules du parenchyme xylémien et de fibres.

– Les vaisseaux, lorsqu'ils sont matures, sont composés de cellules mortes dont la paroi est devenue imperméable par lignification. Ils mesurent entre 20 et 400 μm de diamètre selon l'espèce. Ces cellules ayant perdu leur protoplaste, l'eau peut ainsi circuler librement dans leur cavité grâce à l'absence de membrane plasmique et de cytoplasme. Elles sont de forme allongée mais plus courte que les trachéides et disposées bout à bout pour former une sorte de tuyau rigide. Elles sont reliées les unes des autres par des plaques perforées de nombreuses ouvertures qui permettent le passage de l'eau.

– Les trachéides sont quant à elles de longues et fines cellules, non perforées et biseautées à leurs extrémités. Elles ont un diamètre de 10 à 50 μm selon l'espèce. Ce sont des cellules uniques contrairement aux vaisseaux dont les éléments sont reliés entre eux. Même si elles participent au transport de la sève brute, elles ont principalement un rôle de soutien plus global de la plante.

- Les cellules du parenchyme xylémien sont des cellules vivantes, entourant les éléments conducteurs. Celles qui sont directement en contact avec eux ont une forte activité métabolique, comparable à celle des cellules compagnes liées aux les tubes criblés dans le phloème. Mais la comparaison s'arrête là car leur relation avec les éléments conducteurs est bien différente, ces derniers n'étant plus des cellules vivantes. La communication s'opère par le biais de ponctuations au niveau des vaisseaux. Les solutés doivent traverser la membrane plasmique des cellules de

16

contact puis entrer dans l'espace apoplasmique des vaisseaux. Ces cellules accolées aux éléments conducteurs n'accumulent pas de réserves, cette fonction étant assurée par les cellules du parenchyme plus éloignées.

 Les fibres xylémiennes jouent un rôle important dans le soutien de la plante et parfois dans le stockage. Certaines d'entre elles restent vivantes à maturité.

Les trachéides et les vaisseaux transportent tous deux la sève brute vers les parties supérieures de la plante. Par la structure des trachéides, qui restent un enchainement de cellules isolées, la circulation de la sève se trouve donc indirecte et ralentie par le passage d'une cellule à l'autre. Dans les longs tuyaux des vaisseaux par contre, la circulation de la sève brute se déroule de manière directe. C'est un avantage car ces structures présentent moins de résistance à l'écoulement ; mais en présence d'une bulle d'air par exemple, tout le vaisseau sera inutilisable, alors que si cela se produit dans les trachéides, seule une cellule sera touchée.

Les éléments conducteurs sont plus ou moins lignifiés selon le degré de maturité du tissu. On distingue :

- des éléments annelés et spiralés qui sont extensibles (trachéides du protoxylème),
- des éléments à ponctuations scalariformes ou aréolées (trachéides),
- des éléments rayés, réticulés ou ponctués (vaisseaux).

Les deux derniers types d'éléments xylémiens sont incapables de croître à cause de leur lignification.

#### 2. Le phloème

Le phloème primaire permet le transport de la sève dite élaborée, composée d'eau, de sucres synthétisés par les parties aériennes de la plante lors de la photosynthèse, de sels minéraux, de protéines et de phytohormones. Il permet un transport rapide de la sève et de ses constituants (environ un mètre par heure). Il est issu de la différenciation du procambium.

Il est formé de différents types cellulaires : les tubes criblés (TC), les cellules compagnes (CC) et les cellules du parenchyme phloémien. Les CC et les TC proviennent de la division asymétrique d'une cellule mère unique (Oparka & Turgeon, 1999). Après cette division, les TC dégénèrent en partie. Cette autolyse est sélective puisqu'il y a destruction de certains organites sans que cela touche les autres. En s'ouvrant, la vacuole entraine la dégradation du noyau, de l'appareil de Golgi et des ribosomes cytoplasmiques. Le réticulum endoplasmique est conservé dans les tubes criblés mais il est fortement modifié en un réseau de tubules et d'agrégats appelé SER (sieve element reticulum)(Wooding, 1967). Il ne reste plus dans les tubes criblés que quelques mitochondries modifiées, la membrane plasmique et le SER (Sjolund et al., 1983). On retrouve également des plastes en grand nombre ainsi que des protéines spécifiques du phloème, les protéines-P.

– Les TC sont composés de cellules disposées bout à bout, vivantes mais en partie dégénérées. Elles ne possèdent plus ni noyau ni vacuole ni ribosomes, perdant ainsi probablement leur capacité de transcription et de traduction. Elles conservent par contre leur membrane plasmique qui va recouvrir la paroi et le bord des pores, mais aussi des mitochondries, quelques plastes sans thylakoïdes fonctionnels et du réticulum endoplasmique spécifique à ces cellules. Les TC sont composés de très longues cellules jointives au niveau de leurs extrémités où se trouve une plaque criblée comportant de nombreux pores allant de 200 à 400 nm de diamètre en moyenne mais pouvant atteindre 1 à 2  $\mu$ m chez les Cucurbitacées.

Les CC sont des cellules dérivant de la même cellule-mère que les TC. Elles ont une activité métabolique importante afin de fournir aux TC les différents composés nécessaires à leur survie. Elles participent aussi au chargement des TC en photoassimilats, comme les sucres. Les CC et les TC sont intimement liés par de nombreux plasmodesmes spécifiques, appelés PPU (pore-plasmodesma units)(van Bel, 1996). Ils sont toujours ramifiés du côté des cellules compagnes et uniques du côté tubes criblés (Figure 3). Leur seuil d'exclusion limite (SEL), qui indique la taille maximale des protéines capables de transiter par un type de plasmodesmes, est assez important puisqu'il est de l'ordre de 67 kDa contre 1 kDa pour les plasmodesmes reliant les cellules du mésophylle (Stadler et al., 2005).

Il existe plusieurs types de complexes CC/TC selon le lien existant entre ces deux types cellulaires. Ainsi chez la plupart des herbacées, les CC ne sont pas directement liées aux TC par des plasmodesmes. Ces CC dites de transfert comportent de nombreuses invaginations augmentant ainsi la surface d'échange avec l'extérieur assurant ainsi le transport par le milieu apoplasmique. Dans de nombreuses autres plantes dont les Cucurbitacées, les CC sont reliées aux TC par de nombreux plasmodesmes ce qui permet aux molécules d'emprunter la voie symplasmique. Les CC dans ce cas sont appelées CC intermédiaires. Ces deux systèmes peuvent co-exister au sein de la même espèce.



Figure 3 : Plasmodesme branché reliant un tube criblé (TC) d'*A. thaliana* à une cellule compagne (CC). La flèche bleue montre l'entrée unique du côté du tube criblé et les flèches rouges, les ramifications au niveau de la cellule compagne. (Microscopie électronique à transmission). Echelle: 250 nm (Oparka & Turgeon, 1999)

 Les cellules du parenchyme phloémien sont des cellules vivantes qui constituent des réserves.

Le phloème secondaire présent dans les tissus matures a un rôle complètement différent. Il est mis en place suite à la disparition rapide du phloème primaire. Il forme en partie l'écorce protectrice des arbres et ses cellules parenchymateuses servent de tissus de réserve. Il est issu de la différenciation du cambium.

#### II. Transport et mouvement au sein du système vasculaire

#### 1. Transport et mouvement au sein du xylème

La sève brute (pH 5,5-6) est constituée dans les racines de la plante, plus précisément au niveau des radicelles (Satoh, 2006). Les éléments qui la composent traversent les cellules de l'épiderme, les cellules corticales et l'endoderme de la radicelle par la voie symplastique via des plasmodesmes et pénètrent la zone apoplastique de la stèle contenant les vaisseaux conducteurs. On retrouve dans les cellules du parenchyme xylémien d'*A. thaliana*, plusieurs transporteurs qui pourraient être impliqués dans le chargement d'ions dans le xylème comme le potassium (Gaymard et al., 1998), le phosphate (Hamburger et al., 2002) ou le bore (Takano et al., 2002). Certains gènes, codant pour des protéines retrouvées dans la sève xylémienne du concombre, sont exprimés spécifiquement dans les cellules du parenchyme xylémien. Il s'agit de gènes codant pour une protéine GRP (glycine-rich protein) présente dans la sève brute (Sakuta et al., 1998) et d'une lectine (XSP30) (Oda et al., 2003). Le gène codant pour la lectine est exprimé dans cellules du parenchyme xylémien et aussi dans celle du péricycle.

Dans la sève xylémienne, on retrouve principalement des acides aminés et des ions, puis dans une moindre mesure des sucres, des protéines et des hormones. Ainsi la sève brute de *Cucurbita maxima* contient les acides aminés glutamine et méthylglycine (en cas de sécheresse) et les ions phosphate, nitrate, sulfate, calcium, magnésium, potassium et bore (Satoh, 2006). On y retrouve aussi comme source principale de sucres : des oligosaccharides et des polysaccharides (Iwai et al., 2003), des protéines et une hormone : la cytokinine (Kuroha et al., 2002).

Les acides aminés sont fortement présents dans la sève brute (Hunt et al., 2010) mais cependant en quantité moindre que dans la sève élaborée (Bi et al., 2007). Okumoto et al. (2002) ont montré l'implication possible de la perméase AAP6 (amino acid permease), transporteur d'acides aminés, présente en grande quantité dans les tissus « puits » mais aussi dans les cellules du parenchyme xylémien d'*A. thaliana*, dans le mécanisme de translocation des acides aminés du xylème vers le phloème.

En ce qui concerne les protéines présentes dans la sève brute, certaines familles sont communes à travers les espèces végétales. Ainsi, les protéines GRP sont présentes dans la sève brute des cucurbitacées (Buhtz et al., 2004) et des brassicacées (Kehr et al., 2005). Elles ont un rôle structural puisqu'elles constituent la paroi végétale avec la cellulose, les hémicelluloses, les pectines et la lignine mais elles peuvent également avoir un rôle dans la défense de la plante ou dans la réponse à différents stress (Mangeon et al., 2010). Les protéines GRP du concombre sont exclusivement synthétisées dans les tissus vasculaires des racines et sont ensuite transportées par le xylème pour se déposer au niveau de la paroi des ces vaisseaux. Elles pourraient plus précisément être impliquées dans les mécanismes de réparation de la paroi cellulaire (Sakuta & Satoh, 2000).

Les enzymes sont aussi très représentées dans la part de protéines présentes dans la sève xylémienne. Les péroxydases (POX) par exemple sont des protéines ubiquitaires présentes dans la sève brute de nombreuses espèces comme celle d'arbres fruitiers (Biles & Abeles, 1991), des brassicacées (Kehr et al., 2005) ou des cucurbitacées (Buhtz et al., 2004). Leur rôle dans le xylème est assez incertain vu la multitude des fonctions connues pour ces protéines (Passardi et al., 2005). Des protéinases ont aussi été détectées dans la sève (Kehr et al., 2005, Buhtz et al., 2004).

Chez les brassicacées et certaines solanacées, on retrouve également des protéines impliquées dans les mécanismes de défense de la plante comme des protéines PR (pathogenesis-related) mais aussi des protéines qui leur sont souvent associées (chitinases, glucanases)(Kehr et al., 2005). Ces différentes protéines de défense ont déjà été détectées dans des études précédentes, par exemple dans la sève de tomate infectée par un champignon (Rep et al., 2002). Des chitinases ont aussi été identifiées chez certaines brassicacées (Buhtz et al., 2004) pouvant agir contre des champignons pathogènes dont la paroi est composée de chitine, même si ceci n'a pas encore pu être démontré.

Une autre famille protéique présente dans la sève brute est la famille des lectines. Ces protéines sont capables de se lier avec une forte affinité à des glycoprotéines, des glycolipides ou des polysaccharides. Bien que leurs rôles demeurent mal définis, les lectines semblent être importantes car on les retrouve dans beaucoup d'organes et tissus différents (Chrispeels & Raikhel, 1991).

La sève brute peut contenir certains pathogènes, le xylème étant une des voies d'accès aux différentes parties de la plante (Yadeta & BP, 2013). On peut y retrouver des bactéries du genre *Xylella* (Simpson et al., 2000) ou *Ralstonia* (Salanoubat et al., 2002) par exemple. Elles pénètrent dans la plante de manière passive par l'intermédiaire de blessures ou bien d'insectes-vecteurs (Nadarasah & Stavrinides, 2011), traversent le cortex racinaire et les cellules du parenchyme xylémien après multiplication et rentrent dans les vaisseaux du xylème pour envahir le reste de la plante. Ces infections entraînent souvent la dégradation du xylème.

Certains champignons sont également capables d'utiliser le xylème pour se déplacer dans leur hôte, comme des champignons du genre *Verticillium* ou bien *Fusarium* (Klosterman et al., 2011, Ma et al., 2010). Ils pénètrent dans leur hôte par les racines et atteignent les cellules corticales où leur hyphe migre à travers les cellules du parenchyme xylémien pour accéder aux vaisseaux du xylème et envahir la plante (Pietro et al., 2003, Klosterman et al., 2009).

Alors que le mouvement des phytovirus dans le phloème est avéré, leur transport dans le xylème est plus controversé. Plusieurs virus ou genres viraux ont été localisés dans les éléments conducteurs du xylème mais pour autant le mouvement systémique en tant que tel n'a pas encore été observé. Ainsi des virus comme le *Soilborne wheat mosaic virus* (SBWMV) (Verchot et al., 2001) ou le *Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV) (Kaufmann et al., 1992) pénétrant dans leur hôte par les racines ont été localisés dans le xylème mais aussi dans le phloème. C'est aussi le cas pour les virus du genre Tobamovirus comme le *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) qui s'accumule dans les trachéides des jeunes feuilles (Moreno et al., 2004).

#### 2. Transport et mouvement au sein du phloème

La sève phloémienne est une sève riche en eau, sucres, acides aminés, sels minéraux et divers éléments (protéines, ARN, lipides, hormones). Elle est essentielle à la croissance et au développement des végétaux. Son pH est légèrement alcalin (entre 7,3 et 8,5) (Marschner et al., 1996). Mais elle peut aussi véhiculer des pathogènes qui utilisent cette voie pour se répandre dans tout leur hôte.

#### a. <u>Sucres</u>

Les molécules les plus présentes dans la sève élaborée sont les sucres. Ceci parait logique lorsque l'on sait qu'un des rôles principaux du phloème est d'assurer leur transport des tissus « source » vers les tissus « puits ». Les tissus sources sont des tissus matures produisant plus de photoassimilats que nécessaire pour couvrir leurs besoins et donc qui exportent ce surplus de production vers des tissus immatures ou certains organes (jeunes feuilles, racines, fruits...). Ce sont des tissus puits, consommateurs et importateurs d'assimilats. Des tissus puits peuvent, après maturation, devenir à leur tour des organes sources. La nature des sucres présents dépend de la plante considérée. Trois types de sucres sont capables d'entrer dans le phloème : le saccharose, les sucres de la famille du raffinose (raffinose, stachyose, verbascose...) et les polyols (mannitol, sorbitol...). Les plantes transportent toutes le saccharose mais il n'est pas majoritaire dans toutes les espèces (Lalonde et al., 2004). Il existe trois mécanismes de prise en charge du saccharose dans le phloème. Le mécanisme le plus commun utilise la voie apoplastique. Après être entré dans l'apoplaste, le saccharose est transporté activement dans les petites veines par des cotransporteurs à protons spécifiques (Lalonde et al., 2004). D'autres espèces comme les Salicacées empruntent la voie symplastique. Le saccharose pénètre passivement dans les tubes criblés grâce aux nombreux plasmodesmes présents dans les cellules vasculaires (Turgeon & Medville, 1998). Dans le troisième mécanisme, utilisé par les cucurbitacées, le saccharose provenant des cellules du mésophylle est converti en raffinose et stachyose (respectivement un tri- et un tetraholoside) dans des CC spécifiques appelées cellules intermédiaires avant d'être transporté dans les tubes criblés (McCaskill & Turgeon, 2007). Cette conversion permet d'une part de garder une concentration en saccharose assez basse mais aussi d'augmenter la taille de la molécule afin d'éviter un retour vers le mésophylle.

#### b. Acides aminés

Les amino-acides représentent la principale source d'azote dans la sève phloémienne (Riens et al., 1991, Hunt et al., 2010) et constituent après les sucres, le deuxième composé présent (Rentsch et al., 1998). Le chargement des acides aminés et du saccharose dans le phloème sont étroitement liés (Schobert et Komor, 1989). Jusqu'à présent, deux super-familles de transporteurs à acides aminés ont été identifiées : les transporteurs APC (amino acid, polyamine and choline) et les transporteurs ATF (amino acid transporter)(Fischer et al., 1995, Tegeder M., 2012). Ces derniers comprennent notamment les perméases AAP (amino acid permeases) qui ont été associées pour certaines au transport des acides aminés au niveau des complexes TC-CC (Kwart et al., 1993, Okumoto et al., 2002).

#### c. Sels minéraux

Le troisième élément le plus représenté dans la sève élaborée est l'ion potassium K<sup>+</sup> qui joue un rôle important dans le transport des photoassimilats (Gould et al., 2004). D'après Deeken et al. (2002), les transporteurs à potassium AKT2/3 pourraient favoriser le transport du saccharose en régulant le potentiel osmotique dans les cellules phloémiennes. Chez *A. thaliana*, les ions sulfure et phosphore sont présents à des concentrations significatives (Deeken et al., 2002) et pourraient intervenir dans le maintien et le contrôle du pH de la sève. Enfin, on retrouve l'ion calcium qui a un rôle important dans la physiologie et les voies de signalisation (Furch et al., 2007).

#### d. Protéines

Un grand nombre de protéomes de sève élaborée de plantes saines mais aussi en conditions de stress (sécheresse, infections) ont été réalisés sur plusieurs espèces différentes (Balachandran et al., 1997, Lin et al., 2009, Giavalisco et al., 2006, Malter & Wolf, 2011, Walz et al., 2004, Ishiwatari et al., 1995). Les cucurbitacées figurent parmi les plus étudiées dans ce domaine car la sève est assez facilement disponible en grande quantité. Des centaines de protéines ont été identifiées dans ces études et de manière générale, ces protéines restent conservées entre les espèces (Lin et al., 2009, Batailler et al., 2012). La sève élaborée contient principalement des protéines impliquées dans les mécanismes de stress (composés anti-oxydants, myrosinases, lectines) et de défense (protéines PR, inhibiteurs de protéases). C'est le cas par exemple de certaines cucurbitacées et brassicacées (Giavalisco et al., 2006, Walz et al., 2004, Batailler et al., 2012). Ont également été détectées, des enzymes impliquées dans les voies métaboliques (glycolyse, dégradation des carbohydrates, métabolisme des acides aminés...) et dans le contrôle du potentiel redox. Enfin, on retrouve des protéines impliquées dans les voies de signalisation ainsi que des protéines structurales (protéines de la paroi, protéines-P, protéines du cytosquelette)(Dinant, 2008).

Plus précisément chez les brassicacées, Giavalisco et al. (2006) ont identifié 140 protéines dans la sève de *Brassica napus* (colza). Elles sont impliquées dans le transport de protéines dans les tubes criblés : protéines chaperonnes (cyclophilines) ou des ATPases, dans la régulation du potentiel d'oxydo-réduction (glutaredoxine ou thioredoxine), dans la réponse aux stress (protéines se liant aux myrosinases, lectines), dans le métabolisme, dans le développement. L'actine et des protéines qui lui sont associées comme des profilines ou des facteurs de dépolymérisation de l'actine et des protéines liant l'ARN ont également été identifiées. Dans la sève d'*A. thaliana*, Batailler et al. (2012) ont identifié 287 protéines : majoritairement des enzymes impliquées dans la synthèse d'acides aminés ou de précurseurs métaboliques, des protéines de défense comme les protéines PR et les lectines, des protéines impliquées dans le processus de stress oxydatif ainsi que des protéines liant l'ARN.

Les protéines présentes dans les tubes criblés ne sont pas forcement les mêmes que celles retrouvées dans les CC qui les nourrissent. En effet, toutes les protéines synthétisées dans les CC ne sont pas exportées vers les tubes criblés (Fukuda et al., 2005) et inversement, des protéines synthétisées pendant la différentiation des tubes criblés ne sont pas retrouvées dans les CC (la Cour Petersen et al., 2005).

La présence dans la sève élaborée de protéines intervenant dans les mécanismes de défense suggère que le phloème aurait un rôle important dans les réponses de la plante aux différents stress biotiques ou abiotiques. Certaines observations pourraient également indiquer que ces vaisseaux conducteurs ne serviraient pas uniquement à transporter des signaux mais qu'ils pourraient aussi être à leur origine.

#### e. <u>ARN</u>

L'absence d'activité RNase dans la sève du phloème est propice au transport des ARN par cette voie dans la plante (Sasaki et al., 1998, Doering-Saad et al., 2002). Ainsi, différentes espèces d'ARN sont retrouvées dans la sève phloémienne (Kehr & Buhtz, 2008, Dinant et al., 2010): des ARN messagers cellulaires (ARNm), des petits ARN comme les siARN (impliqués dans le mécanisme de « RNA silencing ») ou les micro-ARN (miARN), des ARN ribosomiques (ARNr), des ARN de transfert (ARNt) mais aussi des ARN viraux.

– Plusieurs centaines d'ARNm cellulaires ont été identifiés dans différentes espèces comme le riz (*Oryza sativa*; (Sasaki et al., 1998), le ricin (*Ricinus communis*; (Doering-Saad et al., 2002), le colza (Giavalisco et al., 2006), le potiron (*Cucurbita maxima*; (Ruiz-Medrano et al., 1999) le melon (*Cucumis melo*; (Omid et al., 2007) ou le maïs (*Zea mays*; (Nakazono et al., 2003). Ces messagers présents dans la sève ne sont pas forcément identiques à ceux présents dans les cellules compagnes comme l'ont montré (Deeken et al., 2008) chez *A. thaliana*, ce qui implique l'existence d'une

certaine sélection des messagers pour le passage dans les tubes criblés. L'entrée des transcrits dans le phloème ne se ferait donc pas par simple diffusion mais serait le fait d'un processus actif de sélection (Haywood et al., 2005).

Les ARNm peuvent agir comme signaux entre les différents organes de la plante. Ceci a été montré lors d'expériences d'hétérogreffe de plants de *C. maxima* où des ARNm codant pour un facteur de transcription CmNACP (NAC domain protein) se sont avérés capables d'atteindre la zone greffée et d'avoir une action spécifique sur le tissu-cible (Ruiz-Medrano et al., 1999). Ceci a aussi été démontré par exemple dans des plants de pomme de terre (Banerjee et al., 2006) et de tomate (Kim et al., 2001). Mais Omid et al. (2007) ont montré qu'une grande majorité de transcrits est incapable de se mouvoir de manière systémique dans le melon (seuls 6 transcrits sur 43 possèdent cette propriété).

- De nombreux petits ARN sont également présents dans la sève élaborée. Cela concerne aussi bien les petits ARN impliqués dans le processus cellulaire de « RNA silencing » que des ARN de transfert ou des ARN ribosomaux, entiers ou partiels. S'il est logique de détecter des siARN en grande quantité dans la sève car ils agissent comme signaux systémiques permettant l'amplification du mécanisme de « RNA silencing » (Lucas et al., 2001, Himber et al., 2003, Kalantidis et al., 2008), il est plus surprenant d'y trouver des miARN car ils sont considérés comme étant restreints aux cellules qui les produisent (Voinnet, 2005). Ainsi, plus de 1000 siARN et 4 miARN (miR156, miR159, mir167 et miR171) ont été identifiés dans la sève du potiron (Yoo et al., 2004). De nombreux petits ARN de 20 à 25 nucléotides ont été détectés dans la sève de colza, dont majoritairement des ARN de 21 et 24 nucléotides et 32 miARN annotés de plante ont été identifiés (Buhtz et al., 2008). Ces miARN ne sont pas seulement présents sous leur forme mature, leur brin complémentaire lui-aussi a aussi été détecté.

– En analysant des petits ARN de 30 à 90 nt présents dans la sève de potiron, Zhang et al. (2009) ont identifié un grand nombre de fragments d'ARN non codant comme des ARN ribosomaux, des ARN de transfert et des ARN du spliceosome. Certains fragments d'ARNt spécifiques de la sève élaborée semblent interférer avec l'activité ribosomale, indiquant ainsi que des ARNt pourraient servir de signal à longue distance dans la plante.

 Des ARN viraux génomiques, des fragments d'ARN viraux ou des viroïdes peuvent également être véhiculés par la sève élaborée. Ceci fera l'objet d'une section spécifique dans la Partie 1:II.2.g.

#### f. Autres molécules

Dans la sève élaborée d'*A. thaliana*, ont été également détectés d'autres types de molécules (Turgeon & Wolf, 2009, Dinant, 2008) comme des lipides retrouvés sous la forme d'acides gras ou d'oxylipines (Guelette et al., 2012). Leur rôle demeure inconnu pour beaucoup, certains sont considérés comme signaux de communication (Benning et al., 2012). On retrouve également des hormones (auxine, cytokinine, acide abscissique, gibbérelline, éthylène) qui agissent dans le développement de la plante (Hoad, 1995), des métabolites secondaires comme les glucosinolates (Halkier & Gershenzon, 2006, Chen et al., 2001), les glycosides phénoliques (Gould et al., 2007) ou les cardénolides (Botha et al., 1977). Cette sève sert aussi de transport de molécules-signal comme l'acide salicylique ou l'acide jasmonique lors de stress biotiques ou abiotique (Zhang & I.T., 1997, Rocher et al., 2006, Shah, 2009).

- g. Virus, viroïdes et autres pathogènes
  - <u>Virus</u>

Afin de permettre à l'infection de se développer dans la plante, les virus doivent pouvoir atteindre des zones éloignées du point d'inoculation et donc se déplacer tout au long de celle-ci. On observe alors deux types de mouvement, le mouvement à courte distance qui permet aux virus de passer de cellule en cellule via les plasmodesmes et le mouvement à longue distance ou mouvement systémique lors duquel les virus utilisent la sève élaborée et les vaisseaux conducteurs de leur hôte pour parcourir de plus grandes distances et envahir la plante entière (Waigmann et al., 2004).

Le sens de déplacement des virus est toujours celui des carbohydrates circulant dans la plante, c'est-à-dire des tissus matures « source » vers les tissus
jeunes « puits » (Turgeon, 1989). Très peu d'études ont été menées pour identifier l'entrée (chargement) ou la sortie (déchargement) des TC. Ces deux étapes du mouvement viral dépendent de l'association virus-hôte (Vuorinen et al., 2011). En effet, l'entrée des *Potyvirus* se fait au niveau des petites veines des feuilles inoculées (Ding et al., 1998) alors que celle du TMV a lieu au niveau de toutes les veines des feuilles « source » (Cheng et al., 2000). Le déchargement a lieu dans les deux cas à partir des veines moyennes de classe III (la classe I étant la veine principale et la classe V comprenant les veines les plus petites) des feuilles « puits » (Ding et al., 1998). Une infection virale met donc moins de temps à se propager dans la plante quand celle-ci est initiée au niveau d'une feuille « source ».

Même si le mouvement systémique viral est couplé au mouvement de cellule à cellule, celui-ci implique des mécanismes bien différents. Ainsi, il existe des virus mutants capables de se multiplier et de former des lésions locales par un mouvement entre cellules mais incapables d'infecter les feuilles systémiques. C'est par exemple le cas du Brome mosaic virus (BMV) dont le domaine C-terminal de sa protéine de mouvement (42 derniers acides aminées) n'est pas indispensable pour le mouvement cellule à cellule mais est requis dans le mouvement viral à longue distance (Takeda et al., 2004) ; c'est aussi le cas pour la protéine NSm (Non structural protein) du Tomato spotted wilt virus (TSWV) pour un domaine de seulement quatre acides aminés (Li et al., 2009a). D'ailleurs pour la plupart des virus, les MP impliquées dans le mouvement cellule à cellule ne jouent pas de rôle direct dans le mouvement systémique. Ainsi, les Tobamovirus sont capables de procéder à une infection systémique même en absence de leur MP (Crawford & Zambryski, 2001), une autre protéine virale pourrait alors pallier à cette absence.

La forme sous laquelle les virus transitent dans le système vasculaire reste souvent assez mal connue car celle-ci peut varier selon l'hôte mais aussi dans un même hôte. La majorité des virus circulent sous forme encapsidée. C'est le cas par exemple de deux *Tobamovirus*, le TMV (Dawson et al., 1988, Crawford & Zambryski, 2001) et le *Cucumber green mottle mosaic virus* (CGMMV) (Simon-Buela & Garcia-Arenal, 1999). D'autres ont besoin de leur protéine de capside (CP), indépendamment de sa capacité à former une capside, comme par exemple du *Tobacco etch virus* (TEV) qui, lorsqu'il possède une CP mutée dans ces extrémités N- ou C- terminales, ne peut plus se déplacer à longue distance malgré la formation d'une capside. Enfin, certains virus sont capables de transiter dans la sève sans être protégés par une capside. C'est le cas par exemple des *Umbravirus* (Taliansky et al., 2003). Ils se déplacent sous la forme d'un complexe ribonucléoprotéique (RNP). L'absence de ribonucléases dans la sève permet à l'ARN viral, protégé par le complexe RNP, de se déplacer sans pour autant être enfermé dans une capside. A l'image des ARN messagers qui sont capables de se déplacer à longue distance via les tubes criblés, il est possible que les virus se déplaçant sous cette forme, utilisent les mêmes mécanismes (Kehr & Buhtz, 2008).

### • <u>Viroïdes</u>

Les viroïdes sont des ARN pathogènes, circulaires, simple brin de petite taille (246 à 401 nucléotides) (Diener, 1991). Ils n'ont pas de fonction codante et utilisent les facteurs de l'hôte pour mener à bien l'ensemble de leur cycle infectieux (réplication, transport...).

Comme certains ARN cellulaires ou viraux, ils se déplacent via le phloème pour envahir la plante entière en détournant des facteurs cellulaires. Par exemple, Gomez and Pallas (2004) ont mis en évidence par immunoprécipitation, une interaction *in vivo*, entre la protéine CsPP2 du concombre et le *Hop Stunt viroid*. Cette protéine pourrait assister l'ARN du viroïde lors de son transport dans le phloème.

## • <u>Autres pathogènes</u>

On peut retrouver d'autres pathogènes dans la sève élaborée comme des eubactéries : les phytoplasmes et les spiroplasmes (Garnier et al., 2001, Christensen et al., 2005), qui sont des bactéries dépourvues de paroi cellulaire et dont la vie dans les plantes est restreinte au phloème. Elles possèdent un génome de petite taille et se propagent de plante en plante par des insectes se nourrissant de la sève phloémienne.

# Partie 2: Caractéristiques générales et présentation des virus étudiés

## I. Cycle infectieux des phytovirus à ARN simple brin, de polarité positive

Les phytovirus sont composés de virus dont le génome est porté soit par de l'ADN soit par de l'ARN simple brin de polarité positive ou négative (Astier et al, 2001). Au cours de ma thèse, je n'ai utilisé que des virus à ARN simple brin à polarité positive, c'est pourquoi seuls ceux-ci seront décrits dans cette partie.

Le cycle infectieux des virus à ARN simple brin de polarité positive est plus simple que celui des autres virus car leur ARN est un ARN codant qui peut être directement traduit. Il n'y a donc pas de phase de transcription. Ce cycle commence par l'entrée du virus dans la plante et la décapsidation de l'ARN viral. Cette étape est souvent couplée à la traduction ou à la réplication. Parmi les premières protéines virales traduites figure souvent la réplicase virale qui va s'associer avec des brins d'ARN néo-formés pour composer des complexes ribonucléoprotéique (RNP) afin de se déplacer dans son hôte, que se soit de cellule à cellule ou bien à plus longue distance dans le phloème. Afin d'envahir de nouveaux hôtes, les virus sont souvent dépendants d'un vecteur qui leur permettra d'être extraits d'une première plante pour être introduit dans une autre.

## 1. Entrée du virus dans la cellule et décapsidation

Naturellement, les plantes sont physiquement protégées de la pénétration de virus par la cuticule qui les recouvre mais aussi par la paroi pectocellulosique qui entoure chaque cellule. Les virus utilisent donc des points d'entrée « accidentels » qui permettent de se débarrasser de ces barrières. C'est par le biais de vecteurs que les virus peuvent atteindre le milieu intracellulaire par des blessures, des piqures... Chez les phytovirus on ne sait pas s'il existe un système de reconnaissance comme chez les virus animaux qui permettrait cette entrée dans la cellule et la décapsidation de l'ARN viral mais il existe une ancienne étude sur le TMV qui tendrait à démontrer son existence (Atabekov, 1975).

#### 2. Traduction

Les virus n'apportent avec eux que ce que leurs hôtes ne peuvent leur fournir, c'est-à-dire de quoi détourner la machinerie cellulaire afin de traduire leur génome en protéines nécessaires à leur réplication, leur mouvement et leur transmission. Ce sont donc les ribosomes cellulaires qui traduisent l'ARN viral et plus particulièrement le système 80S. Les ARN cellulaires étant monocistroniques, les ribosomes ne traduisent que le premier cadre de lecture en 5' de l'ARN. Les virus se sont adaptés en développant plusieurs stratégies d'expression de leurs gènes afin d'exprimer un maximum d'informations en un minimum de séquences.

Contrairement aux messagers cellulaires qui ont en général une coiffe à leur extrémité 5' et une queue polyA à leur extrémité 3', les ARN génomiques viraux possèdent fréquemment d'autres structures à l'une ou l'autre des extrémités voire même aux deux. A l'extrémité 5' de l'ARN viral, on peut donc retrouver une coiffe, une protéine virale liée covalemment à l'ARN, la VPg (viral protein genome-linked) ou parfois, une structure spécifique au virus considéré. En 3', on peut retrouver une queue polyA mais aussi une structure ressemblant à un ARNt (ARNt like) ou une structure spécifique au virus considéré. L'initiation de la traduction en présence de la coiffe se déroule comme pour n'importe quel ARN messager cellulaire, la queue polyA permettant la circularisation du messager afin de s'assurer de son intégrité. Quand la coiffe est absente, la traduction s'initie de manière différente. Ainsi les ARN viraux non coiffés peuvent être traduits à partir d'un site interne d'entrée des ribosomes (IRES) qui permet de positionner la sous-unité 40S au niveau du messager ou directement à son extrémité 5' sans la présence d'une IRES défini. La protéine VPg ne serait, quant à elle, pas nécessaire à la traduction du virus mais à sa réplication. Certains virus comme le Barley yellow dwarf virus (BYDV) ne possèdent ni coiffe ni protéine VPg ni queue polyA mais ils présentent dans leur extrémité 3' une courte séquence appelée TE (translational enhancer) qui stimule fortement l'efficacité de la traduction. Elle permettrait l'initiation de la traduction en participant à la fixation du complexe de traduction (Wang et al., 1999). L'absence de coiffe confère aux virus plusieurs avantages dont celui de s'affranchir de certains facteurs d'initiation de la traduction qui pourraient se trouver en quantité limitante (eIF4E et eIF4G) (Leonard et al., 2000).

Les différentes stratégies d'expression utilisées par les virus à ARN de polarité positive pour synthétiser les protéines virales sont schématisées dans la Figure 4 et développées par la suite.



## a. Maturation d'une polyprotéine

L'ORF code pour une polyprotéine qui va subir un ou plusieurs clivage(s) protéasique(s), en *cis* ou en *trans* afin de libérer plusieurs produits de maturation (Figure 4A).

#### b. Traduction à partir d'un ARN subgénomique (ARNsg)

Les ARN subgénomiques sont synthétisés à partir du brin (-) complémentaire à l'ARN génomique, l'ARNc (Figure 4B). Celui-ci possède plusieurs promoteurs assurant la transcription. Le premier est situé à son extrémité 3' et permet la synthèse, par l'ARN polymérase ARN dépendante, d'un nouveau brin (+) entier et donc la réplication du virus. Le second, le promoteur interne se trouve en amont de l'extrémité 5' et permet la synthèse d'ARN (+) plus courts, colinéaires à l'extrémité 3' de l'ARN génomique. Les ORF présents sur ces ARNsg peuvent alors être traduits de manière classique.

### c. <u>« Leaky scanning »</u>

Le mécanisme de leaky scanning a lieu lorsque le premier codon initiateur rencontré par le ribosome se trouve en contexte défavorable à l'initiation de la traduction (Figure 4C). Le ribosome va donc, dans la majorité des cas, continuer sa lecture jusqu'au prochain codon AUG à partir duquel sera traduite la protéine. Selon Cavener and Ray (1991), la séquence consensus optimale chez les Dicotylédones est ANA/C**AUG**GC où N=A, C, G ou U. Le premier ORF n'est alors que très peu traduit.

#### d. Décalage de cadre de lecture ou « frameshift »

Lors de la traduction, les ribosomes sont ralentis par un pseudo-nœud formé par l'ARN viral (Figure 4D). La présence de la séquence XXXYYYZ (X=A, U ou G, Y=A ou U, Z=A, C ou U), en amont de cette structure secondaire provoque un décalage de la phase de lecture d'un nucléotide vers l'extrémité 5' (-1) ou vers l'extrémité 3' (+1). Le produit de ce deuxième ORF n'est synthétisé que sous la forme d'une protéine de fusion avec le produit du premier ORF. D'une manière générale, ce mécanisme n'est pas très fréquent puisque 99% des ribosomes traduisent le premier ORF sans décalage de cadre de lecture.

## e. <u>Translecture ou « Readthrough »</u>

On appelle translecture ou « readthrough » du codon stop, la reconnaissance d'un codon stop par un ARNt suppresseur qui le traduit en codon sens et qui permet

ensuite l'insertion d'un acide aminé (Figure 4E). Le ribosome poursuit sa lecture jusqu'au prochain codon stop. Il en résulte la synthèse d'une protéine de fusion.

La protéine mineure de capside du TuYV est synthétisée de cette manière, sous la forme d'une protéine de fusion P3-5. On l'appelle d'ailleurs la protéine RT (Readthrough).

#### 3. Réplication

Cette étape du cycle viral se déroule au sein de structures spécifiques, toujours associées au système membranaire de l'hôte, qui forment des complexes de réplication. Le type de membrane dépend de chaque genre viral (Salonen et al., 2005, Miller & Krijnse-Locker, 2008). Ainsi la membrane externe des choroplastes est probablement le site de réplication du *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV)(Jakubiec et al., 2004) et de l'*Alfalfa mosaic virus* (AMV)(Ibrahim et al., 2012). Le TMV (Mas & Beachy, 1999) ainsi que les *Potyvirus* (Schaad et al., 1997a) se répliqueraient quant à eux au niveau du réticulum endoplasmique, les *Cucumovirus* au sein d'invaginations du tonoplaste (Huh et al., 2011) et les *Nepovirus* dans une prolifération de vésicules dérivant du réticulum endoplasmique (Ritzenthaler et al., 2002).

Après traduction, les protéines virales nécessaires à la réplication (polymérase, hélicase, méthyl-transférase) vont former un complexe avec des protéines cellulaires et l'extrémité 3' de l'ARN viral. Ces protéines virales et cellulaires forment la réplicase. Tous les virus à ARN de polarité positive codent pour une protéine ayant une activité ARN polymérase ARN dépendante dont la majorité possède une activité hélicase. L'activité polymérase n'a été démontrée biochimiquement que pour quelques virus, c'est donc la présence du motif GDD entouré de résidus hydrophobes, retrouvé dans toutes les polymérases de virus de plantes et d'animaux étudiées (Kamer & Argos, 1984), qui permet d'identifier un domaine protéique avant une probable activité polymérase. Pour l'hélicase, on considère que la présence de 7 régions homologues plus ou moins conservées au niveau du domaine de fixation à l'ARN est la signature d'une activité hélicase. Il semblerait qu'elle soit nécessaire seulement pour la réplication des génomes de plus de 5-6 kb car elle semble absente pour les plus petits génomes (Koonin & Dolja, 1993). Il est plus difficile d'identifier les composants cellulaires car ils sont spécifiques à chaque virus mais on retrouve par exemple des facteurs d'initiation de

la traduction comme eIF1a chez les *Tombusvirus* (Li et al., 2009b) ou eIF3 chez le *Brome mosaic virus* (BMV) (Quadt et al., 1993) et le TMV (Taylor & Carr, 2000). Chez le *Potyvirus Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV), c'est une protéine PABP (poly-A binding protein) qui a été identifiée comme interagissant avec la polymérase virale (Wang et al., 2000) et chez le *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), c'est la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GADPH) qui serait impliquée (Wang & Nagy, 2008).

La réplication se divise en deux étapes : la synthèse d'un brin (-), complémentaire au brin matrice, et la synthèse de nombreux brins (+) à partir de ce brin (-). C'est donc un processus asymétrique. L'initiation de la synthèse du brin (-) se déroule au niveau d'une séquence promotrice située à l'extrémité 3' de l'ARN viral. Cette séquence est, soit une structure en ARNt ou en trèfle (*Tymovirus, Bromovirus, Cucumovirus, Tobamovirus*), soit une queue polyA (*Potyvirus*), soit une séquence spécifique encore inconnue (*Polerovirus*). Pour la synthèse du brin (+), les séquences promotrices se situent à l'extrémité 3' du brin (-).

#### 4. Mouvement de cellule à cellule

Ce type de mouvement fait intervenir des protéines virales spécifiques appelées protéines de mouvement (MP). Elles permettent le passage de cellule en cellule du génome viral ou de particules virales en augmentant le seuil d'exclusion limite (SEL) des plasmodesmes. Les cellules végétales étant entourées d'une paroi pecto-cellulosique, elles ne peuvent communiquer entre elles que par le biais de connexions complexes et dynamiques appelées plamodesmes. Ils assurent une continuité du cytoplasme, de la membrane plasmique et du réticulum endoplasmique entre les cellules, créant un domaine symplasmique. Ces ponts intercellulaires permettent aux cellules de communiquer entre elles en échangeant des nutriments ou des signaux (Roberts & Oparka, 2003, Heinlein & Epel, 2004). Les plasmodesmes ont un diamètre variable selon le type cellulaire, généralement entre 20 et 50 nm. On retrouve au centre du pore une structure tubulaire que l'on nomme desmotubule, correspondant à du réticulum endoplasmique modifié. Deux types de plasmodesmes ont été caractérisés dans la plante : les plasmodesmes simples qui ne présentent qu'un seul pore non ramifié et les plasmodesmes branchés qui ont au minimum deux pores (Roberts & Oparka, 2003). On retrouve les plasmodesmes simples dans les tissus jeunes et immatures de la plante alors que les plasmodesmes branchés, plus complexes, sont présents dans les tissus matures. On peut aussi distinguer, de part leur biogénèse, les plasmodesmes primaires qui sont formés pendant la cytocinèse au niveau de la plaque cellulaire qui va former la nouvelle paroi, des plasmodesmes secondaires qui se forment *de novo*, dans la paroi déjà existante. Ce sont dans ce caslà essentiellement des plasmodesmes branchés qui se forment. D'un point de vue structurel, il est très difficile de différencier les plasmodesmes branchés issus de plasmodesmes primaires de ceux issus de plasmodesmes secondaires (Ehlers & Kollmann, 2001). Une notion importante quand on parle de plasmodesme est celle de seuil d'exclusion limite ou SEL. En effet, il s'agit de la taille limite au delà de laquelle une molécule ne peut plus diffuser passivement à travers les plasmodesmes. Le SEL varie selon l'espèce végétale, le type cellulaire considéré et le stade de développement du tissu (Crawford & Zambryski, 2001).

Les phytovirus synthétisent des MP pour dilater les plasmodesmes et permettre leur passage d'une cellule à la cellule voisine. Les MP sont très variées et ne présentent que très peu d'homologies de séquence. Elles ont néanmoins été classées en superfamilles, parmi lesquelles la superfamille des "MP 30K" qui tire son nom de la MP du *Tobacco mosaic virus* (TMV). Dans cette superfamille, on distingue deux mécanismes de mouvement. Dans le premier cas dont l'exemple-type est le TMV, la MP permet une modification réversible du plasmodesme, afin de permettre le passage d'un complexe ribonucléoprotéique. La MP du TMV possède des domaines de liaison aux acides nucléiques simple brin, non spécifiques de la séquence nucléique, qui lui permettent de fixer l'ARN viral afin d'en réduire considérablement l'encombrement (Citovsky et al., 1992). Elle possède également un domaine de localisation aux plasmodesmes (Boyko et al., 2000) ainsi qu'un domaine induisant l'élargissement de ces structures pour permettre le passage de molécules allant jusqu'à 4,3 nm de diamètre (Waigmann et al., 1994). La MP du TMV est donc nécessaire et suffisante au mouvement viral de cellule à cellule.

Dans le deuxième cas, une stratégie employée par exemple par le *Cowpea mosaic virus* (CPMV), la MP s'assemble en tubules traversant les plasmodesmes et le virus passe sous forme de virions à travers ces tubules pour infecter les cellules voisines (van Lent et al., 1990). Dans ce cas les plasmodesmes sont fortement modifiés. La MP se

divise en plusieurs domaines fonctionnels intervenant dans l'adressage de la protéine à la membrane plasmique et son accumulation formant des structures ponctuées donnant naissance à des tubules qui sont formés dans à travers les plasmodesmes (Pouwels et al., 2003). Le relargage des particules virales dans la cellule voisine nécessiterait le désassemblage du tubule. Il est à noter que dans ce deuxième mécanisme, la protéine de capside formant les virions est indispensable au mouvement viral.

Le mouvement cellule à cellule d'un virus est hôte spécifique, ce qui peut expliquer parfois la résistance de certains hôtes suite à une infection virale, le virus étant incapable de quitter le site de primo-infection.



#### Figure 5 : Trajet du virus dans la plante, d'après (Hipper et al., 2013).

(1) Dans un premier temps, le virus se multiplie dans les cellules des feuilles inoculées et se déplacent dans les cellules avoisinantes. (2) Le virus atteint ensuite les cellules phloémiennes et amorce le mouvement à longue distance en se déplaçant dans la sève élaborée circulant dans les tubes criblés. (3) Une fois, arrivé au niveau des feuilles « puit », le virus sort des cellules du phloème et va envahir de nouvelles feuilles.

#### 5. Mouvement systémique

Cette phase du mouvement viral dans son hôte est beaucoup moins bien renseignée que le mouvement cellule à cellule. Ce qui est connu a été résumé dans une revue par Hipper et al. (2013). Une fois dans les cellules du mésophylle (Figure 5-1), le mouvement systémique se divise en deux étapes successives: le déplacement du virus entre cellules phloémiennes (cellules du parenchyme phloémien, CC, TC) et le transport rapide dans la sève le long des TC (Figure 5-2), puis sortie du virus des TC vers les CC, les cellules du parenchyme phloémien vers les cellules du mésophylle (Figure 5-3).

Il a été déterminé que le SEL des plasmodesmes des tissus vasculaires est plus élevé que celui des cellules du mésophylle (Kim et al., 2005, Stadler et al., 2005). De plus, au sein des cellules du phloème, il y a aussi des différences entre les jonctions reliant les tubes criblés aux CC et les celles reliant les complexes TC/CC avec les autres cellules phloémiennes. Dans leur étude, Stadler et al. (2005) ont utilisé des protéines fusionnées à la protéine GFP de différentes tailles (36 à 67 kDa) afin d'établir le SEL des plasmodesmes entre les cellules phloémiennes. Ils ont mis en évidence que les plasmodesmes entre les TC et les CC sont plus larges que les autres (SEL supérieur à 67 kDa).

Afin de se déplacer dans le phloème, les virus ont développé diverses stratégies en interagissant avec certains facteurs de l'hôte (Harries & Ding, 2011). Mais il arrive aussi que d'autres de ces facteurs empêchent partiellement voire complètement ce mouvement.

#### a. Facteurs cellulaires facilitant le mouvement viral dans le phloème

Les facteurs de l'hôte interagissant de manière positive sur le mouvement viral peuvent avoir une action à différents niveaux. Ils peuvent être nécessaires au chargement ou au déchargement dans le phloème, être impliqués directement dans la formation ou la stabilisation du complexe viral. Ils peuvent également être recrutés par le virus pour se protéger contre les défenses de la plante. L'infection de mutants d'*A. thaliana vsm1* (virus systemic movement), par les *Tobamovirus Turnip vein clearing virus* (TVCV) et TMV, reste bloquée au niveau de l'entrée du virus dans les TC (Lartey et al., 1998) ; ce qui suggère que la protéine VSM1 participe au chargement du

virus dans les TC. Cette inhibition semble être spécifique aux *Tobamovirus* puisqu'elle n'a pas lieu avec le Turnip crinkle virus (TCV), un Carmovirus. Une autre protéine impliquée dans le mouvement systémique des Tobamovirus a été identifiée. Il s'agit de la protéine DSTM1 (Delayed systemic tobamovirus movement 1) qui agirait directement au niveau de la formation de la particule virale ou de sa stabilité (Serrano et al., 2008). Certains facteurs cellulaires facilitent aussi le mouvement systémique des Potyvirus, comme le gène SHA3 qui, quand il est muté, réduit spécifiquement le mouvement systémique du Plum pox virus (PPV)(Pagny et al., 2012). L'action des facteurs cellulaires peut aussi avoir lieu en amont du mouvement dans le phloème lors du mouvement cellule à cellule par exemple. Il est parfois compliqué de découpler ces deux étapes de l'infection virale. C'est le cas avec le *Turnip mosaic virus* (TuMV) dont la protéine VPg interagit avec une protéine riche en cystéine, la protéine PVIP (Potyvirus VPg-interacting protein)(Dunoyer et al., 2004). Cette interaction aiderait au mouvement du virus dans la plante mais on ignore si cette interaction profite au mouvement de cellule à cellule ou au transport systémique.

La fibrillarine, composant majeur du nucléole, joue aussi un rôle important dans le cycle infectieux des *Umbravirus* et plus particulièrement dans le mouvement systémique (Kim et al., 2007, Taliansky et al., 2010). Elle interagit avec la protéine produite par l'ORF3 du *Groundnut rosette virus* (GRV). Ceci est également observé avec un *Polerovirus*, le *Potato leafroll virus* (PLRV)(Kim et al., 2007).

#### b. Facteurs cellulaires inhibant le mouvement viral dans le phloème

Ont été identifiés parmi les gènes de résistance des plantes contre les virus, des facteurs qui limitent ou bloquent le mouvement viral à longue distance. Ainsi pour les *Potyvirus* comme le *Tobacco etch virus* (TEV), le PPV ou le LMV, il existe une famille de gènes, les gènes *RTM* (Restricted TEV movement) codant notamment pour les protéines RTM1, RTM2 et RTM3, capables d'inhiber le mouvement systémique des *Potyvirus* (Cosson et al., 2012, Decroocq et al., 2006, Mahajan et al., 1998, Revers et al., 2003, Whitham et al., 1999). Je reviendrai plus en détail sur cette famille de gènes dans le Chapitre 3 des Résultats.

Plusieurs études ont décrit l'effet inhibiteur de l'acide salicylique sur le mouvement systémique de divers virus. Connue pour induire la réponse de SAR

(Systemic acquired resistance), cette molécule cause également un retard dans le mouvement systémique du *Cucumber mosaic virus* (CMV) (Naylor et al., 1998, Mayers et al., 2005) ainsi qu'une inhibition de ce mouvement chez le *Cauliflower mosaic virus* (CaMV)(Love et al., 2012) et le PPV (Alamillo et al., 2006), sans pour autant altérer la réplication ou le mouvement de cellule à cellule des ces virus.

#### 6. Transmission à un autre hôte

Les phytovirus ont très souvent recours à un vecteur pour assurer leur propagation à de nouveaux hôtes. Cette nécessité est due à l'immobilité des végétaux et à la présence de la paroi quasiment infranchissable protégeant les cellules végétales. Il existe deux types de transmission virale : la transmission verticale et la transmission horizontale. Lors du premier cas, les virus infectent les cellules germinales pour être transmis à la descendance. Ce type de transmission est restreint à une centaine de virus appartenant aux genres des Potyvirus, des Nepovirus ou Comovirus. A l'inverse, la transmission horizontale est assurée par des vecteurs biologiques qui transportent les virus dans le sol ou par voie aérienne et assurent l'introduction du virus dans la plante pendant une phase de leur cycle de multiplication. Dans la majorité des cas, les vecteurs sont des arthropodes comme les pucerons (Myzus persicae, vecteur du TuYV) (Figure 6A), les cochenilles (Pulvinaria floccifera, vecteur du Grapevine leafroll-associated virus ou GLRaV) (Figure 6B) ou des thrips (Frankliella occidentalis, vecteur du Tomato spotted wilt virus ou TSWV) (Figure 6C), mais on trouve également des nématodes (Xiphinema index, vecteur du Grapevine fanleaf virus ou GFLV) (Figure 6D) ou des protozoaires (Polymyxa betae, vecteur du *Beet necrotic yellow vein virus* ou BNYVV) (Figure 6E).

La transmission de virus peut aussi être occasionnée par l'intermédiaire d'une action mécanique engendrée par l'homme, par exemple lorsqu'il utilise des instruments contaminés par des plantes infectées sur des plantes saines. Il est intéressant de noter que ce type de transmission ne concerne pas les *Luteoviridae*, en raison de leur tropisme phloémien spécifique.



Figure 6: Exemples de vecteurs de phytovirus. (A) un puceron Myzus persicae, vecteur du TuYV et du CABYV (Photographie © J. Poorani 2007), (B) des cochenilles Pulvinaria floccifera, vecteur du GLRaV (Photographie R. J. Gill), (C) des nématodes Xiphinema index, vecteur du GFLV (photographie INRA), (D) un thrips, Frankliella occidentalis, vecteur TSWV du (http://www.agralangrowers.co.uk), (E) des protozoaires, Polymyxa betae, vecteur du BNYVV (Central Science Laboratory, York, Grande Bretagne)

## II. Le virus des jaunisses du navet ou *Turnip yellows virus* (TuYV): famille *Luteoviridae*, genre *Polerovirus*

Le *Turnip yellows virus* (TuYV) appartient au genre des *Polerovirus* et à la famille des *Luteoviridae*. Les particules de ces virus sont icosaédriques de symétrie T=3 et mesurent environ 25 nm de diamètre (Figure 7). Cette famille de virus peut infecter une large variété de plantes, économiquement très importantes, comme la pomme de terre, les céréales, la betterave ou les cucurbitacées, tout en provoquant comme son nom l'indique en latin, un jaunissement des feuilles. Les *Luteoviridae* sont obligatoirement transmis de plante à plante par un vecteur : le puceron. Ces virus ont la particularité de se répliquer exclusivement dans les tissus vasculaire de leur hôte, c'est à dire dans les CC, les TC et les cellules du parenchyme phloémien.



**Figure 7**: *Turnip yellows virus*: (A) Particules virales en microscopie électronique (http://www.rothamsted.ac.uk/). (B) Immunoempreinte d'un pétiole *d'A. thaliana* avec un marquage dirigé contre la protéine mineure de capside (coloration violette) qui met en évidence la localisation du virus au niveau des faisceaux vasculaires. (C) Vecteur transmettant le virus d'une plante à l'autre, le puceron *Myzus persicae* (http://ephytia.inra.fr, ©S. Chamont, INRA).

Les *Luteoviridae* se divisent en trois genres qui diffèrent les uns des autres notamment par leur organisation génomique (Tableau 1) : les *Luteovirus* dont le membre-type est le *Barley yellow dwarf virus-PAV* (BYDV-PAV), les *Polerovirus* représentés par le *Potato leafroll virus* (PLRV) et les *Enamovirus* dont le seul membre connu à l'heure actuelle est le *Pea enation mosaic virus-1* (PEMV-1). Selon le comité international de taxonomie des virus (ICTV, www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp), 17 *Polerovirus* ont été référencés.

Le TuYV que nous étudions au laboratoire est l'isolat FL1 issu de la laitue, qui était connu auparavant comme étant un isolat du *Beet western yellows virus* (BWYV). Il a été renommé en raison de différences importantes au niveau de la séquence nucléotidique avec les autres isolats de BWYV et surtout à cause de la difficulté à infecter la betterave. J'ai aussi utilisé un autre *Polerovirus* pour quelques expériences, le *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) qui est un virus très proche du TuYV.

Famille	Genre	Espèce	
Luteoviridae	Enamovirus	Pea enation mosaic virus-1	PEMV-1
	Luteovirus	Barley yellow dwarf virus-PAV	BYDV-PAV
	Polerovirus	Beet mild yellowing virus	BMYV
		Beet western yellows virus	BWYV
		Cereal yellow dwarf virus-RPS	CYDV-RPS
		Cereal yellow dwarf virus-RPV	CYDV-RPV
		Cucurbit aphid-borne yellows virus	CABYV
		Potato leafroll virus	PLRV
		Turnip yellows virus	
		Sugarcane yellow leaf virus	SCYLV
		Cotton leafroll dwarf virus	CLRDV

**Tableau 1 : Taxonomie des Luteoviridae.** La famille des Luteoviridae se divise en trois genres les *Enamovirus*, les *Luteovirus* et les *Polerovirus* représentés par leur membre-type (**en gras**). Les principaux *Polerovirus* sont mentionnés ici.

Il est à noter que certains *Luteoviridae* ne sont assignés à aucun genre. Source : http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy

## 1. Gamme d'hôtes et symptômes

La plupart des *Polerovirus* ont une gamme d'hôte très limitée (Tableau 2). C'est le cas par exemple du PLRV, qui infecte exclusivement les solanacées ou bien le CABYV qui se limite aux plantes de la famille des cucurbitacées. Ce n'est pas le cas de notre virus-modèle, le TuYV, qui est capable d'infecter une grande variété d'espèces végétales (plus de 150 espèces réparties sur 23 familles), dont beaucoup d'espèces qui ont une réelle importance agronomique.

Comme cela a été dit précédemment, les principaux symptômes causés par les *Polerovirus* sont un jaunissement des feuilles. Mais on peut aussi observer, pour certaines espèces de plantes, un rougissement des feuilles, un enroulement ou un retard de croissance. Ces symptômes n'étant pas spécifiques d'une infection virale, des analyses plus poussées sont indispensables afin d'imputer ces maladies aux *Polerovirus*. Il est intéressant de noter que des virus proches des *Polerovirus*, et encore non classés, sont découverts, identifiés et séquencés régulièrement (Zhou et al., 2012, Xiang et al., 2011).

Genre	Espèce		Hôtes
Polerovirus	Beet chlorosis virus	BChV	Chenopodiaceae
	Beet mild yellowing virus	BMYV	Brassicaceae, Chenopodiaceae, Asteraceae
	Beet western yellows virus	BWYV	Chenopodiaceae, Asteraceae, Cucurbitaceae, Solanaceae, Fabaceae, Brassicaceae
	Carrot red leaf virus	CtRLV	Apiaceae
	Cucurbit aphid-borne yellows virus	CABYV	Cucurbitaceae
	Potato leafroll virus	PLRV	Solanaceae
	Sugarcane yellow leaf virus	SCYLV	Poaceae
	Turnip yellows virus	TuYV	Asteraceae, Cucurbitaceae, Solanaceae, Fabaceae, Brassicaceae

Tableau 2 : Gammes d'hôtes de certains Polerovirus. Cette liste n'est pas exaustive.

## 2. Cycle viral des Polerovirus

Le cycle viral des *Polerovirus* commence à l'entrée des virus dans leur hôte, c'est-à dire quand ceux-ci sont relargués par leur vecteur, le puceron, lors de sa prise alimentaire et ce, directement dans les TC de la plante. Ils vont ensuite pénétrer dans les cellules phloémiennes où ils pourront initier leur cycle infectieux en synthétisant les protéines nécessaires à l'initiation de certaines défenses antivirales de la plante ainsi qu'à la réplication de leur génome. La production de nouvelles particules virales sera nécessaire pour envahir la plante entière par le système vasculaire. Une fois l'infection systémique installée, le virus pourra être acquis par un nouveau puceron avirulifère en se nourrissant de sève infectée et ainsi propager la maladie.

## a. Inoculation naturelle et transmission par pucerons

Les deux *Polerovirus* étudiés au laboratoire, le TuYV et le CABYV, sont transmis par la même espèce de puceron très polyphage, *Myzus persicae ou* puceron vert du pêcher. Mais le CABYV est également couramment transmis par une autre espèce de puceron, *Aphis gossypii*. Les pucerons appartiennent à l'ordre des Hémiptères et sont des insectes piqueurs-suceurs qui se nourrissent de la sève des plantes en introduisant leur stylet entre les cellules jusqu'à arriver aux TC dans lesquels circule la sève élaborée. La transmission des *Polerovirus* par le puceron se déroule sous le mode dit circulant, non propagatif. Ceci signifie que le virus transite par le vecteur sans s'y multiplier. Le virus est acquis par le puceron lorsque celui-ci se nourrit de la sève élaborée d'une plante (Figure 8), il est ainsi ingéré par le puceron en même temps que la sève.



Figure 8: Cheminement des particules virales des Luteoviridae dans le puceron (d'après Brault et al. (2007). Les virions sont ingérés par le canal alimentaire (ca) avant d'arriver dans l'intestin moyen (im) ou l'intestin iusau'à postérieur (ip). Ils traversent ensuite la paroi intestinale pour atteindre l'hémocèle (h) avant de pénétrer dans les glandes salivaires accessoires (gsa) pour être relargués avec la salive dans l'hôte lors d'une nouvelle prise alimentaire. (ep : épiderme, p : phloème)

Il transite par le canal alimentaire (ca) au niveau du stylet de l'insecte, puis dans l'estomac jusqu'à l'intestin moyen (im) pour le TuYV, voire jusqu'à l'intestin postérieur (ip) pour certains *Luteoviridae* comme le CYDV. Le CABYV est capable de traverser la paroi intestinale aux deux niveaux de l'intestin (im) et (ip). Les virions traversent l'épithélium intestinal par un processus d'endocytose/exocytose, probablement par l'intermédiaire de vésicules à clathrine, puis la lame basale (Brault et al., 2007). Une fois dans la cavité générale, l'hémocèle (h), ils atteignent la tête du puceron pour pénétrer les glandes salivaires accessoires (gsa) par un nouveau mécanisme d'endocytose/exocytose. Les virions sont alors excrétés dans le phloème d'une plante-hôte, en même temps que la salive de l'insecte lors d'une nouvelle prise alimentaire. Ce passage du virus dans le puceron dure au minimum 24 heures.

La spécificité du vecteur pour un ou plusieurs virus implique la présence d'interactions spécifiques entre les deux protagonistes.

La première sélection qui va déterminer la reconnaissance virus-vecteur se déroule au niveau de l'intestin. Même si le processus de transcytose semble similaire pour tous les *Polerovirus*, le fait que ces différents virus ne soient pas internalisés au même endroit de l'intestin suggère la présence de récepteurs permettant des interactions spécifiques. De plus, il semble que la protéine mineure de capside, la protéine RT, jouerait un rôle important dans la transcytose au niveau de l'intestin en augmentant l'efficacité de passage de virions à ce niveau, mais sa présence n'est pas strictement indispensable (Brault et al., 2007).

Lors de leur passage dans l'hémocèle, les virions interagissent avec la symbionine, une protéine qui est synthétisée par une bactérie endo-symbiotique du genre Buchnera. Cette interaction non spécifique à un *Polerovirus* donné (van den Heuvel et al., 1997) pourrait protéger les virions contre le système immunitaire de l'insecte et permettre aux virions d'accéder aux glandes salivaires accessoires. Pour atteindre la lumière des glandes salivaires accessoires, les virions doivent à nouveau traverser par transcytose la barrière cellulaire composée de la lame basale et de cellules des glandes salivaires accessoires. La spécificité virus-vecteur est là encore déterminante : seuls certains *Polerovirus* sont capables, selon la combinaison virus/vecteur, de franchir cette barrière. Après avoir franchi cette dernière étape dans le puceron, les virions sont relargués avec la salive dans le phloème d'une nouvelle plante où ils pourront se répliquer à condition que celle-ci soit hôte.

Seddas et al. (2004) ont identifié trois protéines de *Myzus persicae* capables d'interagir avec les protéines de capside du TuYV et qui pourraient donc avoir un rôle dans les processus de transcytose. Il s'agit des protéines Rack-1 (receptor for activated kinase 1), GADPH3 (glyceraldehyde-3-phosphate deshydrogenase), qui joueraient un rôle plus précisément dans la régulation de l'endocytose, et l'actine, qui

interviendrait plutôt au niveau de l'entrée des virions dans les vésicules à clathrine. Plus récemment, Yang et al. (2008) ont identifié à partir d'une étude protéomique différentielle, quatre protéines isolées de puceron *S. graminum* appartenant à un génotype vecteur. Ces protéines co-immunoprécipitent avec le virus CYDV-RPV (Tamborindeguy et al., 2013).

## b. Organisation génomique des Polerovirus et expression des gènes

## • Organisation génomique

Les *Polerovirus* sont des virus à ARN simple brin de polarité positive. La taille de leur génome est inférieure à 6 kb. Ils possèdent à leur extrémité 5', une petite protéine appelée VPg qui serait produite par clivage de la protéine P1.

Le génome du TuYV présente 6 ORF, les ORF 0 à 5. Les ORF0, ORF1, OFR2 sont exprimés à partir de l'extrémité 5' de l'ARN viral et les ORF3, ORF4, ORF5 présents en 3' du génome, à partir d'un ARN subgénomique. Chez les *Luteoviridae*, seuls les *Polerovirus* et les *Enamovirus* possèdent un ORF supplémentaire en 5' de leur génome, l'ORF0. Le génome du TuYV est détaillé dans la Figure ci-dessous.



## • Mécanisme de traduction des protéines du TuYV

L'utilisation de différentes stratégies d'expression des protéines permet aux *Polerovirus* de compacter leur génome afin de porter un maximum d'informations en un minimum de séquences, pour pouvoir être contenu dans la capside.

L'ORFO qui code pour la protéine PO (29 kDa) recouvre en partie l'ORF1. Il est exprimé à partir du premier codon AUG présent sur le génome du TuYV. Ce codon présentant un contexte défavorable pour l'initiation de la traduction (UUG**AUG**CA), l'initiation sera privilégiée au niveau du second codon AUG, celui de l'ORF1, qui est en contexte légèrement plus favorable (<u>AUA</u>AUGUA) grâce à la présence de deux adénines en amont de ce codon.

L'ORF1 est exprimé, par le processus de leaky scanning, en une polyprotéine P1 de 70 kDa. Cette polyprotéine possède plusieurs domaines fonctionnels (Figure 10), dont un motif « chymotrypsin-like serine proteinase » qui permettrait de cliver la protéine P1 en *trans* comme cela a été démontré pour le PLRV (Li et al., 2000). Ce clivage libère un fragment de 25 kDa qui porte à son extrémité N-terminale la protéine VPg. Elle porte aussi un domaine basique de liaison à l'ARN dans son extrémité C-terminale qui pourrait être impliqué dans la maturation de la protéine VPg comme pour le PLRV, hypothèse énoncée par Prüfer et al. (1999). Le processus qui permet la libération de la protéine VPg reste encore inconnu mais il pourrait s'agir de la même activité protéasique que pour le clivage de son extrémité Nterminale. La protéine P1 possède aussi à son extrémité N-terminale un domaine hydrophobe, caractéristique d'une liaison aux membranes.



Figure 10: Différents domaines fonctionnels potentiels composant la protéine P1 du TuYV: un domaine hydrophobe à l'extrémité N-Terminale, un domaine protéasique au milieu de la protéine qui permettrait le clivage de l'extémité C-Terminale comprenant la VPg et un domaine basique de liaison à l'ARN.

L'ORF2 est exprimé par un mécanisme de décalage de la phase de lecture (-1), lors de la traduction de l'ORF1. Pour le TuYV, la séquence de l'heptanucléotide facilitant le glissement du ribosome d'un nucléotide vers l'extrémité 5' est GGGAAAC et est suivi d'un pseudo-nœud (Miller et al., 1995). La protéine produite est une protéine de 119 kDa, la protéine P1-2.

L'ORF3 code pour la protéine majeure de capside ou CP (22 kDa). Il est exprimé à partir d'un ARN subgénomique comme les autres ORF de la partie 3' du génome du TuYV, l'ORF4 et l'ORF5. Comme pour l'ORF0, le codon initiateur de l'ORF3 (UU<u>A</u>AUGAA) est placé en condition défavorable à l'initiation de la traduction par rapport au second codon AUG, codon initiateur de l'ORF4 (UC<u>A</u>AUG<u>G</u>A), qui présente une guanine après le codon AUG améliorant son contexte.

L'ORF4 est exprimé comme l'ORF1, par le mécanisme de leaky scanning (Dinesh-Kumar & Miller, 1993). L'ORF3 du TuYV recouvre entièrement l'ORF4, ce qui n'est pas le cas pour le CABYV. La protéine P4, codée par cet ORF, est une petite protéine de 17kDa qui possède une extrémité N-terminale chargée négativement formant trois hélices  $\alpha$  et un domaine C-terminal chargé positivement et replié en feuillets  $\beta$  (Mayo & Ziegler-Graff, 1996).

L'ORF5 est exprimé selon un mécanisme de translecture ou « readthrough » du codon ambre de l'ORF3. Brown et al. (1996) ainsi que Bruyère et al. (1997) ont démontré la nécessité pour ce mécanisme de la présence d'une séquence spécifique de l'ARN viral d'environ 700 pb située en aval du codon-stop. La traduction peut ainsi se poursuivre et il en résulte une protéine de fusion P3-5 appelée protéine RT (readthrough) de 74 kDa. Le produit de l'ORF5 n'est retrouvé *in planta* que sous cette forme fusionnée à la protéine CP.

Voici résumé dans le Tableau 3 ci-dessous, les protéines exprimées par le génome des *Polerovirus* ainsi de leur(s) rôle(s) possible(s) ou démontré(s). Leurs différents modes d'action sont détaillés dans chaque étape du cycle infectieux dans laquelle ils prennent part.

Protéines	Taille (kDa)	Fonction(s)	Références	
		Facteur de pathogénicité (PLRV)	(Ziegler-Graff et al., 1996, van der Wilk et al.,	
PO	29	Suppresseur de « RNA silencing »	1997, Pfeffer et al., 2002, Pazhouhandeh et	
		Amplification de l'infection (TuYV et CABYV)	al., 2006)	
P1 70		Protéase « chymotrypsin-like serine (PLRV)	(Prüfer et al. 1999 Li et al. 2000)	
F I	70	VPg: réplication?		
P1-2 119		ARN polymérase ARN dépendant caractérisé	(Veidt et al., 1992)	
112	115	par un motif GDD	(,,	
СР	22	Formation de la capside (protéine majeure)	(Reutenauer et al., 1993)	
			(Tacke et al., 1991, Tacke et al., 1993,	
Р4	17	Protéine de mouvement hôte-spécifique?	Ziegler-Graff et al., 1996, Schmitz et al.,	
			1997, Sokolova et al., 1997, Hofius et al., 2001, Lee et al., 2002, Vogel et al., 2007)	
	74	Formation de la capside (protéine mineure)		
RT		Transport à longue distance	(Bruyère et al., 1997, Brault et al., 2000,	
		Transmission par puceron	Brault et al., 2005, Peter et al., 2008)	

Tableau 3 : Fonctions connues ou	a supposées des différentes	s protéines produites pa	r le génome du TuYV.
----------------------------------	-----------------------------	--------------------------	----------------------

## c. <u>Réplication</u>

Peu de choses sont connues sur la réplication du TuYV. Néanmoins en faisant l'analogie avec les *Potyvirus*, on émet des hypothèses sur certaines protéines pouvant y prendre part. Ainsi, la protéine VPg pourrait participer à la réplication virale pendant ou après sa maturation ; elle se lierait de manière covalente à l'extrémité 5' de l'ARN viral afin de permettre sa réplication. Les protéines P1 et P1-2 sont indispensables à la réplication de l'ARN viral (Reutenauer et al., 1993) pourtant ce n'est pas le cas des protéines CP, P4 et RT du TuYV dans des cellules isolées (Ziegler-Graff et al., 1996a).

#### d. Encapsidation

Les protéines CP forment avec la protéine RT, la capside des *Polerovirus* (25 nm de diamètre). Elle est composée de 180 sous-unités de CP assemblées selon une symétrie T=3. La protéine CP est divisée en deux domaines, le domaine R riche en arginine, situé à l'extrémité N-terminale et le domaine S (shell), situé du côté C-terminal de la protéine. Par analogie avec des études cristallographiques réalisées sur d'autres virus de symétrie T=3 (Rossmann & Johnson, 1989, Terradot et al., 2001), le domaine R serait localisé à l'intérieur de la particule virale et interagirait avec l'ARN génomique.

La protéine RT est la protéine mineure de capside. Elle s'insère par sa partie Nterminale P3 dans la particule virale, la partie C-terminale P5 reste quant à elle exposée à l'extérieur de la capside. Elle n'est pourtant pas indispensable à l'encapsidation (Reutenauer et al., 1993). D'ailleurs, en absence de la protéine CP, elle est incapable de former des particules virales. La proportion RT/CP a été estimée à 1/20 pour le TuYV par Mutterer et al. (1999). Des expériences de purification de virus ont mis en évidence la présence d'une protéine RT d'environ 55 kDa (notée RT\*), tronquée dans sa partie C-terminale, dont on commence tout juste à déchiffrer le rôle chez le CABYV (Boissinot et al., 2014). Cette forme tronquée de la protéine RT est retrouvée dans les particules purifiées de tous les *Luteoviridae* (Filichkin et al., 1994, Peter et al., 2008) mais jamais dans les broyats de plantes infectées.

#### e. <u>Mouvement du virus dans la plante</u>

Les *Polerovirus* étant directement introduits dans la sève élaborée par leur vecteur et ne se multipliant que dans les cellules du phloème, ils n'ont pas le même type de parcours dans la plante que les autres phytovirus. En effet, leur mouvement à courte distance est limité au passage entre cellules du parenchyme phloémien, cellules compagnes et tubes criblés, passage qui s'effectue au travers des plasmodesmes.

La protéine P4 du PLRV possède dans sa partie N-terminale un domaine impliqué dans des interactions protéine-protéine. Ce domaine permet la formation d'homodimères P4-P4 (Tacke et al., 1993). L'organisation en domaines fonctionnels étant très conservée chez les Polerovirus, on peut penser qu'il en est de même pour toutes les protéines P4 de ce genre. Le rôle de la protéine P4 qui partage des caractéristiques communes avec des protéines de mouvement d'autres virus n'est toujours pas clairement déterminé. En effet, elle possède plusieurs caractéristiques des protéines de mouvement virales, comme la capacité d'interactions avec les acides nucléiques, l'augmentation du seuil d'exclusion limite (SEL) des plasmodesmes, la localisation intracellulaire à leur niveau (Schmitz et al., 1997), la formation d'homodimères (Tacke et al., 1993) et la capacité à être phophorylée (Sokolova et al., 1997). De plus, Vogel et al. (2007) a démontré que l'adressage de la protéine P4 aux plasmodesmes dépend des voies de sécrétion et du réseau d'actine. Même si cette protéine semble jouer un rôle dans le mouvement des Polerovirus, son action est toutefois hôte-dépendante, comme l'ont démontré par exemple Ziegler-Graff et al. (1996a) pour la protéine P4 du TuYV qui n'est pas nécessaire pour l'établissement d'une infection systémique dans Nicotiana clevelandii alors qu'elle est requise pour l'infection de la laitue. De la même manière, la protéine P4 du PLRV est indispensable pour une infection systémique de plants de pomme de terre par exemple, mais pas dans N. benthamiana ou N. clevelandii (Lee et al., 2002). Toutes ces pistes indiquent qu'il existerait deux mécanismes différents permettant aux Polerovirus de se mouvoir à longue distance, l'un nécessitant la présence de la protéine P4, l'autre non (Ziegler-Graff et al., 1996a).

Le mouvement à longue distance des *Polerovirus* fait également intervenir plusieurs autres protéines virales. Ainsi les protéines CP, RT et RT\* que l'on retrouve au niveau de la particule virale interviennent dans le mouvement à longue distance (Bruyère et al., 1997, Brault et al., 2000). Le domaine RT, c'est-à-dire le domaine correspondant au produit de l'ORF5, peut être divisé en deux parties : le domaine C (conservé) situé dans la partie N-terminale, conservé entre les différents Luteoviridae et le domaine NC (non conservé) du côté C-terminal qui est beaucoup plus variable. Ces deux domaines jouent un rôle dans le mouvement à longue distance du virus car en leur absence, même si le TuYV reste capable de se mouvoir dans toute la plante, l'accumulation du virus est fortement réduite (Bruyère et al., 1997). La diminution du titre viral est plus marquée pour des mutants présentant une délétion dans la partie C-terminale. De plus, Boissinot et al. (2014) ont montré, en utilisant des virus mutants conçus pour ne synthétiser qu'une seule forme de la protéine RT, soit la protéine entière, soit la protéine tronquée, que les deux formes sont indispensables à une infection systémique efficace du CABYV.

Les *Polerovirus* semblent se déplacer dans le phloème sous une forme encapsidée. En effet, Mutterer et al. (1999) ont observé des particules virales du TuYV dans des plasmodesmes reliant les différentes cellules phloémiennes aux tubes criblés. De plus, des mutations dans la protéine CP, qui empêchent la formation de la capside, inhibent le transport systémique du virus (Brault et al., 2003, Hipper et al., 2014). La mise en place d'une infection systémique nécessite la présence du virus sous sa forme encapsidée (Ziegler-Graff et al., 1996a).

#### f. Suppression de RNA silencing

Le mécanisme de RNA silencing antiviral est initié par la présence d'ARN double brin viral, produit intermédiaire de la réplication virale. Il est reconnu par une enzyme DCL (Dicer-like) qui le coupe et forme des petits duplexes de 21 à 24 nucléotides, appelés siRNA. L'un des deux brins est ensuite pris en charge par la protéine AGO1 (ARGONAUTE 1) dans le complexe effecteur RISC (RNA induced silencing complex). La protéine AGO1 est alors capable de cibler sur l'ARN viral, la séquence complémentaire du petit ARN chargé et de cliver l'ARN viral à ce niveau, entraînant sa dégradation par d'autres processus (Ding & Voinnet, 2007). La plupart des virus ont trouvé un moyen d'inhiber ou de contourner ce système de défense en exprimant des protéines dites « suppresseurs de RNA silencing » ou VSR (viral suppressor of RNA silencing). Leur séquence, leur structure mais aussi leur mode d'action diffèrent selon le virus considéré (Diaz-Pendon & Ding, 2008).

Chez les *Polerovirus*, la protéine ayant une activité VSR est la protéine PO qui avait été caractérisée jusqu'alors comme facteur de pathogénicité (Pfeffer et al., 2002). Chez le TuYV, la protéine P0 n'est pas essentielle à l'infection contrairement à celle du PLRV (Sokolova et al., 1997). De grandes avancées ont été faites dans la compréhension du mécanisme d'action de la protéine P0 du TuYV comme VSR, avec l'identification de partenaires cellulaires de cette protéine. En effet, la protéine PO qui possède un motif « F box » interagit avec la protéine SKP1 (S-phase kinase-related protein 1)(Pazhouhandeh et al., 2006), un des constituants du complexe SCF (SKP-Cullin-F-box protein) qui est responsable de l'ubiquitination des protéines destinées à la dégradation par la voie du protéasome 26S (Lechner et al., 2006). De plus, Bortolamiol et al. (2007) ont démontré que la cible de la protéine P0 dans la voie de RNA silencing est la protéine AGO1 (Figure 11), et Baumberger et al. (2007) ont complété cette étude en rapportant que les protéines AGO2, AGO4, AGO5, AGO6 et AGO9 sont aussi sensibles à l'action de la protéine P0, protéines qui possèdent toutes, comme la protéine AGO1, un domaine ND-PAZ potentiellement reconnu par la protéine P0. La première hypothèse fut que la protéine P0 prenne part au complexe SCF comme protéine à F-Box pour mener à la dégradation de la protéine AGO1. Récemment, Derrien et al. (2012) ont démontré que la protéine AGO1 était dégradée par le mécanisme d'autophagie et que sa dégradation nécessitait son ubiquitination par le complexe SCF. L'autophagie est un processus catabolique intracellulaire qui permet la dégradation et le recyclage de composants cytoplasmiques par les lysosomes (Kuang et al., 2013). C'est un processus sélectif qui permet de renouveler les organelles et d'éliminer les débris cellulaires et les pathogènes intracellulaires.



Figure 11: Dégradation de la protéine AGO1 par la protéine PO du TuYV dans des plantes transgéniques exprimant la protéine FLAG-AGO1 constitutivement et la protéine PO sous promoteur inductible à l'oestradiol. Trois lignées de plantes avec (+) ou sans (-) induction à l'oestradiol (est) ont été testées par western blot avec un anticorps anti-FLAG. La charge est vérifiée par la coloration du gel du bas. (C: contrôle positif) (Bortolamiol et al., 2007)

#### 3. Inoculation des Polerovirus en laboratoire

Afin d'initier une infection, les *Polerovirus* doivent atteindre directement les tissus vasculaires de leur plante-hôte. Ainsi pendant longtemps, le seul moyen d'infecter les plantes par les *Polerovirus* en laboratoire était l'utilisation de pucerons. Afin de s'affranchir de cette contrainte, Leiser et al. (1992) ont développé une méthode jusque-là utilisée pour les virus à ADN circulaire : l'agro-inoculation.

*Agrobacterium tumefaciens* est une bactérie responsable de la galle du collet. Elle possède un plasmide Ti (Tumour inducing) qui porte des gènes de virulence (vir), responsables du transfert de l'ADN-T (ADN de transfert), et des gènes oncogènes intervenant dans la formation de tumeurs. L'ADN-T peut s'intégrer au hasard dans le génome des cellules. Au laboratoire nous utilisons des agrobactéries contenant un plasmide Ti désarmé qui comprend les gènes vir nécessaires au transfert en trans et de l'ADN d'intérêt porté par un plasmide binaire. Ici l'ADN d'intérêt est l'ADNc codant pour le génome complet du TuYV (FL1) ou du CABYV sous le contrôle d'un promoteur fort, constitutif (promoteur 35S du CaMV) et d'un terminateur de la transcription (terminateur du gène NOS Nopaline synthase). Après transfert de cet ADN dans la cellule végétale, il est transcrit puis traduit en protéines virales capables d'initier une infection virale.

Cette méthode d'inoculation m'a permis d'infecter les plantes par les Polerovirus tout au long de mes expérimentations. Elle s'est même avérée efficace pour inoculer le BYDV et le CYDV à des plantes considérées comme non hôtes (Yoon et al., 2011).

Une autre technique d'inoculation a été rapportée pour le TuYV et le PLRV (Hoffmann et al., 2001), la biolistique, mais elle reste très largement moins efficace que l'agro-inoculation. Elle consiste à bombarder des tissus végétaux avec des microbilles enrobées de l'ARN viral d'intérêt ou de particules virales afin de les amener directement dans les cellules du phloème pour que l'ARN y soit traduit. Cette méthode présente l'avantage de ne pas introduire un second pathogène dans les plantes étudiées.

## III. Le virus de la mosaïque de la laitue ou *Lettuce mosaic virus* (LMV): famille *Potyviridae*, genre *Potyvirus*

L'étude du cycle viral du LMV ainsi que la caractérisation de ses protéines n'étant pas des études abouties (German-Retana et al., 2008, Moreno & Fereres, 2012), je me baserai dans ce chapitre sur des études réalisées sur d'autres *Potyvirus* lorsque les données sur le LMV restent inconnues ou incomplètes. Il est donc possible que les résultats observés sur ces autres *Potyvirus* ne soient pas transposables au LMV.

Le lettuce mosaic virus ou LMV est l'un des virus de la laitue qui cause le plus de dégats dans les cultures car, en plus d'être transmis par différentes espèces de pucerons, il peut aussi être transmis verticalement par les graines chez la laitue. Il présente une large gamme d'hôtes dont de nombreuses plantes d'intérêt économique (laitue, pois, endive, plantes ornementales...). Ce virus flexueux d'environ 750 x 15 nm (Moghal & Francki, 1981) fait partie de la famille des *Potyviridae* et du genre des *Potyvirus* dont le membre-type est le *Potato virus Y* (PVY). D'après le comité international de taxonomie des virus (ICTV), les *Potyviridae* comportent 8 genres (Tableau 4) dont 7 ne regroupent que peu d'espèces. Seul le genre des *Potyvirus* est particulièrement important puisqu'il regroupe 146 espèces.

Famille	Genre	Nombre d'espèces	<b>Tableau 4 : Taxonomie des </b> <i>Potyviridae.</i> Cette famille de virus comporte 8 genres et 2 espèces non classées. Source :		
	Brambyvirus	1	http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy		
Potyviridae	Bymovirus	6			
	Ipomovirus	5			
	Macluravirus	6			
	Poacevirus	2			
	Potyvirus	146			
	Rymovirus	3			
	Tritimovirus	5			
	virus non classés	2			

## 1. Gamme d'hôtes et symptômes

Le LMV est présent tout autour du monde. Il est capable d'infecter des plantes appartenant à plus de 20 genres regroupés en 10 différentes familles comme les astéracées, les brassicacées, les cucurbitacées, les fabacées, les solanacées ou les chénopodiacées. Il s'agit aussi bien de plantes à destinée alimentaire que des plantes ornementales.

Les principaux symptômes développés sur la laitue sont assez variables mais ils consistent la plupart du temps en un éclaircissement des nervures sur les feuilles jeunes et des mosaïques sur les plus anciennes (Figure 12A). On observe aussi un retard de croissance ainsi qu'une forte déformation des feuilles au niveau du cœur de la laitue (Figure 12B), ces feuilles paraissent gaufrées. Selon la souche de LMV, on peut aussi observer une nécrose des veines. Ces symptômes étant assez généraux d'infections virales, ils ne sont pas spécifiques au LMV et des analyses plus poussées sont souvent nécessaires pour attester de sa présence.



**Figure 12 : Principaux symptômes du LMV observés sur la laitue.** (A) Feuille de laitue présentant une mosaïque et un gaufrage du limbe. Photographie H. Lot, INRA. (B) Laitues-batavia présentant un fort retard de croissance (par rapport aux autres laitues non infectées autour), une mosaïque et un gaufrage des feuilles (Moreno & Fereres, 2012)

## 2. Cycle viral du LMV

## a. Inoculation naturelle et transmission

La principale voie de transmission du LMV est la transmission verticale. Les laitues infectées produisent des graines qui portent le virus, ce qui permet une large propagation du virus (Nebreda et al., 2004).

La deuxième voie de transmission du LMV est la transmission par un insecte vecteur, le puceron. Un grand nombre d'espèces de pucerons sont capables d'acquérir le LMV, particulièrement Myzus persicae, comme pour le TuYV, mais aussi Aphis gossypii et *Macrosiphum euphorbiae* qui sont les espèces les plus efficaces pour la transmission du LMV. La transmission se fait de manière non persistante: après acquisition par le puceron, les particules virales sont directement relarguées lors de la prise alimentaire suivante. Le puceron ne reste virulifère qu'un court moment, de l'ordre de la minute (Ng & Perry, 2004). Le virus est retenu sur des sites spécifiques du stylet ou du canal alimentaire. La protéine de capside du virus est donc un élément déterminant dans la transmission et dans la spécificité de l'interaction. Ceci a été mis en évidence pour les *Potyvirus*, après l'étude de deux virus mutants de ce genre : le Tobacco vein mottling virus (TVMV) (Atreva et al., 1995) et de Soybean mosaic virus (SMV)(Jossey et al., 2013), touchés au niveau du motif peptidique « DAG » situé à l'extrémité N-terminale de la protéine CP. Ces virus mutants se sont avérés non transmissibles. Mais la protéine de capside n'est pas le seul déterminant de la transmission du virus car celle-ci nécessite également la présence de la protéine Helper component-proteinase (HC-Pro) qui forme un pont entre la particule virale et le stylet du puceron (Pirone & Blanc, 1996). Seo et al. (2010) émettent l'hypothèse que la transmission serait contrôlée par des interactions plus complexes qu'un simple pont. En effet, ils ont démontré chez le SMV que l'interaction entre les protéines CP et HC-Pro est très importante pour la transmission des Potyviridae.

### b. Organisation génomique (Urcuqui-Inchima et al., 2001) et traduction

Le génome du LMV est composé d'un ARN simple brin de polarité positive présentant une protéine VPg de 25 kDa à son extrémité 5' et une queue polyadénylée à son extrémité 3'. Cet ARN de 10080 nucléotides est exprimé en deux polyprotéines. La principale polyprotéine produite (3255 acides aminés pour le LMV) va être clivée en 10 protéines matures par les trois protéases virales, à des sites de clivage dont les séquences restent très conservées entre les différents *Potyvirus* (Figure 13). Les trois protéases virales permettant cette maturation sont les protéines P1, HC-Pro et NIa-Pro (nuclear inclusion proteinase).



**Figure 13 : Modes de clivage des polyprotéines exprimées à partir du génome d'un** *Potyvirus.* Figure reproduite à partir de Mathur et al., (2012). Les clivages de la polyprotéine sont assurés par les protéines P1, HC-Pro et VPg-Pro en cis symbolisés par les flèches violettes, les clivages de la polyprotéine par la protéine NIa en trans sont symbolisés par les flèches grises.

La protéine P1 est une des trois protéases virales permettant le clivage en *cis* de la polyprotéine des *Potyvirus* entre les domaines P1 et HC-Pro et aboutissant à sa libération (Verchot et al., 1991, Mavankal & Rhoads, 1991). C'est une protéase à sérine de type chymotrypsine. Le clivage P1/HC-Pro est vital pour le TVMV (Klein et al., 1994). La protéine HC-Pro est une protéine multifonctionnelle de 56 kDa, impliquée elle aussi dans le clivage de la polyprotéine (Carrington et al., 1989b). C'est le domaine C-terminal de la protéine qui porte l'activité protéase et qui permet le clivage en *cis* entre son extrémité C-terminale et de la protéine P3 (Carrington et al., 1989a). La protéine peut se diviser en trois domaines fonctionnels, un domaine central et deux domaines N- et C- terminaux. La protéine NIa (environ 48 kDa) comprend les protéines VPg et NIa-Pro. Cette dernière possède la troisième activité protéasique du génome viral (protéase à cystéine de type trypsine), qui agit en *cis*, permettant la maturation des protéines VPg et NIa, et en trans, ce qui permet le clivage de la polyprotéine au niveau des jonctions P3/6K1, 6K1/CI et NIb/CP (Carrington & Dougherty, 1987) (Figure 13).

Récemment a été découverte chez les Potyvirus, une deuxième polyprotéine produite à partir de l'ARN viral, il s'agit de la petite polyprotéine P3N-PIPO (Pretty Interesting Potyviridae ORF). Elle est exprimée à partir de la séquence codant pour la protéine P3 par un mécanisme de décalage de cadre de lecture (+2) (Chung et al., 2008). La protéine PIPO n'a jamais été détectée seule mais uniquement en fusion avec la partie N-terminale de la protéine P3 (Chung et al., 2008). Des mutations empêchant l'expression de PIPO chez le *Turnip mosaic virus* (TuMV) rendent le virus non infectieux (Chung et al., 2008). Voici résumé dans le Tableau 5 ci-dessous, les différentes protéines produites par le génome du LMV ou de divers *Potyvirus* ainsi de leur(s) rôle(s) possible(s) ou démontré(s). Leurs différents modes d'action sont détaillés dans chaque étape du cycle infectieux dans laquelle ils prennent part.

Protéines	Taille (kDa)	Fonction(s)	Références	
		Protéase à sérine de type		
		«chymotrypsin-like»	(Verchot et al., 1991, Mavankal & Rhoads, 1991,	
P1	50	Amplification Infection	Verchot & Carrington, 1995, Kasschau &	
			Carrington, 1998, Valli et al., 2006)	
		silencing » (CVYV)		
		Suppresseur de « RNA		
		silencing »		
		Clivage polyprotéine	(Carrington et al., 1989a, Atreya et al., 1992, Huet	
HC-Pro	56	Réplication (TEV)	et al., 1994, Kasschau & Carrington, 1995, Cronin et al. 1995, Rojas et al. 1997, Kasschau &	
		Mouvement de cellule à cellule	Carrington, 1998, Lakatos et al., 2006)	
		Transmission par le puceron		
Р3	37	Réplication?	(Merits et al., 1999b, Jenner et al., 2003)	
		Symptomatologie		
6K1	6	Réplication? (PVA)	(Merits et al., 2002, Hong et al., 2007)	
		Mouvement (SMV)		
CI	71	Activités hélicase et ATPase: Réplication?	(Lain et al., 1990, Lain et al., 1991, Rojas et al., 1997, Rodriguez-Cerezo et al., 1997, Carrington et	
		Mouvement cellule à cellule	al., 1998)	
		Réplication? (PVA, TuMV)	(Merits et al., 2002, Leonard et al., 2004, Spetz &	
6K2	6	Symptomatologie et mouvement	Valkonen, 2004, Cotton et al., 2009, Grangeon et	
		Systemique (Tulviv)		
	NIa 48		(Corrington & Dougharty, 1097, Hong & Hunt	
NIa		(TVMV) et systémique (TEV)	1996, Nicolas et al., 1997, Schaad et al., 1997b,	
		Protéase à cysteine de type	Puustinen & Makinen, 2004)	
		«trypsin-like»		
NIb	58	ARN polymérase ARN dépendante: réplication	(Hong & Hunt, 1996)	
		Protéine de capside		
СР	31	Transmission par le puceron	(Dougherty et al., 1985, Dolja et al., 1995, Rojas et	
		Mouvement cellule à cellule et	al., 1997, Haldeman-Cahill et al., 1998, Flasinski & Cassidy, 1998)	
		systémique		
		Réplication (TEV)		
P3N-PIPO	25	Mouvement	(Wen & Hajimorad, 2010, Vijayapalani et al., 2012)	

Tableau 5 : Fonctions connues ou supposées des différentes protéines produites par le génome du LMV ou de d'autres *Potyvirus*.

#### c. <u>Réplication des Potyvirus</u>

L'amplification du génome nécessite la synthèse préalable de l'ARN polymérase ARN dépendante virale. Les processus de réplication et de traduction du génome viral étant interdépendants, il est compliqué de séparer clairement les acteurs mis en jeu dans ces deux mécanismes (Revers et al., 1999). Ceci étant, on sait que la fonction ARN polymérase ARN dépendante est portée par la protéine NIb (58 kDa) (Hong & Hunt, 1996), qui est donc directement impliquée dans la réplication virale. La protéine NIa possède quant à elle une fonction *cis*-réplicative (Schaad et al., 1996) et, en interagissant avec la protéine NIb (Li et al., 1997), pourrait faire partie du complexe de réplication. La protéine VPg liée covalemment à l'extrémité 5' de l'ARN viral (Murphy et al., 1996) intervient dans l'initiation de la réplication (Puustinen & Makinen, 2004). Elle interagit également avec un facteur d'initiation de la traduction eIF4E (Ala-Poikela et al., 2011, Tavert-Roudet et al., 2012).

Chez le TEV, les complexes de réplication sont associés aux membranes du réticulum endoplasmique, potentiellement par les protéines 6K (Schaad et al., 1997a). Les protéines 6K1 et 6K2 (6kDa) des Potyvirus sont des petites protéines dont le rôle commence seulement à être connu. La protéine 6K1 a été détectée pour la première fois in vivo en 2006 dans des N. benthamiana infectés par le Plum pox virus (PPV) (Waltermann & Maiss). Les études existantes sur cette protéine suggèrent que cette dernière serait impliquée dans la réplication virale. En effet, Merits et al. (2002) ont montré que la délétion de la région codant pour la protéine 6K1 rendait le Potato virus A (PVA) non infectieux. Comme la protéine 6K1, la protéine 6K2 est indispensable à la réplication virale du PVA (Merits et al., 2002). Chez le TuMV, elle est responsable des réarrangements membranaires impliqués dans la réplication et le mouvement intracellulaire des composants viraux. Ces structures membranaires sont de deux types : la première est une structure globulaire périnucléaire et la seconde est une structure vésiculaire corticale (Cotton et al., 2009, Grangeon et al., 2012). Ces vésicules portant la protéine 6K2 dans leur membrane sont capables de se mouvoir dans la cellule mais aussi de cellule à cellule (Grangeon et al., 2013).

D'autres protéines virales pourraient aussi intervenir dans ce processus mais comme il est difficile de dissocier la réplication de la traduction, le rôle de chacune n'est pas clairement défini. Des études portant sur des mutations des protéines P1 (Verchot & Carrington, 1995), HC-Pro (Kasschau et al., 1997) et P3 (Klein et al., 1994) ont mis en évidence leur implication dans l'amplification du génome viral. Certaines protéines virales comme la protéine CI (cyclindrical inclusion) possèdent un ou plusieurs domaines de liaison à l'ARN, ce qui pourrait indiquer leur lien avec le processus de réplication viral (Merits et al., 1998).

La protéine CI est une protéine de 71 kDa qui possède les activités hélicase (Lain et al., 1990) et ATPase (Lain et al., 1991), ce qui conforterait son rôle dans la réplication.

La protéine P3 des Potyvirus est une protéine de 37 kDa dont le rôle reste encore mal défini. Elle présente peu d'homologie de séquence avec des protéines d'autres virus. Elle est localisée dans le cytoplasme, associée à la protéine CI, ce qui pourrait montrer son implication dans la réplication (Merits et al., 1999). La protéine CP en tant que telle ne semble pas nécessaire à ce processus mais il apparaît que sa structure secondaire et son extrémité N-terminale soit requises pour la réplication du génome viral du TEV (Haldeman-Cahill et al., 1998).

### d. Mouvement des Potyvirus dans la plante

#### • Mouvement de cellule à cellule

Un grand nombre de protéines synthétisées par les *Potyvirus* interviennent dans le mouvement même si elles ne sont pas à proprement parler des MP (Urcuqui-Inchima et al., 2001). C'est le cas par exemple des protéines CI (Carrington et al., 1998), VPg (Nicolas et al., 1997), HC-Pro et CP (Rojas et al., 1997) qui sont impliquées dans le mouvement de cellule à cellule. Malgré son implication dans ce mouvement, la protéine CI n'est pourtant pas une protéine de mouvement « conventionnelle» car elle est incapable de bouger d'une cellule à l'autre et de modifier la taille des plasmodesmes (Rojas et al., 1997). Elle se localise plus précisément à proximité des plasmodesmes dans des cellules infectées par le TVMV (Rodriguez-Cerezo et al., 1997).

Comme elle est liée à l'ARN viral, la protéine VPg est également exposée à une extrémité de la particule virale. Par ce fait, elle pourrait avoir un rôle dans le mouvement orienté du virus, ce qu'ont démontré Nicolas et al. (1997) pour le TVMV dans le tabac.

La protéine HC-Pro du LMV induit une augmentation du seuil d'exclusion limite (SEL) des plasmodesmes (Rojas et al., 1997).

En ce qui concerne la polyprotéine P3N-PIPO, un virus muté du Soybean mosaic virus (SMV) incapable de synthétiser la protéine, est restreint à des îlots de cellules au niveau de la feuille inoculée (Wen & Hajimorad, 2010). Chez le TuMV, la polyprotéine P3N-PIPO est localisée dans les plasmodesmes de *N. benthamiana* où elle interagit avec la protéine CI (Wei et al., 2010). Cette interaction a aussi été démontrée dans le cas du PPV (Zilian & Maiss, 2011). Vijayapalani et al. (2012) ont proposé un modèle pour le passage du virus à travers les plasmodesmes (Figure 14) : la protéine P3N-PIPO se lierait au virion par le biais de la protéine CI et mènerait ce complexe jusqu'aux protéines membranaires PCaP1 (Plasma membrane-associated cation-binding protein 1), ancrées à la membrane plasmique. Ce complexe s'accumulerait ensuite au niveau des plasmodesmes grâce à la présence probable de protéines cellulaires non identifiées qui faciliteraient le passage du virus à travers les plasmodesmes.

La grande inconnue de ce transport intercellulaire reste la forme sous laquelle le virus se déplace dans la plante. Quelques pistes suggèrent que les *Potyvirus* circuleraient sous la forme de virions car des mutations dans la région centrale de la protéine CP empêchent l'assemblage de la particule virale du TEV et son mouvement de cellule à cellule (Dolja et al., 1994).



Figure 14 : Modèle de passage des Potyvirusde cellule en cellule, proposé parVijayapalani et al. (2012). CW: paroi cellulaire,PD : plasmodesme, ER : reticulumendoplasmique, PM : membrane plasmique.

#### • Mouvement à longue distance

Andrianifahanana et al. (1997) ont montré dans des plants de piments (*Capsicum annuum*) que le PepMoV (*Pepper mottle virus*) suit le flux des photoassimilats des tissus « source » vers les tissus « puits » de la plante. Dans un premier temps, le virus suit le transport descendant dans le phloème externe de la feuille inoculée, puis suit le transport ascendant dans le phloème interne vers les tissus plus jeunes (tissus « puits »).

La première étape de ce mouvement, l'entrée des *Potyvirus* dans les faisceaux vasculaires, reste un processus encore mal connu car il dépend de l'hôte mais aussi de la sensibilité ou la résistance de la plante au virus considéré (Saenz et al., 2002). Plusieurs protéines virales sont impliquées dans le mouvement à longue distance des *Potyvirus* : les protéines CP, HC-Pro, VPg, 6K2 et P3N-PIPO. En effet, Dolja et al. (1994) ont montré qu'une délétion des régions C- ou N-terminale de la protéine CP du TEV permet la formation de virions mais inhibe le mouvement systémique du virus. Ceci a aussi été démontré pour la protéine CP du *Pea Seed-borne Mosaic Virus* (PSbMV) dans *Chenopodium quinoa* (Andersen & Johansen, 1998) ou celle du TVMV dans des plants de tabac (Atreya et al., 1995).

En ce qui concerne la protéine HC-Pro, c'est plus particulièrement sa région centrale qui est impliquée dans le mouvement systémique comme l'ont montré Cronin et al. (1995) et Kasschau and Carrington (2001) pour le TEV. L'implication de la protéine HC-Pro du TVMV dans ce mouvement a aussi été mis en évidence par Klein et al. (1994). Le fait que la région centrale de la protéine HC-Pro soit aussi indispensable à son rôle de VSR suggère que ces deux processus sont liés et que le mouvement à longue distance des Potyvirus nécessiterait l'activité de suppression du RNA silencing (Kasschau & Carrington, 2001).

L'implication de la protéine VPg dans le mouvement à longue distance des *Potyvirus* a été démontrée pour le TEV par Schaad et al. (1997b) en utilisant des virus chimériques capables ou non de se mouvoir à longue distance dans le tabac. Les protéines CP et VPg étant exposées à l'extérieur du complexe de transport (Dougherty et al., 1985, Schaad et al., 1997b), on peut penser qu'elles assurent la fonction de liaison avec des facteurs cellulaires afin de permettre un mouvement efficace du virus dans toute la plante.
Lorsque la protéine 6K2 est mutée, le mouvement systémique du PVA et du TEV est bloqué (Rajamaki & Valkonen, 1999, Spetz & Valkonen, 2004). C'est aussi le cas de la protéine P3N-PIPO du SMV qui peut inhiber le mouvement viral à longue distance lorsqu'elle est mutée (Wen & Hajimorad, 2010).

En ce qui concerne les déterminants cellulaires participant au transport viral, quelques protéines ont été identifiées capables de jouer un rôle positif ou négatif sur le déplacement des *Potyvirus* dans la plante. Ainsi les protéines RTM1, RTM2 et RTM3 (restricted TEV movement) bloquent le mouvement systémique de plusieurs *Potyvirus* comme le TEV (Mahajan et al., 1998, Whitham et al., 2000, Cosson et al., 2010b), le PPV ou le LMV (Decroocq et al., 2009). Le rôle de la protéine cellulaire PVIP (Potyvirus VPg-Interaction Protein) est différent car sa présence permet le mouvement systémique du TuMV (Dunoyer et al., 2004). En effet, l'absence d'interaction entre la protéine PVIP et la protéine VPg induit un ralentissement du mouvement systémique.

#### e. Suppression de « RNA silencing »

Il a été démontré que la protéine HC-Pro des Potyvirus possédait une activité de suppression de RNA silencing en empêchant le chargement des siARN dans le complexe RISC contenant la protéine AGO1 (Lakatos et al., 2006, Schott et al., 2012). Bien que les protéines HC-Pro du TuMV et du PVY ne possèdent pas de propriétés de liaison avec les siARN *in vitro*, elles suppriment néanmoins le RNA silencing *in vivo* (Merai et al., 2006). Récemment, un nouveau cofacteur interagissant *in planta* avec la protéine HC-Pro du TuMV a été identifié : le facteur de transcription RAV2 (régulé par l'éthylène) qui est requis pour l'activité de RNA silencing (Endres et al., 2010). Une autre protéine pourrait agir comme VSR chez certains Potyvirus, comme la protéine P1 du *Cucumber vein yellowing virus* (CVYV), qui agirait en aval de la formation des duplex d'ARN (Valli et al., 2006).

#### 3. Transmission du LMV en laboratoire

Le LMV se transmet très facilement en laboratoire. En effet, on procède à une inoculation mécanique pour infecter de nouvelles plantes. Il suffit de broyer, dans du tampon phosphate avec de la célite ou du carborundum, des feuilles de plantes infectées et de frotter les feuilles d'une plante saine avec ce broyat. La célite ou le carborundum permet de broyer plus facilement et plus finement les feuilles mais aussi de causer des micro-blessures sur la feuille à inoculer afin de faciliter l'entrée du virus dans les cellules.

# Partie 3: Etudes transcriptomiques de tissus phloémiens ou de plantes virosées

Dans ce chapitre, je vais vous exposer l'état des lieux des études transcriptomiques déjà réalisées sur *Arabidopsis thaliana* et sur des sujets proches de celui traité dans ce projet. Les études qui nous intéressent peuvent être regroupées en deux parties :

- Les études transcriptomiques de tissus végétaux spécifiques de notre thématique : les tissus phloémiens
- Les études transcriptomiques comparatives de tissus infectés par des virus par rapport à des tissus sains

## I. Etudes transcriptomiques de tissus phloémiens

#### 1. Différentes méthodes d'isolement de tissus spécifiques.

Plusieurs techniques d'isolement de tissus ou de cellules spécifiques ont été développées ces dernières années. Ces méthodes ont chacune leur avantage, le bon choix de celles-ci dépend surtout du type de matériel que l'on veut analyser qui est plus ou moins fragile et/ou accessible, et de l'usage du prélèvement (extraction d'ARN ou de protéines) qui nécessite plus ou moins de précautions. Voici quelques exemples de techniques employées pour prélever spécifiquement certains types cellulaires :

#### a. <u>Prélèvement du contenu cytosolique par aspiration grâce à des micro-</u> <u>capillaires</u>

Comme son nom l'indique, cette technique consite à prélever le contenu de certaines cellules à l'aide de capillaires très fins qui permettent de récolter le contenu cytosolique par capilarité (Brand et al., 2002).

L'inconvénient majeur de cette technique est qu'elle n'est possible que pour des cellules accessibles en périphérie du tissu choisi (Figure 15).

Des micro-capillaires ont également été utilisés pour prélever le contenu de TC chez le maïs (Brandt et al., 1999).



**Figure 15 : Méthode d'isolement de tissus spécifique :** prélèvement du contenu cytosolique d'une cellule de mésophylle à l'aide d'un micro-capillaire.

#### b. Immunoprécipitation de sous-unités ribosomales

Cette technologie repose sur l'expression dans des plantes transgéniques de la protéine ribosomale RPL18 marquée, soit par une étiquette (FLAG, HA), soit par une protéine fluorescente comme la protéine eGFP et exprimée sous le contrôle d'un promoteur cellule-spécifique (Zanetti et al., 2005, Heiman et al., 2008, Mustroph et al., 2009a). Après immunoprécipitation de l'extrait végétal sur des billes portant des anticorps dirigés contre le marquage utilisé, on extrait les ARN messagers marqués issus des cellules spécifiques que l'on veut étudier (Figure 16) et on obtient le « translatome » (banque d'ADNc contruite à partir d'ARNm en cours de traduction) spécifique de ces cellules ou de ce tissu. L'inconvénient de cette technique est le grand nombre de paralogues composant chaque sous-unité ribosomale ce qui implique que tous les ribosomes ne sont pas marqués et que l'on ne récupère qu'une partie des messagers pris en charge par les ribosomes.



Figure16 :Méthoded'isolementdetissusspécifiques :Immuno-précipitationdepolysomesparlessous-unitésribosomales.

# c. <u>Isolement de noyaux marqués de cellules spécifiques : système INTACT</u> <u>(Isolation of nuclei tagged in specific cell types)</u>

Des plantes transgéniques permettant d'obtenir des noyaux biotinylés dans des cellules spécifiques sont produites par Deal and Henikoff (2010). Elles expriment d'une part la biotine ligase BirA (Biotin operon repressor) sous le contrôle d'un promoteur constitutif (Figure 17a) et d'autre part, sous le contrôle d'un promoteur « cellule-spécifique », une protéine de fusion appelée NTF (nuclear targeting fusion), qui est composée du domaine WPP de la protéine RanGAP1 et qui permet son association à l'enveloppe nucléaire, de la protéine GFP et du substrat de la protéine BirA, le peptide BLRP (biotin ligase recognition peptide). Ainsi si les deux protéines sont produites dans la même cellule (Figure 17b), le noyau de celle-ci sera marqué par la protéine biotinylée. Pour purifier spécifiquement ces noyaux, il suffit d'extraire les noyaux totaux. Ceux qui sont biotinylés se lient à des billes recouvertes de streptavidine, les autres sont élués. Cette méthode est facile mais présente un certain nombre de désavantages tels que le délai de transformation des plantes, la mauvaise connaissance des effets de la purification de noyaux sur le transcriptome et l'obtention d'ARN non régulés par des modifications post-transcriptionnelles.



**Figure 17 : Méthode d'isolement de tissus spécifiques :** Isolement de noyaux marqués de cellules spécifiques par le système INTACT. (a) Cellule exprimant constitutivement la protéine BirA (biotin operon repressor). (b) Cellule d'intérêt exprimant constitutivement la protéine BirA et la protéine de fusion NTF (nuclear targeting fusion), comportant le domaine WPP de la protéine RanGAP1 (Ran GTPase-activating protein), la protéine GFP et le le substrat de la la protéine BirA : BLRP (biotin ligase recognition peptide), sous le contrôle d'un promoteur cellule-spécifique.

• <u>Microdissection et capture laser (LCM)</u>

Il s'agit certainement de la technique la plus utilisée au cours de ces dernières années en vue d'analyses transcriptomiques, notamment sur les tissus vasculaires de différentes espèces végétales. On peut citer Asano et al. (2002) qui s'est intéressé au phloème du riz, Nakazono et al. (2003) à celui du maïs, Jiao et al. (2009) à 40 types cellulaires de riz, Portillo et al. (2009) à la tomate, Deeken et al. (2008) au phloème d'*A. thaliana*.

Deux systèmes de microdissection sont disponibles actuellement (Espina et al., 2006). Le premier est basé sur la capture infra-rouge (IR). En effet, après visualisation par microscopie de la zone choisie, un film plastique thermosensible posé sur une capsule est appliqué sur la zone d'intérêt grâce à un laser IR. En soulevant la capsule, la zone sélectionnée est alors retenue sur le film et donc sur la capsule.





Le second système est basé sur la coupe aux rayons ultraviolets (UV). Un laser UV permet de découper directement la zone sélectionnée. Celle-ci est récupérée sur un bouchon portant un film adhésif d'un tube eppendorf. Ce système est plus invasif car les rayons UV détruisent les cellules adjacentes à la zone choisie, ce qui peut provoquer des dégradations dans l'échantillon sélectionné.

La préparation des échantillons est une étape cruciale de cette méthode d'isolement puisqu'il faut trouver un bon équilibre entre deux paramètres très importants : le maintien des structures anatomiques de l'échantillon pour pouvoir reconnaître les différents tissus ou cellules à micro-disséquer et l'intégrité des ARN qui en seront extraits pour les différentes analyses. De nombreux protocoles de préparation de ces échantillons (fixation, inclusion, coupe) sont proposés dans différentes études. Kerk (2003) a testé certains de ces protocoles afin d'optimiser la méthode.

Le principal désavantage de cette technique d'isolement de cellules spécifiques est le grand nombre d'étapes de préparation, ce qui rallonge la durée du prélèvement au cours duquel les ARN peuvent être dégradés. La microdissection associée à la capture laser étant une des techniques que j'ai testée dans cette étude, les différentes méthodes de préparation des échantillons seront détaillées dans le Chapitre 1 des Résultats (I.1).

# d. <u>Préparation de protoplastes et tri par FACS (Fluorescent activated cell</u> <u>sorting)</u>

Contrairement au tri de cellules animales, le tri par FACS des cellules végétales nécessite une étape supplémentaire puisqu'il faut se débarrasser de la paroi cellulaire. La préparation de protoplastes est donc nécessaire. Un petit nombre d'études transcriptomiques ont été effectuées avec des cellules isolées par cette méthode. Ainsi Birnbaum et al. (2003), Gifford et al. (2008), Bargmann and Birnbaum (2009) ont étudié le transcriptome de différents types cellulaires de racines d'*A. thaliana* en utilisant des plantes transgéniques exprimant la protéine GFP sous le contrôle de promoteurs tissu-spécifiques.

La principale critique de cette technique est que l'on connaît mal l'effet de la préparation de protoplastes du tri cellulaire sur le transcriptome. En effet, il est probable que certains gènes répondent à ces traitements.

Cette méthode a néanmoins été utilisée pour notre étude puisque nous recherchons un différentiel d'expression entre deux échantillons traités dans les mêmes conditions. Les changements d'expression dus à la technique ne devraient donc pas se retrouvés dans nos analyses. Cette technique est détaillée dans le Chapitre 1 des Résultats (I.2).

#### 2. Etudes transcriptomiques de tissus phloémiens d'A. thaliana

Une grande majorité des transcrits présents dans les cellules du phloème, que ce soit dans la sève élaborée ou dans les cellules directement, est aussi présente dans d'autres cellules (Le Hir et al., 2008). Peu de gènes possèdent une signature strictement phloémienne, mais on retrouve quelques centaines de gènes préférentiellement exprimés ou réprimés dans ces cellules (Birnbaum et al., 2003, Zhao et al., 2005).



**Figure 19 : Comparaisons entre différentes études transcriptomiques de cellules compagnes de racines et de parties aériennes d'***A. thaliana*, d'après Mustroph et al. (2009b). (A) Comparaison entre les translatomes des CC de racines et des parties aériennes (Mustroph et al., 2009b). (B) Comparaison entre le translatome de CC de racines et le transcriptome de ce même type cellulaire obtenu par Brady et al. (2007). (C) Comparaison entre le translatome de CC des parties aériennes et le transcriptome de CC des parties aériennes et le translatome de CC des parties aériennes et le translatome de CC des parties aériennes et le translatome de CC des parties aériennes et le transcriptome de CC des hypocotyles obtenu par Zhao et al. (2005).

Dans leur étude, Mustroph et al. (2009b) ont comparé les « translatomes » obtenus par immunoprécipitation de sous-unités ribosomales, de différents types cellulaires, notamment ceux de cellules compagnes isolées à partir de racines ou des parties aériennes de plants d'Arabidopsis thaliana. Après l'analyse par puces (microarrays Affymetrix), ils détectent 480 gènes différentiellement exprimés dans les CC de racines, 798 dans celles des parties aériennes et 291 communs entre ces deux parties de la plante (Figure 19A). En comparant le « translatome » de CC de racines aux données transcriptomiques de Brady et al. (2007) issues de protoplastes de ces mêmes cellules, triés par FACS, 323 dérégulations communes ont été mises en évidence (Figure 19B). Elles concernent des gènes impliqués dans la réponse à divers stress, dans l'activité de transporteurs ou celle de facteurs de transcription. Pour compléter leur étude, Mustroph et al. (2009b) ont comparé le « translatome » de cellules compagnes des parties aériennes aux données transcriptomiques de Zhao et al. (2005) issues de cellules compagnes d'hypocotyles (402 transcrits) et trouvent 174 dérégulations communes (Figure 19C). Là encore, on constate des gènes impliqués dans la réponse à différents stress, des facteurs de transcription et des transporteurs. Enfin, la comparaison de leurs données avec le transcriptome de sève

extraite du phloème par Deeken et al. (2008) identifie 78 dérégulations communes, ce qui suggère que certains messagers produits dans les CC peuvent passer dans les TC pour se déplacer dans la sève élaborée. Cette hypothèse est d'ailleurs démontrée par Deeken et al. (2008) en comparant les transcriptomes obtenus à partir de la sève élaborée (2417 transcrits) et des tissus vasculaires microdisséqués (1291 transcrits) avec une banque d'ADNc de protoplastes de CC triés manuellement (444 transcrits) par Ivashikina et al. (2003). 114 transcrits sont communs à ces trois populations d'ARN (Figure 20). Environ 2/3 des transcrits présents dans les tissus vasculaires microdisséqués (714 + 114 transcrits sur 1291) sont aussi retrouvés dans la sève phloémienne. Tous les ARNm synthétisés dans les CC ne sont donc pas mobiles. Ceci peut s'expliquer par leur incapacité à passer dans les TC, du fait de leur liaison à des protéines chaperonnes qui les retiennent dans les CC, ou par une durée de vie très courte.



Figure 20 : D'après Deeken et al. (2008), comparaison entre des études transcriptomiques de cellules phloémiennes microdisséquées, de sève élaborée et de protoplastes de CC triés manuellement (Ivashikina et al., 2003). La banque d'ADNc représente 444 trancrits, le transcriptome de sève élaboré 2417 celui des tissus vasculaires et microdisséqués, 1291.

Certains processus ou fonctions sont communément trouvés dans ces différentes études transcriptomiques de cellules et de sève phloémienne. La plupart de ces transcrits ne sont pas spécifiques au phloème mais sont particulièrement enrichis dans ce tissu. Ainsi comme le détaillent Le Hir et al. (2008) dans leur revue, on retrouve souvent dans le phloème des éléments impliqués dans les processus de transcription et de traduction, des composants de la paroi cellulaire et du cytosquelette, des molécules impliquées dans la voie de signalisation de l'auxine, dans les processus de mort cellulaire, de réponse aux stress, de photosynthèse ou de potentiel redox. La partie qui va suivre récapitule les familles de gènes exprimés dans les tissus phloémiens et impliqués dans certaines fonctions biologiques.

- <u>Transcription-traduction</u>

On retrouve des gènes de plusieurs sous-familles de facteurs de transcription dont certaines sont spécifiques aux plantes (Riechmann et al., 2000), comme des protéines WRKY (Mustroph et al., 2009b), TGA-bZIP (Basic Leucine Zipper)(Ivashikina et al., 2003, Deeken et al., 2008, Mustroph et al., 2009b) ou bien encore MYB (Myeloblastosis) comprenant les protéines APL (Altered phloem development), les protéines Dof (DNA binding with one finger) (Birnbaum et al., 2003, Zhao et al., 2005, Mustroph et al., 2009b) et les protéines NAM (No apical meristem) (Zhao et al., 2005). D'après Le Hir and Bellini (2013), tous les gènes codant pour les facteurs de transcription appartenant à la famille Dof pourraient être exprimés dans les tissus vasculaires et servir de molécules-signal pour permettre une communication à longue distance. Ivashikina et al. (2003) ont également identifié des transcrits codant pour des facteurs de la transcription et de la traduction comme les polymérases, hélicases, histones ou protéines ribosomiques.

<u>Paroi cellulaire</u>

De nombreux transcrits impliqués dans la synthèse et le renouvellement de la paroi cellulaire d'*A. thaliana* ont été identifiés (Ivashikina et al., 2003, Birnbaum et al., 2003, Zhao et al., 2005, Deeken et al., 2008), ainsi que des transcrits impliqués dans la synthèse de la callose (Zhao et al., 2005). Constituant de la paroi, notamment au niveau des plaques criblées des TC, la callose peut boucher les pores afin de bloquer la circulation phloémienne.

#### - <u>Cytosquelette et trafic subcellulaire</u>

Dans les différentes études effectuées sur le transcriptome d'*A. thaliana*, plusieurs transcrits codant pour des éléments constituant le cytosquelette, des protéines associées ou des éléments de régulation du mouvement intracellulaire ont été détectées. Ainsi par exemple, sont présents des transcrits codant pour des facteurs de dépolymérisation de l'actine, des tubulines, des MAPs (microtubule-associated proteins), des dynéines et des myosines (Ivashikina et al., 2003, Zhao et al., 2005). Ivashikina et al. (2003) ont également identifié des ARNm codant pour des protéines SNARE (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment receptor

proteins) et pour des protéines ABP1 (auxin binding protein) qui sont spécifiques des CC. Les protéines SNARE et ABP1 interviennent dans le mouvement intracellulaire.

- <u>Réponse aux stress</u>

Sans surprise, le phloème est une voie de propagation et/ou d'amplification de signaux de stress produits par la plante en réponse à une situation anormale. Même s'il peut être compliqué de différencier les transcrits produits suite à un stress « naturel » de ceux produits par la manipulation en elle-même, on retrouve dans toutes les études des cellules phloémiennes, des transcrits correspondant à des protéines connues pour être produites en cas de stress comme des myrosinases, des lectines, des jacalines, mais aussi toutes sortes de HSP (heat shock protein), de protéines PR (pathogenesis-related), de protéases (Ivashikina et al., 2003, Birnbaum et al., 2003, Deeken et al., 2008). Des transcrits codant pour certains stress particuliers sont aussi identifiés dans plusieurs études, comme des enzymes impliquées dans le stress oxydatif, comme par exemple la superoxyde-dismutase (Ivashikina et al., 2003, Birnbaum et al., 2003, Zhao et al., 2005).

#### - Photosynthèse

Le mécanisme de photosynthèse est aussi bien représenté parmi les gènes identifiés dans les études transcriptomiques des cellules phloémiennes et de sève. Des transcrits de constituants du photosystème I et du photosystème II, mais aussi la RuBisCO (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase) ont été détectés dans le transcriptomes des CC d'*A. thaliana* et dans la sève phloémienne (Ivashikina et al., 2003, Deeken et al., 2008).

- Potentiel d'oxydo-réduction

Beaucoup de transcrits codant pour des protéines intervenant dans la régulation du potentiel d'oxydo-réduction comme des thioredoxines, des glutaredoxines (Mustroph et al., 2009b) ou encore la superoxyde dismutase (Ivashikina et al., 2003) sont également présentes dans le transcriptome des cellules phloémiennes.

#### - <u>Mort cellulaire</u>

Ces études ont également mise en évidence des gènes participant au processus de mort cellulaire. On peut ainsi détecter des transcrits des inhibiteurs de protéases (Ivashikina et al., 2003, Birnbaum et al., 2003, Zhao et al., 2005) qui permettraient le contrôle de l'autophagie lors de la différentiation des TC (Petzold et al., 2012) mais aussi des constituants du protéasome (Deeken et al., 2008, Mustroph et al., 2009b).

- <u>Hormones :</u>

Le phloème constitue également la voie royale pour la distribution des hormones et différents acteurs de leur voie de signalisation d'être distribués dans la plante entière. Mustroph et al. (2009b) ont quant à eux identifié des transcrits impliqués dans la réponse aux hormones. Ainsi Zhao et al. (2005) mais aussi Deeken et al. (2008) ont identifié des transcrits codant pour des facteurs participant à la voie de signalisation de l'auxine : des protéines ARF (auxin response factors) et des facteurs de transcription. Deeken et al. (2008) ont aussi détecté des transcrits des voies de biosynthèse de l'auxine, de l'acide gibbérellique et de cytokinine dans l'exsudat de phloème d'*A. thaliana* et Ivashikina et al. (2003), des transcrits d'éléments impliqués dans les voies de signalisation de l'acide gibbérellique et de l'éthylène.

Les résultats des études transcriptomiques des cellules phloémiennes d'*A. thaliana* diffèrent d'une étude à l'autre, malgré certains éléments impliqués dans des fonctions communes. Ceci peut être dû à la méthode employée pour effectuer ces analyses. Ainsi, lorsque l'on étudie le « translatome » de certaines cellules (Mustroph et al., 2009b), ce ne sont que les ARN liés aux ribosomes que l'on identifie. Ces ARN ne sont pas nécessairement les mêmes que ceux qui circulent dans la sève (Deeken et al., 2008), ou que ceux présents spécifiquement dans des protoplastes (Brady et al., 2007), ou des cellules microdisséquées. Dans toutes ces méthodes, on ne sélectionne pas le même « pool » d'ARN. Les autres facteurs qui peuvent modifier des résultats de transcriptomiques sont les conditions de croissance des plantes étudiées. Ainsi, beaucoup de paramètres de culture ou de croissance peuvent provoquer l'activation ou la répression de la transcription de certains gènes, comme l'âge ou le stade de développement de la plante, le temps de récolte et les traitements subis par les plantes ou les échantillons. Là encore, le profil des transcrits obtenu est donc directement lié aux évènements auxquels est exposée la plante.

#### II. Analyses différentielles entre plantes virosées et saines

Généralement, les plantes répondent aux différents pathogènes qu'elles rencontrent en activant des voies de défense comme celles de l'acide salicylique, de l'acide jasmonique ou bien encore de l'éthylène. En particulier, l'infection par les virus à ARN activerait principalement la voie de l'acide salicylique chez leur hôte (Whitham et al., 2006). Certains gènes ont d'ailleurs été identifiés comme marqueurs de cette voie, comme les gènes PR1, PR2 et PR5 (Pieterse & Van Loon, 2004). C'est ce qu'ont démontré Whitham et al. (2003) après avoir analysé par puces « microarrays », des ARN extraits de feuilles d'A. thaliana inoculées par cinq virus appartenant à des familles différentes (CMV, ORMV, PVX, TVCV et TuMV) à différents temps postinoculation. 114 gènes se sont montrés induits pour les 5 virus à au moins un temps, dans les plantes infectées, par rapport à une plante saine. Un tiers de ces gènes sont impliqués dans des mécanismes de réponse aux stress ou de défense de la plante comme, par exemple, les gènes PR1, PR5, PAD3 et PAD4. De nombreux gènes codant pour des « Heat Shock Proteins » comme HSP83, HSP70, HSP17.6A ou HSP17.4 sont aussi induits par l'infection de ces 5 virus. On remarque néanmoins selon le type de virus considéré, un délai de réponse de la plante pour l'expression de ces gènes. En effet, les tobamovirus (ORMV et TVCV) induisent une réponse plus rapide et plus spécifique, alors que les autres virus ne déclenchent de réaction qu'à des temps plus tardifs.

Trois études transcriptomiques menées avec des *Potyvirus*, le TuMV, le PPV et le TEV (Yang et al., 2007, Babu et al., 2008, Agudelo-Romero et al., 2008) ont mis en évidence un enrichissement en gènes impliqués dans la réponse aux stress et dans la signalisation cellulaire. Postnikova and Nemchinov (2012a) ont comparé les données d'un grand nombre d'études transcriptomiques d'*A. thaliana* infectés par divers pathogènes (virus, champignons, bactéries) dont certaines portaient sur 11 virus (CaLCuV, CAMV, CMV, LMV, PPV, TCV, TEV, TMV, TRV, TuMV). Leur analyse met en évidence 7639 gènes dérégulés par l'ensemble de ces 11 virus : 69% sont uniquement induits, 14% uniquement réprimés et 17% sont soit induits soit réprimés. Cette liste de gènes dérégulés est particulièrement enrichie en gènes impliqués dans le métabolisme protéique et la réponse aux stress. Ils mettent aussi en évidence le fait que la majorité des changements d'expression suite à une infection virale est similaire aux modifications provoquées par une infection par le TMV. D'autre part, les Potyvirus (LMV et TEV) induisent des changements très similaires dans la plante. Ils ne relèvent pas de différence notable entre virus à ARN et virus à ADN. Peu de gènes sont communs à toutes les infections mais ils identifient 198 gènes très souvent dérégulés entre les différents virus. Ces gènes sont principalement impliqués dans les mécanismes de défense et de catabolisme cellulaire. Rodrigo et al. (2012) ont eux aussi étudié les transcriptomes d'A. thaliana infectés par 8 différents virus dont 7 virus à ARN (2 souches de TEV, TuMV, PPV, TMV, TRV, TCV) et un virus à ADN, le CaLCuV. Etonnamment, ils identifient 5296 gènes qui sont dérégulés par au moins un virus, mais aucun gène commun à toutes ces différentes infections. Un seul gène est surexprimé dans toutes les infections, mis à part celle provoquée par le PPV, il s'agit d'un gène codant pour une protéase impliquée dans la migration cellulaire (AT5G10760). Pour six de ces virus, sept gènes seulement sont identiques dont six impliqués eux aussi dans la migration cellulaire et le dernier code pour la protéine PR5.

Ces études transcriptomiques ont été réalisées sur feuilles systémiques ou sur des protoplastes de feuilles systémiques d'*A. thaliana*, infectés par les divers types de virus. Contrairement aux transcriptomes de cellules spécifiques, elles ne prennent pas compte des spécificités d'expression des différents tissus. Elles permettent néanmoins d'observer la réponse génétique globale de la plante face à une infection virale et d'analyser les différences selon le virus pris en compte.

Les résultats de ces études transcriptomiques seront comparés ultérieurement aux données obtenues dans notre étude transcriptomique de CC infectées (Chapitre 1 des Résultats).

# Résultats

# Résultats

# Chapitre 1 : Etudes transcriptomiques de cellules compagnes d'*Arabidopsis thaliana* infectés par le LMV ou le TuYV

Le tissu phloémien étant le compartiment de la plante où se joue le mouvement à longue distance, il était important de pouvoir étudier les changements d'expression des gènes précisément au niveau de ce tissu. C'est pourquoi la première partie de mon projet a consisté à mettre au point une technique permettant de prélever de manière spécifique les cellules compagnes. L'objectif de l'étude transcriptomique de ces cellules isolées à partir de plantes infectées par le LMV ou le TuYV est d'identifier des gènes ou processus cellulaires potentiellement impliqués dans le mouvement viral systémique afin de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu.

## I. Mise au point de la méthode d'isolement de cellules phloémiennes d'Arabidopsis thaliana

Le choix d'une méthode d'isolement des cellules phloémiennes, adaptée à notre objectif d'étude et à nos paramètres s'est posé dès le début du projet. Dans un premier temps, nous pensions utiliser la microdissection et capture laser pour isoler nos cellules mais divers facteurs nous ont contraints à changer de technique et à finalement privilégier le tri de protoplastes issus de plantes transgéniques exprimant une protéine fluorescente sous le contrôle d'un promoteur cellule-spécifique. La validité de l'efficacité de cette technique a été démontrée en recherchant par PCR quantitative des marqueurs spécifiques des cellules compagnes dans nos échantillons triés.

#### 1. Microdissection et capture laser

Afin d'isoler spécifiquement les cellules compagnes d'*A. thaliana*, nous avions opté dans un premier temps pour la microdissection et capture laser. Cette technologie nous semblait plus appropriée par rapport au type d'échantillon considéré, de la finalité de l'étude et du matériel disponible. Les différentes études menées jusque-là décrivant des protocoles de préparation des échantillons et de microdissection bien différentes, nous avons dû mettre au point un protocole pour l'adapter à notre sujet d'étude.

La préparation des échantillons pour la microdissection comprend plusieurs étapes cruciales car il faut trouver le bon équilibre entre le maintien de la structure anatomique des tissus et la conservation de l'intégrité des ARN. A ce compromis il faut ajouter un autre paramètre : la force de l'adhésion de l'échantillon à microdisséquer sur la lame. En effet, la zone sélectionnée doit pouvoir facilement se détacher de la lame sans pour autant arracher les tissus environnants.

Nous envisagions d'utiliser des plantes transgéniques exprimant la protéine GFP sous le contrôle d'un promoteur spécifique des cellules compagnes, le promoteur pSUC2 (Imlau et al., 1999) (Figure 21), afin de repérer plus facilement les cellules à prélever, mais les premiers tests ont montré que la fluorescence de la GFP disparaissait des échantillons au cours des différents traitements de fixation. De plus, les fixateurs produisent pour la plupart une autofluorescence après excitation à 488 nm, longueur d'onde d'excitation de la GFP, qui empêche de distinguer les cellules spécifiquement marquées avec la GFP. Les échantillons d'*A. thaliana* Col0 ont donc simplement été colorés à l'éosine car les tissus vasculaires, et plus particulièrement le phloème, forment une structure assez facilement reconnaissable sans coloration spécifique (Figure 22).





**Figure 21 : Coupes transversales d'un pétiole et d'une hampe florale d'***A. thaliana* **pSUC2::GFP.** Observation de la fluorescence de la GFP au niveau des structures vasculaires, sur des tissus frais

coupés à la lame de rasoir (environ 1mm d'épaisseur) (microscopie à épifluorescence, filtre GFP).





La mise au point d'un protocole adapté à notre objectif a nécessité de réduire au maximum la durée de chaque étape afin de limiter les risques de dégradation des ARN. Les conditions de travail se sont déroulées autant que possible dans des conditions « RNase free » et, à chaque paramètre testé, une observation au microscope et une analyse d'ARN a été effectuée afin de vérifier l'intégrité des structures histologiques et des ARN.

Plusieurs paramètres ont été testés pour l'optimisation de la préparation des échantillons et ceci avant même l'utilisation de l'appareil à microdissection:

- Le choix de l'organe de la plante à considérer, le type et l'épaisseur de coupe Différentes parties de la plante (tiges, pétioles et feuilles) ont été coupées dans le but d'avoir un maximum de structures reconnaissables à prélever sur une même lame. Après observation au microscope, il apparaît que la tige soit le meilleur candidat. En effet, chaque coupe transversale de tige comprend une dizaine de faisceaux vasculaires distincts, soit autant de faisceaux phloémiens; contrairement aux pétioles et aux feuilles qui n'en contiennent qu'un, en position centrale, facilement reconnaissable. En coupe longitudinale, les tissus phloémiens ne sont pas réellement reconnaissables et imbriqués dans les cellules du xylème.

En ce qui concerne l'épaisseur de la coupe, il s'agit de récupérer un maximum de matériel cellulaire en une capture, sachant que si la coupe est trop épaisse, la zone sélectionnée ne sera pas prélevée sur toute son épaisseur. Différentes épaisseurs de coupe ont été testées (entre 7 et 20  $\mu$ m) et il s'avère que ce sont les coupes de 15  $\mu$ m qui présentent la meilleure efficacité de prélèvement.

 <u>La durée et le type de fixation des échantillons (</u>résumés dans le Tableau 6 page 82)

Afin de réduire la durée de fixation tout en conservant les structures intactes, nous avons testé trois durées différentes: une heure, deux heures et toute la nuit. Des observations faites au microscope à épifluorescence ont permis de vérifier la conservation des structures entre ces différents essais. Les tissus sont aussi bien conservés après une heure de fixation qu'après toute une nuit, donc cette durée peut être réduite à une heure afin de limiter des dégradations possibles des ARN.

Par la suite, j'ai testé trois types de fixateurs chimiques et une méthode de fixation physique. Le premier fixateur chimique testé contient un agent pontant, permettant une fixation forte des tissus, le formaldéhyde associé à de l'éthanol et de l'acide acétique, pour déshydrater l'échantillon et fixer les acides nucléiques (fixateur FEA: formaldéhyde/éthanol/acide acétique). Les deux autres fixateurs testés ne contiennent pas d'agent pontant mais sont basés sur la déshydratation des tissus. Il s'agit du fixateur «Methacarn » (Balestrini et al., 2007) contenant du méthanol, du chloroforme, de l'acide acétique et du fixateur EA contenant de l'éthanol et de l'acide acétique. Enfin, le dernier type de fixation testé est la cryofixation des tissus à l'azote liquide. Cette fixation n'a été utilisée que pour des échantillons coupés au cryostat c'est à dire à une température d'environ -20°C.

En ce qui concerne les structures histologiques, aucune différence notable n'a été observée au microscope à épifluorescence entre les fixateurs chimiques au grossissement qui nous intéresse pour la microdissection, donc aucun fixateur ne peut être privilégié aux vues de ces observations. Par contre, la cryofixation a complétement détruit les tissus, aucune structure n'est reconnaissable après la fixation par le froid (Figure 23), probablement en raison de la formation de cristaux d'eau qui ont pu faire exploser les structures végétales très rigides. Ce problème est récurrent pour les tissus végétaux à cause de la présence de vacuoles remplies principalement d'eau et qui peuvent représenter jusqu'à 90% du volume de la cellule. Quand cette eau contenue dans les vacuoles gèle, les cristaux détruisent les structures cellulaires. Ces artéfacts peuvent être diminués ou évités en utilisant au préalable de la congélation un cryoprotectant comme le saccharose, mais malheureusement cette solution ne m'a pas donné de meilleurs résultats.

J'ai donc privilégié la fixation chimique en choisissant celle qui assurait une meilleure conservation des ARN.



**Figure 23 : Coupe transversale d'une hampe florale d'***A. thaliana,* colorée à l'éosine. Les structures ont été détruites par la coupe au cryostat (20 µm d'épaisseur) malgré une fixation EA (éthanol/acide acétique).

La qualité des ARN est testée par un appareil de type «Bioanalyzer» (Agilent) qui permet de séparer, par électrophorèse sur puce, les différents ARN d'un échantillon selon leur taille et leur quantité. Une éventuelle dégradation est donc détectable. Les échantillons sont marqués avec de la cyanine 5 qui se fixe sur les acides nucléiques et permet de visualiser la séparation des ARN en fonction des intensités de fluorescence (exprimée en unité de fluorescence ou FU) qui permettent de quantifier les ARN. Sur le graphique obtenu suite à l'électrophorèse (Figure 24A), on observe deux grands pics correspondant aux ARN ribosomaux, les ARN 18S et 25S chez les végétaux, mais on peut aussi détecter les ARN ribosomaux chloroplastiques, 16S et 23S. Ces pics diffèrent selon les organismes car tous n'ont pas les mêmes sousunités ribosomales. Le profil des pics des ARN ribosomaux permet de déterminer l'intégrité de l'échantillon. En effet, ces ARNr sont stables et présents en grande quantité dans toutes les cellules. Hormis ces pics et le marqueur de référence, la ligne de base de la courbe doit être assez basse et plane dans le cas d'un échantillon de bonne qualité. Le rapport entre les surfaces des deux principaux pics d'ARNr permet de calculer une valeur caractérisant la qualité des ARN. Cette valeur appelée RIN (RNA integrity number) va de 0 à 10, 10 correspondant aux ARN de meilleure qualité. Par exemple, sur la Figure 24A, on observe clairement les quatre pics correspondant

aux ARN ribosomaux. La présence des ARN 16S et 23S chloroplastiques dépend du tissu dont on a extrait les acides nucléiques. Ils ne sont retrouvés que dans les organes photosynthétiques de la plante. Le marqueur indique des fragments d'une taille de 25 nucléotides. Sur la Figure 24B, on peut observer un large pic correspondant une grande quantité d'ARN de petite taille, car ce sont ceux qui migrent en premier. Ceci signifie que les ARN de cet échantillon sont complètement dégradés.



**Figure 24 : Profil de migration obtenu par le bioanalyzer (Agilent) pour des échantillons d'ARN extraits d'***A. thaliana.* (A) Profil d'ARN de bonne qualité montrant les 4 pics représentant les ARN ribosomaux, dont les deux principaux, correspondant aux ARN 18S et 25S servent au calcul du RIN (RNA integrity number) de l'échantillon. Cet échantillon a un RIN presque parfait de 9,2. Les astérisques identifient les ARN ribosomaux chloroplastiques 16S et 23S) (B) Profil d'ARN fortement dégradés. Le pic représente une grande majorité de petits fragments d'ARN. Cet échantillon a un RIN de 2,2.



**Figure 25 : Résultats de l'analyse au Bioanalyzer (Agilent), des ARN extraits suite à une fixation à l'azote liquide (A) et EA (éthanol/acide acétique) (B).** FU : unité de fluorescence, M : marqueur de taille, RIN : RNA integrity number

L'analyse de l'intégrité des ARN issus des tissus traités lors de notre test pour choisir le meilleur fixateur pour nos échantillons montre que tous les ARN extraits sont de bonne qualité, en particulier les ARN extraits des échantillons cryofixés. Les meilleures conservations d'ARN concernent ces derniers ainsi que ceux fixés par le fixateur EA (Figure 25). Des ARN issus d'échantillons fixés avec le fixateur EA puis imprégnés des bains de saccharose en concentration croissante (pour éviter la formation de cristaux d'eau) ont aussi été analysés mais ils se sont avérés dégradés.

 <u>Le type d'imprégnation avant inclusion et le type d'inclusion</u> (résumés dans le Tableau 6 page 82).

J'ai testé différents solvants permettant d'inclure les échantillons dans de la paraffine: du xylène, de l'histoclear et de l'isopropanol. Après inclusion dans la paraffine, les ARN de ces échantillons extraits et testés par Bioanalyzer ont montré des profils caractéristiques d'une dégradation totale des ARN, ce qui ne permet pas de conclure quant au meilleur solvant à utiliser. Cette dégradation peut s'expliquer par la durée et la température requises pour l'inclusion dans la paraffine: 2 jours, à 60°C. Afin de réduire cette durée d'inclusion, nous avons testé un robot qui prend en charge l'imprégnation dans le solvant et l'inclusion (Clinique de la souris, Département d'Histopathologie et Embryologie, Illkirch-Graffenstaden). Celui-ci permet d'éviter les variations intempestives de température dues au traitement manuel de la paraffine et surtout de diminuer la durée d'inclusion à 15 heures. Malgré cette optimisation et le gain de temps, la qualité des ARN extraits de ces échantillons ne s'est pas améliorée. Pour finir, une inclusion dans une cire contenant notamment du PEG (polyéthylène glycol) a été testée car elle permet d'abaisser la température de 60°C à 38°C et de réduire la durée d'inclusion. Cet essai n'a pas été plus concluant (Figure 26A).

Nous avons aussi testé l'inclusion dans un milieu spécifique pour la coupe au cryostat, à -21°C. Des échantillons fixés au froid ou avec le fixateur EA ont été traités. Les ARN extraits de ces échantillons sont de très bonne qualité pour la fixation au froid, beaucoup moins pour les échantillons fixés avec le fixateur EA. Mais le problème reste le même que précédemment pour des échantillons cryofixés : les tissus sont complétement détruits (Figures 26B et 23).

La mise au point de la préparation d'échantillons permettant l'extraction d'ARN intacts provenant de zones microdisséquées n'ayant pas abouti, nous nous sommes donc tournés vers une autre méthode de sélection des cellules compagnes d'*A. thaliana* : le tri de protoplastes par FACS.



**Figure 26 : Résultats de l'analyse au Bioanalyzer (Agilent).** (A) Analyse des ARN extraits avant et après inclusion dans du PEG. (B) Analyse des ARN extraits suite à une congélation rapide dans l'azote liquide, précédée ou non d'une fixation chimique. A gauche: Migration sur gel. A droite: Profil de l'électrophorèse. FU : unité de fluorescence, M : marqueur de taille, RIN : RNA integrity number

	Fixation				Inclusion		
Туре	FEA	EA	Méthacarn	N <sub>2</sub> liquide	paraffine	PEG	Milieu cryo
Intégrité des tissus	++	++	++	-	++	++	-
Intégrité des ARN	++	+++	++	+++	-	-	+++

Tableau 6 : Résultats des tests de fixation et d'inclusion des échantillons préparés pour la microscopie et capture laser (LCM). FEA : formaldéhyde, éthanol, acide acétique ; EA : éthanol, acide acétique.

#### 2. Protoplastes enrichis en CC d'A. thaliana sucGFP et tri par FACS

Afin d'isoler spécifiquement les CC d'A. thaliana, nous avons opté pour le tri de cellules exprimant de manière spécifique la protéine GFP sous le contrôle du promoteur pSUC2. Le tri cellulaire nécessitant l'obtention de cellules isolées, il est nécessaire au préalable d'éliminer la paroi végétale en préparant des protoplastes. Les protocoles de préparation de protoplastes d'A. thaliana existants n'étant pas adaptés aux cellules phloémiennes, une optimisation des techniques existantes a donc été entreprise. En effet, à l'inverse des cellules du mésophylle ou de l'épiderme facilement accessibles pour les enzymes de digestion, car situées en superficie de la plante, il s'agissait de libérer des protoplastes de CC localisées plus en profondeur dans les tissus. L'utilisation de plantes pSUC2::GFP a permis de suivre la libération des protoplastes de CC fluorescents. Cette optimisation de protocole a permis de relâcher et de récolter beaucoup plus de CC et donc d'enrichir notre suspension de protoplastes en cellules fluorescentes (environ 7% du total) (Figure 27). Le reste du processus (conditions de tri et d'extraction des ARN) a également fait l'objet d'une attention particulière en préparant tous les tampons de manière « RNase-free » et en traitant tout le matériel de la même manière. Des tests ont été effectués prouvant le bon fondement de ces traitements. Ce travail de mise au point a été réalisé conjointement avec le Dr. Caren Rodriguez-Medina (INRA Colmar).



Figure 27: Suspension cellulaire de protoplastes d'*A.thaliana* pSUC2::GFP contenant des protoplastes de mésophylle riches en chloroplastes autofluorescents et des petits protoplastes de CC exprimant la GFP. Observations faites au microscope confocal.

#### a. Mise au point de la préparation de protoplastes enrichis en CC

Plusieurs paramètres ont été testés pour optimiser le rendement en protoplastes de CC et ceci dans des conditions « RNase free », avec du matériel stérilisé: type d'organe de la plante (tige, feuille ou pétiole), type d'enzyme utilisé pour digérer la paroi végétale, durée de cette digestion, durée des centrifugations permettant de récupérer les protoplastes souhaités (les protoplastes de CC étant beaucoup plus petits que des protoplastes de cellules du mésophylle), nécessité d'une purification au sucrose. Les paramètres ont été déterminés de manière à effectuer l'ensemble de l'expérience (préparation de protoplastes et tri par FACS) en une journée pour limiter au maximum la reprogrammation des cellules et la dégradation des ARN. Ces tests ont été effectués en collaboration avec le Dr. Caren Rodriguez-Medina.

Suite à nos diverses expérimentations, nous avons choisi d'utiliser des feuilles car le rendement en protoplastes fluorescents était meilleur. Les protoplastes ont donc été préparés à partir de 50 feuilles issues de 15 à 20 plantes (selon le nombre de plantes infectées), les feuilles dilacérées étant mises à digérer dans une solution enzymatique contenant de la cellulase RS et de la pectolyase. Les feuilles choisies sont des feuilles plutôt jeunes dans leur stade de développement afin de s'assurer de prendre des feuilles systémiques infectées, mais dont la taille est suffisante pour que l'on puisse en extraire un maximum de protoplastes. La durée optimale de digestion est de quatre heures, c'est la durée nécessaire pour obtenir un bon rendement de protoplastes fluorescents sans pour autant que celle-ci ne soit trop longue. La purification par gradient de sucrose est un moyen utilisé couramment pour éliminer un maximum de débris et de cellules mortes suite à la découpe et à la digestion. Ce traitement n'est cependant pas adapté à la purification de protoplastes de CC, car il entraîne la perte des protoplastes fluorescents, il a donc été abandonné. Lors de nos différents tests, il s'est avéré que le temps de centrifugation des protoplastes était un paramètre crucial à prendre en considération. En effet, un temps de centrifugation court (comme c'est la cas pour la majorité des protocoles de préparation de protoplastes) entraîne une perte des cellules les plus petites, parmi lesquelles se trouvent les protoplastes de CC. Des centrifugations de 15 minutes sont donc nécessaires pour sédimenter ces protoplastes.

#### b. Mise au point du tri par FACS

Les protoplastes, ainsi préparés à partir d'A. thaliana transgéniques exprimant la protéine GFP spécifiquement dans les CC, sont ensuite triés par FACS (BD FACSDiva ™) selon la fluorescence de la protéine GFP exprimée. Des protoplastes d'A. thaliana non transgéniques de l'écotype Col0 ont été préparés en parallèle de chaque tri afin de servir de contrôle négatif. Le but de cette mise au point est de trier une quantité suffisante de cellules GFP (+) (exprimant la protéine GFP) pour en extraire assez d'ARN et ce, le plus rapidement possible afin d'éviter leur dégradation. Néanmoins, un tri trop rapide des cellules peut induire des erreurs de tri et donc des contaminations de l'échantillon d'intérêt. Afin de réduire le temps de tri de chaque échantillon, nous avons divisé la suspension de protoplastes en plusieurs tubes et limité la durée du tri d'un même échantillon à moins de 30 minutes afin de pouvoir garder les échantillons au maximum dans la glace et donc préserver les cellules triées de l'attaque de RNAses. De plus, la concentration cellulaire influencant l'efficacité du tri, puisqu'un échantillon trop concentré bouche plus facilement les tubulures et qu'un échantillon trop dilué augmente le temps de tri, nous avons optimisé cette concentration. Chaque suspension de protoplastes préparée à partir de 50 feuilles est donc divisée en 6 tubes de 500 ul chacun renfermant environ 4 millions de cellules au total (Figure 28).



**Figure 28 : Exemple d'analyses par FACS de suspensions de protoplastes.** Ces graphiques sont des graphiques dynamiques représentant 100 000 événements donc 100 000 éléments triés. La colonne de droite résume en chiffres les différents critères de tri pour éliminer les débris cellulaires, les cellules mortes et les cellules accolées. La colonne de gauche représente le nombre d'évènements en fonction des intensités de fluorescence. Ainsi dans l'échantillon Col0 ne contenant pas de cellules exprimant la GFP et servant donc de contrôle négatif, on observe un pic de fluorescence qui correspond à l'autofluorescence de la chlorophylle contenue dans les protoplastes. Sur les échantillons suivants, on remarque un deuxième pic plus élevé correspondant à la fluorescence de la GFP. Dans la colonne centrale, les évènements sont représentés en fonction de la fluorescence servant à déterminer le profil de population triée. Les cellules nommées GFP (-) ont été déterminées à partir du contrôle Col0 à chaque nouveau tri.

#### 3. Validation de l'efficacité du tri cellulaire par PCR quantitative

Afin de valider l'efficacité du tri cellulaire et de tester l'enrichissement de notre suspension de protoplastes en cellules fluorescents GFP (+), j'ai recherché l'abondance relative de certains ARNm connus pour être spécifiquement exprimés dans les CC, ou à l'inverse absent des CC. Dans cette optique, j'ai isolé par FACS des protoplastes « GFP (+) » de 6 plantes individuelles pour estimer la reproductibilité des résultats. Les ARN extraits de ces échantillons ont été analysés par PCR quantitative (qPCR) et comparés à des ARN extraits de chaque échantillon avant le tri, échantillons appelés protoplastes totaux.

	Gène		Fonction des protéine	Références	
Groupe 1 : CC et/ou cellules du phloème	SUC2	AT1G22710	transporteur de sucrose, SUC2	(Stadler & Sauer, 1996)	
	AKT2	AT4G22200	canal à potassium, AKT2	(Marten et al., 1999)	
	AHA3	AT5G57350	pompe H+/ATPase, AHA3	(DeWitt & Sussman, 1995)	
	PP2-A1	AT4G19840	lectine abondante dans la sève phloèmienne	(Dinant et al., 2003)	
	RTM1 AT1G05760		protéines bloquant le mouvement à longue distance d'un potyvirus, le Tomato etch virus (TEV)	(Chisholm et al., 2001)	
	RTM2	AT5G04890			
<u>Groupe 2 :</u> suspension cellulaire sans CC	EIN4	AT3G04580	récepteur à l'éthylène, EIN4	(Jung et al., 2009)	
	BRI1	AT4G39400	protéine impliquée dans la perception des brassinostéroïdes	(Wang et al., 2001)	
	PIN3	AT1G70940	transporteur de l'auxine	(Friml et al., 2002)	
Cellules du mésophylle	LHCA6	AT1G19150	composant du photosystème I	(Sawchuk et al., 2008)	

**Tableau 7 : Gènes testés en qPCR pour valider la spécificité du tri cellulaire**. Le groupe 1 réunit des gènes spécifiques des CC et des cellules phloémiennes, le groupe 2, des gènes fortement exprimés dans une suspension de cellules de mésophylle exempte de CC (Ivashikina et al., 2003) et le dernier gène n'est exprimé dans les CC mais dans les cellules du mésophylle.

J'ai sélectionné plusieurs gènes exprimés ou non dans certains types cellulaires (Tableau 7). Les gènes du premier groupe sont spécifiquement exprimés dans les CC et la protéine synthétisée se retrouve dans les cellules du phloème. Il s'agit des gènes *SUC2*, *AKT2/3*, *AHA3*, *PP2-A1*, *RTM1*, et *RTM2*. Les gènes du deuxième groupe ont été choisis d'après les résultats d'Ivashikina et al. (2003) qui les ont identifiés comme étant les plus exprimés dans une suspension contenant uniquement des cellules du mésophylle, exempte de CC. Il s'agit des gènes *EIN4*, *BRI1* et *PIN3*. Enfin, nous avons aussi recherché le transcrit du gène codant pour la protéine LHCA6 qui n'est exprimé que dans les cellules du mésophylle (Sawchuk et al., 2008).

Les valeurs d'expression obtenues par QPCR en temps réel ont été normalisées par les valeurs de trois gènes de référence dont l'expression reste constante durant les différents traitements appliqués (Lilly et al., 2011). Il s'agit des gènes *GADPH* (*AT1G13440*), *AT4G26410* et *TIP41-like* (*AT4G34270*).

D'une façon générale, les six gènes spécifiques des CC sont surexprimés dans les échantillons de cellules triées (Figure 29). Cependant il faut également noter une certaine variabilité entre plantes dans l'expression de ces gènes, allant par exemple pour le gène AHA3, d'un facteur 2 à un facteur supérieur à 10 dans les échantillons de protoplastes GFP (+). L'expression des gènes codant pour les transporteurs spécifiques des CC (SUC2, AKT2 et AHA3) est nettement plus forte dans les échantillons de protoplastes triés GFP+ que dans les échantillons de protoplastes non triés. On observe notamment un enrichissement moyen en messagers du gène SUC2 de 7,8 fois dans les protoplastes triés GFP (+), de 5 fois pour le gène AHA3 et de 4,7 fois pour le gène AKT2. Les ARN messagers du gène PP2-A1 sont également 3,9 fois plus abondants. Pour les gènes RTM1 et RTM2, l'augmentation de l'expression des gènes est plus variable et moins forte mais elle est cependant bien réelle. Ainsi en moyenne, on retrouve 2,8 fois plus de transcrits du gène *RTM1* et 1,8 fois plus pour le gène *RTM2* dans les protoplastes triés que dans la suspension protoplastique totale. Cependant il faut noter une forte variabilité dans le cas du gène RTM2 puisque la moitié des plantes ne montrent pas de surexpression du gène en question. Par exemple, on retrouve dans les plantes 3, 4 et 6 une augmentation de l'expression du gène alors que les plantes 2 et 5 ne montrent pas de variation significative avec l'échantillon de protoplastes totaux, et la plante 1 présente même une légère

AHA3 SUC2 AKT2 Ċ. Ē RTM2 RTM1 **PP2-A1** I E 1,5 EIN4 **BRI1** PIN3 1,5 T Т 0,5 n Figure 29: Mesure de l'expression relative de gènes LHCA6 marqueurs par PCR quantitative dans des échantillons de protoplastes GFP+, triés par FACS par rapport à un échantillon de protoplastes totaux, non triés. Les chiffres de 1 à 6 indiquent les résultats obtenu pour chacune des six plantes. Gènes exprimés dans les CC, gènes majoritaires dans le mésophylle, gène exprimé spécifiquement dans les cellules du 0,5 mésophylle. Protoplastes totaux Protoplastes GFP+ 

diminution de l'expression de *RTM2*, ce qui est en contradiction avec ce que l'on devrait trouver.

En ce qui concerne les gènes identifiés par Ivashikina et al. (2003), comme majoritairement exprimés dans les cellules du mésophylle (*BRI1, PIN3* et *EIN4*), seul le troisième gène, le gène *BRI1* répond comme prévu. L'expression moyenne de ce gène est significativement diminuée, puisque l'on retrouve 1,4 fois moins de messagers dans les protoplastes triés que totaux. A l'inverse, on constate des résultats surprenants pour les gènes *EIN4* et *PIN3*. En effet, aucune différence d'expression du gène *EIN4* n'est observée entre les protoplastes triés GFP (+) et la suspension cellulaire totale. Par contre, on peut remarquer une surexpression significative du gène *PIN3* dans les 6 plantes alors que l'on s'attendait à une baisse d'expression dans les cellules triées. L'expression du gène *LHCA6*, qui est spécifiquement exprimé dans les cellules du mésophylle, est sans surprise diminuée de 1,8 fois dans les cellules triées.

Ces résultats montrent que les échantillons de cellules triées ne contiennent pas uniquement des cellules compagnes ou des cellules phloémiennes puisque l'on a identifié dans nos échantillons des transcrits de gènes exprimés dans le mésophylle. On peut cependant affirmer que les suspensions de protoplastes triés sont fortement enrichies en cellules phloémiennes, car l'accumulation d'ARNm de gènes spécifiques de ces cellules (*SUC2, AHA3, AKT2, PP2-A1* et *RTM1*) est nettement amplifiée. En ce qui concerne les gènes précédemment identifiés comme majoritaires dans des cellules du mésophylle (*BRI1, EIN4* et *PIN3*), les résultats ne sont pas tranchés car ces gènes sont très vraisemblablement aussi exprimés dans les cellules phloémiennes. Les données de qPCR n'étant pas présentées dans la publication d'Ivashikina et al. (2003), il est difficile de juger. Une autre hypothèse serait que ces gènes, en particulier le gène *PIN3* codant pour un transporteur de l'auxine, pourraient perdre leur spécificité d'expression lors de la préparation des protoplastes, plus longue dans notre cas que dans les expériences publiées par Ivashikina et al. (2003).

Dans cette analyse, il aurait été plus rigoureux de comparer les échantillons de protoplastes triés GFP (+) à des échantillons de protoplastes triés comme GFP (-) (idéalement les cellules non sélectionnées lors du tri par FACS) afin d'avoir des résultats plus significatifs. Plusieurs essais ont été réalisés mais les ARN extraits de ces cellules GFP (-) se sont toujours avérés dégradés ou fortement contaminés par

d'autres composants (débris cellulaires, cellules mortes pouvant libérer des RNases). Nous avons donc choisi de comparer les échantillons GFP (+) avec une suspension de protoplastes totaux, tout en sachant que la suspension totale contient aussi des cellules phloémiennes et que les différences d'expression de certains gènes peuvent donc être atténuées. De plus, la préparation de protoplastes a été optimisée pour isoler les cellules phloémienne et a donc pu entraîner la perte de certaines autres cellules. En conclusion, la technique du FACS associée aux protoplastes a permis un enrichissement notable en cellules phloémiennes dans nos échantillons plutôt qu'un tri sélectif rigoureux. Un autre point important peut être tiré de cette expérience : quelque soit le gène analysé, on constate une variabilité importante entre plantes, variabilité qui de plus est, observée au niveau des gènes: une même plante peut présenter une expression élevée de certains gènes spécifiques aux CC, alors que d'autres gènes, eux aussi spécifiques des CC, ne varieront pas. Ces résultats justifient donc pleinement le fait de regrouper les échantillons, à savoir les plantes dans nos expériences futures, afin de lisser ces variations intrinsèques.

# II. Etude transcriptomique de cellules compagnes infectées par le LMV ou par le TuYV

## 1. Introduction

a. Description de l'expérience biologique



**Figure 30 : Descriptif de l'expérience biologique.** 50 feuilles issues de 15 à 20 plants d'*A. thaliana* pSUC2::GFP ont été prélevées puis dilacérées. Après un bain de quatre heures dans une solution enzymatique permettant la libération de protoplastes, ceux-ci subissent plusieurs lavages et centrifugations afin d'éliminer les débris et restes de parois. La suspension cellulaire est ensuite aliquotée et chaque échantillon est trié par FACS qui permet la séparation des cellules exprimant la protéine GFP des autres. Les ARN sont extraits de chaque échantillon et après vérification qualitative et quantitative, ils sont utilisés pour les analyses transcriptomiques (RNAseq, puces microarray CATMA) et pour les tests de qPCR.

Afin d'identifier les gènes cellulaires spécifiquement exprimés dans les cellules compagnes de plantes infectées par les phytovirus TuYV ou LMV, j'ai infecté des plants d'*Arabidopsis thaliana* transgéniques pSUC2::GFP (fond génétique : écotype
C24) âgés de six semaines (stade huit feuilles). Les deux virus étant inoculés de manière différente, un contrôle négatif spécifique était nécessaire pour chacun d'entre eux. Pour 20 plantes infectées, 20 plantes contrôles ont été utilisées pour chaque virus. Ainsi le LMV a été inoculé mécaniquement à partir d'un broyat de feuilles de laitue infectées par l'isolat de LMV AFVAR1 qui contourne les résistances RTM présentes chez *A. thaliana* C24 (Decroocq et al., 2009). Les plantes contrôles (T-) ont été traitées seulement avec du tampon de broyage. Le TuYV a été transmis par agro-infiltration en utilisant le clone pBIN BW<sub>0</sub> (Leiser et al., 1992). Comme contrôle négatif, j'ai agro-infiltré les bactéries portant le vecteur binaire pBIN61 vide. 22 jours après inoculation, les plantes ont été testées par immuno-empreintes de pétioles en utilisant des anticorps spécifiques des protéines de capside de chaque virus (Figure 31). Dans certaines expériences, l'infection a été confirmée par PCR après rétro-transcription de séquences virales (Figure 32).



**Figure 31 : Immuno-empreintes de pétioles d'***A.thaliana* **infectés par le LMV ou le TuYV (feuilles systémiques).** (A) Pétiole non-infecté. (B) Pétiole de plante infectée par le LMV. Marquage avec un anticorps reconnaissant la CP du LMV, couplé à la peroxydase. Le LMV est présent dans tous les tissus. (C) Pétiole de plante infectée par le TuYV. Marquage avec un anticorps reconnaissant la protéine RT du TuYV, couplé à la phosphatase alcaline. Le TuYV est localisé au niveau des faisceaux vasculaires.



**Figure 32 : Contrôle par PCR suite à une retro-transcription des ARN, de l'infection dans les protoplastes triés.** (1) Contrôle positif de PCR pour le LMV (2) Protoplastes de CC triés, contrôle négatif LMV (3) Protoplastes de CC triés infectés par le LMV (4) Contrôle positif de PCR pour le TuYV (5) Protoplastes de CC triés, contrôle négatif TuYV (6) Protoplastes de CC triés infectés par le TuYV

Le délai de trois semaines est nécessaire pour permettre la mise en place de l'infection dans les feuilles systémiques, mais également pour obtenir des rosettes suffisamment développées, à partir desquelles les protoplastes peuvent être isolés. Pour s'affranchir de la variabilité entre plantes, des feuilles de toutes les plantes infectées ou témoin ont été récoltées pour la suite de l'expérience. Pour chaque condition, 50 jeunes feuilles (d'environ 1,5 cm) prélevées sur 15 à 20 plantes (soit deux à trois feuilles par plante) ont servi à la préparation des protoplastes qui seront triés par FACS le même jour. Cette suspension cellulaire a été divisée en plusieurs tubes (cinq ou six tubes) pour écourter le temps de manipulation de l'échantillon et donc préserver au maximum l'intégrité des cellules. Un échantillon de protoplastes provenant de plantes Col0 non transgéniques et non traitées a été préparé en parallèle afin de servir de contrôle négatif lors du tri de cellules exprimant la protéine GFP (Figure 28). Après extraction des ARN de ces échantillons triés, leur qualité a été vérifiée par Bioanalyzer (Figure 33). Le RIN n'étant pas un paramètre de choix suffisant (en particulier pour des échantillons issus de plantes à cause des ARN ribosomaux supplémentaires), les ARN ont aussi été sélectionnés selon l'allure générale de la courbe obtenue par le Bioanalyzer.



**Figure 33 : Exemple de profils (Bioanalyzer) des ARN extraits de protoplastes de CC (expérience Exp1).** Ces échantillons d'ARN présentent des profils dont la qualité est très correcte (RIN autour entre 5,3 et 6,5), mise à part une légère dégradation dans l'échantillon du TuYV.

J'ai également vérifié par qPCR (PCR en temps réelle permettant de quantifier l'expression d'un gène), l'accumulation des messagers de la protéine GFP dans les échantillons triés par rapport aux échantillons totaux (Figure 34). Plusieurs expériences d'infection ont été réalisées tant la quantité et la qualité des ARN obtenus se sont avérés assez variables. Au final, les ARN provenant de six expériences d'infection ont été utilisés au cours de cette étude, quatre ont été analysés par les techniques à haut débit, soit par séquençage à haut-débit (Illumina), soit par hybridation de puces CATMA (Tableau 8). Mais seules deux expériences ont pu être analysées en parallèle par les deux technologies (Exp1 et Exp3). En effet, en raison de quantités limitantes d'ARN de qualité (RIN>5,5), la seconde expérience (Exp2) n'a été analysée que par séquençage à haut-débit et l'expérience (Exp4) que par puces CATMA. Les ARN des expériences Exp5 et Exp6, dont la qualité n'était pas assez élévée pour les techniques plus pointues de RNAseq et d'hybridation sur puces, ont servi pour la validation par qPCR des dérégulations de certains gènes identifiés par les analyses transcriptomiques.



**Figure 34 : Exemple des variations du taux d'expression de l'ARNm de la GFP dans les échantillons de protoplastes de CC triés pour le TuYV et son témoin.** Les taux d'expression des messagers sont normalisés par rapport à l'échantillon de protoplastes non triés.

		Quantité d'ARN	Moyenne RIN	RNAseq	Puces CATMA	PCR quantitative	Tableau 8 : Récapitulatif					
	LMV	19,4 µg	6,5	,		,	quantité des APN					
Erm1	Т-	24,7 μg	6,3		~	v	ovtraite nour los six					
схрт	TuYV	17,6 µg	4,9	/*			extraits pour les six					
	pBIN vide	17,9 μg	5,6	v	v	v	(Error 1 ) Error () La sus antité					
	LMV	4,5 μg	6,4				(Expl a Exp6). La quantite					
Evn2	T-	16 µg	4,9	,			totale d'ARN représente la					
LVb7	TuYV	9 μg	5,9				somme des ARN extraits					
	pBIN vide	2,1 μg	7,1	-			des 5 ou 6 tubes					
	LMV	22,4 μg	5,6		1	1	d'échantillons et le RIN					
Euro?	T-	38,3 µg	4,4				mentionné ici est le RIN					
схрэ	TuYV	27,9 μg	5,5	,		,	moven de ces 5 ou 6 tubes					
	pBIN vide	48,9 µg	4,8	~	· · ·		✓: utilisation réalisée pour					
	LMV	8,4 μg	5,9		1		chaque répétition, * les					
Fyn4	T-	12,6 µg	5,4									
Бур г	TuYV	6,4 μg	4,8		1	1	lifely and the sequencing of the					
	pBIN vide	8,9 μg	4,8									
	LMV	6,3 µg	5,2			1	etant partielles, cette					
ErroF	Т-	16,5 μg	2,9				experience n'a donc pas pu					
схрэ	TuYV	13,8 µg	4,4				être prise en compte pour					
	pBINvide	39,5 μg	4,1			7	le TuYV.					
Exp6	LMV	22,8 µg	4,6									
	Т-	22,1 μg	2,2									
	TuYV	16,2 μg	3,7			1						
	pBIN vide	29,4 μg	4,1									

#### b. <u>Séquençage à haut-débit</u>

Le séquençage à haut-débit a été réalisé par la plateforme « Biopuces et Séquençage » de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC, Illkirch-Graffenstaden). C'est la technologie Illumina HiSeq 2500 qui a été utilisée, en séquençant des fragments de 54 pb sur un seul brin (single-end). La technologie de multiplexage (marquage de chaque échantillon par des adaptateurs différents permettant le séquençage de plusieurs échantillons sur une même ligne) n'étant pas encore disponible à l'IGBMC, chaque échantillon a été traité individuellement, d'où le nombre très élevé de lectures ou « reads » (Tableau 9).

La première étape précédant le séquençage à haut débit est la construction d'une banque d'ADNc, à partir d'ARN polyadénylés, sélectionnés sur une colonne d'oligo dT. Après fragmentation et transcription inverse, des adaptateurs spécifiques sont ligués à chaque extrémité de ces fragments d'ADNc. Ils sont ensuite déposés au niveau d'une « piste », sur une « lame de séquençage » appelée « flowcell » recouverte d'amorces spécifiques complémentaires aux adaptateurs qui ont été ajoutés aux fragments d'ADNc. L'amplification « en pont » par PCR et le séquençage de ces fragments se font au niveau de « clusters » isolés sur la lame. Le séquençage est réalisé par incorporation de bases modifiées, marquées par des fluorochromes différents.

Des analyses qualitatives du séquençage ont été effectuées pour s'assurer de la bonne répartition des nucléotides au cours des différents cycles et du taux d'erreur de cette incorporation. Un exemple de cette analyse qualité est présenté dans la Figure 35.



Figure 35 : **Exemple de contrôle qualité de l'échantillon LMV de l'expérience Exp2 analysé par RNAseq.** (A) Scores de qualité « phred » le long de la séquence des « reads » permettant d'évaluer le taux d'erreurs au fur et à mesure des cycles. (B) Répartition des différents nucléotides le long de la séquence des « reads ». Les séquences obtenues, ou « reads», ont ensuite été alignées sur le génome de référence d'*A. thaliana* (TAIR10) en utilisant les logiciels d'alignement Tophat v1.3.1 (Trapnell et al., 2009) et Bowtie v.0.12.7 aligner (Benjamini et al., 2001). Les « reads » correspondant à la séquence nucléotidique du LMV ont été écartés avant l'alignement (dans les échantillons concernés) car ce virus possède, contrairement au TuYV, une queue polyA en 3' de son génome et a donc été amplifié et séquencé en même temps que les transcrits de la plante.

Le Tableau 9 récapitule les résultats globaux du séquençage : le nombre de reads, le pourcentage d'alignement des reads sur le génome de référence et la proportion de reads uniques obtenus. Les pourcentages d'alignement sont bons puisqu'ils recouvrent pour la plupart plus de 90 % du génome de référence, sauf pour l'échantillon pBINvide1 où les reads uniques ne recouvrent que 10,97 % du génome. Seule une petite partie du génome est donc représentée dans cet échantillon. Cette valeur anormale peut s'expliquer par une dégradation de l'échantillon d'ARN avant la construction de la banque. Je ne considérerai donc pas par la suite cette expérience (Exp1) pour le TuYV.

	Echantillons	Nombre de reads	Pourcentage de reads alignés	Pourcentage de reads uniques alignés	
	LMV1	27 740 866	89,86%	87,38%	
Even 1	T-1	20 754 589	90,84%	88,17%	
ЕХРІ	TuYV1	21 405 013	91,25%	88, 02 %	
	pBINvide1	24 792 291	95,16%	10, 97 %	
	LMV2	26 333 431	92,14%	85,37%	
Even 2	T-2	27 662 832	91,16%	86,09%	
Expz	TuYV2	20 176 649	89,62%	84,63%	
	pBINvide2	26 824 129	90%	81,09%	
	LMV3	29 124 974	93,35%	89,61%	
Frm2	T-3	28 734 278	93,39%	90,58%	
схрэ	TuYV3	29 912 304	93,39%	90,29%	
	pBINvide3	31 019 989	95,22%	90,13%	
Table	au 9: Résultat	ts globaux des	analyses de l	RNAseq des trois	
expréi	riences Exp1, F	Exp2 et Exp3: 1	nombre de "re	ad" obtenus pour	
chaqu	e échantillon et	taux de couver	ture du génome	2.	

Le logiciel Cufflinks v0.9.3 (Trapnell et al., 2010) a été utilisé pour l'analyse de la quantification de l'expression génétique. La comparaison du taux d'expression a été effectuée selon l'approche proposée par Anders and Huber (2010) et validée par la méthode statistique du False Discovery Rate (FDR) de Benjamini et al. (2001). Pour nos analyses, je n'ai considéré que des différences de taux d'expression avec des FDR< 5 %.

## c. Puces CATMA

L''hybridation de puces a été effectuée à la plateforme transcriptomique de l'Unité de Recherche en Génomique Végétale (URGV, Evry). Les puces utilisées sont des puces CATMA (Complete Arabidopsis Transcriptome MicroArray) version 5 (v5) qui contiennent 34660 spots. Chaque spot est constitué d'une sonde d'ADN double brin (Gene-specific Sequence Tags: GST), correspondant à des fragments de gènes amplifiés par PCR et choisis pour être les plus spécifiques possibles des gènes d'*A. thaliana* mais aussi de certains marqueurs de sélection, gènes rapporteurs, gènes chloroplastiques et mitochondriaux, gènes humains et différents contrôles. Au final, 24 576 GST sont spécifiques au génome d'*A. thaliana*, dont 22089 gènes ont été prédits sur la base d'annotation EuGene (Schiex, 2001).

Comme précédemment, la première étape est la construction d'une banque d'ADNc, qui est marquée par deux fluorochromes : soit la cyanine Cy-3 (vert) soit la cyanine Cy-5 (rouge). Les lames sont ensuite hybridées avec ces ADNc marqués et l'intensité de fluorescence est mesurée pour chaque spot. Une répétition technique d'inversion des fluorochromes (dye-swap) est effectuée pour chaque échantillon afin d'éliminer les biais liés au marquage. Après analyse statistique de ces résultats de dye-swap, on obtient des valeurs correspondant aux variations d'intensité de fluorescence selon les conditions biologiques testées, sous la forme d'un logarithme de base 2 ou log2 des ratios moyens de ces intensités. Ces valeurs représentent la variation du taux d'expression pour un gène donné, entre nos deux conditions (infectés/contrôle). La différence d'intensité a été validée par un T-test avec une variance commune et une correction de Bonferroni. Je n'ai considéré que les différences d'expression avec une p-value de Bonferroni < 0,05, quel que soit la valeur du log2 du ratio entre les deux échantillons considérés.

L'expression des gènes marqueurs codant pour la protéine GFP et pour la résistance à la kanamycine des échantillons étudiés a été vérifiée par la présence de GST spécifiques à ces deux gènes (Annexe 1).

#### d. Critères d'analyse des données de transcriptomiques

Afin d'extraire le maximum d'informations des analyses transcriptomiques, j'ai choisi dans un premier temps d'étudier, pour chaque technologie et pour chaque virus, les résultats des expériences prises individuellement pour identifier les gènes dérégulés. Dans un deuxième temps, j'ai considéré la moyenne des valeurs obtenues pour l'ensemble des gènes afin de constituer une liste principale des gènes dérégulés. Une liste commune aux deux technologies a ensuite été compilée pour chaque virus. C'est cette liste principale qui a servi de base aux analyses d'ontologie et au choix des gènes qui ont été analysés par qPCR.

Enfin, j'ai complété cette analyse en recherchant selon l'ontologie des familles de gènes, celles qui présentent un enrichissement notable dans les échantillons infectés par rapport aux témoins. En philosophie, l'ontologie est une branche étudiant les propriétés générales de ce qui existe. Par analogie, l'ontologie en informatique consiste à regrouper des termes ou concepts selon un certain nombre d'informations. En bioinformatique, un consortium a été créé en 2007 (Ashburner et al., 2000) afin de structurer la description des gènes présents dans l'ensemble des banques de données et dans le cadre d'une ontologie commune à toutes les espèces. Ainsi dans le projet « Gene Ontology » (GO) (http://www.geneontology.org), trois types de classification ont été définis : les composants cellulaires, les fonctions moléculaires, les processus biologiques.

L'outil d'analyse FATIGO disponible sur le site internet de Babilomics (http://bioinfo.cipf.es/babelomicswiki/tool:fatigo) m'a permis d'évaluer l'enrichissement en termes de GO représentés parmi les gènes identifiés lors de cette étude transcriptomique. L'enrichissement a été calculé pour chaque répétition afin d'observer une sur-représentation de certaines familles géniques appartenant à certains processus biologiques ou fonctions moléculaires. Etant donné le faible nombre de gènes dérégulés identifiés par RNAseq avec un FDR < 5 %, j'ai choisi d'augmenter le nombre de gènes dérégulés en élargissant le seuil de FDR considéré à 10 % pour le calcul de l'enrichissement des échantillons seulement et ceci afin d'avoir des résultats plus significatifs en ce qui concerne le type de processus potentiellement impliqués dans l'infection virale dans les cellules compagnes.

## 2. Etude transcriptomique de cellules compagnes de plantes infectées par le LMV

### a. Analyse par RNAseq des expériences d'infections par le LMV

#### Comparaison des expériences analysées individuellement

Les ARN issus de trois expériences d'infection par le LMV ont été analysées par séquençage à haut débit (Exp1, Exp2 et Exp3) mais seules deux d'entre elles ont aussi été analysées par puces CATMA (Exp1 et Exp3). Chaque répétition en RNAseq a mis en évidence respectivement 161, 191 et 70 dérégulations de gènes dans les CC infectées par le LMV (Figure 36A), 31 sont communes aux expériences Exp1 et Exp2, sept aux expériences Exp1 et Exp3 et sept aux expériences Exp2 et Exp3. Aucun gène n'a été retrouvé dérégulé dans les trois essais à la fois. La majorité des dérégulations observées dans les trois expériences sont des surexpressions de gènes.

Le faible nombre de gènes dérégulés partagés entre les différentes répétitions traduit un manque de reproductibilité. La raison principale de ces variations est sans aucun doute la durée de l'expérience. En effet, il est difficile de contrôler de manière stricte les conditions de culture des plantes pendant les 4 semaines d'infection (infestation possible par certains parasites, irrégularité des arrosages, problèmes techniques au niveau de l'éclairage ou de la température). Par ailleurs, le nombre d'étapes critiques (infection, préparation de protoplastes, tri cellulaire) est important, ce qui augmente encore l'impact sur la variabilité possible des résultats.

## • <u>Analyse de la moyenne des valeurs obtenues lors des expériences de</u> <u>RNAseq</u>

Malgré la variabilité importante entre les répétitions biologiques, j'ai choisi de considérer les moyennes des valeurs de dérégulations (log2ratio infectées/saines) des trois expériences qui présentent des FDR < 5 % et de traiter ces expériences en triplicat biologique. Cette méthode d'analyse statistique a permis de mettre en évidence 58 dérégulations de gènes dans les CC de plantes infectées par le LMV dont 40 surexpressions et 18 répressions (Figure 36C). Ces gènes sont listés dans le Tableau 10 appelé LMVseq.

Gènes	Description	T- (normalisée)	LMV (normalisée)	log2FC	p-value ajustée
AT2G31018	/	84	0	-Inf	1,90E-07
AT1G32650	/	82	0	-Inf	2,47E-06
AT3G52302	/	74	0	-Inf	8,25E-06
AT2G45161	/	59	0	-Inf	8,59E-06
AT4G35589	/	44	0	-Inf	0,001267
AT2G07684	/	30	0	-Inf	0,008534
AT2G20784	/	28	0	-Inf	0,006721
AT3G45851	/	23	0	-Inf	0,041100
AT1G05220	Transmembrane protein 97, predicted	22	0	-Inf	0,029476
AT1G48598	CPuORF31 (Conserved peptide upstream ORF)	299	8	-5,18	1,85E-08
AT3G60140	DIN2 (dark inducible 2)	911	65	-3,81	1,85E-08
AT3G16670	Pollen Ole e 1 (allergen and extensin family protein)	99	8	-3,70	0,008534
AT1G73602	CPuORF32 (Conserved peptide upstream ORF)	138	11	-3,66	0,005120
AT5G64395	/	345	38	-3,18	0,001037
AT1G52400	BGL1 (beta glucosidase 18)	2586	420	-2,62	0,010044
AT1G10060	BCAT-1 (branched-chain amino acid transaminase 1)	216	35	-2,62	0,037794
AT5G24770	VSP2 (vegetative storage protein 2)	1742	295	-2,56	0,012949
AT5G46730	glycine-rich protein	1297	332	-1,97	0,029961
AT1G13340	Regulator of Vps4 activity in the MVB pathway protein,	1037	3843	1,89	0,030651
AT3G22600	Lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily	2557	10589	2,05	0,007107
AT5G49730	ATFRO6 (ferric reduction oxidase 6)	254	1051	2,05	0,043822
AT3G57260	BGL2 (beta-1,3-glucanase 2) or PR2	405	1687	2,06	0,018617
AT3G22620	Lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily	130	571	2,13	0,027911
AT3G60120	BGLU27 (beta glucosidase 27)	95	419	2,15	0,030749
AT5G13080	WRKY75 (WRKY DNA-binding protein 75)	476	2130	2,16	0,009607
AT1G74590	GSTU10 (glutathione S-transferase TAU 10)	167	749	2,16	0,021128
AT4G23700	ATCHX17 (cation/H+ exchanger 17)	78	354	2,18	0,047115
AT2G30770	CYP71A13 (cytochrome P450)	400	1845	2,21	0,002679
ATCG00020	PSBA (photosystem II reaction center protein A)	1336	6584	2,30	0,005391
AT5G46050	ATPTR3 (peptide transporter 3)	52	261	2,33	0,039581
AT1G75040	PR5 (pathogenesis-related gene 5)	575	3090	2,43	0,001286
AT3G26830	PAD3 (Cytochrome P450 superfamily protein) or CYP71B15	477	2583	2,44	0,000494
AT1G24040	Acyl-CoA N-acyltransferases (NAT) superfamily protein	40	223	2,46	0,047115
ATCG00590	ORF31 electron carriers	62	349	2,49	0,045412
AT1G13520	Protein of unknown function (DUF1262)	160	951	2,57	0,001935
AT1G26380	FAD-binding Berberine family protein	892	5696	2,67	6,59E-05
AT3G18250	Putative membrane lipoprotein	32	214	2,76	0,016873
AT2G14610	PR1 (pathogenesis-related gene 1)	474	3329	2,81	9,07E-05
AT2G30750	CYP71A12 (cytochrome P450)	19	158	3,04	0,027911
AT1G06137	/	13	117	3,16	0,028455
AT3G15534	/	13	122	3,22	0,026328
ATCG00510	PSAI (photsystem I subunit I)	16	149	3,23	0,008534
AT3G11000	DCD (Development and Cell Death) domain protein	5	84	3,94	0,016873
AT5G13181	/	7	115	4,13	0,004961
AT5G40180	/	4	75	4,41	0,005120
AT1G13480	Protein of unknown function (DUF1262)	4	88	4,53	0,005120
AT1G24735	S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein	1	64	6,60	0,001286
AT5G42203	/	0	131	Inf	5,45E-09
AT3G48298	/	0	123	Inf	1,85E-08
AT3G26539	/	0	44	Inf	0,003154
AT1G65541		0	38	Inf	0,007798
AT1G18220	ATPUP9 (purine permease 9)	U	36	Inf	0,010912
AT1G07885		0	36	Int	0,012371
A15G12450	FBD-like domain family protein	U	35	Inf	0,015272
A13G1/845	/	0	33 22	Int	0,01/553
AT2G26511		0	33	Inf	0,023101
AT2G36632	/	0	29	Inf	0.037794
	/	5			0,007751

**Tableau 10 : Tableau LMVseq regroupant les gènes dérégulés dans les protoplastes de CC infectés par le LMV, identifiés par RNAseq à partir de la moyenne des valeurs des dérégulations des 3 répétitions (58 gènes).** Le nombre de « reads » est indiqué pour chaque gène pour les conditions sain et infecté. Le différentiel d'expression est indiqué par le log2ratio de ces deux valeurs (FDR < 5%). En bleu figurent les gènes qui seront testés en qPCR. Log2FC : Log2FoldChange.

#### b. <u>Analyse par puces CATMA des expériences d'infections par le LMV</u>

#### • Comparaison des expériences analysées individuellement

Les ARN extraits de 3 expériences d'infection ont été analysées par hybridation sur puces CATMA (Exp1, Exp3 et Exp4), deux d'entre elles ayant aussi été analysées par séquençage à haut débit (Exp1 et Exp3). De façon surprenante, l'expérience Exp3 a produit un nombre de gènes particulièrement élevé comparé aux deux autres expériences (592 gènes contre 183 pour l'expérience Exp1 et 66 pour l'expérience Exp4) dans les CC de plantes infectés par le LMV (Figure 36A), 33 gènes sont communs uniquement aux expériences Exp1 et Exp3, six uniquement aux expériences Exp1 et Exp4, 15 uniquement aux expériences Exp3 et Exp4. On retrouve aussi huit gènes communs à ces trois expériences: un gène surexprimé qui code pour une protéine de la famille des LTP (*AT3G22600*) impliquée dans la réponse de la plante aux stress et sept gènes réprimés lors de l'infection. Il s'agit des gènes identifiés dans la liste LMVtot (Annexe 2) *LSU2 (AT5G24660), LSU3 (AT3G49570), LSU4 (AT5G24655) et APR1 (AT4G04610)* qui sont tous impliqués dans le métabolisme du soufre ainsi les gènes *TGG1 (AT5G26000), TGG2 (AT5G25980) et CYP710A1* (*AT2G34500*).

Comme précédemment, cette analyse transcriptomique reflète une forte variabilité entre les différentes répétitions biologiques. Néanmoins, et contrairement à l'analyse par séquençage à haut débit, quelques gènes communs à ces trois répétitions ont été identifiés.

# • <u>Analyse de la moyenne des valeurs obtenues lors des expériences sur puces CATMA</u>

Nous avons considéré, comme pour les gènes analysés par RNAseq, la moyenne des répétitions biologiques. Cette méthode a mis en évidence 49 dérégulations lors de l'infection par le LMV, 19 surexpressions et 30 répressions (Figure 36C). Ces dérégulations sont détaillées dans le Tableau 11 appelé LMVcat.

Gènes	Description	Intensité LMV	Intensité T-LMV	log2ratio (I LMV/I T-LMV)	Pvalue
AT5G24660	LSU2 (response to low sulfur 2)	8,65	9,87	-1,22	0,00E+0
ATCG00790	RPL16 (ribosomal protein L16)	8,86	9,79	-0,93	0,00E+0
AT1G62180	APR2 (5'-adenylylsulfate reductase 2)	8,97	9,88	-0,91	7,70E-12
AT1G31930	XLG3 (extra-large GTP-binding protein 3)	7,09	7,96	-0,87	1,69E-10
ATCG00340	PSAB	8,61	9,47	-0,86	3,70E-10
AT4G04610	APR1 (5'-adenylylsulfate reductase 1)	7,23	8,07	-0,85	1,09E-9
AT3G49570	LSU3 (response to low sulfur 3)	7,91	8,75	-0,84	1,54E-9
AT3G46230	HSP17.4 (heat shock protein 17.4)	9,94	10,72	-0,79	4,59E-8
ATCG00300	YCF9	9,75	10,52	-0,77	1,27E-7
AT5G24655	LSU4 (response to low sulfur 4)	7,45	8,19	-0,74	9,88E-7
AT5G48850	ATSDI1 (Sulphur deficiency-induced 1)	6,59	7,30	-0,70	8,37E-3
AT5G24420	PGL5 (6-phosphogluconolactonase 5)	8,42	9,11	-0,69	1,89E-5
ATCG00280	PSBC	8,22	8,90	-0,68	2,79E-5
AT4G38470	ACT-like protein tyrosine kinase family protein	7,95	8,61	-0,66	1,11E-4
ATCG00480	ATPB (ATP synthase subunit beta)	11,05	11,71	-0,65	1,45E-4
ATCG00380	RPS4 (chloroplast ribosomal protein S4)	9,29	9,94	-0,65	1,68E-4
AT2G29500	17.6 kDa class I small heat shock protein	9,16	9,81	-0,65	2,33E-4
AT5G52640	HSP81-1 (HEAT SHOCK PROTEIN 81-1)	9,50	10,11	-0,61	1,37E-3
AT3G49620	DIN11 (DARK INDUCIBLE 11)	7,11	7,72	-0,61	1,61E-3
AT4G38620	MYB4 (myb domain protein 4)	8,31	8,91	-0,59	3,23E-3
AT3G22890	APS1 (ATP sulfurylase 1)	9,83	10,40	-0,57	9,26E-3
AT4G11130	RDR2 (RNA-dependant RNA polymerase 2)	7,04	7,61	-0,57	1,03E-2
AT3G55970	JRG21 (jasmonate-regulated protein)	7,54	8,10	-0,56	1,41E-2
ATCG00800	/	8,86	9,42	-0,56	1,84E-2
ATCG00710	PSBH (photosyst II reaction center protein H)	9,39	9,94	-0,55	2,42E-2
AT1G75270	DHAR2 (dehydroascorbate reductase 2)	7,93	8,48	-0,55	2,55E-2
AT3G56200	amino acid transporter family protein	7,20	7,75	-0,55	2,73E-2
AT2G46240	BAG6 (BCL-2-associated athanogene 6)	9,28	9,82	-0,55	3,15E-2
ATCG00040	MATK (maturase K)	7,12	7,66	-0,54	3,56E-2
AT1G75280	Isoflavone reductase-P3	7,00	7,54	-0,54	4,03E-2
AT1G14870	PCR2 (cadmium resistance protein 2)	9,54	8,99	0,55	3,08E-2
AT2G47480	/	8,49	7,93	0,56	1,74E-2
AT5G57560	TCH4 (TOUCH 4)	8,65	8,09	0,56	1,55E-2
A12G38170	CAX1 (Cation Exchanger 1)	8,24	7,67	0,57	1,06E-2
ATIG11610	CYP7IAI8 (cytochrome P450 7IAI8)	7,39	6,82	0,57	1,02E-2
A15G35525	PLACE family protein	9,02	8,42	0,60	2,85E-3
AT4G24370	EAD binding and REE domain containing protein	8,50 7,70	7,89	0,61	1,475-3
AT1020380		0.21	7,05 9 E 4	0,01	
ATEC02210	/	9,21	0,54	0,67	3,002-3
AT5C03120	NDP1 (kinocin light chain like protein)	10,99 9 71	10,52 8 02	0,67	2,09E-2
AT5G10200	RING1 (F3 ubiquitin protoin ligaço)	0,/1 Q 15	7 16	0,00	2,405-2
AT1675040	PPS (pathogonosis related protein 5)	7 42	6.66	0,89	2,302-3
AT1075040	FRD (pathogenesis-related protein 5)	2 7 2	7 0/	0,75	4,5/E-/ 8 /5E.9
AT2G14610	PR1 (nathogenesis-related protein 1)	7 28	6 60	0,78	6.46F-8
AT1G1/880	PCR1 (cadmium resistance protein 1)	8 72	7 01	0,70	7 565-0
AT1612220	AHP2 (homologous-pairing protoin 2)	0,72 0.00	2 15	0,02	7,30L-3
AT5G55450	protease inhibitor/lipid transfer protein (LTP) family	7,85	6,85	1,00	6,96E-9
AT3G22600	protease inhibitor/lipid transfer protein (LTP) family protein	11,29	10,04	1,26	0,00E+0

**Tableau 11: Tableau LMVcat regroupant les gènes dérégulés dans les protoplastes de CC infectés par le LMV, identifiés par puces CATMA.** Les intensités de fluorescence moyennes de chaque sonde sont indiquées pour les deux échantillons, sain et infecté, ainsi que le log2ratio de ces deux valeurs qui nous permet d'évaluer une différence d'expression. En bleu figurent les gènes qui seront testés en qPCR.



**Figure 36 :** (A) Représentation par diagramme de Venn du nombre de gènes dérégulés lors de trois expériences d'infection par le LMV, analysés par RNAseq (Exp1, Exp2, Exp3) ou puces CATMA (Exp1, Exp3, Exp4). Dans le tableau ne sont considérés comme gènes communs à deux expériences que les gènes uniquement identifiés dans celles-ci. (B) Comparaison des gènes dérégulés lors de l'infection par le LMV pour les expériences Exp1 et Exp3, entre les deux techniques. (C) Comparaison des gènes dérégulés lors de l'infection par le LMV pour la moyenne des valeurs, entre les deux techniques. Le nombre de gènes induits ou réprimés est indiqué des les tableaux par (+) et (-) respectivement.

- c. Comparaison des résultats obtenus par les deux technologies
  - Comparaison des expériences analysées individuellement

Seuls les ARN extraits des expériences Exp1 et Exp3 ont été traités à la fois par les deux technologies : RNAseq et puces CATMA. L'analyse comparative des résultats a permis de mettre en évidence quelques similitudes mais également de nombreuses différences.

Dans le cas de l'expérience Exp1, on observe 161 dérégulations dans les CC de plantes infectées par le LMV en RNAseq et 183 en puces CATMA (**Figure 36**B). 39 dérégulations communes sont observées, dont celles concernant les gènes *LSU2*, *LSU3* et *APR1*, déjà retrouvés communs entre les trois expériences dans l'analyse des puces CATMA ainsi que le gène *GH3.3* (*AT2G23170*), impliqué dans la réponse à une stimulation par l'auxine.

En ce qui concerne la deuxième expérience (Exp3) analysée par les deux techniques, on observe 70 dérégulations dans les CC de plantes infectées par le LMV identifiées par RNAseq et 592 par puces (Figure 36B). 23 dérégulations ont été identifiées par les deux analyses dont le gène *GH3.3*, les gènes *PR5 (AT1G75040), PR1 (AT2G14610), PNP-A (AT2G18660)* et *PCC1 (AT3G22231)* impliqués dans la réponse aux stress.

Soulignons à nouveau le nombre de gènes dérégulés, particulièrement disproportionné entre les deux techniques pour cette expérience. En effet, on observe presque huit fois plus de gènes dérégulés en utilisant les puces CATMA que le RNAseq. Il semble donc qu'il y ait, pour cet échantillon, un biais dans l'analyse par puces CATMA, biais qui n'est retrouvé ni par RNAseq ni avec les autres répétitions.

#### • <u>Comparaison des gènes</u> dérégulés identifiés par les deux technologies

En comparant les listes LMVseq (Tableau 10) et LMVcat (Tableau 11), les gènes dérégulés par le LMV, c'est-à-dire 58 gènes pour le RNAseq et 49 pour les puces CATMA, on identifie 4 gènes communs : les gènes *PR1*, *PR5* et *AT3G22600*, impliqués dans la réponse aux stress et le gène *AT1G26380* codant pour une protéine de la famille des berbérines fixant le cofacteur FAD (Flavine adénine dinucléotide).

Au final, nous avons identifié par deux différentes techniques 103 gènes dont l'expression est modifiée dans les protoplastes de CC des plantes infectées par le LMV, 55 sont induits et 48 sont réprimés par l'infection. Ces 103 gènes sont listés avec leurs différentes caractéristiques dans le tableau LMVtot (Annexe 2).

## d. <u>Analyse de l'enrichissement en termes d'ontologie des échantillons infectés</u> <u>par le LMV</u>

Les tableaux récapitulant les termes de GO enrichis et leur pourcentage d'enrichissement sont à la fin du manuscrit, en annexes (Annexe 3 : RNAseq et Annexe 4 : puces CATMA).

#### • <u>RNAseq</u>

Il est difficile d'établir un enrichissement en termes de GO communs aux différentes expériences. En effet dans les processus biologiques, l'expérience Exp1 présente un enrichissement en gènes impliqués dans la réponse à différents stress, qu'ils soient biotiques (bactéries, champignons) ou abiotiques (réponse à la lumière, à la chaleur ou au stress oxydatif). On peut également signaler un enrichissement en gènes participant à la synthèse de camaléxine, une phytohormone ayant des propriétés antimicrobiennes. L'échantillon de l'expérience Exp2 présente principalement des enrichissements en gènes impliqués dans la photosynthèse. Dans l'expérience Exp3, on identifie une majorité de termes de GO liés aux stress biotiques (résistance systémique acquise ou la réponse de défense immune). Néanmoins, il faut signaler un enrichissement en termes de GO commun dans les expériences Exp1 et Exp2 concernant des gènes participant au métabolisme du soufre.

En ce qui concerne les gènes identifiés à partir de la moyenne des expériences, les enrichissements en termes de GO concernent des gènes impliqués dans la biosynthèse de phyto-alexines (composés antimicrobiens) et plus précisément de la camaléxine et dans la réponse aux stress biotiques comme le mécanisme de résistance systémique acquise (SAR).

#### • Puces CATMA

L'analyse des enrichissements en termes de GO parmi les processus biologiques montre des similitudes entre les trois expériences et la moyenne de celles-ci. Ainsi un enrichissement en gènes impliqués dans le métabolisme du soufre est observé dans toutes les expériences mais principalement dans les expériences Exp3 et Exp4 (Annexe 4). Les expériences Exp1 et Exp3 réunissent des enrichissements important en gènes participant au processus de photosynthèse et à la réponse aux stress biotiques et abiotiques. Enfin, des gènes de la voie de biosynthèse des glucosinolates sont également enrichis dans les expériences Exp3 et Exp4. L'expérience Exp1 montre également une forte représentation de gènes impliqués dans le processus de mort cellulaire. Il est également à noter que l'analyse ontologique des composés cellulaires confirme que les expériences Exp1 et Exp3 concentrent un grand nombre de termes de GO impliqués dans la photosynthèse (8 termes parmi les 9 les plus enrichis pour l'expérience Exp1). De plus, l'expérience Exp3 présente un certain nombre de termes GO se rapportant au protéasome et donc à la dégradation des protéines. Enfin, au niveau des fonctions moléculaires, le terme de GO lié à l'activité de conjugaison de l'auxine est sur-représenté dans l'expérience Exp1.

Les mêmes termes de GO sont retrouvés dans l'analyse des enrichissements réalisés pour les gènes dérégulés dans la moyenne des expériences, avec une accentuation sur les gènes impliqués dans le métabolisme du soufre (assimilation du soufre et métabolisme de composés soufrés), dans la régulation de la mort cellulaire et dans la réponse aux stress.

### • Comparaison des enrichissements en termes de GO obtenus après analyse par RNAseq et par puces CATMA

Pour l'expérience Exp1, les enrichissements en termes GO pour les deux techniques d'étude transcriptomique sont assez similaires: ils concernent des gènes impliqués dans la réponse à différents stress et dans le métabolisme du soufre.

Les enrichissements en termes de GO communs pour l'expérience Exp3 concernent des gènes impliqués dans la réponse aux stress comme le mécanisme de SAR et la réponse innée.

Dans la moyenne des expériences, les seuls enrichissements communs entre les deux techniques utilisées sont ceux concernant des gènes impliqués dans la réponse aux stress biotiques.

## e. <u>Validation de la dérégulation de certains gènes candidats par la technique de</u> <u>qPCR</u>

Afin de vérifier la validité des dérégulations de gènes obtenus par séquençage à haut débit et puces CATMA, un certain nombre de transcrits ont été quantifiés par PCR en temps réel sur les mêmes échantillons d'ARN (Exp1 et Exp3) ou sur des ARN issus d'une autre expérience (Exp5). Ces gènes ont été choisis principalement parmi ceux trouvés enrichis dans les processus biologiques dans nos échantillons par rapport à leur représentation dans le génome.

Il est intéressant de noter que parmi les 103 gènes dérégulés dans les deux jeux de données (LMVtot), sept participent au métabolisme du soufre et sont réprimés : il s'agit des gènes LSU2 (low sulfur 2), LSU3, LSU4, SDI1 (sulphur deficiency-induced 1), APR1 (APS reductase 1), APR2 et APS1 (ATP sulfurylase). Parmi ceux-ci, six gènes (tous sauf le gène *LSU3*) sont répertoriés dans un réseau de gènes co-régulés par identifié par ATTED-II (Obayashi et al., 2011). Ce site internet (http://atted.jp/index.shtml) permet de mettre en évidence des gènes co-régulés afin d'appréhender leur fonction (Figure 37A). L'analyse par qPCR confirme que ces sept gènes (Figure 38A) sont réprimés lors de l'infection par le LMV dans tous les échantillons, sauf les gènes APS1 et APR2 que l'on retrouve légèrement plus exprimés, dans les échantillons infectés que dans les témoins de l'expérience supplémentaire Exp5. De plus, le transcrit du gène *SDI1* n'a pas été détecté dans l'expérience Exp5. En conclusion, ces expériences de validation ont permis de confirmer la répression de ces sept gènes impliqués dans le métabolisme du soufre dans les mêmes expériences analysées par RNAseq et puces CATMA (Exp1 et Exp3), et de quatre gènes sur sept dans l'expérience supplémentaire (Exp5). Cette répression est globalement assez forte (minimum deux fois moins d'expression) et significative dans tous les échantillons testés.

Un autre réseau ATTED-II de gènes co-régulés a été identifié : il s'agit de gènes liés à la **réponse de SAR** (systemic acquired resistance): les gènes *PR1* (pathogenesis-



*LSU2/4* (low sulfur 2/4); *SDI1* (sulphur deficiency-induced 1); *APR1/2/3* (APS reductase 1/2/3); *APS1/3* (ATP sulfurylase 1/3); *SHM7* (serine hydroxymethyltransferase 7); *CPK 17/34* (calcium-dependant protein kinase 17/34); *BGLU28* (beta glucosidase 28); *CSLD4* (cellulose synthase like D4)



related gene 1), PR5, BGL2 (beta-1,3-glucanase 2) ou PR2 et AT5G55450 (Figure 37B). l'ai pu compléter cette liste avec deux gènes suspectés de participer également à ce mécanisme de défense, les gènes AT3G22600, AHP2 ainsi qu'avec trois gènes identifiés dans l'expérience Exp3, par les deux technologies : les gènes PNP-A (plant natriuretic peptide A), AT5G10760 et PCC1 (pathogen and circadian controlled 1). Ces trois gènes sont néanmoins tous induits dans les précédentes analyses mais à un niveau inférieur aux critères retenus. L'analyse par qPCR a permis de confirmer que l'ensemble de ces neuf gènes impliqués dans la réponse aux stress est induit lors de l'infection par le LMV (Figure 38B). La seule exception concerne les transcrits du gène *PCC1* dans l'expérience Exp1, que l'on retrouve en même quantité dans les échantillons sains et infectés. Ceci peut s'expliquer par le fait que ce gène n'a pas été trouvé dérégulé dans l'expérience Exp1 par RNAseq ou par puce CATMA. Ceci étant, c'est aussi le cas des gènes PNP-A et AT5G10760 pourtant en surexpression lors de ces manipulations de qPCR. Il est à noter également que malgré quelques tentatives, aucune amplification en qPCR n'a été détectée pour la recherche du gène AHP2 dans l'expérience supplémentaire Exp5.

Parmi l'ensemble non négligeable de gènes de stress dont l'expression est dérégulée par le LMV (environ 25 % des gènes dérégulés), la plupart sont induits en condition de virose. C'est le cas par exemple des gènes appartenant au réseau ATTED-II précédemment cités. Cependant, deux gènes codant pour des petites **protéines de stress thermique** (sHSP: small heat shock protein) se retrouvent réprimés : il s'agit des gènes *HSP17.4* (*AT3G46230*) et *AT2G29500* codant pour une protéine HSP de la superfamille des HSP20, anciennement nommée HSP17.6B. Cette observation a été confirmée par qPCR pour les deux gènes dans chacune des trois expériences testées (Figure 39A).



Métabolisme du soufre

Ayant identifié quatre gènes impliqués dans la biosynthèse de la camaléxine, hormone produite en réaction à divers pathogènes (dont les pucerons), j'ai choisi de vérifier leur niveau d'expression (Figure 39B). Trois d'entre eux proviennent des analyses de RNAseq, il s'agit des gènes *PAD3, CYP71A12* et *CYP71A13* et le dernier, le gène *CYP71A18*, provient des analyses CATMA. L'analyse par qPCR confirme que les gènes *PAD3, CYP71A12* et *CYP71A13* sont bien induits dans toutes les expériences d'infection, sauf dans une expérience (Exp5) où le transcrit du gène *CYP71A12* n'a pas pu être amplifié. Quant au transcrit du gène *CYP71A18*, il n'a jamais pu être détecté par qPCR quelle que soit l'expérience considérée, ceci peut être expliqué par le fait que l'expression de ce gène est très faible dans la plante sauf dans le pollen (Schmid et al., 2005). Sa valeur d'intensité est d'ailleurs assez faible sur la puce CATMA même si sa variation d'expression est statistiquement fiable.

Enfin, j'ai choisi de compléter cette analyse d'expression par qPCR avec 5 autres gènes: le gène *AT1G26380* (codant pour une protéine de la famille des berbérines), qui est surexprimé dans les deux types d'analyse, les gènes *DIN11, BAG6*, tous deux réprimés dans les analyses de puces CATMA, et les gènes *PCR2* et *WRKY75* surexprimés dans l'analyse de RNAseq pour le premier et dans celle de puces CATMA pour le second (Figure 39C). Le gène *BAG6* a également été identifié dans l'analyse du LMV mais il y était induit. Hormis pour le gène *BAG6* qui est clairement réprimé dans les échantillons infectés de toutes les expériences, les résultats de l'analyse par qPCR pour les autres gènes sont bien moins tranchés. Leur expression varie selon l'expérience considérée et n'est pas toujours celle attendue suite aux précédentes analyses, nous n'allons donc pas poursuivre les investigations avec ces gènes.











Ces expériences de validation par qPCR confirment pour une grande majorité des gènes testés les dérégulations identifiées précédemment. Le tableau ci-dessous (Tableau 12) récapitule les modifications d'expression de tous les gènes précédemment cités dans cette validation.

	<b>C</b> )				qPCR		
	Genes	5	RNAseq	Puces CATMA	Exp1	Exp3	Exp5
e	APR1	AT4G04610		-	-	-	-
oufr	APR2	AT1G62180		-	-	-	+
du s	LSU2	AT5G24660		-	-	-	-
me	LSU3	AT3G49570		-	-	-	-
olis	LSU4	AT5G24655		-	-	-	-
étak	APS1	AT3G22890		-	-	-	+
Σ	ATSDI1	AT5G48850		-	-	-	/
	PR1	AT2G14610	+	+	+	+	+
	BGL2 (PR2)	AT3G57260	+		+	+	+
	PR5	AT1G75040	+	+	+	+	+
	AT3G22600	AT3G22600	+	+	+	+	+
SAR	AHP2	AT1G13330		+	+	+	/
	AT5G55450	AT5G55450		+	+	+	+
	PNP-A	AT2G18660	+ (Exp3)	+ (Exp3)	+	+	+
	PCC1	AT3G22231	+ (Exp3)	+ (Exp3)	=	+	+
Autres Camalexine sHSP SAR Métabolisme du soufre	AT5G10760	AT5G10760	<b>+</b> (Exp3)	+ (Exp3)	+	+	+
SP	HSP17.4	AT3G46230		-	-	-	-
R	HSP17.6B-CI	AT2G29500		-	-	-	-
е	PAD3	AT3G26830	+		+	+	+
exir	CYP71A12	AT2G30750	+		+	+	/
mal	CYP71A13	AT2G30770	+		+	+	+
Ca	CYP71A18	AT1G11610		+	/	/	/
	AT1G26380	AT1G26380	+	+	+	-	+
s	DIN11	AT3G49620		-	+	-	/
utre	BAG6	AT2G46240		-	-	-	-
Ā	PCR2	AT1G14870		+	+	+	+
	WRKY75	AT5G13080	+		+	+	=

Tableau 12 : Validation par PCR quantitative, des variations d'expression de certains gènes<br/>obtenus après analyse par RNAseq et puces CATMA, lors d'une infection par le LMV dans des<br/>protoplastes de cellules compagnes. + : Induction de l'expression, - : Répression de<br/>l'expression, = : pas de changement d'expression entre les deux conditions, / : pas d'amplification,<br/>(Exp3): gènes dérégulés uniquement dans l'expérience Exp3

Ces résultats prouvent la pertinence des analyses transcriptomiques effectuées, que ce soit par séquençage à haut-débit ou par puces. Malgré les variations importantes des données entre les différentes répétitions biologiques et techniques d'analyse utilisées, notre choix d'analyse des différents jeux de données nous menant à la liste des 103 gènes dérégulés se trouve justifié par l'analyse par qPCR. Mis à part le gène *CYP71A18* dont le transcrit n'a pu être détecté, la technique de qPCR a confirmé la majorité des dérégulations observées par les analyses transcriptomiques à haut débit.

#### f. Etude des gènes dérégulés par le LMV et discussion

#### • Implication du LMV dans le métabolisme du soufre ?

Dans la plante, l'assimilation du sulfate produit du soufre réduit qui est utilisé pour la synthèse des acides aminés méthionine et cystéine, de coenzymes, de groupes prosthétiques et de nombreux métabolites secondaires. Le sulfate doit être activé en adénosine 5'-phosphosulfate (APSulfate) par une ATP sulfurylase (APS) (Figure 40). Cet APSulfate est ensuite réduit en sulfite par une APS réductase (APR), sulfite qui sera lui aussi réduit en sulfide par une sulfite réductase ferrédoxine-dépendante. Le sulfide pourra être incorporé pour former au final la cystéine qui est le donneur primaire de soufre réduit à toutes les réactions de biosynthèse qui en nécessitent (Leustek, 2002, Kopriva, 2006). Les deux gènes APR2 et APR1 que l'on a identifiés codent pour des adénosine 5'-phosphosulfate réductases et le gène *APS1* code pour une ATP sulfurylase qui permet d'adénylation du sulfate. Les gènes APS1, APR1 et APR2 sont activés par des facteurs de transcription MYB (Myeloblastosis) qui régulent également la biosynthèse des glucosinolates (Yatusevich et al., 2010). Cette biosynthèse est intimement connectée au processus d'assimilation du sulfate car la dernière étape nécessite le transfert d'un groupement sulfate (Yatusevich et al., 2010).



**Figure 40 : Assimilation du sulfate** (inspirée de Yatusevich et al., 2010). Le sulfate est activé par adénylation en APS (5'-phosphosulfate) par une ATP sulfurylase. L'APS est ensuite soit phosphorylé par une APS kinase en PAPS (3'-phosphoadénosine 5'-phosphosulfate) pour la synthèse des glucosinolates ou autres composés soufrés, soit réduit en sulfite par une APS réductase. Le sulfite est ensuite réduit en sulfide par une sulfite réductase. Le sulfide pourra être incorporé dans une acétylsérine pour former la cystéine.

Le gène *SDI1* est induit suite à une déficience de la plante en soufre. Il participerait plus précisément à l'utilisation du soufre stocké dans la plante lors d'un manque de soufre (Howarth et al., 2009). Le rôle des gènes *LSU2* (low sulfur), *LSU3* et *LSU4* reste pour le moment inconnu. Comme pour le gène *SDI1*, l'expression de ces gènes est fonction de la présence de soufre dans la plante.

Afin de vérifier si la dérégulation est spécifique aux protoplastes de CC infectés par le LMV ou bien si elle est observée au niveau de la plante entière (le LMV infectant presque tous les types de cellules), j'ai réalisé une cinétique d'infection pour analyser l'expression de certains de ces gènes-candidats. Les ARN ont été extraits de feuilles systémiques de deux plantes à un temps précoce (7 jours post-infection) et à un temps tardif (28 jours post-infection) et soumis à une analyse par qPCR en prenant en compte la moyenne des valeurs des deux plantes considérées. A 28 jours postinfection, les profils d'expression des gènes *LSU2, APR1, APR2, SDI1* dans les feuilles systémique est le même que celui observé dans les protoplastes de CC triées par FACS (Figure 41A), les dérégulations observées dans les CC ne sont donc pas spécifiques à ces cellules mais plutôt à l'infection par le LMV. Ceci est également en corrélation avec les dérégulations observées dans certaines analyses transcriptomiques de plantes infectées par d'autres *Potyvirus*. Ainsi les gènes *APR1* et *APS1* sont réprimés par le *Potyvirus* TuMV (Yang et al., 2007) et le *Geminivirus* CaLCuV (Ascencio-Ibanez et al., 2008) mais les gènes *APR1* et *LSU2* sont induits par le *Potyvirus* PPV (Babu et al., 2008). Le gène *APR2* est réprimé par le *Carmovirus* TCV mais induit par le TMV (Espinoza et al., 2007) (Tableau 13).

						A. tha	<i>liana</i> : Tra	anscrip	tome				
	Gènes		Proto- plastes CC	Proto- plastes totaux			Feui	illes de	plantes	infecté	es		
	Virus		LMV	PPV <sup>(1)</sup>	TEV (2)	TEV AT17	TuMV	PPV (1)	CMV (4)	TCV (5)	TMV (6)	TRV (7)	CalCuV
ufre	APR1	AT4G04610	-				-	+					-
lu so	APR2	AT1G62180	-							-	+		
ime o	LSU2	AT5G24660	-					-					
silode	APS1	AT3G22890	-				-						-
Méta	ATSDI1	AT5G48850	-	$\checkmark$									
	PR1	AT2G14610	+			+							+
tress	BGL2 (PR2)	AT3G57260	+		+	+	+	-		+		+	+
.s xne	PR5	AT1G75040	+		+	+		-		+		+	+
nse a	AT3G22600	AT3G22600	+		+				-				+
Répo	AHP2	AT1G13330	+					-		+			+
	AT5G55450	AT5G55450	+	$\checkmark$				-					+
sHSP	HSP17.6B-CI	AT2G29500	-			+							
lexine	PAD3	AT3G26830	+										+
	CYP71A12	AT2G30750	+						-				
amal	CYP71A13	AT2G30770	+										+
U	DIN11	AT3G49620	-						-				
	RING1	AT5G10380	+		+	+	+			+	+	+	+
	PCR1	AT1G14880	+							+		+	
	PCR2	AT1G14870	+				+	-					+
	HSP81-1	AT5G52640	-		+	+		+	-	+	-		+
	CAX1	AT2G38170	+			+							
	DIC2	AT4G24570	+		+				+				
s	RAP2-3	AT3G16770	+				-						+
vutre	TCH4	AT5G57560	+					-					
٩	GSTU10	AT1G74590	+		+	+	+	-		+			+
	ATCHX17	AT4G23700	+							+			+
	BGL1	AT1G52400	-			-		+		-			-
	PGL5	AT5G24420	-			-			-	-		-	-
	ATFRO6	AT5G49730	-							-			
	DHAR2	AT1G75270	-							+			+
	ATPTR3	AT5G46050	+		+	+							+

	BCAT-1	AT1G10060	-			-							
	MYB4	AT4G38620	-			-						-	
	DIN2	AT3G60140	-			+			-				+
	BGLU27	AT3G60120	+						-				
	DIP2	AT5G03210	+						-				
	ATPB	ATCG00480	-								+		
	RDR2	AT4G11130	-									+	+
	WRKY75	AT5G13080	+			+							+
	AT3G18250	AT3G18250	+			+				+			+
	AT3G16670	AT3G16670	-							-	-		-
	AT1G13340	AT1G13340	+		+	+							+
	AT1G74450	AT1G74450	+		+								+
	AT3G22620	AT3G22620	+					+					+
	AT1G75280	AT1G75280	-			-				-			-
	AT1G24735	AT1G24735	+	$\checkmark$									
	AT5G12450	AT5G12450	+	$\checkmark$									
	AT1G26380	AT1G26380	+										+
	AT3G11000	AT3G11000	+					-					
	AT5G40180	AT5G40180	+					-					
	AT5G46730	AT5G46730	-								+		
Table	eau 13 : (	Comparaiso	on entre	les don	nées	obtenues	par	nos	analyse	es et	d'aut	res a	nalyses
trans	criptomiau	es (Rodrigo	o et al 2	<b>012)</b> . (+)	: Gè	ne induit (	dans le	s exr	érience	es co	nsidéré	es : (	-) Gène
rónri	mé dans los	avnáriance	s considó	,• (•) róos • (•/	1.65	no nrácon	t danc l			conci	dáráoc	· (1) /	Rabu et
	eprime dans les experiences considerees ; ( $\checkmark$ ) : Gene present dans les analyses considerees ; (1) (Babu et												
al.,20	υ»); (2) (A	gudelo-Kon	iero et al.	, 2008);	(3) (1	rang et al.,	2007)	; (4)	liviarati	ne et	ai., 200	J4);(	(2) NCBI
GEO	accession G	iSE29387;	(6) (Espino	oza et al.	, 200	)/);(7) NC	BI GEC	acce	ession (	SE15	557;(	8) (A	scencio-
Ibane	anez et al., 2008).												

On peut tout de même noter que dans la cinétique d'infection, les quatre gènes *LSU2, APR1, APR2, SDI1* ne répondent pas de manière précoce à l'infection car leur expression ne varie pas encore 7 jours post-infection.

Pour vérifier un éventuel effet sur la systémie du virus et/ou sur la cinétique d'infection, des *A. thaliana* simples mutants *lsu2, sdi1* et doubles mutants knock out *apr1/2 et apk1/2* (Koprivova et al., 2008) ont été infectés par le LMV, mais aucun changement n'a été observé par ELISA sur l'accumulation du virus dans ces mutants (expériences réalisées à l'INRA Bordeaux par le Dr. F. Revers). Les gènes *APK* codent pour des APS kinases qui catabolisent la réaction de phosphorylation de l'APS en 3'-phosphoadenylylsulfate ou PAPS (Figure 40). L'absence d'effet sur ces mutants peut être dû à une redondance fonctionnelle entre les gènes d'une même famille. Il existe par exemple, trois gènes *APR* chez *A. thaliana*.

En plus des expériences d'infection de plantes transgéniques mutantes, un dosage et une mesure d'activité de certains composants prenant part au métabolisme du soufre (APS réductases, ATP sulfurylases, sulfate et thiols) a été effectué par le Dr. S. Kopriva (John Innes Centre, Norwich, UK) sur des plants d'*A. thaliana* infectés par le LMV et récoltés à un temps précoce sur les feuilles inoculées (5 jours post- infection) et à des temps plus tardifs sur les feuilles systémiques (12, 17 et 21 jours post-infection) pour étudier un potentiel effet du virus sur la formation de métabolites secondaires soufrés. Aucune variation significative n'a été relevée entre les plantes saines et les plantes infectées, mais ces expériences devront être répétées pour confirmer ces résultats.



**Figure 41 : Cinétique d'expression de certains gènes candidats mesurée par qPCR à 7 et 28 jours post-infection par le LMV.** Les valeurs d'expression ont été analysées sur deux plantes. (A) Gènes impliqués dans le métabolisme du soufre. (B) Gènes impliqués dans le mécanisme de SAR.

## • Résistance systémique acquise (SAR): un mécanisme de défense induit par le LMV ?

Comme nous l'avons vu précédemment, plusieurs gènes dérégulés par le LMV dans nos conditions d'étude sont impliqués dans le mécanisme de résistance systémique acquise ou SAR. Il s'agit des gènes *PR1*, *PR2*, *PR5*, *AT3G22600*, *AT5G55450*, *AT5G10760* et *PNP-A*. D'autres gènes de défense ou de réponse aux stress ont également été identifiés comme les gènes *PCC1* et *AHP2* ou bien ceux participant à la biosynthèse de la camaléxine (*PAD3*, *CYP71A12*, *CYP71A13*).

Les protéines PR sont produites en réponse à de nombreux pathogènes. Elles sont de bons marqueurs moléculaires pour le mécanisme de SAR (Durrant & Dong, 2004, Gozzo & Faoro, 2013), qui est un mécanisme de défense de la plante contre une grande variété de micro-organismes. Il confère à l'hôte une protection efficace, puisque la résistance contre les pathogènes se répand de manière systémique dans la plante. Les protéines PR sont exprimées suite à une accumulation d'acide salicylique aussi bien au niveau du site de l'infection que dans les tissus systémiques (Ryals et al., 1996). Les protéines PR1, PR2 et PR5 font partie de ce mécanisme de défense même si leur fonction n'est pas clairement définie (Cao et al., 1994). Chez A. thaliana, il est établi que la transcription du gène PR1 dans cette voie est activée en trans par la protéine NPR1 (Nonexpresser of PR genes 1), par des facteurs de transcription de la clade des TGA2 et par des éléments situés en *cis* de la séquence promotrice du gène, les éléments LS (linker scanning)(Cao et al., 1994, Lebel et al., 1998, Zhang et al., 2003, Pajerowska-Mukhtar et al., 2013). Plus précisément, suite à une augmentation de la concentration en acide salicylique, la protéine NPR1 pourrait se lier au facteur de transcription TGA2, ce qui stimulerait l'activité de liaison à l'ADN de cette dernière et qui viendrait donc se fixer au niveau de la séquence promotrice du gène PR1, activant ainsi sa transcription (Despres et al., 2000, Kinkema et al., 2000, Fan & Dong, 2002). Certains gènes codant pour les protéines PR, notamment les trois gènes PR1, PR2 et PR5, ont également été identifiés dans d'autres études transcriptomiques portant sur des infections virales d'A. thaliana. C'est le cas par exemple pour le Potyvirus TEV (Agudelo-Romero P. et al., 2008) et le CaLCuV, membre de la famille des Geminiviridae, virus à ADN (Ascencio-Ibanez et al., 2008)(Tableau 13). Les gènes *PR2* et *PR5* sont aussi dérégulés lors d'une infection par le TCV, le TRV et le PPV mais dans le dernier cas, ces gènes sont réprimés et non surexprimés (Babu et al., 2008).

L'induction du gène *PR2* a aussi été détecté suite à une infection par le TuMV (Yang et al., 2007).

Les protéines de la grande famille des LTP (lipid transfert proteins) dont font partie le produit des gènes *AT3G22600* et *AT5G55450*, pourraient agir comme molécules-signal dans le mécanisme de SAR (Durrant & Dong, 2004). Ces protéines partagent une similarité de séquence avec les élicitines produites par *Phytophtora spp.*, qui elles-mêmes induisent des réactions de défense de la plante. Les élicitines qui sont des molécules-signal et les protéines LTP partageraient les mêmes récepteurs impliqués dans la transduction de signal au niveau de la membrane plasmique (Blein et al., 2002). Les deux gènes détectés dans nos analyses, *AT3G22600* et *AT5G55450*, ont également été identifiés lors d'infections par d'autres virus comme le CaLCuV (Ascencio-Ibanez et al., 2008). D'autres virus ne dérégulent que l'expression du gène *AT3G22600*, le TEV qui induit sa surexpression (Agudelo-Romero et al., 2008) et le CMV qui induit sa répression (Marathe et al., 2004). Le PPV lui, provoque la répression du gène *AT5G55450* (Babu et al., 2008)(Tableau 13).

En ce qui concerne les trois gènes additionnels dérégulés uniquement dans l'Exp3, il existe quelques données intéressantes à préciser. Le gène *AT5G10760* code pour une protéine possédant une activité endopeptidasique de type aspartyl. Cette protéine interviendrait également dans le mécanisme de SAR mais son rôle n'est pour le moment pas connu. La protéine PNP-A a été quant à elle plus étudiée. Les membres de cette famille de protéines sont des molécules mobiles partageant des similitudes de séquence avec les expansines, qui sont elles aussi impliquées dans le mécanisme de SAR (Ruzvidzo et al., 2011, Wang et al., 2011). Dans leur étude transcriptomique sur l'infection par le CaLCuV, Ascencio-Ibanez et al. (2008) ont montré que ce gène était également dérégulé. La protéine PCC1 est une protéine qui agirait comme régulateur de la défense contre les pathogènes, ce qui a été démontré avec *Pseudomonas syringae* dont l'infection induit l'expression dans les plants de tomate (Mohr & Cahill, 2007). Cette protéine intervient également dans la transition vers la floraison causée par des stress, processus qui est également dépendant de l'acide salicylique (Sauerbrunn & Schlaich, 2004, Segarra et al., 2010).

Enfin, la protéine AHP2 est quant à elle, la protéine homologue chez *A. thaliana* de la protéine Hop2 de *S. cerevisiae*. Cette protéine serait impliquée dans la réplication de l'ADN et notamment dans la réparation des cassures double-brin

(Vignard et al., 2007, Uanschou et al., 2013). Des études transcriptomiques portant sur l'infection par le CaLCuV (Ascencio-Ibanez et al., 2008), le TCV et le PPV ont également montré une surexpression du gène codant pour la protéine AHP2 sauf dans le cas du PPV où ce gène est réprimé (Tableau 13). Il est intéressant de noter que le PPV qui est un *Potyvirus* comme le LMV a souvent des effets contraires aux autres virus pour ce qui est de l'expression de ces gènes de défense, pourtant les expériences ont également été réalisées à des temps tardifs d'infection (17 et 42 jours post-infection).

Une cinétique d'infection a également été réalisée et analysée par qPCR sur quatre de ces gènes: *PR1, PR5, AT5G55450, AT5G10760* (Figure 41B). Comme pour les gènes impliqués dans le métabolisme du soufre, les profils d'expression des gènes *PR1, PR5* et *AT5G55450* dans les feuilles systémiques est le même que celui observé dans les protoplastes de CC triées par FACS à savoir une induction tardive. A l'inverse, le gène *AT5G10760* ne présente pas de différence d'expression significative entre la plante saine et la plante infectée à 28 jours post-infection, temps correspondant approximativement à celui des analyses sur les protoplastes. Ce gène codant pour une endopeptidase pourrait donc présenter une expression spécifique dans les CC suite à une infection par le LMV. Pour rappel, ce gène n'a été identifié que dans l'expérience Exp3. L'expression des trois autres gènes (*PR1, PR5* et *AT5G55450*) ne serait donc pas spécifique aux cellules phloémiennes dans le cas du LMV.

Le processus de biosynthèse de camaléxine est également un processus de défense de la plante, la camaléxine étant synthétisée suite à l'infection par de nombreux pathogènes. La production d'acide salicylique est nécessaire mais non suffisante à son accumulation dans la plante (Zhao & Last, 1996, Zhou et al., 1998). Cette phytoaléxine est dérivée du tryptophane par la voie de l'indole-3-acétaldoxime. Les gènes *CYP71A13* et *PAD3* codent pour deux enzymes essentielles de la biosynthèse de la camaléxine. Lors de la première étape, l'enzyme CYP71A13 permet la conversion de cet indole-3-acétaldoxime en indole-3-acetonitrile (IAN) (Nafisi et al., 2007). La protéine PAD3 (ou CYP71B15) qui code pour une cytochrome monooxygénase intervient lors de la dernière étape de biosynthèse en catalysant la conversion de l'acide dihydrocamaléxique (DHCA) en camaléxine (Schuhegger et al., 2006).

Il est intéressant de noter qu'un gène supplémentaire *CYP71A12* a été identifié comme surexprimé. Or ce gène localisé sur le chromosome 2 à proximité du gène *CYP71A13* présente une forte homologie de séquence avec ce dernier et pourrait avoir la même fonction (Moldrup et al., 2013). Ces deux gènes ayant été identifiés par RNAseq, seul l'un d'eux pourrait être dérégulé. En effet, les « read » obtenus après séquençage ne mesurant que 54 bases, il est possible qu'ils puissent s'aligner sur la séquence de l'un ou l'autre de ces deux gènes. Ceci étant, pour les expériences de qPCR effectuées, des couples d'oligonucléotides spécifiques de chacun d'entre eux ont été dessinés afin de différencier leur taux d'expression pourtant des variations différentes ont été retrouvés pour ces deux gènes.

Des plants d'*A. thaliana* mutants dans les gènes *PR5* et *AT5G10760* ont été infectés par le LMV pour observer les effets de ces mutations sur l'infection et la systémie du virus. Aucune différence sur l'infection par le LMV n'a été observée par ELISA sur ces mutants mais cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois (par le Dr. F. Revers).

#### • Protéines de stress réprimées par le LMV

Les protéines HSP de faible poids moléculaire (entre 15 et 42 kDa) sont appelées petites HSP (sHSP: small HSP). Les protéines sHSP sont des protéines chaperonnes qui participent à la formation de complexes permettant d'éviter la dénaturation des protéines ou à la réorganisation des protéines dénaturées (Lee & Vierling, 2000). Ces protéines sont généralement induites en cas de stress comme le choc thermique, la sècheresse, le stress osmotic ou oxydatif (Stanley Kim et al., 2005, Nakamoto & Vigh, 2007) mais elles peuvent également être produites lors de différentes étapes du développement de la plante comme la germination. C'est d'ailleurs le cas des deux protéines sHSP que l'on a identifiées dans nos analyses (Wang et al., 2008). Le génome d'*A. thaliana* code pour 19 sHSP potentielles, divisées en plusieurs classes selon leur localisation cellulaire. Les deux gènes codant pour des sHSP que l'on a identifiés dans notre étude font partie des protéines sHSP de classe I (localisation cytoplasmique et/ou nucléaire).

La particularité de nos résultats concernant ces deux protéines est leur répression suite à l'infection par le LMV, ce qui va à l'encontre des résultats qui pourraient être attendus puisque ces protéines sont généralement induites en cas de stress. Whitham et al. (2003) ont identifié une induction du gène HSP17.4 lors de l'infection précoce par différents virus (TVCV, OrMV, CMV, PVX et TuMV), induction débutant le premier jour post infection pour les deux *Tobamovirus* et entre le troisième et le cinquième jour pour les autres. Agudelo-Romero P. et al. (2008) ont ont observé une induction du gène codant pour la protéine HSP17.6B lors d'une infection par le TEV, 21 jours post-infection.

#### • Comparaison avec d'autres études portant sur le phloème

Afin de conforter nos résultats vis à vis de la spécificité au phloème, nous avons recherché si, dans les études portant sur le transcriptome de cellules phloémiennes ou de sève élaborée d'A. thaliana ou le protéome de sève, certains gènes identifiés dans nos analyses transcriptomiques d'infection par le LMV étaient également présents (Tableau 14). Ainsi nous avons détecté (mais pas toujours vérifié par qPCR) des dérégulations dans l'expression des gènes APR1, APS1, AT5G10380 et AT1G75280 que Deeken et al. (2008) ont également identifiés dans les tissus phloémiens microdisséqués. Nous avons également identifié des dérégulations communes avec la banque d'ADNc issue de protoplastes de CC (Ivashikina et al., 2003) pour les gènes codant pour les sHSP : HSP17.4 et HSP17.6B mais aussi pour une HSP plus grande, la protéine HSP81-1 et le gène AT1G14880 codant pour la protéine PCR1 (Cadmium resistance protein 1). Nous avons également identifié 17 gènes dont les transcrits ont déjà été trouvés dans la sève d'A.thaliana correspondant à un exsudat phloémien par Deeken et al. (2008), dont les gènes APS1, PR1, PR5, HSP17.4, BAG6, PCR2, HSP81-1. D'autres part, nous avons trouvé six gènes codant pour des protéines identifiées par Batailler et al. (2012) dans cette même sève: les protéines PR1, PR2, PR5, TCH4 (une xyloglucan-endotransglycosylase), DHAR2 (une glutathione S-transférase) et une potentielle isoflavone réductase codée par le gène AT1G75280. Nous avons également identifié des gènes codant pour des protéines détectées dans la sève d'autres plantes, comme chez Brassica napus avec la protéine DHAR2 (Giavalisco et al., 2006) et chez Cucurbita maxima avec les protéines LSU2, HSP81-1, DHAR2 et une protéine de la famille des tyrosine-kinases codée par le gène AT4G38470 (Lin et al., 2009).

				Protéome			
	Gène	25	Protoplastes CC	Protoplastes CC	Cellules du phloème (LCM) <sup>(2)</sup>	Sève <sup>(2)</sup>	Sèves
	Viru	s	LMV	/	/	/	/
sme re	APR1	AT4G04610	-		✓		
aboli souf	LSU2	AT5G24660	-				C. maxima (3)
Mét du	APS1	AT3G22890	-		$\checkmark$	$\checkmark$	
aux	PR1	AT2G14610	+			$\checkmark$	A. thaliana (4)
onse stress	BGL2 (PR2)	AT3G57260	+				A. thaliana
Rép	PR5	AT1G75040	+			$\checkmark$	A. thaliana
SP	HSP17.4	AT3G46230	-	$\checkmark$		$\checkmark$	
SH	HSP17.6B-CI	AT2G29500	-	$\checkmark$			
	BAG6	AT2G46240	-			$\checkmark$	
	RING1	AT5G10380	+		$\checkmark$	~	
	PCR1	AT1G14880	+	$\checkmark$		~	
	PCR2	AT1G14870	+			~	
	HSP81-1	AT5G52640	-	$\checkmark$		~	C. maxima
	CAX1	AT2G38170	+			~	
	DIC2	AT4G24570	+			~	
res	RAP2-3	AT3G16770	+			~	
Auti	TCH4	AT5G57560	+			~	A. thaliana
	BGL1	AT1G52400	-			~	
	ATFRO6	AT5G49730	-			~	
	DHAR2	AT1G75270	-				A. thaliana, C. maxima, B. napus (5)
	AT1G74450	AT1G74450	+			$\checkmark$	
	AT1G75280	AT1G75280	-		$\checkmark$		A. thaliana
	AT4G38470	AT4G38470	-			$\checkmark$	C. maxima
Table trans indui	eau 14 : Con criptomiques t dans les ex Gène ou pro-	mparaison entres s ou protéomique périences consistéme présent da	re les donnée ues de cellules p idérées ; (-) Gèr	s obtenues pa phloémiennes en ne retrouvé rép considérées : (1	ar nos analyses t de sève ou exsu primé dans les ex ) (Ivashikina et al	et d'au dat. (+) : périence 2003) ·	tres analyses Gène retrouvé s considérées ; (2) (Deeken et

induit dans les expériences considérées ; (-) Gène retrouvé réprimé dans les expériences considérées ; ( $\checkmark$ ) : Gène ou protéine présent dans les analyses considérées ; (1) (Ivashikina et al., 2003) ; (2) (Deeken et al., 2008) ; (3) (Lin et al., 2009) ; (4) (Batailler et al., 2012) ; (5) (Giavalisco et al., 2006).

Ces différentes études ont identifié les composants (ARN ou protéines) des cellules phloémiennes ou de la sève. Le fait que l'on retrouve également dans nos résultats des gènes précédemment identifiés comme étant présents dans les cellules phloémiennes corrobore la spécificité de notre tri cellulaire. Cependant, la plupart de ces éléments, étant abondants dans le phloème, nous incite à rester prudent dans nos conclusions.

# 3. Etude transcriptomique de cellules compagnes de plantes infectées par le TuYV

## a. Analyse par RNAseq des expériences d'infection par le TuYV

## • Comparaison des expériences analysées individuellement

Seules deux expériences (Exp2 et Exp3) ont été testées par séquençage à haut débit pour le TuYV car l'échantillon contrôle de l'expérience Exp1 s'est avéré dégradé donc inutilisable, comme expliqué précédemment dans le Tableau 9 (page 97).

L'analyse des données de l'expérience Exp2 m'a permis d'identifier 136 gènes dérégulés dans les protoplastes de CC de plantes infectées par le TuYV par rapport à des protoplastes de CC de plantes agro-inoculées avec le plasmide pBin vide, mais seulement 90 dans l'expérience Exp3 (Figure 42A). Neuf gènes dérégulés sont communs à ces deux expériences, six sont induits et trois sont réprimés. Parmi les gènes induits, on observe notamment le gène *BCAT4* (Branched-chain aminotransferase 4) impliqué dans la voie de biosynthèse des glucosinolates, le gène *AT3G15610* codant pour une transducine à domaine «WD40 repeat-like » et le gène *AT4G00780* codant pour une protéine à domaine TRAF-like.

## • <u>Analyse de la moyenne des valeurs obtenues lors des expériences de</u> <u>RNAseq</u>

Comme pour le LMV, nous avons calculé la moyenne des valeurs de log2ratio (infectées/saines) des deux expériences. Cette analyse fait apparaître 33 dérégulations dans des CC infectées par le TuYV, 24 inductions et 9 répressions (Figure 42A). Ces dérégulations sont consignées dans le Tableau 15.

Gènes	Description	pBIN vide (normalisée)	TuYV (normalisée)	log2FC	p-value ajustée
AT5G62998	/	65	0	-Inf	0,000807
AT4G05091	/	45	0	-Inf	0,013219
AT1G66553	/	45	0	-Inf	0,016504
AT4G19829	/	45	0	-Inf	0,016504
AT1G44941	/	41	0	-Inf	0,024517
AT5G01300	PEBP (phosphatidylethanolamine-binding protein) family protein	94	1	-7,07	0,000557
AT3G15605	/	170	3	-6,08	3,36E-05
AT4G28050	TET7 (tetraspanin 7)	45	1	-5,99	0,024307
AT3G45851	/	82	2	-5,61	0,009718
AT5G25840	Protein of unknown function (DUF1677),	85	2	-5,33	0,024307
AT3G16670	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	231	8	-4,91	0,000440
-----------	---	--------------	--------------	----------	----------------
AT2G31141	/	166	10	-4,06	0,005657
ATCG00560	PSBL (photosystem II reaction center protein L)	1069	158	-2,76	0,018469
AT3G60318	/	409	79	-2,37	0,023088
AT3G19710	BCAT4 (Branched-chain aminotransferase4)	436	2538	2,54	0,013210
AT1G64370	/	202	1464	2,86	0,005468
AT3G02020	AK3 (aspartate kinase 3)	70	510	2,87	0,015906
AT1G78370	GSTU20 (Glutathione S-transferase Tau 20)	189	1414	2,90	0,004173
AT5G18600	Thioredoxin superfamily protein	28	253	3,18	0,033209
AT1G16410	CYP79F1 (cytochrome P450 79F1)	30	304	3,34	0,017903
AT4G03060	AOP2 (alkenyl hydroxalkyl producing 2)	240	2859	3,58	3,67E-05
AT1G06830	Glutaredoxin family protein	9	172	4,32	0,005468
AT1G72600	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	2	79	5,40	0,015475
AT3G15610	Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein	1	139	7,21	0,000509
AT5G42053	/	0	94	Inf	0,001215
AT3G12835	/	0	102	Inf	0,001397
AT1G18220	ATPUP9 (purine permease 9)	0	67	Inf	0,005657
AT1G53542	/	0	54	Inf	0,013210
AT5G57181	/	0	49	Inf	0,014503
AT4G09840	/	0	44	Inf	0,022226
AT1G17560	HLL, HUELLENLOS	0	45	Inf	0,027576
AT1G28281	/	0	42	Inf	0,027576
AT2G41082	/	0	40	Inf	0,034785
Tableau 1	5 : Tableau TuYVseq regroupant les gènes de	érégulés dan	s les protop	lastes d	le CC infectés

**Tableau 15 : Tableau 10YVseq regroupant les genes deregules dans les protoplastes de CC infectes par le TuYV, identifiés par RNAseq pour la moyenne des deux répétitions (33 gènes).** Le nombre de « reads » est indiqué pour chaque gène pour les conditions sain et infecté. Le différentiel d'expression est indiqué par le log2ratio de ces deux valeurs (FDR < 5%). En rouge figurent les gènes qui seront testés par qPCR. Log2FC : Log2FoldChange.

# b. Analyse par puces CATMA des expériences d'infections par le TuYV

# • Comparaison des expériences analysées individuellement

Les ARN provenant de trois expériences de CC de plantes infectées par le TuYV ont été analysés par hybridation sur puces CATMA (Exp1, Exp3 et Exp4). On retrouve respectivement 161, 631 et 86 dérégulations pour ces trois répétitions individuelles (Figure 42A). Comme pour le LMV, on constate un nombre très important de gènes dérégulés dans l'expérience Exp3. 26 gènes sont retrouvés uniquement dans les expériences Exp1 et Exp3, 8 uniquement dans les expériences Exp1 et Exp4 et 29 uniquement dans les expériences Exp3 et Exp4. Parmi ces gènes communs, quatre sont présents dans les trois expériences. Il s'agit des gènes *LSU2, LSU3* déjà vus précédemment chez le LMV, le gène *CYP704B1* codant pour un cytochrome P450 impliqué dans la synthèse de la sporopollénine (composant majeur de la paroi du pollen) (Dobritsa et al., 2009) et le gène *TCH4* codant pour une enzyme modifiant la paroi cellulaire en réponse à des stimuli environnementaux.

# • <u>Analyse de la moyenne des valeurs obtenues lors des expériences de puces CATMA</u>

En considérant la moyenne des valeurs de log2ratio (infectées/saines) des dérégulations des trois expériences, 26 gènes dérégulés sont identifiés lors de l'infection des CC par le TuYV, 12 sont réprimés et 14 sont induits (Figure 42C). Ces dérégulations sont regroupées dans le Tableau 16.

Gènes	Description	Intensités TuYV	Intensités pBIN vide	log2ratio (ITuYV/IpBIN vide)	Pvalue
AT2G01021	/	8,97	9,64	-0,67	2,19E-5
AT1G23650	/	7,90	8,52	-0,62	3,67E-4
AT2G05530	Glycine-rich protein	9,62	10,23	-0,61	5,84E-4
ATCG00340	PSAB	8,35	8,97	-0,61	6,53E-4
AT2G21660	GRP7 (Glycine rich protein 7)	7,59	8,20	-0,61	7,34E-4
AT2G05380	GRP3S (Glycine-rich protein 3 short isoform)	10,33	10,94	-0,61	8,44E-4
AT2G16586	/	8,80	9,37	-0,57	4,77E-3
AT2G24180	CYP71B6 (Cytochrome P450 71B6)	7,30	7,86	-0,56	9,07E-3
AT2G22660	Protein of unknown function (DUF1399)	8,34	8,90	-0,56	1,06E-2
AT4G35630	PSAT (Phosphoserine aminotransferase)	8,17	8,71	-0,55	1,67E-2
AT2G05520	GRP-3 (Glycine-rich protein 3)	10,46	11,00	-0,54	1,81E-2
AT1G59510	CF9 (Carbohydrate-binding protein)	8,02	8,56	-0,53	3,37E-2
AT2G46240	BAG6 (BCL-2-associated athanogene 6)	9,89	9,36	0,53	4,44E-2
AT1G24030	protein kinase family protein	7,94	7,42	0,53	3,97E-2
AT4G12400	НОР3	9,15	8,60	0,54	1,95E-2
AT3G19710	BCAT4 (Branched-chain aminotransferase4)	7,67	7,11	0,56	8,84E-3
AT1G68250	/	7,68	7,10	0,58	3,80E-3
AT3G26060	ATPRX Q (peroxiredoxin Q)	8,99	8,41	0,58	3,21E-3
AT5G20240	PI (PISTILLATA)	7,79	7,21	0,58	2,84E-3
AT1G07350	SR45A (serine/arginine rich-like protein 45A)	9,71	9,11	0,60	1,10E-3
AT1G78370	GSTU20 (Glutathione S-transferase Tau 20)	7,50	6,88	0,62	3,67E-4
AT4G24390	AFB4 (auxin signaling F-BOX 4)	10,11	9,49	0,62	3,01E-4
AT1G66090	TIR-NBS class of disease resistance protein	10,94	10,26	0,69	8,41E-3
AT5G23035	DEFL (defensin-like protein)	7,30	6,57	0,73	1,25E-3
AT5G25980	TGG2 (myrosinase 2)	8,23	7,48	0,75	1,79E-7
AT5G26000	TGG1 (myrosinase 1)	9,68	8,64	1,04	0,00E+0
Tableau 1	6 · Tableau TuVVcat regroupant les gènes dérégul	és dans les p	rotoplastes	s de CC infecté	s nar le

**Tableau 16 : Tableau TuYVcat regroupant les gènes dérégulés dans les protoplastes de CC infectés par le TuYV, identifiés par puces CATMA.** Les intensités de fluorescence moyennes de chaque sonde sont indiquées pour les deux conditions, sain et infecté, ainsi que le log2ratio de ces deux valeurs qui nous permet d'évaluer une différence d'expression. En rouge se retrouvent les gènes qui seront testés pour la validation.



**Figure 42** : (A) Représentation par diagramme de Venn du nombre de gènes dérégulés lors de trois expériences d'infection par le TuYV, analysés par RNAseq (Exp1, Exp2, Exp3) ou puces CATMA (Exp1, Exp3, Exp4). Le nombre de gènes induits ou réprimés est indiqué dans les tableaux par (+) et (-) respectivement. (B) Comparaison des gènes dérégulés lors de l'infection par le TuYV pour l'expérience Exp3, entre les deux techniques. (C) Comparaison des gènes dérégulés lors de l'infection par le TuYV pour la (moyenne des valeurs), entre les deux techniques.

#### c. Comparaison des résultats obtenus par les deux technologies

• Comparaison des expériences analysées individuellement

Pour le TuYV, il n'y a qu'une seule expérience (Exp3) qui a été traitée par les deux technologies de RNAseq et puces CATMA. 90 gènes dérégulés ont été identifiés par RNAseq et 631 par puces CATMA (Figure 42B). 19 dérégulations sont communes entre ces deux technologies comme par exemple des gènes impliqués dans la biosynthèse des glucosinolates, les gènes *CYP79F1*, *BCAT4*, gènes *GSTU20* (glutathione S-transferase TAU 20) et *AOP2* ou également d'autres gènes comme le gène *AT1G06830*, codant pour une glutarédoxine.

# • Analyse de la moyenne des deux technologies

Quand on compare les valeurs moyennes des expériences analysées soit par RNAseq (33 dérégulations) soit par puces CATMA (26 dérégulations), seuls 2 gènes sont retrouvés dans les deux jeux de données, les gènes *BCAT4* et *GSTU20*. Tous deux sont induits lors de l'infection par le TuYV (Figure 42C).

Au final, nous avons identifié 57 gènes dérégulés dans les protoplastes de CC infectées par le TuYV, 31 induits, 26 réprimés par l'infection. Un tableau nommé TuYVtot récapitulant l'ensemble des gènes dérégulés avec leur description et les trois catégories d'ontologie (processus biologiques, fonctions moléculaires et composants cellulaires) est donné en Annexe 5.

# d. <u>Analyse de l'enrichissement en termes d'ontologie des échantillons infectés</u> <u>par le TuYV</u>

Les tableaux récapitulant les termes de GO enrichis et leur pourcentage d'enrichissement sont en annexe à la fin du manuscrit (Annexe 6 pour le RNAseq et Annexe 7 pour les puces CATMA).

# • <u>RNAseq</u>

Quand on considère les expériences de manière individuelle, on remarque que les enrichissements en GO varient fortement entre les deux expériences Exp2 et Exp3, il y a donc, comme pour les infections avec le LMV, un problème de reproductibilité. L'échantillon de l'expérience Exp2 est enrichi en gènes impliqués dans les processus de mort cellulaire, de photosynthèse, de métabolisme des glucosinolates et des composés soufrés. Etonnamment, l'échantillon de l'expérience Exp3 et la liste de gènes obtenue en traitant les valeurs moyennes des deux expériences de RNAseq en moyenne, ne présentent pas d'enrichissements de manière significative en gènes appartenant à des processus biologiques communs. On observe néanmoins dans ces jeux de données, la présence de gènes identifiés dans la biosynthèse des glucosinolates.

#### • Puces CATMA

Etant donné la forte variabilité entre les échantillons des expériences Exp1, Exp3 et Exp4 analysées par puces CATMA, les enrichissements en termes de GO ne sont pas homogènes entre eux. Cependant, on observe dans les trois expériences, un enrichissement en gènes impliqués dans la réponse à différents stress et dans la photosynthèse. Ce processus est d'ailleurs très majoritaire dans l'échantillon de l'expérience Exp4. Les expériences Exp1 et Exp3 présentent également un enrichissement en gènes intervenant dans le métabolisme secondaire. Dans l'échantillon de l'expérience Exp3, les gènes impliqués dans les métabolismes des glucosinolates et des composés soufrés sont également fortement représentés. En ce qui concerne la liste des gènes TuYVcat (page 130) l'enrichissement en termes de GO concerne le métabolisme des glucosinolates.

# • Comparaison des enrichissements en termes de GO obtenus par analyse par RNAseq et par puces CATMA

Les enrichissements en termes de GO pour l'expérience Exp3 ne sont pas comparables pour les deux technologies car on n'a identifié aucun enrichissement dans cette expérience analysée par RNAseq. Par contre, la comparaison des valeurs moyennes des expériences analysées, soit par RNAseq, soit par puces CATMA, met en évidence comme précédemment un enrichissement des gènes appartenant à la voie de biosynthèse des glucosinolates.

#### e. Validation de la dérégulation de certains gènes candidats par qPCR

Afin de confirmer les dérégulations observées par les deux technologies de séquençage à haut débit et de puces CATMA, j'ai sélectionné certains gènes pour lesquels j'ai analysé leur expression par qPCR. Ces analyses ont été effectuées sur les mêmes échantillons d'ARN que celles effectuées par RNAseq et puces CATMA c'est à dire les expériences Exp1, Exp3 et Exp4 mais également sur des ARN de deux autres expériences supplémentaires: Exp5 et Exp6.

Mon choix s'est tourné en premier vers la voie de biosynthèse des glucosinolates qui a été clairement mise en évidence par les analyses d'enrichissement. J'ai testé neuf gènes impliqués dans cette voie, les gènes CYP79F1, GSTU20, AOP2, BCAT4, TGG1 et TGG2 de la liste TuYVtot (Annexe 5) et les gènes CYP79B2, IMS2, MAM1 qui ne sont trouvés dérégulés que dans l'analyse par RNAseq avec un FDR plus élevé (10 %). Tous ces gènes sont surexprimés dans nos analyses à haut débit. Les expériences de qPCR confirment une surexpression de ces gènes dans les protoplastes de CC lors de l'infection par le TuYV et ceci, dans les cinq expériences indépendantes hormis dans l'expérience Exp1 pour les gènes CYP79F1 et IMS2 et dans l'expérience Exp6 pour le gène GSTU20 où l'expression des gènes en question ne varie pas (Figure 43A). Même les gènes sélectionnés avec des critères plus souples, c'est-à-dire les gènes CYP79B2, IMS2 et MAM1 présentent une nette augmentation d'expression en présence du virus. Par contre, les gènes TGG1 et TGG2 ne répondent pas de manière homogène dans toutes les expériences. Alors que dans nos analyses de puces CATMA, ces deux gènes étaient assez largement induits, seule l'expérience Exp3 marque une forte induction du gène dans les analyses par qPCR. Dans les quatre autres expériences indépendantes, ces gènes sont soit réprimés (Exp1, Exp5 et Exp6) soit inchangés (gène TGG2 dans l'Exp6) soit faiblement induits dans l'expérience Exp4.



Trois gènes identifiés par nos analyses sont co-régulés dans un même réseau de co-régulation ATTED-II comprenant aussi des gènes spécifiques des CC comme les gènes *SUC2*, *PP2-A1* et *AHA3* (en vert dans la Figure 44A). Il s'agit des gènes *AT5G18600*, *AT1G64370* (en rouge dans la Figure 44A) et *AT4G00780* (en rose dans la Figure 44A, identifié uniquement dans l'expérience Exp3) qui, testés en qPCR, sont tous induits lors de l'infection par le TuYV (Figure 43B), mis à part dans les expériences Exp5 et Exp6 où le gène *AT1G18600* ne varie pas et où le gène

*AT1G64370* est réprimé uniquement dans l'expérience Exp6, contrairement aux autres expériences et aux analyses transcriptomiques.



**Figure 44 : Réseaux de co-régulation de gènes (ATTED-II).** Les gènes entourés de rouge sont des gènes que nous avons identifies comme dérégulés dans nos analyses et validés par qPCR. Les gènes entourés de rose ont également été détectés dans nos analyses mais uniquement dans l'expérience Exp3. Les gènes entourés de vert sont des gènes spécifiques du phloème qui ne sont dérégulés par le TuYV.

Deux autres gènes se retrouvent aussi induits dans un réseau ATTED-II commun (Figure 44B) : le gène *BAG6* qui joue un rôle dans le processus de mort

cellulaire programmée et le gène *HSFA2*, un facteur de transcription impliqué dans la réponse aux stress. Ces gènes sont assez largement surexprimés dans toutes les expériences sauf dans l'expérience Exp1 où leur expression est diminuée par rapport aux échantillons contrôles (Figure 45A).



**Figure 45 : Taux d'expression mesuré par qPCR, de certains gènes identifiés par RNAseq et puces CATMA dans les expériences Exp1, Exp3, Exp4, Exp5 et Exp6.** Les valeurs d'expression ont été normalisées par rapport au contrôle négatif pBIN vide, (blanc). L'échantillon infecté (rouge) est représenté en rouge. (A) Gènes de stress co-régulés. (B) Autres gènes.

Parmi l'ensemble des gènes dérégulés par le TuYV, j'ai choisi d'autres gènes qui pourraient être potentiellement intéressants : le gène *AT3G15610* cité précédemment, codant pour la transducine, les gènes *AT1G66090* de la famille des gènes *TIR-NBS*, et *AT5G23035* codant pour des protéines de défense, le gène *AT1G06830* codant pour une glutarédoxine et le gène *GRP7* codant pour une protéine riche en glycine et seul gène réprimé dans les analyses transcriptomiques. Les analyses par qPCR (Figure 45B) confirment que les gènes *AT3G15610, AT1G66090* et *AT1G06830* sont effectivement surexprimés dans les CC pendant l'infection par le TuYV, au moins dans quatre expériences sur quatre ou cinq. Quant à l'expression du gène *AT5G23035*, elle n'a pu être mesurée que dans trois expériences (Exp1, Exp3 et Exp4). Elle confirme la surexpression identifiée dans les études transcriptomiques, sauf dans l'expérience Exp3 où elle ne varie pas. Ces quatre derniers gènes constituent donc un pool de gènes dont le rôle dans l'infection pourra être étudié. Enfin le gène *GRP7* a aussi été analysé mais, alors qu'il était réprimé dans les analyses à haut débit, seule l'expérience Exp3 confirme ces résultats. Les analyses des autres expériences par qPCR montrent une très nette induction de ce gène.

	Gènes   CYP79F1 AT1G16410   GSTU20 AT1G78370   AOP2 AT4G03060   BCAT4 AT3G19710   CYP79B2 AT4G39950   IMS2 AT5G23020   MAM1 AT5G23010   TGG1 AT5G25980   AT1G64370 AT1G64370   glutaredoxine AT5G18600		DNA	Puces			qPCR		
	Genes		RNAseq	САТМА	Exp1	Exp3	Exp4	Exp5	Exp6
	CYP79F1	AT1G16410	+		+	+	+	/	+
	GSTU20	AT1G78370	+	+	+	+	+	+	=
	AOP2	AT4G03060	+		+	+	+	+	+
Sč	BCAT4	AT3G19710	+	+	+	+	+	+	+
sinolate	<i>CYP79B2</i>	AT4G39950	+ (FDR<10%)		+	+	+	+	+
Glucos	IMS2	AT5G23020	+ (FDR<10%)		-	+	+	+	+
	MAM1	AT5G23010	+ (FDR<10%)		+	+	+	+	+
	TGG1	AT5G26000		+	-	+	+	-	-
	TGG2	AT5G25980		+	-	+	+	-	=
	AT1G64370	AT1G64370	+		+	+	+	/	-
	glutaredoxine	AT5G18600	+		+	+	+	=	Ш
	TRAF-like	AT4G00780	+ (Exp3)	+ (Exp3)	+	+	+	/	+
	HSFA2	AT2G26150		+	-	+	+	+	+
res	BAG6	AT2G46240		+	-	+	+	+	+
Aut	AT3G15610	AT3G15610	+		+	+	+	+	=
	TIR-NBS class	AT1G66090		+	-	+	+	+	+
	AT5G23035	AT5G23035		+	+	+	+	/	/
	AT1G06830	AT1G06830	+		+	+	+	/	+
Autres	GRP7	AT2G21660		-	+	-	+	+	+

Ces résultats de qPCR sont résumés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 17 : Validation par PCR quantitative, des variations d'expression de certains gènes identifiés après analyse par RNAseq et/ou puces CATMA, lors d'une infection par le TuYV dans des protoplastes de cellules compagnes. (+) : Induction de l'expression ; (-) : Répression de l'expression ; (=) : pas de changement d'expression entre les deux conditions ; /: pas d'amplification ; (FDR<10%) : Gènes dérégulés en considérant une valeur de FDR <10% ; (Exp3): gènes dérégulés uniquement dans l'expérience Exp3.

- f. Etude des gènes dérégulés par le TuYV et discussion
  - <u>Activation de la voie des glucosinolates en réponse à l'infection par le</u> <u>TuYV ?</u>

Les glucosinolates (GS) représentent un groupe de métabolites secondaires dérivés d'acides aminés soufrés. Ils sont caractéristiques de l'ordre des Brassicales et sont impliqués dans la défense contre les herbivores et les insectes (Halkier & Gershenzon, 2006). Suite à une blessure, les GS contenus dans la vacuole sont libérés et entrent en contact avec des myrosinases comme les protéines TGG1 et TGG2 (Wittstock & Burow, 2010). Celles-ci vont les dégrader pour former des composés volatiles (isothiocyanates et nitriles) qui agissent comme répulsifs actifs contre les insectes et les herbivores (Rask et al., 2000). L'interaction entre les GS et les myrosinases dépend des groupements sulfate portés par les GS (Ratzka et al., 2002). Ils forment trois groupes selon les acides aminés qui les constituent : les GS aliphatiques, indoliques et benzéniques (Sonderby et al., 2010). Leur biosynthèse peut être divisée en trois phases distinctes : élongation de la chaîne à partir de certains acides aminés (méthionine et phénylalanine), formation du noyau du GS et modifications secondaires des chaînes latérales (Figure 46). Les gènes BCAT4 (Branched-chain amino acid aminotransferase 4), MAM1 (Méthylthioalkylmalate synthase 1) et IMS2 (également nommé MAM3 ou MAML, MAM-like) interviennent dans la première de ces étapes. La protéine BCAT4 permet la désamination de la méthionine en un oxoacide (Schuster et al., 2006) qui va être condensé avec l'acétylcoenzyme A par les enzymes MAM1 ou IMS2 (Field et al., 2004, Textor et al., 2007). Les gènes CYP79 jouent un rôle dans la formation du noyau du GS : le cytochrome P450 CYP79B2 catalyse avec son homologue CYP79B3 la conversion du tryptophane en IOAx (indole-3-acetaldoxime) (Mikkelsen et al., 2000) et le cytochrome CYP79F1 permet la synthèse de courtes chaînes de dérivés de la méthionine (Reintanz et al., 2001). La protéine GSTU20 interviendrait également dans cette deuxième étape en catalysant une des réactions de la formation du noyau. La protéine AOP2 intervient dans la troisième étape de modifications secondaires en permettant la conversion de méthylsulfinylalkyl en alkenyl GS (Neal et al., 2010).



**Figure 46 : Voies de synthèse des glucosinolates (GS) et dosage de certains métabolites .** (A) Synthèse de GS aliphatiques à partir de la méthionine. (B) Synthèse de GS indoliques à partir du tryptophane. Les enzymes dont les transcrits sont induits par le TuYV dans les protoplastes de CC sont indiquées en orange.

🔵 Composés testés

Accumulation plus importante uniquement dans Col0 infectés

Accumulation plus importante dans Col0 et C24 infectés 🔴 Accumula

Accumulation plus importante uniquement dans C24 infectés

Ces différents gènes impliqués dans la synthèse des GS sont surexprimés dans les protoplastes de CC lors de l'infection par le TuYV. Cette voie pourrait donc être une voie de défense contre le TuYV. Plusieurs études ont montré que d'autres virus provoquent également des dérégulations dans cette voie (Tableau 18).

Gènes			A. thaliana: Transcriptome								
	Gènes		Protoplastes CC		Fe	uilles	de plan	tes inf	fectées		
	Virus		TuYV	TEV AT17 (1)	TuMV (2)	PPV (3)	CMV (4)	TCV (5)	TMV (6)	TRV (7)	CalCuV (8)
es	CYP79F1	AT1G16410	+		-	+					-
Glucosinolate	GSTU20	AT1G78370	+		-						-
rcosi	AOP2	AT4G03060	+		-						-
Autres Glucosinolates	BCAT4	AT3G19710	+		-						-
	TIR-NBS class	AT1G66090	+					+			
	TGG1	AT5G26000	+					-			
	TGG2	AT5G25980	+								-
	НОРЗ	AT4G12400	+				-				
	GRP7	AT2G21660	-					+		+	
	AK3	AT3G02020	+		-	+					-
	GRP3	AT2G05520	-	+						+	
	AT2G22660	AT2G22660	-						+		+
	PSAT	AT4G35630	-	+				+			
	TET7	AT4G28050	-	-							
tres	GRP3S	AT2G05380	-	+						+	+
Au	AT2G05530	AT2G05530	-	+							
	AT1G24030	AT1G24030	+	-							
	AT1G07350	AT1G07350	+				-				+
	AT1G72600	AT1G72600	+					+			
	AT3G16670	AT3G16670	-					-	-		-
	CYP71B6	AT2G24180	-					+			+
	PRX Q	AT3G26060	+					-			-
	AT5G25840	AT5G25840	-						+		
	AT5G18600	AT5G18600	+			-					
	AT3G15610	AT3G15610	+								+
	AT1G06830	AT1G06830	+			-					
Tablea transc	au 18: Co riptomique	omparaiso es et d'au	n entre les tres analyse	donn s trans	iées o scripto	obter	iues ue o	par u pr	nos otéoi	an nigu	alyses les de

Tableau 18: Comparaison entre les données obtenues par nos analyses transcriptomiques et d'autres analyses transcriptomique ou protéomiques de cellules phloémiennes et de sève (ou exsudat). (+): Gène induit dans les expériences considérées; (-) Gène réprimé dans les expériences considérées; (1) (Agudelo-Romero et al., 2008); (2) (Yang et al., 2007); (3) (Babu et al., 2008); (4) (Marathe et al., 2004); (5) NCBI GEO accession GSE29387; (6) (Espinoza et al., 2007); (7) NCBI GEO accession GSE15557; (8) (Ascencio-Ibanez et al., 2008).

Le *Potyvirus* TuMV (Yang et al., 2007) et le Geminivirus CaLCuV (Ascencio-Ibanez et al., 2008) induisent une répression de certains de ces gènes: *CYP79F1*, *GSTU20*, *AOP2*, *BCAT4* ainsi que le gène *TGG2* en plus pour le CaLCuV. Le gène codant pour la protéine CYP79F1 est surexprimé suite à une infection par le PPV (Babu et al., 2008) et celui codant pour la protéine TGG1 est réprimé suite à une infection par le TCV (NCBI GEO accession GSE29387, non publié).

Afin de confirmer le rôle de ces gènes dans l'infection par le TuYV, un certain nombre de mutants d'*A. thaliana* touchés dans ces gènes a été infecté et le titre viral analysé par ELISA. Des *A. thaliana* simples mutants dans les gènes *TGG1* et *TGG2* (Islam et al., 2009), *BCAT4* (SALK\_020775C, insertion dans promoteur), *CYP79F1* (SALK\_075469C, insertion dans promoteur), *CYP79B2* (SALK\_130570C et SALK\_113348C, insertions dans exon 1 et 2) et *AOP2* (Neal et al., 2010) ainsi que des doubles mutants *tgg1/tgg2* (Islam et al., 2009), *bcat3/bcat4* (GK-039C02-030268, insertions dans exons) ont été testés vis à vis de l'infection par le TuYV. Aucun changement significatif dans l'accumulation du virus dans les feuilles systémiques n'a été observé mais ces expériences d'infection doivent être reproduites avant de pouvoir confirmer définitivement (expériences réalisées par les Drs. V. Brault pour les mutants *tgg* et B. Monsion pour les autres mutants). D'autres mutants *cyp79f1*, *cyp79f2 et cyp79f1/cyp79f2* (Tantikanjana et al., 2004) vont être prochainement testés au laboratoire.

Nos résultats ayant montré que la voie de biosynthèse des glucosinolates pouvait être impactée lors de l'infection par le TuYV, un dosage de 24 glucosinolates a été effectué par chromatographie en phase liquide ultra-performance couplée à la spectrométrie de masse (UP)LC-MS/MS, sur des plantes (Col0 et C24) infectées par le TuYV par rapport à des plantes saines ou infiltrées avec le vecteur vide (tests réalisés par le Dr. R. Lugan, Plateforme de métabolomique, IBMP). Des résultats préliminaires montrent que la plupart des composés testés s'accumulent significativement lors de l'infection par le virus (Figure 47). On observe néanmoins des différences d'accumulation de certains GS entre les deux écotypes (glucuraphanine, gluconapine, 8-méthylthiooctyl glucosinolate par exemple) mais les tendances globales restent les mêmes. C'est principalement la voie de synthèse des GS à partir de la méthionine (GS aliphatique) qui est affectée par l'infection : les composés formés à partir d'homo- de di- et de triméthionine (sinigrine, progoitrine et glucobrassicanapine) s'accumulent plus fortement lors de l'infection dans Col0 et C24 (Figure 46). Rappelons que les enzymes participant aux premières étapes de la synthèse de ces GS sont notamment les enzymes codées par les gènes *MAM1*, *IMS2* pour l'élongation de la chaîne d'acides aminés et *BCAT4* et *CYP79F1* pour la formation du noyau, gènes dont l'expression a été trouvée induite lors de nos études transcriptomiques. Certains composés formés à partir du tryptophane (GS indolique) s'accumulent également dans l'infection par le TuYV dans Col0 (glucobrassicine, 4-méthoxyglucobrassicine)(Figure 46). Cette voie fait intervenir notamment l'enzyme CYP79B2, induite dans nos analyses. Ces résultats très encourageants doivent être confirmés pour pouvoir réellement démontrer l'implication de la voie des glucosinolates dans la réponse de la plante à l'infection par le TuYV.



unité arbitraire (surface des pics). Les histogrammes jaunes représentent les échantillons de plantes Col0 infectées par le TuYV et les histogramme orange, ceux de plantes C24 infectées par le TuYV. Les plantes contrôles « Ctrl » sont des plantes saines et les plantes VV ont été infiltrées par le vecteur vide.

#### • Induction de certains gènes de stress

Le gène AT5G18600 code pour une glutarédoxine monothiol, une oxydoréductase qui permet le transfert d'électrons du glutathion (GSH) vers des résidus-cystéines oxydés. La majorité des glutarédoxines d'A. thaliana (17 sur 21) interagissent avec les facteurs de transcription TGA2 dans le système de doublehybride dans la levure (Zander et al., 2012). Rappelons que cette famille de facteurs de transcription est notamment impliquée dans le mécanisme de SAR, comme nous l'avons vu dans la partie transcriptomique traitant du LMV. Cette voie de corégulation pourrait donc être une réponse supplémentaire de la plante à l'infection par le TuYV, spécifique des cellules phloémiennes car les gènes AT1G64370, AT5G18600 et AT4G00780 sont également co-régulés avec les gènes SUC2, AHA3 et PP2-A1 spécifiques du phloème. Le gène AT1G64370 code pour une protéine hypothétique qui n'a pas encore été caractérisée. On peut également noter que le gène AT4G00780 code pour une protéine de la famille des TRAF-like (TNF receptor associated factors) dont la fonction reste inconnue pour le moment. Quant au gène AT5G18600 codant pour la glutarédoxine, il a été retrouvé réprimé suite à une infection par le Potyvirus PPV (Babu et al., 2008) (Tableau 18).

Le gène *BAG6* (BCL-2-associated athanogene 6) code pour une protéine dont les protéines homologues chez les mammifères régulent l'apoptose. Chez *A. thaliana*, cette protéine joue le même rôle de régulation dans les processus de mort cellulaire provoqués par des attaques de pathogènes, de stress abiotiques et du développement. L'expression de ce gène est induite par le facteur de transcription HSFA2 (Nishizawa et al., 2006) dont le gène est également surexprimé dans les CC infectées par le TuYV.

Le gène *HSFA2* (heat stress transcription factor) code pour un facteur de transcription qui permet la régulation de l'induction du système de défense de la plante en réponse à différents stress environnementaux. Son expression est ellemême inductible par la chaleur (Schramm et al., 2006, Nishizawa et al., 2006).

Des *A. thaliana* mutants dans les gènes *HSFA2* (SALK\_008978C, insertion dans exon 2) et *BAG6* (SALK\_047959C, insertion dans exon) ont été infectés par le TuYV pour étudier un effet éventuel de ces mutations sur l'accumulation du virus. Aucune

différence notable n'a été observée mais cette expérience devra être répétée (Dr. B. Monsion).

# • Comparaison avec d'autres études (Tableau 19)

Quelques gènes identifiés dans notre étude ont également été détectés dans d'autres études transcriptomiques ou protéomiques de tissus phloémiens ou de sève élaborée. Ainsi Deeken et al. (2008) ont identifié les ARNm des gènes *GSTU20* et *BCAT4* dans les tissus phloémiens microdisséqués d'*A. thaliana* et Ivashikina et al. (2003), ceux des gènes *AT1G64370* et *TGG1* dans leur banque de protoplastes de CC. Par contre, aucun gène commun n'a été identifié avec le « translatome » de CC de Mustroph et al. (2009b). Dans des exsudats d'*A. thaliana*, Deeken et al. (2008) ont détecté les transcrits des gènes *BCAT4*, *BAG6*, *TGG1*,*TGG2* et Batailler et al. (2012), les protéines GSTU20 et BCAT4. Dans la sève de *B. napus*, Giavalisco et al. (2006) ont également trouvé la protéine codée par le gène *AT1G64370*, de fonction inconnue.

				A. thaliana: Trans	criptome		Protéome
	Gènes		Protoplastes CC	Protoplastes CC <sup>(1)</sup>	Cellules du phloème (LCM) <sup>(2)</sup>	Sève <sup>(2)</sup>	Sèves non infectées
	Virus		TuYV	/	/	/	/
ses	GSTU20	AT1G78370	+		1		A. thaliana <sup>(3)</sup>
nolat	BCAT4	AT3G19710	+		1	1	A. thaliana
ıcosi	BAG6	AT2G46240	+			1	
פוי	TIR-NBS class	AT1G66090	+			~	
	TGG1	AT5G26000	+	1		1	
	TGG2	AT5G25980	+			1	
	НОР3	AT4G12400	+	1			
	GRP7	AT2G21660	-	1		1	
	AK3	AT3G02020	+			1	
utres	GRP3	AT2G05520	-			1	
AL	AT2G22660	AT2G22660	-			1	
	PSAT	AT4G35630	-			1	
	AT1G64370	AT1G64370	+	1			B. napus <sup>(4)</sup>
	AT3G15610	AT3G15610	+			1	C. maxima <sup>(5)</sup>
	AT1G06830	AT1G06830	+	1	1		

Tableau 19 : Comparaison entre les données obtenues par nos analyses transcriptomiques et d'autres analyses transcriptomique ou protéomiques de cellules phloémiennes et de sève (ou exsudat). (+) : Gène induit dans les expériences considérées ; (-) Gène réprimé dans les expériences considérées ; ( $\checkmark$ ) : Gène présent dans les analyses considérées ; (1) (Ivashikina et al., 2003), (2) (Deeken et al., 2008), (3) (Batailler et al., 2012), (4) (Giavalisco et al., 2006), (5) (Lin et al., 2009).

4. Comparaison des résultats obtenus pour le LMV et le TuYV

#### a. Comparaison directe sur puces CATMA

Afin d'exploiter au maximum nos résultats, j'ai comparé directement des échantillons de CC infectées par le LMV et le TuYV sur puces CATMA pour les expériences Exp1 et Exp3. L'analyse des données a été effectuée individuellement pour chaque expérience mais aussi en traitant les données comme répétitions biologiques. Les deux échantillons de CC de plantes infectées par les virus sont comparés directement sur puces, sans comparer les échantillons à leur témoin négatif respectifs. L'Exp1 présente 199 gènes différentiellement exprimés entre des CC infectées par le TuYV et le LMV, l'Exp3, 88. Dix gènes sont communs à ces deux expériences (Figure 48). Quand on considère les valeurs moyennes des deux expériences, on identifie 35 gènes différentiellement exprimés (Tableau 20).

Les résultats de cette comparaison sont à prendre avec d'infinies précautions. En effet, le mode d'infection des deux virus étant différent, certaines dérégulations peuvent provenir du mode d'inoculation et non pas être induits par l'infection spécifique de chaque virus.



**Figure 48** : **Représentation par des diagrammes de Venn du nombre de gènes dérégulés par le LMV et le TuYV** en comparaison directe sur puces CATMA (A) ou en comparant directement les listes de gènes (LMVtot et TuYVtot) issues des analyses transcriptomiques précédentes (B).

	fonction	Mol FoGO	TuYV	LMV	Ratio	Pval
AT3G22600	protease inhibitor/lipid transfer protein (LTP) family protein	lipid transport	10,13	11,49	-1,35	0,00E+0

AT1G09500	cinnamyl-alcohol dehydrogenase	metabolic process	8,38	9,65	-1,28	0,00E+0
AT5G13080	WRKY75 transcription factor	regulation of transcription	7,25	8,40	-1,15	0,00E+0
AT3G15450	/	/	8,94	9,98	-1,03	8,34E-10
AT1G72060	serine-type endopeptidase inhibitor, DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein	biological process unknown	8,24	9,26	-1,03	1,11E-9
AT1G11610	CYP71A18 (cytochrome P450)	electron transport	6,80	7,69	-0,88	2,36E-6
AT3G47340	ASN1 (DARK INDUCIBLE 6)	asparagine biosynthetic process	8,50	9,36	-0,85	9,92E-6
AT1G26380	FAD-binding domain-containing protein	biological process unknown	7,22	8,06	-0,84	2,12E-5
AT2G14610	PR1 (PATHOGENESIS-RELATED GENE 1)	biological process unknown	7,30	8,12	-0,82	4,57E-5
AT5G14780	FDH (FORMATE DEHYDROGENASE); NAD binding / cofactor binding / oxidoreductase	metabolic process	9,48	10,24	-0,75	9,59E-4
AT1G65280	heat shock protein binding	protein folding	8,76	9,51	-0,75	1,07E-3
AT1G15380	lactoylglutathione lyase	carbohydrate metabolic process	6,96	7,71	-0,75	1,22E-3
AT1G75040	PR5 (PATHOGENESIS-RELATED GENE 5)	response to other organism	7,30	8,02	-0,72	3,58E-3
AT5G13320	PBS3 (AVRPPHB SUSCEPTIBLE 3)	response to auxin stimulus	8,08	8,80	-0,72	3,90E-3
AT1G36622	/	transport	7,53	8,24	-0,71	5,83E-3
AT1G73480	hydrolase, alpha/beta fold family protein	biological process unknown	10,38	11,07	-0,69	1,21E-2
AT1G20870	/	protein phosphorylation	6,52	7,20	-0,68	1,62E-2
AT1G44960	/	biological process unknown	8,13	8,80	-0,68	2,01E-2
AT5G07440	GDH2 (GLUTAMATE DEHYDROGENASE 2);	amino acid metabolic process	9,04	9,72	-0,68	2,02E-2
AT5G50200	WR3 (WOUND-RESPONSIVE 3)	response to nitrate	8,23	8,90	-0,67	2,49E-2
AT5G35525	/	biological process unknown	8,73	9,39	-0,67	2,92E-2
AT5G54080	HGO (HOMOGENTISATE 1,2-DIOXYGENASE)	L-phenylalanine catabolic process	7,78	8,44	-0,67	3,11E-2
AT1G80920	J8; heat shock protein binding	protein folding	9,21	9,87	-0,66	3,54E-2
AT1G65130	ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-related	catabolic process	7,19	7,85	-0,66	4,01E-2
AT1G18700	DNAJ heat shock domain-containing protein	protein folding	7,59	8,24	-0,65	4,60E-2
AT4G03060	AOP2 (ALKENYL HYDROXALKYL PRODUCING 2);	glucosinolate biosynthesis	8,26	7,58	0,68	1,91E-2
AT4G24390	F-box family protein (FBX14)	catabolic process	9,94	9,26	0,68	1,85E-2
AT5G23010	MAM1 (2-isopropylmalate synthase 3)	metabolic process	7,92	7,22	0,70	9,37E-3
AT5G25980	TGG2 (GLUCOSIDE GLUCOHYDROLASE 2); myrosinase, hydrolyzing O-glycosyl compounds	carbohydrate metabolic process	8,78	8,07	0,71	6,35E-3
AT5G20240	PI (PISTILLATA); transcription factor	regulation of transcription	7,89	7,16	0,72	3,59E-3
AT4G25100	FSD1 (FE SUPEROXIDE DISMUTASE 1); iron superoxide dismutase	superoxide metabolic process	10,02	9,27	0,75	1,25E-3
AT1G15820	LHCB6 (LIGHT HARVESTING COMPLEX PSII); chlorophyll binding	photosynthesis, light harvesting	11,01	10,15	0,86	9,29E-6
AT2G15620	NIR1 (NITRITE REDUCTASE); ferredoxin-nitrate reductase	electron transport	9,58	8,68	0,89	1,41E-6
ATCG00790	/	translation	10,26	9,31	0,95	8,63E-8
ATCG00150	/	dATP biosynthetic process from ADP	9,11	8,06	1,05	4,09E-10

**Tableau 20 : Analyse comparative des échantillons de TuYV et de LMV par puces CATMA.** Les intensités de fluorescence moyennes de chaque sonde sont indiquées pour les deux conditions, sain et infecté, ainsi que le log2ratio de ces deux valeurs qui nous permet d'évaluer une différence d'expression. En rouge se trouvent les intensités des échantillons de TuYV et en vert celles du LMV.

b. Comparaison listes LMV/TuYV

Pour compléter cette analyse entre les deux virus, j'ai choisi de comparer les listes des gènes dérégulés présentées précédemment. Cette comparaison est peut être plus judicieuse que la précédente car elle prend en considération les dérégulations de l'expression des gènes par rapport à un témoin négatif, différent pour chaque virus. J'ai donc comparé les listes de gènes dérégulés obtenues à partir des valeurs moyennes des expériences pour chaque technologie (voir les listes LMVtot et TuYVtot), c'est-à-dire les 103 gènes dérégulés lors de l'infection par le LMV et les 57 gènes dérégulés pour le TuYV (Figure 48). La comparaison des deux listes permet d'identifier cinq gènes communs : *AT3G45851, AT3G16670, PUP9* (perméase permettant le transport de purine), issus des expériences de séquençage à haut débit, et des gènes *BAG6* et *ATCG00340*, issus des analyses par de puces CATMA (Tableau 21). Tous ces gènes observent un même sens de dérégulation quelque soit le virus, sauf le gène *BAG6* qui est réprimé dans les CC infectées par le LMV et induit dans les CC infectées par le TuYV.

En conclusion, très peu de gènes dérégulés identiques ont été identifiés dans les plantes infectées par les deux virus.

Gènes	Description	T-	LMV	log2 Fold Change	Adjusted p-value	pBIN vide	TuYV	log2 Fold Change	Adjusted p-value
AT3G45851	/	23	0	-Inf	0,041101	82	2	-5,61	0,009718
AT3G16670	Pollen Ole e 1 (extensin family protein)	99	8	-3,70	0,008534	231	8	-4,91	0,000440
AT1G18220	ATPUP9 (purine permease 9)	0	36	Inf	0,010912	0	67	Inf	0,005657

Gènes	Description	Intensité T-LMV	Intensité LMV	log2 ratio (ILMV / IT-LMV)	Pvalue	Intensités pBIN vide	Intensités TuYV	log2 ratio (ITuYV / IpBINØ)	Pvalue
AT2G46240	BAG6 (BCL-2- associated athanogene 6)	9,82	9,28	-0,55	3,15E-2	9,36	9,89	0,53	4,44E-2
ATCG00340	PSAB	9,47	8,61	-0,86	3,70E-10	8,97	8,35	-0,61	6,53E-4

**Tableau 21 : Analyse comparative des listes des gènes dérégulés par le LMV et le TuYV.** Le premier tableau regroupe les gènes retrouvés communs par RNAseq. Ils ont le même sens de dérégulation. Le second tableau regroupe les gènes communs sur les puces CATMA. Ces deux gènes n'ont pas le même sens de variation de leur expression.

# 5. Discussion générale

#### a. Considérations techniques

Au vu du nombre de technologies et techniques différentes utilisées, un certain nombre de biais techniques se sont rajoutés les uns aux autres lors de notre projet. Malgré cela, nous avons réussi à identifier un transcriptome spécifique de CC infectées par le LMV ou le TuYV, transcriptome dont la majorité des gènes testés par qPCR ont été validés (25/27 gènes pour le LMV et 16/19 pour le TuYV).

Les technologies de RNAseq et de puces microarrays (puces CATMA dans notre cas) sont toutes deux des techniques visant à déterminer le transcriptome d'un échantillon d'intérêt. Alors que les puces ne permettent que d'effectuer des analyses différentielles, le RNAseq permet également de séquencer directement un échantillon, et donc d'annoter un génome de novo. L'alignement sur le génome est une phase nécessaire quand il s'agit d'effectuer une analyse différentielle précise. Dans notre cas, cet alignement a été réalisé sur le génome annoté de l'écotype Col0, car celui de l'écotype C24 n'avait pas encore été totalement caractérisé. Cette différence a été palliée en réalignant les « reads » non alignés sur le génome de l'écotype Col0 (entre 4,78% et 10,38% du nombre total de « reads », selon l'échantillon (Tableau 9, page 102) sur le génome de l'écotype C24. Cet alignement a été effectué par S. Graindorge (Plateforme de Bioinformatique, IBMP) avec Tophat-2.0.7 (aucun mésappariement) et l'option « very-sensitive » de Bowtie2 sur les données concernant l'écotype C24 recueillie sur le site internet «1001 genomes data center » http://1001genomes.org/data/MPI/MPISchneeberger2011/releases/current//C24/. Les reads qui ont été alignés sur le génome de C24 ont ensuite été comptés pour réaliser une analyse différentielle de chaque échantillon avec Cufflinks 2.0.2 avec un FDR < 5%. Peu de gènes supplémentaires ont été identifiés. Trois gènes (AT2G31570, AT4G25200, AT4G28880) pour l'expérience Exp2 du LMV sont réprimés. Pour le TuYV, un alignement dans l'expérience Exp2 marquant une répression est détecté et pourrait correspondre à quatre gènes (AT4G03360, AT1G15410, AT4G03340 ou AT4G03350). Dans l'expérience Exp3, quatre alignements ont été positifs dont trois correspondent à des gènes uniques : le gène *AT3G14415* qui est réprimé et les gènes AT5G42650, AT5G64310 qui sont induits. Le quatrième alignement induit pourrait correspondre à quatre gènes (AT5G61790, AT5G61800, AT5G07340 ou AT5G07320). L'alignement sur le génome de l'écotype Col0 plutôt que C24 n'a donc pas eu de grande influence sur les transcriptomes obtenus.

A l'inverse, les puces nécessitent quant à elles que le génome ou qu'une grande partie de celui-ci soit connu, car elles portent les séquences complémentaires recherchées dans l'échantillon testé. Les puces CATMA v5 que nous avons utilisées représentaient dans cette version, environ 73% de la totalité des gènes (gènes codants et non-codants, pseudogènes), ce qui peut être une limite de cette technique. Actuellement, la plateforme d'Evry utilise une nouvelle génération de puces (CATMA v7) qui présentent une meilleure couverture du génome (30834 sondes spécifiques au génome d'*A. thaliana* contre 24576 pour la version v5 que nous avons utilisée) et permettent de faire plus d'hybridations en même temps, de façon plus stable.

Le choix de l'une ou l'autre de ces technologies dépend surtout de la finalité de l'étude menée : analyse différentielle de l'expression de gènes, élaboration d'un transcriptome, annotation de génome, analyse d'expression de gènes spécifiques... En effet, une étude comparative réalisée à Evry (Plateforme Biopuces) sur les technologie de RNAseq et de puces CATMA (en version v6 plus récente et plus complète que celle utilisée pour notre étude) a permis de montrer que le RNAseq avait une meilleure sensibilité de détection que les puces et ceci sans qu'il soit nécessaire d'augmenter les nombre de « reads » pour une meilleure détection. Le multiplexage est donc tout à fait approprié. Néanmoins, il existe une disparité dans la distribution des « reads » puisque 60% des « reads » correspondent à moins de 5% des gènes alors que de nombreux gènes n'ont qu'un ou deux « reads ». Malgré cela, une bonne corrélation entre les valeurs d'intensité des puces CATMA et celles des comptes de RNAseq a été observée, hormis pour les intensités inférieures à huit en analyse CATMA, car les dérégulations sont alors trop proches du bruit de fond. Cet inconvénient est apparemment corrigé par le RNAseq car il apparaît que pour de faibles expressions, il permet de détecter plus de variations d'expression, alors qu'étonnamment il est beaucoup moins puissant pour des intensités moyennes de puces CATMA. Concernant la méthode de qPCR, qui est précise et rapide, celle-ci obtient des résultats en corrélation avec les deux technologies précédentes. Elle est même plus sensible que celles-ci mais elle nécessite de connaître les gènes-cibles au préalable. La qPCR est donc une très bonne méthode de validation pour infirmer ou confirmer des résultats obtenus par puces microarrays ou RNAseq.

La technologie de RNAseq est une technologie d'avenir très puissante mais qui est encore pour le moment bridée par des lacunes dans l'analyse bioinformatique et statistique de ses résultats. En effet, aucune loi statistique ne permet pour le moment de modéliser de façon exacte la phase de comptage du nombre de « reads ». Comme la variabilité biologique est plus grande que celle attendue sous une loi de Poisson, on utilise une loi binomiale négative pour la modélisation de la distribution des comptage, mais le problème du faible nombre de répétitions biologiques demeure. Ce qui pourrait améliorer la robustesse de cette modélisation est l'augmentation significative du nombre de ces répétitions afin d'obtenir un meilleur estimateur, mais dans la réalité, ce paramètre est souvent compliqué à mettre en oeuvre du fait de la difficulté de la préparation d'échantillons en quantité et qualité satisfaisantes pour ce type d'analyse, mais aussi le coût engendré par la multiplication de ces analyses.

La méthode de contrôle de la qualité des résultats d'analyse différentielle (pvalue) est également importante dans l'analyse des résultats. Dans le cas des puces CATMA, c'est la méthode de FWER (familywise error rate) qui a été utilisée. Elle contrôle la probabilité de sélectionner à tort au moins un gène sur l'ensemble des gènes étudiés (procédure de Bonferroni). Dans les analyses de RNAseq, c'est la méthode de FDR (false discovery rate) qui a été choisie. Elle contrôle la proportion de faux-positifs par les déclarés positifs (Benjamini et al., 2001). Ce sont deux méthodes de correction utilisées dans le cas de comparaison multiple. Chacune a ses inconvénients : le FWER étant basé uniquement sur le contrôle de faux positifs, il peut augmenter la probabilité de produire des faux négatifs, ce qui réduit la robustesse statistique et entraîne la perte de certaines données valides. Quant au FDR, il permet d'assurer un taux de confiance minimum, 95% de fiabilité par exemple pour un FDR de 5%, mais le pourcentage restant peut être entièrement représenté par des faux positifs, c'est-à-dire 5% dans notre exemple. Ces méthodes de contrôle ont donc leurs limites qu'il faut prendre en compte dans le reste de l'analyse des résultats. Des expériences de validation par d'autre techniques comme la qPCR, qui permet de vérifier l'expression de gènes spécifiques de manière précise sous les conditions désirées, sont donc nécessaires afin confirmer les résultats obtenus.

Une des observations principales que l'on peut faire suite à notre étude est le manque de reproductibilité entre les différentes expériences biologiques analysées. Cette constatation peut avoir plusieurs origines mais il est certain que la durée nécessaire entre la mise place de l'infection systémique et l'extraction des ARN est un facteur important dans cette variabilité. En effet, plus ce temps est long, plus les plantes sont confrontées à différents évènements qui peuvent influer sur leur état physiologique et la réponse à ces évènements et donc sur leur transcriptome : variations dans les conditions de culture (arrosage, luminosité), attaques de parasites ou bien encore variabilité saisonnière et ce, même si l'horloge circadienne a été respectée lors du prélèvement des feuilles entre les différentes expériences (tous les prélèvements ont été effectués à 6 heures du matin). Ces variations peuvent également être dues au grand nombre de techniques nécessaires à la préparation des échantillons avant l'analyse par RNAseq ou puces CATMA: infection, préparation de protoplastes, tri par FACS et extraction d'ARN. Toutes ces étapes sont des moments critiques, au cours desquelles chaque changement peut introduire des variations supplémentaires dans le profil d'expression de la plante. Enfin, en ce qui concerne ce manque de reproductibilité entre les différentes répétitions biologiques, on peut également émettre l'hypothèse que ce soit la réponse des plantes à l'infection virale qui n'est pas parfaitement synchronisée entre les différentes expériences.

Considérant ces observations, une autre étude statistique a été menée sur nos résultats de RNAseq et de puces CATMA par le Dr. G. Thébaud (SupAgro, Montpellier) qui a, sans rentrer dans les détails, changé l'hypothèse initiale de probabilité en ajoutant une condition de fluctuation aléatoire dans l'expression des gènes et qui considère pour chaque technique toutes les expériences en même temps. Les résultats de cette analyse sont encore plus restreints en gènes dérégulés que celles réalisées précédemment (Annexe 8) puisqu'elles permettent d'identifier pour le LMV onze gènes dérégulés (dix gènes réprimés et un induit) dans les analyses des puces CATMA et trois gènes induits dans les analyses du RNAseq. Pour le TuYV, aucun gène n'est identifié dans les analyses de puces CATMA et deux gènes sont dérégulés (un réprimé et un induit). On retrouve notamment pour le LMV les gènes LSU2, LSU3, LSU4, APR1, APR2 dans les analyses de CATMA mais aucun des gènes précédemment détectés dans les analyses de RNAseq. Pour le TuYV, on retrouve seulement le gène AT3G15610 codant pour la transducine, appartenant à la superfamille WD40 et le gène *AT3G15605* codant pour une protéine se fixant aux acides nucléiques, gènes qui sont chevauchant et inversés. Les autres gènes détectés par cette analyse n'ont pas été pour le moment confirmés. Cette analyse est plus spécifique à notre

problématique de manque de reproductibilité et pourrait paraître plus adéquate mais le fait que l'on ait confirmé par qPCR des gènes identifiés par les premières analyses et non par celle-ci, montre que cette méthode est peut-être trop restrictive puisqu'elle ignore un certain nombre de gènes dont la dérégulation a été confirmée par qPCR, comme les gènes impliqués dans la SAR par exemple pour le LMV ou ceux participant à la biosynthèse des GS.

On peut néanmoins penser que malgré toutes les variabilités observées entre nos expériences, l'identification d'un faible nombre de gènes dérégulés renforce la robustesse de cette liste d'autant plus qu'il est difficile d'obtenir des conditions quasiidentiques entre les répétitions dans ce projet. Le fait que la plupart des gènes identifiés aient été confirmés par qPCR valide cette hypothèse.

Parmi les trois expériences analysées sur les puces CATMA, l'expérience Exp3 met en évidence un nombre de dérégulations particulièrement important : environ 600 dérégulations alors que l'expérience Exp1 ne présente qu'environ 170 gènes dérégulés et l'expérience Exp4 environ 70 gènes dérégulés. Cette disproportion n'est pas observée pour la même expérience analysée en RNAseq. Sachant que ce sont les mêmes ARN qui ont été analysés par les deux technologies, il est possible qu'il y ait eu un problème de détection sur la puce lors de l'analyse.

En ce qui concerne les expériences supplémentaires analysées uniquement par qPCR (Exp5 et Exp6), l'expression de certains gènes testés a parfois été impossible à détecter ou bien s'est révélée contraire aux résultats attendus. Les ARN utilisés pour ces expériences sont des ARN qui étaient de moins bonne qualité que ceux utilisés pour les analyses de RNAseq et sur puces CATMA, ce qui peut expliquer qu'il n'ait pas toujours été possible de détecter le gène recherché à cause de possibles dégradations dans l'échantillon infecté ou dans l'échantillon contrôle.

#### a. Analyse globale des résultats de transcriptomique

Nous avons décidé d'analyser nos échantillons par les deux technologies de RNAseq et de puces CATMA pour avoir une meilleure couverture des gènes dérégulés. Grâce à ce choix, nous avons pu identifier plus de gènes dérégulés dans nos conditions d'expérience. D'une manière générale, pour les deux virus, les gènes identifiés comme dérégulés ne subissent pas de fortes variations par rapport à leur témoin. Dans les analyses des puces CATMA par exemple, peu de gènes ont une valeur de log2ratio supérieure à un ce qui correspond à une variation de deux fois. Ceci ne met pas en cause la réalité de la dérégulation puisque les p-values indiquent clairement que les échantillons sont statistiquement différents, mais les gènes ne sont que faiblement dérégulés lors de l'infection par nos deux virus.

L'identification d'un certain nombre de gènes communs avec d'autres études transcriptomiques ou protéomiques de cellules du phloème ou de sève (Tableau 14, page 127 et Tableau 19 page 146) nous permet de corréler la réponse de la plante au LMV et au TuYV avec une expression dans les cellules phloémiennes.

Le fait que l'on retrouve peu de gènes dérégulés communs aux deux virus était prévisible puisque ce sont deux virus très différents l'un de l'autre. La réponse de la plante est spécifique pour chacun d'entre eux : la répression de la voie d'assimilation du sulfate et l'activation du mécanisme de SAR pour le LMV et la voie des glucosinolates pour le TuYV. Dans leur comparaison bio-informatique d'études transcriptomiques réalisées à la suite d'infections virales par des virus très différents, Postnikova and Nemchinov (2012b) ont également pointé du doigt le peu de gènes communs à tous les virus et la grande variété de gènes dérégulés par les différents virus (23% du génome d'A. thaliana) dont plus de deux tiers sont induits. Néanmoins ils ont identifié le gène AT5G38530, dérégulé par tous les virus considérés. Ce gène est impliqué dans la voie de biosynthèse du tryptophane, précurseur pour la synthèse de nombreux métabolites secondaires tel l'auxine, l'acide indole-3-acétique (AIA) mais aussi les GS et la camaléxine, qui participent aux mécanismes de défense de la plante contre les pathogènes. Avec surprise, ce gène ne figure pas dans nos analyses différentielles. Cette voie de défense pourtant courante ne semble donc pas activée dans notre étude. On peut donc s'interroger sur l'absence d'induction de ce gène dans les CC infectées : est-ce lié au temps tardif de l'infection, le gène étant situé en amont de la voie ou à la spécificité tissulaire ou encore à l'absence d'effet du LMV et du TuYV sur leur expression?

A des temps tardifs d'infection et ce, pour la plupart des virus étudiés, cette étude a identifié des enrichissements en terme d'ontologie concernant le mécanisme de respiration cellulaire, les processus de catabolisme et de sénescence pour les gènes induits et plutôt des voies de la photosynthèse et de la production d'énergie pour les gènes réprimés. Contrairement à nos résultats, ils observent également une sur-représentation des gènes réprimés impliqués dans la majorité des voies de réponse aux stress activées à des temps plus précoces (réponse au stress oxydatif, à l'auxine ou à l'acide abscissique, voie de biosynthèse des glucosinolates).

# b. <u>Dérégulations spécifiques identifiées dans les CC de plantes infectées par le LMV ou par le TuYV</u>

# • Infection par le LMV

Deux voies biologiques semblent être particulièrement dérégulées dans les CC d'*A. thaliana* suite à une infection par le LMV. Il s'agit des voies du métabolisme du soufre et du mécanisme de défense de SAR. Dans le premier cas, vu que les gènes identifiés sont réprimés lors de l'infection par le LMV, une hypothèse envisageable est l'inhibition de ces gènes par le virus pour faciliter la progression de l'infection. Il est difficile de comprendre à ce stade comment cette inhibition pourrait avoir lieu et quel est l'effet direct ou indirect de la répression de l'expression de ces gènes sur l'infection. On peut imaginer qu'en réprimant certains gènes de cette voie, le LMV empêcherait ou réduirait la synthèse de certains composés soufrés impliqués dans la réponse à certains pathogènes, comme les glucosinolates ou la camaléxine par exemple. Cette voie semble également touchée lors de l'infection d'A. thaliana par un autre *Potyvirus* le TuMV (Manacorda et al., 2013) puisque certains gènes impliqués dans le métabolisme du soufre, comme les gènes APR1 et APS1 ont été trouvés réprimés par le virus (Yang et al., 2007). Aucune étude transcriptomique concernant d'autres *Potyvirus* n'a mis en évidence pour le moment une implication de ces virus dans l'assimilation du soufre mais d'autres études sur ces virus l'indiquent pour le ZYMV (Shapiro et al., 2013), le PVY (Baebler et al., 2011) ou le Clover yellow vein virus (ClYVV) (Atsumi et al., 2009).

Certains gènes impliqués dans le mécanisme de SAR sont quant à eux induits lors de l'infection par le LMV. Cette dérégulation pourrait être déclenchée par la plante en réponse à l'infection par le LMV. Le mécanisme de SAR permet à la plante de mettre en place une résistance à longue distance, dans les tissus systémiques, et donc de contenir l'infection à un niveau local. Dans ce cas, on peut imaginer aisément que les mécanismes de mise place de cette dérégulation font suite à la détection du virus par la plante qui organise une défense contre ce pathogène. Des études portant sur la protéine HC-Pro (le suppresseur de RNA silencing) des *Potyvirus* suggéraient que le mouvement viral vasculaire nécessite la suppression du silencing (Kasschau & Carrington, 2001). Alamillo et al. (2006) ont démontré que le mouvement du PPV est restreint chez *N. tabacum* par l'action combinée dans l'espace de l'acide salicylique et des mécanismes de RNA silencing. Comme ce dernier aurait lieu dans les CC (Marathe et al., 2000), il pourrait bloquer le virus au niveau du système vasculaire alors que le mécanisme de SAR, acide salicylique dépendant mis en place par la plante, contribuerait à la restriction de l'infection du PPV au niveau des tissus nonvasculaires (Alamillo et al., 2006).

# • Infection par le TuYV

La plante semble répondre par plusieurs voies différentes à une infection par le TuYV. La première implique des métabolites secondaires, les glucosinolates, qui lorsqu'ils sont dégradés, produisent des molécules répulsives contre les herbivores et certains insectes. Une étude récente a montré que cette voie de défense est déclenchée contre le CMV-Fny (virus transmis par puceron) dont le suppresseur de RNA silencing, la protéine 2b permettrait l'accumulation d'un GS indolique : le 4methoxy-indol-3-yl-méthylglucosinolate (4MI3M) qui agit comme répulsif contre les pucerons (Westwood et al., 2013). A l'inverse, l'infection par le TuMV (*Potyvirus* transmis par pucerons) ou le CaLCuV (*Geminivirus* transmis par aleurodes) aurait un effet inhibiteur de l'expression de certains gènes impliqués dans le métabolisme des GS, ce qui suggère que ces virus ont trouvé un moyen d'inhiber cette voie de défense (Tableau 18, page 141). Il a également été montré que certains micro-organismes pathogènes peuvent être inhibée par la voie des GS (Clay et al., 2009).

Une autre voie de défense de la plante contre le TuYV pourrait être le processus de mort cellulaire mis en place par la plante contre certains pathogènes impliquant les gènes *HSFA2* et *BAG6* (Nishizawa et al., 2006).

# Chapitre 2 : Identification d'un partenaire protéique de la protéine RT du TuYV par un crible double-hybride dans la levure

# La protéine CIPK7 se lie au domaine C-terminal de la protéine RT du TuYV et induit une accumulation locale du virus

Cette étude a été réalisée grâce à la mise au point du tri de protoplastes de CC, technique que j'ai développée au début de mon manuscrit (Chapitre1, I.2). Une banque d'ADNc a été construite à partir d'ARN extraits de protoplastes de CC issus de plants d'A. thaliana pSUC2:GFP et triés par FACS. Cette banque a été introduite dans un vecteur pGADT7 (S. cerevisiae lignée Y187) permettant de réaliser des cribles double-hybride dans la levure. Caren Rodriguez de l'équipe de Véronique Brault de l'INRA de Colmar a criblé cette banque avec le domaine C-terminal de la protéine RT du TuYV et a identifié une interaction spécifique avec la protéine CIPK7 (calcineurin B-like protein-interacting protein kinase-7). Le choix de la protéine appât s'est orienté vers la protéine RT en raison du rôle de cette protéine dans le mouvement viral à longue distance (Bruyère et al., 1997, Brault et al., 2000). En l'absence du domaine RT, c'est-à-dire le domaine codé par l'ORF5 synthétisé en fusion avec la protéine CP, le virus peine à s'accumuler dans les feuilles systémiques (Bruyère et al., 1997). Boissinot et al. (2014) ont démontré récemment, à l'aide de virus mutants n'exprimant que la protéine RT entière ou que la protéine RT\*, que les deux formes de la protéine étaient indispensables à un mouvement systémique efficace du CABYV, un Polerovirus proche du TuYV. C. Rodriguez a donc tout d'abord testé l'accumulation en systémie d'un virus TuYV mutant codant pour une protéine RT délétée des 200 derniers acides aminés, semblable à la protéine RT\*. Ce virus mutant appelé TuYV- $\Delta RT_{Cter}$  s'accumule nettement moins que le virus sauvage dans les feuilles systémiques de différentes plantes-hôtes.

Des expériences ont ensuite été réalisées afin de comprendre le rôle de l'interaction de la protéine CIPK7 avec le domaine C-terminal du TuYV *in planta*. L'accumulation du TuYV dans les feuilles systémiques a été testée dans des *A. thaliana* mutants KO pour le gène *CIPK7* (insertion d'ADN-T, SALK124117) mais

aucune différence n'a été observée avec les *A. thaliana* Col0 infectés par le virus sauvage. Ceci peut s'expliquer par le fait qu'il existe au moins 25 gènes codant pour les protéines CIPK chez *A. thaliana* et qu'il peut y avoir une redondance fonctionnelle entre certaines de ces protéines. Par contre, une co-expression transitoire de la protéine CIPK7 fusionnée à la GFP (GFP:CIPK7) avec le virus dans *N. benthamiana* a conduit à une accumulation modérée du TuYV dans les feuilles inoculées qui ne s'est pas répercutée sur le mouvement systémique viral.

Afin de tester une possible régulation des ARNm de la protéine CIPK7 suite à l'infection par le TuYV, des expériences de qPCR ont été réalisées sur des *A. thaliana* inoculés par des pucerons virulifères 10 et 21 jours post-inoculation. Aucune variation n'a été observée par qPCR dans l'expression de ce gène.

L'interaction de la protéine CIPK7 et du domaine C-terminal de la protéine RT du TuYV nous a incité à observer la localisation de ces deux protéines *in planta*. Lors de la co-expression transitoire des protéines GFP:CIPK7 et RT-RFP dans *N. benthamiana,* la protéine GFP:CIPK7 change de localisation puisqu'on la retrouve au niveau des microtubules et du nucléole, alors que lorsqu'elle est exprimée seule, elle se situe au niveau des plasmodesmes, du noyau, du cytoplasme ou d'agrégats cytosoliques mais jamais au niveau du nucléole ni des microtubules. De même, en contexte viral, c'est-à-dire co-exprimée avec le TuYV dans *N. benthamiana*, la protéine GFP:CIPK7 est présente au niveau du noyau (à l'exception du nucléole), de structures ponctuées le long de la membrane plasmique et au niveau des microtubules. Ces expériences suggèrent que la protéine RT pourrait délocaliser la protéine CIPK7 et l'adresser à d'autres compartiments comme les microtubules où elle serait inactive. Par sa localisation naturelle au niveau des plasmodesmes, la protéine CIPK7 pourrait avoir un rôle de « contrôleur » des plasmodesmes qui ralentirait le passage du virus de cellule à cellule.

Ma participation dans cette étude a consisté à préparer des protoplastes à partir de plants d'*A. thaliana* transgéniques pSUC2:GFP sains qui ont été triés par FACS à l'IGBMC (Illkirch-Graffenstaden). J'ai ensuite extrait les ARN des échantillons triés et vérifié leur qualité avant qu'ils ne soient utilisés pour la construction de la banque d'ADNc destinée au crible double hybride en levure.

Voici l'article soumis dans le journal Molecular Plant Pathology:

The calcineurin B-like protein-interacting protein kinase-7 binds the C-terminal domain of the readthrough protein of *Turnip yellows virus* and increases local virus accumulation

<sup>1</sup>Caren Rodriguez-Medina, <sup>1,#</sup>Dalya Gereige, <sup>2</sup>Sophie Chapuis, <sup>1,†</sup>Maryam Rastegar, <sup>1</sup>Sylvaine Boissinot, <sup>1</sup>Monique Erdinger, <sup>2</sup>Véronique Ziegler-Graff, <sup>3</sup>Frédéric Revers and <sup>1</sup>Véronique Brault <sup>1</sup>UMR 1131 SVQV INRA-UDS, 28 rue de Herrlisheim, 68021 Colmar, France

<sup>2</sup>Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Laboratoire propre du CNRS conventionné avec l'Université de Strasbourg, 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg, France

<sup>3</sup>INRA, Université de Bordeaux, UMR 1332 de Biologie du Fruit et Pathologie 33882 Villenave d'Ornon, France

<sup>#</sup>present address: Lebanese University, Faculty of Science 3, Tripoli, Liban

†present address: Shiraz University, Plant Protection Department, Shiraz, Iran

#### Total word count: 6262

Summary: 204 Introduction: 639 Results: 2341 Discussion: 1014 Experimental procedure: 1312 Acknowledgements: 131 Legends figures: 621

#### Summary

*Turnip yellows virus* (TuYV) is a phloem-limited virus strictly transmitted by aphids. TuYV encodes a protein of 74 kDa known as the readthrough protein (RT) which is involved in virus movement. In particular, we showed that deletion of the C-terminal part of the RT protein resulted in a TuYV mutant affected in long-distance movement. A phloem-specific

165

cDNA library from *Arabidopsis thaliana* was screened by the yeast two-hybrid system using the C-terminal domain of the RT protein as bait, and the calcineurin B-like proteininteracting protein kinase-7 (AtCIPK7) was subsequently identified as an interacting factor. When a GFP:CIPK7 fusion protein was transiently co-expressed with the virus in *Nicotiana benthamiana*, the level of TuYV accumulation increased in infiltrated leaves, but no stimulatory effect was observed on long-distance movement of the virus. Interestingly, co-infiltration of GFP:CIPK7 and RT-RFP or the full-length viral construct in *N. benthamiana* induced a re-localization of GFP:CIPK7 from plasmodesmata to microtubules, a location that was not targeted by the kinase alone. These results suggest that AtCIPK7 interacts with the C-terminal part of the RT protein of TuYV to negatively regulate virus export from the cell. Re-distribution of AtCIPK7 by the RT protein to distinct sites could be a viral counter-defense to hamper its activity.

#### Introduction

*Turnip yellows virus* (TuYV), previously referred to as *Beet western yellows virus* (BWYV), is a polerovirus belonging to the *Luteoviridae* family. This phloem-limited group of plant viruses is transmitted by aphids and possesses a small (5.6 kb) plus sense-RNA genome protected by an icosahedral capsid of about 25 nm. The viral particles are composed of two structural proteins: the major coat protein of 22 kDa (CP) and a minor component of ca. 54 kDa referred to as the readthrough (RT\*) protein (Brault et al., 1995, Cheng et al., 1994, Filichkin et al., 1994, Jolly & Mayo, 1994, Wang et al., 1995). The RT\* protein arises from C-terminal cleavage of the full-length precursor RT protein of 74 kDa synthesized after ribosomes bypass the CP stop codon. Both structural proteins, CP and RT\*, are involved in virus movement and aphid transmission (Brault et al., 1995, Bruyère et al., 1997, Chay et al., 1996, Mutterer et al., 1999, Peter et al., 2009, Peter et al., 2008, Wang et al., 1995). Involvement of the full-length RT protein of TuYV in virus movement was previously demonstrated by monitoring *in planta* progression of viral mutants either unable to synthesize the RT protein or bearing small deletions in the C-terminal domain (Brault et al.,

166

1995, Bruyère et al., 1997). More recently the RT protein was shown to play a role in virus phloem limitation (Peter et al., 2009). An additional viral protein (P4) encoded by ORF4 is also involved in polerovirus movement. The P4 protein possesses characteristics of conventional movement proteins (Schmitz et al., 1997, Sokolova et al., 1997, Tacke et al., 1991, Tacke et al., 1993) but its involvement in polerovirus movement was shown to be host-specific (Lee et al., 2002, Ziegler-Graff et al., 1996b).

To accomplish their infection cycle in the plant, poleroviruses rely on specific interactions with host cellular proteins but so far only a few partners of polerovirus proteins have been identified. The P0 protein encoded by TuYV and *Cucurbit aphid borne yellows virus* (CABYV) was shown to bind, *in vitro* and in yeast, to components of the SCF family of ubiquitin E3 ligases, namely ASK1 and ASK2 proteins (Pazhouhandeh et al., 2006). These interactions induce the degradation of AGO1, the major component of the RNA-induced silencing complex, leading to suppression of the plant's viral-targeted cellular defenses (Baumberger et al., 2007, Bortolamiol et al., 2007, Csorba et al., 2010). Translation initiation factors from the 4G and 4E families have recently been shown to play a role in the infection cycles of, respectively, TuYV and *Beet mild yellowing virus* (BMYV) in *A. thaliana* and to directly interact in yeast with the 5' viral genome-linked protein (Reinbold et al., 2013). The ORF4-encoded movement protein (17 kDa) of *Potato leafroll virus* (PLRV) was shown to be phosphorylated *in vitro* by a membrane-associated protein kinase (Sokolova *et al.*, 1997), but its specific role in the virus cycle *in planta* has not been demonstrated.

To obtain more insights into the function of the RT protein in polerovirus movement and in particular to decipher the role of the C-terminal domain of the protein, we monitored *in planta* virus accumulation of a TuYV RT C-terminal deletion mutant. We confirmed that this domain is involved in TuYV long-distance movement. By screening a phloem specific cDNA library from *A. thaliana* using the C-terminal domain of the RT protein as a bait, we identified calcineurin B-like-interacting protein kinase 7 (AtCIPK7) as a putative interacting partner. Transient over-expression of AtCIPK7 in leaves promoted an increase of local virus accumulation, which had no consequence on virus long-distance movement. Co-expression

of AtCIPK7 with the RT protein or the whole virus induced a relocalization of AtCIPK7 to microtubules, a cellular site where the protein kinase was never observed when expressed alone. This study suggests a role of AtCIPK7 in inhibiting virus export from the infected cells.

#### Results

#### Role of the C-terminal domain of the RT protein of TuYV in the viral cycle

TuYV virions are composed of two structural proteins, the major coat protein of 22 kDa (CP), and a minor component of ca. 54 kDa (named RT\*) arising from a C-terminal cleavage of the full RT protein of 74 kDa (theoretical MW) (Fig. 1A). The lysine at position 437 in the TuYV-RT is the last C-terminal amino acid of the RT\* protein identified by mass spectrometry (Revollon et al., 2010) suggesting that the TuYV-RT protein is cleaved at a close position downstream from this amino acid. To investigate more precisely the function of the C-terminal part of the TuYV-RT protein in the virus cycle, a deletion was introduced downstream this position (Lys 437) since we previously showed that a sequence encompassing this position was strictly required for the readthrough mechanism of the CP stop codon, reflecting a long-distance effect on this process (Bruyère et al., 1997). A deletion starting at the glutamine at position 471 was therefore introduced in the RT sequence of TuYV-NM, a wild-type virus sequence bearing two unique restriction sites in the RT sequence (Brault et al., 2005). The deletion virus mutant, designed hereafter as TuYV-ΔRT<sub>Cter</sub>, was missing the 200 C-terminal amino acids of the RT protein (Fig. 1A). TuYV- $\Delta RT_{Cter}$  was fully competent for replication in plant protoplasts inoculated with *in vitro* synthesized transcripts and produced, together with the major CP, a truncated RT protein of about 60 kDa migrating slightly above the RT\* (Fig. 1B).

To address the ability of TuYV- $\Delta RT_{Cter}$  to infect whole plants, the virus mutant was introduced into a binary vector under the control of the *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S promoter in order to be inoculated to *Montia perfoliata*, *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana benthamiana* by agroinfiltration. When assayed by ELISA, no difference in

168

accumulation of TuYV-NM or TuYV- $\Delta RT_{Cter}$  was observed in agroinoculated leaves of M. perfoliata and N. benthamiana when compared with TuYV-WT (Table S1). Virus titer was then measured on the young non-inoculated leaves of M. perfoliata and A. thaliana 4 weeks after inoculation. TuYV- $\Delta RT_{Cter}$  infected a lower number of plants compared to TuYV-WT or -NM (Table 1). Moreover, TuYV- $\Delta RT_{Cter}$  accumulation in systemic leaves, measured by ELISA, was significantly lower compared to TuYV-WT or -NM (Table 1) and remained at such low level in *M. perfoliata* during the eight weeks of three independent experiments (Table S2). These results show that long-distance movement of TuYV-ART<sub>Cter</sub> is reduced but not completely abolished in the two plant species tested. To provide additional evidence of the slower migration rate of TuYV- $\Delta RT_{Cter}$ , virus accumulation was followed in N. benthamiana plants, whose phyllotaxis is better adapted to monitor virus progression towards systemic leaves. Previous experiments showed that when the virus source was removed by cutting the infiltrated leaves at 7 days post-inoculation (dpi), TuYV-WT had already spread to non-inoculated leaves as it was detected there 2 weeks later (data not shown). Based on these results, we compared the time course of TuYV-WT or TuYV- $\Delta RT_{Cter}$  accumulation at earlier time points in the newly-developed leaves after cutting the inoculated leaves 7 dpi. Both TuYV-WT and the mutant TuYV-ΔRT<sub>Cter</sub> were undetectable by ELISA in non-inoculated leaves 7 dpi (Table 2, 0 days post-cutting (dpc). Four days after removing the viral source the wild-type virus was detected in the systemic leaves in 1 out of 10 inoculated plants (Table 2, 4 dpc). The number of plants infected with TuYV-WT gradually increased during the following days, reaching 70% of infection at two weeks postcutting (Table 2, 14 dpc). Conversely TuYV-ART<sub>Cter</sub> was never detected in upper noninoculated leaves when the viral source leaf was withdrawn 7 days after infiltration (Table 2). Taken together, these data showed that TuYV long-distance movement is greatly impaired in the absence of the C-terminal domain of the RT protein.

CIPK7 from A. thaliana is a potential phloem-partner of the C-terminal domain of the TuYV-RT protein
In order to unravel the function of the C-terminal domain of the TuYV-RT protein in the infection cycle, we looked for phloem partners of this viral domain. A phloem specific cDNA library of A. thaliana was directly constructed in Saccharomyces cerevisiae strain Y187, using total RNA extracted from companion cell protoplasts. These phloem specific cells were isolated from transgenic A. thaliana expressing the GFP under the control of the AtSUC2 companion cell promoter (Imlau et al., 1999). Fluorescent protoplasts were sorted by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) and sorting efficacy was controlled by measuring expression of companion cell specific genes by real-time PCR (Chapuis et al., in preparation). The cDNA library cloned into the pGADT7 vector contained an average insert size of about 750 nucleotides and had a titer of  $1.5 \times 10^7$  cfu/ml. The C-terminal domain of TuYV-RT protein was expressed as a fusion with the GAL4 DNA binding domain (BD) in yeast strain Y2HGold and subsequently used as a bait. Screening of the phloem cDNA library using the viral bait was performed by yeast mating. A cDNA clone encoding the Cterminal sequence of the CIPK7 from A. thaliana referred thereafter as AtCIPK7 (AT3G23000, residues 346-429) was identified as a potential interacting partner of the viral domain. CBL-interacting protein kinases (CIPKs) are a group of serine/threonine protein kinases that interact with the Ca<sup>2+</sup> sensors Calcineurin B-like proteins (CBLs) (Kolukisaoglu et al., 2004, Weinl & Kudla, 2009). To confirm the interaction between the AtCIPK7 partial domain and the C-terminal domain of the TuYV-RT protein, the plasmid bearing the partial AtCIPK7 cDNA sequence (referred to hereafter as pGAD-CIPK7<sub>346-429</sub>) was introduced into Y2HGold yeast strain together with pGBKT7-RT<sub>Cter</sub>. Serial dilutions of the co-transformed cells were plated onto a medium deprived of leucine and tryptophan [-LW], to allow yeast growth after transformation, and onto the [-LWHA] medium (LW medium additionally deprived of histidine and adenine) to select yeast cells in which in vivo interactions occurred (Fig. 2). Interestingly, we observed that the C-terminal part of the RT protein was able to interact with the full-length AtCIPK7, a protein of 429 amino acids, but not with the first 283 N-terminal amino acids of AtCIPK7 (Fig. 2). No yeast growth was observed on [-LWHA] medium when pGBKT7-RT<sub>Cter</sub> was present with empty pGADT7 or pGAD.GH vectors.

170

These results show that the C-terminal domain of the RT protein preferentially binds sequences localized at the C-terminus of the AtCIPK7. This interaction was specific because no binding was recorded in yeast between the C-terminal domain of AtCIPK7 and the major (CP) and minor (RT\*) coat proteins of TuYV (not shown). Interaction between AtCIPK7 and the complete RT protein could not be assessed because the readthrough domain of the protein activated transcription of both *ADE2* and *HIS3* reporter genes when expressed alone. The specific binding between the AtCIPK7 and the C-terminal part of the RT protein observed in yeast may reflect a genuine interaction *in planta* with the free C-terminal part of the RT protein has never been detected in infected plants, either because of a lack of sensitivity of the detection techniques or because of a rapid degradation of this product, the second hypothesis is more likely.

#### Effect of expression inhibition or over-expression of AtCIPK7 on TuYV accumulation

To address the function of AtCIPK7 in the TuYV cycle, we analyzed virus accumulation in a *cipk7 A. thaliana* knock-out mutant (T-DNA insertion, SALK124117). The T-DNA insertion encompasses the 3' terminal coding and non-coding sequences of *AtCIPK7*. Absence of AtCIPK7 mRNA expression in the *cipk7* mutant was confirmed by RT-PCR (Fig. S1). Homozygous plants were inoculated with the virus using viruliferous aphids, and TuYV accumulation was measured three weeks post-inoculation in the non-inoculated leaves. In two independent experiments, no significant difference in virus accumulation was observed in *cipk7* when compared with TuYV accumulation in Col-0 (Table S3). Since genome analysis has shown that there are at least 25 CIPKs in *A. thaliana* (Kolukisaoglu *et al.*, 2004, Weinl & Kudla, 2009), functional redundancy between the different CIPK proteins is likely, which may explain the absence of differential virus accumulation between *cipk7* and Col-0 plants.

In another set of experiments, we investigated the effect of overexpression of AtCIPK7 on TuYV accumulation. *N. benthamiana* leaves were co-infiltrated with a TuYV construct together with one of the AtCIPK7 fusion constructs where GFP was placed at the N- or Cterminus of the protein. As a control, leaves were infiltrated with both the virus and the free GFP constructs. Expression of the AtCIPK7-GFP fusion proteins was confirmed by Westernblot two days after infiltration (Fig. S2). TuYV accumulation in inoculated tissue was measured by ELISA three to four days post-inoculation to evaluate local virus accumulation. No statistical difference in virus accumulation was observed when TuYV was co-expressed with AtCIPK7 fused to GFP at its C-terminus (CIPK7:GFP) or with free GFP (Fig. 3). Conversely, when GFP was positioned at the N-terminus of AtCIPK7 (GFP:CIPK7) leaving the AtCIPK7 C-terminus free, co-expression of the virus and this protein caused a moderate but significant increase in the local accumulation of TuYV in infiltrated tissue. When referred to the standard curve of known amounts of TuYV virions, this augmentation represents a 5 to 10 fold increase in virus accumulation (Fig. 3 and Fig. S3).

To determine whether such increase in TuYV titer observed in leaves transiently expressing GFP:CIPK7 could influence virus export from the inoculated leaves, systemic leaves of plants co-infiltrated with TuYV and GFP:CIPK7 constructs or TuYV and GFP were assayed by ELISA at two weeks post-inoculation (two independent experiments, 38 plants inoculated for each condition). We did not observe a higher percentage of plants that became systemically infected when the virus was infiltrated with GFP:CIPK7 construct (47%) compared to plants infiltrated with TuYV and free GFP constructs (66%). This result shows that the local increase of TuYV accumulation in infiltrated leaves observed when GFP:CIPK7 was transiently overexpressed, did not favor virus movement towards upper non-inoculated leaves.

#### Regulation of CIPK7 mRNA after infection of A. thaliana with TuYV

Since we observed that overexpression of GFP-CIPK7 affected TuYV accumulation, we addressed the question of whether TuYV could have a feed-back effect on the expression of AtCIPK7 mRNA. Accumulation of AtCIPK7 mRNA was quantified by qRT-PCR in *A. thaliana* plants inoculated with TuYV using viruliferous aphids. *M. persicae* were allowed

to acquire purified virus particles from an artificial diet before being transferred onto *A. thaliana* Col-0 plants. As a control, aphids fed on the artificial diet free of virions were deposited onto test plants. Aphids were eliminated by an insecticide treatment four days after loading and RNA was extracted from newly developed leaves 10 or 21 days post-aphid infestation (dpai). Presence or absence of viral RNA in systemic leaves was first tested on each individual plant by RT-PCR before combining the RNA samples of infected plants for qRT-PCR. While *AtCIPK7* expression was similar in infected and non-infected plants 10 dpai, a moderate reduction of AtCIPK7 mRNA accumulation was observed 21 dpai (Fig. 4). When measured by qRT-PCR, no significant differences in virus level were observed at 10 dpai and 21 dpai (data not shown) suggesting that the moderate decrease of AtCIPK7 mRNA 21 dpai was not linked to virus accumulation.

# Subcellular redistribution of AtCIPK7 upon co-expression with the TuYV-RT protein or in a viral context

As the GFP:CIPK7 construct influenced TuYV accumulation in infiltrated leaves, we wondered whether the expressed protein was localized in the same subcellular organelle as the TuYV RT protein. GFP:CIPK7 construct was transiently expressed in *N. benthamiana* and epidermal cells observed under confocal microscopy. GFP:CIPK7 was localized in the nucleus, the cytoplasm (Fig. 5A) and in cytosolic aggregates (Fig. 5C, lower panels). Interestingly, GFP:CIPK7 was also observed in plasmodesmata as confirmed by the co-localization of GFP:CIPK7 with the plasmodesmata marker PDLP1 (Amari et al., 2010) fused to RFP (Fig. 5A, three right panels). As previously mentioned, the RT-C-terminal domain was never detected in plant extracts and subcellular localization experiments were therefore conducted with the complete TuYV-RT. The TuYV-RT protein fused to RFP at its N-terminus was observed in the nucleolus and cytosol of *N. benthamiana* epidermal cells (Fig. 5B). Interestingly, the RT protein was additionally observed on microtubules as confirmed by the co-localization of the RFP-RT with the microtubule marker tubulin-alpha fused to GFP (TUA:GFP) (Gillespie et al., 2002) (Fig. 5B, three right panels). When

GFP:CIPK7 and RFP:RT fusion proteins were co-expressed in *N. benthamiana* cells, colocalization of both proteins was observed in the nucleolus, on microtubules and in dots located along the plasma membrane in the cytoplasm (Fig. 5C). It is important to point out that localization of AtCIPK7 in the nucleolus and on microtubules was never reported when AtCIPK7 was expressed alone.

Localization of GFP:CIPK7 was further analyzed in the viral context. Because TuYV is a phloem-limited virus that cannot reach mesophyll or epidermal cells, TuYV was delivered as a binary construct bearing the full-length virus sequence by agro-inoculation into epidermal cells of N. benthamiana together with the GFP:CIPK7 construct. Presence of the replicating virus in infiltrated tissue was confirmed by Western blot (data not shown). In this viral context, GFP:CIPK7 was observed in the nucleus, but not in the nucleolus, and as punctuated dots along the plasma membrane in the cytoplasm (Fig. 5D, upper and lower panels). Interestingly, GFP:CIPK7 was additionally targeted to a microtubule-like network (Fig. 5D, middle panel). This localization is similar to the one observed when GFP:CIPK7 was expressed together with the RFP:RT protein (Fig. 5C, middle panels). Even if we cannot discard the hypothesis that viral proteins, other than the RT protein, may affect AtCIPK7 relocalization, these observations strongly support of a role of the TuYV-RT protein in the microtubule network targeting of AtCIPK7. Since GFP:CIPK7 was not observed in the nucleolus, this experiment also suggests that the nucleolar localization of GFP:CIPK7 driven by RFP:RT is an artefact or a transitory/minor effect during the viral cycle and is not observed in the viral infection conditions used.

Taken together, these data suggest that the RT protein expressed either ectopically or from the virus is able to relocate AtCIPK7 to the microtubule network.

#### Discussion

Using a TuYV mutant, we obtained evidence that the C-terminal part of the RT protein is implicated in long-distance transport of the virus. Although this domain is not strictly required for invasion of non-inoculated tissue, it plays an essential role in the process.

174

Recently, we showed that the C-terminal domain of the RT of another polerovirus, CABYV, contrarily to TuYV, is strictly required for systemic movement (Boissinot et al., 2014). Poleroviruses seem therefore to rely on different viral domains to move over long-distances in the plant.

By screening a phloem specific cDNA library by yeast two-hybrid, we showed that the C-terminal domain of the RT protein of TuYV binds AtCIPK7 and, more precisely, the C-terminal part of this kinase protein. AtCIPK7 belongs to a group of serine/threonine protein kinases which interact with the  $Ca^{2+}$  sensors, Calcineurin B-like proteins (CBL) (Kudla et al., 1999). CBLs and CIPKs form complexes that are involved in plant response to environmental signals, particularly salt and osmotic stress (Batistic & Kudla, 2012, D'Angelo et al., 2006, Halfter et al., 2000, Liu et al., 2000, Quan et al., 2007, Shi et al., 2000, Weinl & Kudla, 2009). Genome-wide analyses showed that there are at least 10 CBLs and 25 CIPKs in A. thaliana (Kolukisaoglu et al., 2004, Weinl & Kudla, 2009). CIPKs have a two-domain structure, consisting of a highly conserved N-terminal kinase domain and a variable C-terminal regulatory domain. This latter domain includes a NAF domain (also known as a FISL motif), responsible for interaction with CBLs, and a protein-phosphatase interaction (PPI) domain mediating CIPK interaction with phosphatases (Albrecht et al., 2001, Ohta et al., 2003). Interaction between the kinase active site and its regulatory domain seems to maintain the kinase protein in an inactive state, whereas binding to CBL breaks the interaction between the two domains and activates the kinase (Gong et al., 2002, Guo et al., 2001). We observed that the C-terminal part of TuYV-RT does not bind to the CBL-binding domain but to a peptide that may encompass the PPI domain of AtCIPK7. This suggests that the viral protein may rather influence the activity of the phosphatase binding to PPI than CBL binding.

Transient overexpression of the AtCIPK7 protein tagged to GFP increased local TuYV accumulation in *N. benthamiana*. Such a stimulatory effect on the virus titer was only observed when GFP was fused to the N-terminus of AtCIPK7 and not to its C-terminus, suggesting that a free C-terminus of AtCIPK7 is essential for this effect. These results

obtained *in planta* are in accordance with the experiments performed in yeast, which showed that the C- and not the N-terminal domain of the kinase interacts with the viral RT domain. Surprisingly, the elevated virus accumulation in the inoculated leaves was not correlated with more efficient virus movement towards non-inoculated leaves. A hypothesis explaining this observation could be that overexpression of AtCIPK7 blocks virus exit from the infected cells, therefore inducing an over-accumulation of the virus in the inoculated cells. When analyzing CIPK7 mRNA expression in TuYV infected plants, we observed a moderate reduction in the accumulation of AtCIPK7 mRNA, 21 days after virus inoculation, which could correspond to a virus counter-mechanism to impede the action of the kinase. Considering the phloem-restriction of this virus, it is still conceivable that the AtCIPK7 mRNA is more tightly regulated in infected phloem cells than in other cell types, an effect that would be minored in the global analysis performed here.

As previously mentioned, the C-terminal domain of the RT protein in its free form has never been detected in plants, implying that the interaction we observed between this peptide and AtCIPK7 could reflect either a genuine interaction before destabilisation of the viral product, or an interaction with the complete RT protein. The second hypothesis is more likely and we therefore conducted co-localization experiments with the complete RT protein of TuYV and AtCIPK7. The TuYV-RT protein fused to RFP was observed in the nucleolus and microtubules. The GFP:CIPK7, when expressed alone, localized in the cytoplasm and in plasmodesmata. When GFP:CIPK7 and RFP:RT fusion protein constructs were co-infiltrated into N. benthamiana cells, AtCIPK7 was redirected to the nucleolus and the microtubules where the protein was never observed when expressed alone. In the viral context, only relocalization of GFP:CIPK7 to the microtubule-like network was observed, indicating that the nucleolus re-targeting of the GFP:CIPK7 previously observed when the RFP:RT protein was co-expressed could be an artefact of the assay or a transitory effect not monitored in our experimental conditions. Interestingly, nucleolar localization of PLRV-RT protein has been reported previously but this nucleolar localization was lost in PLRV-infected plants suggesting that in natural viral infection, the RT protein is probably not localized in the

176

nucleolus (Haupt et al., 2005). Although physical interaction between the two fusion proteins (GFP:CIPK7 and RFP:RT) could not be confirmed by FLIM/FRET due to low fluorescent signals, these experiments suggest a direct or indirect interaction between the two proteins, leading to the redistribution of AtCIPK7 to microtubules where TuYV-RT is located. Based on these results, we propose a model setting up the basis for the function of AtCIPK7 in the TuYV cycle. Making the assumption that the plasmodesmata localization of AtCIPK7 may hamper virus exit to adjacent cells, the free RT protein by its C-terminal domains would, directly or indirectly, relocate the kinase to microtubules. This interaction occurs specifically with the C-terminus of the protein which is absent from the viral particles suggesting that virions alone cannot relocate the AtCIPK7. Removing or reducing the amount of AtCIPK7 present at plasmodesmata would enable the virus particles to move to neighboring cells.

Implication of a CIPK protein in plant virus cycle is a novel concept that has only been reported for *Cucumber mosaic virus* (CMV). The CMV polymerase 2a protein was identified as an interacting partner of the tobacco NtCIPK12 homolog (Kang et al., 2012). The C-terminus of NtCIPK12 was able to phosphorylate the 2a protein (Kang *et al.*, 2012). Further examination of the RT protein phosphorylation status by AtCIPK7 should bring more insights into the biological function of AtCIPK7 in the TuYV cycle.

#### **Experimental procedures**

#### Viral mutant construct and plant inoculation

To obtain TuYV- $\Delta$ RT<sub>Cter</sub>, the TuYV mutant bearing a deletion of the C-terminal part of the RT protein, conventional PCR cloning techniques were employed. The plasmid pBWNhe/Mlu, containing the full-length sequence of TuYV (previously referred to as *Beet western yellows virus*) with two additional restriction sites NheI and MluI (Brault *et al.*, 2005) was used as template for PCR amplification using the oligonucleotides listed in Table S4. The PCR fragment was digested by NheI and MluI enzymes and introduced into the NheI-MluI-digested pTuYVNhe/Mlu to yield the pTuYV $\Delta$ RT<sub>Cter</sub>. To construct the plasmid used for agroinoculation, the *SpeI-Sal*I fragment from pTuYV $\Delta$ RT<sub>Cter</sub> was subsequently

subcloned into pBinTuYVG $\Delta$ RN (Leiser et al., 1992) digested with the same enzymes. The plasmid constructs were verified by DNA sequencing. The resulting plasmid was introduced into *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (Holsters et al., 1980) for agroinoculation. *A. tumefaciens* harboring the binary plasmids was grown to an optical density (OD) at 600 nm of 0.5 and agroinfiltrated into different plant species (English et al., 1997). Inoculated plants were assayed by double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) three weeks post-inoculation (Clark & Adams, 1977) with an antiserum raised against BMYV (Loewe, Kronach, Germany). *A. thaliana* Col-0 were also inoculated with TuYV using 5 aphids per plant which had previously been fed on purified virus (50 µg/ml) (Bruyère *et al.*, 1997).

#### Protoplast infection and viral protein detection

Protoplasts of *Chenopodium quinoa* were inoculated with viral RNA transcripts by electroporation as described by Bruyère (Bruyère *et al.*, 1997). Proteins were extracted from infected protoplasts and analyzed by Western blot using coat protein- and RT-specific antibodies (Reutenauer et al., 1993).

#### Yeast two-hybrid assay and protein detection in yeast

Total RNA was extracted from fluorescent protoplasts expressing the GFP under the control of the AtSUC2 companion cell specific promoter (Chapuis *et al.*, in preparation) using RNeasy Plant mini kit (Qiagen) and following the manufacturer's instructions. *Isolated RNA was used to construct an A. thaliana* companion cell specific cDNA library in the pGADT7 vector, directly in *Saccharomyces cerevisiae* strain Y187, following the protocol from the "Mate and Plate" library system (Clontech). Y2HGold yeast cells, containing the reporter genes *HIS3* and *ADE2*, were transformed with a construct expressing the C-terminal part of the RT protein sequence (nts 4768 – 5495) fused to the GAL4 DNA binding domain (BD) into the pGBKT7 vector, and the resulting fusion protein was used as bait. The phloem cDNA library was screened against the bait by yeast mating using the Matchmaker<sup>TM</sup> Gold

Yeast Two-Hybrid Gal4 promoter-based system (Clontech) as described by the manufacturer. Selection of the colonies in which interactions occurred was made by plating yeast cells onto minimal synthetically defined medium for yeast (SD medium) deprived of leucine, tryptophan, histidine and adenine [-LWHA]. The prey fragments of the yeast clones developing on the selective media were amplified by PCR and sequenced. The resulting sequences were used to identify the corresponding interacting proteins in the GenBank database.

The N-terminal domain of AtCIPK7 covering the first 283 amino acid residues was amplified by RT-PCR and cloned into the pGADT7 vector between EcoRI and BamHI sites to yield pGAD-CIPK7<sub>1-283</sub> using the primers listed in Table S4. The AtCIPK7 full-length sequence, cloned into the pGAD.GH vector (pGAD-CIPK7-FL<sub>1-429</sub>), was kindly provided by J. Kudla. In order to test the interaction of pGAD-CIPK7-FL<sub>1-429</sub>, pGAD-CIPK7<sub>1-283</sub>, and pGAD-CIPK7<sub>346-429</sub> with pGBKT7-RT<sub>Cter</sub>, Y2HGold yeast cells were co-transformed with one of the pGAD-derived constructs and with pGBKT7-RT<sub>Cter</sub> using the lithium acetate method. Co-transformed yeast cells were selected on SD medium lacking leucine and tryptophan [-LW] before being spotted onto SD [-LWHA] after serial dilutions in 2% glucose (A<sub>600</sub>= 1 to 10<sup>-4</sup>). Yeast cells were grown at 23°C for 8 days. All experiments were performed in triplicate. Empty pGADT7 or pGAD.GH vectors were used as negative controls.

#### Subcellular localization by confocal microscopy

Site-directed mutagenesis was performed to obtain the full-length TuYV-RT sequence. The UAG stop codon of the coat protein was changed to UAC using the QuikChange Lightning site-directed mutagenesis method (Stratagene) following the manufacturer's instructions and using pBW<sub>0</sub> as template (Veidt et al., 1992) and the primers listed in Table S4. The full-length coding sequence of AtCIPK7 was amplified by RT-PCR from total RNA extracted from *A. thaliana* (RNeasy plant mini kit, Qiagen). AtCIPK7 and RT protein fused to a fluorochrome were generated by the Gateway technique according to the manufacturer's

instructions (Invitrogen). Briefly, AtCIPK7 and RT sequences were recombined into the Gateway donor plasmid pDONR207 (Invitrogen) to yield entry clones which were subsequently analyzed by sequencing. Entry clones were further used for recombination with the destination vectors pH7WGR2 for expression in plants of RFP N-terminal fusion of the RT protein, and pK7WGF2 or pK7FWG2 for expression of AtCIPK7 fused with GFP at, respectively, its N- or C-terminus (Karimi et al., 2002). The primers containing attB1 and attB2 recombination sequences that were used to generate Gateway constructs are listed in Table S4.

*A. tumefaciens* C58C1 was transformed with the recombinant Gateway constructs and three to four week old *N. benthamiana* plants infiltrated (English *et al.*, 1997). All infiltrations were performed in the presence of the viral silencing suppressor of *Tobacco bushy stunt virus*, the P19 protein. Images were acquired 48 hours after infiltration using a laser scanning confocal microscope (Zeiss) with software package LSM510 (version 2.8), equipped with a 63× water-corrected objective in multitrack mode. eGFP was excited with the 488 nm line of an Argon laser and detected via a 505-530 nm band emission pass filter. mRFP was excited at 543 nm and detected with a 560 nm long pass filter. Protein expression was analyzed by Western blot assay using commercial antibodies directed against mRFP. In-house made eGFP antibodies were provided by the "Institut de Biologie Moléculaire des Plantes" (IBMP-CNRS, Strasbourg, France).

#### qRT-PCR analysis of CIPK7 expression in TuYV infected plants

Total RNA was isolated from young leaves collected from mock-inoculated and virusinfected *A. thaliana* using an RNeasy Plant mini kit (Qiagen) and following the manufacturer's instructions. On-column DNase treatment using RNase-free DNase set (Qiagen) was performed. Three biological samples were analyzed per treatment and each sample represented a pool of RNA isolated from three plants. Presence of the virus was tested by RT-PCR before pooling the RNA extracts. Complementary DNA was synthesized from 1 µg total RNA using oligo (dT) primers and SuperScript<sup>®</sup> III reverse transcriptase

180

(Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. qPCR primers were designed using ProbeFinder 2.45 (Roche Applied Sciences) (Table S4). Specificity of PCR primers was assessed by melting curve analysis of PCR products. PCR was performed using the Bio-Rad CFX96 Touch<sup>TM</sup> Real-Time PCR Detection System and SsoFast<sup>TM</sup> EvaGreen<sup>®</sup> Supermix (Bio-Rad). Ten microliters of PCR reaction contained 12.5 ng cDNA, 400 nM primers and 5 µl SsoFast EvaGreen supermix. Average amplification efficiency (E) was determined by LinRegPCR. Relative expression levels were normalized to *EXPRESSED PROTEIN*, *At4g26410* (Czechowski et al., 2005), whose cycle threshold (C<sub>T</sub>) value was subtracted from the C<sub>T</sub> value of *AtCIPK7*, yielding a  $\Delta$ C<sub>T</sub> value. The relative expression levels of *AtCIPK7* were calculated using the  $\Delta\Delta$ C<sub>T</sub> method. The qPCR cycles were set up as follows: 95°C for 30 sec followed by 40 cycles at the following conditions: 95°C for 5 sec, 61°C for 5 sec and 77°C for 5 sec; melt curve analysis was performed at 55°C to 95°C in 0.5°C increments for 5 sec.

#### T-DNA mutant characterization

The *A. thaliana* T-DNA insertion mutant *cipk7* (SALK\_124117) in the Col-0 background was obtained from the Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) (Alonso et al., 2003). Insertion of the T-DNA sequence into the CIPK7 sequence of the *cipk7* mutant was controlled by PCR genotyping using gene-specific primers and left border primers of the T-DNA insertion (LBb1) (Table S4). Absence of expression of AtCIPK7-mRNA in *cipk7* mutant was controlled by RT-PCR on total RNA extracts (RNeasy Plant mini kit, Qiagen), and RNA integrity was confirmed by RT-PCR amplification of actin mRNA. All primers are described in Table S4.

#### Acknowledgments:

We thank Jörg Kudla (Münster University, Münster) for giving us the AtCIPK7 full-length clone, for critical reading of the manuscript and for fruitful discussions. Manfred Heinlein (IBMP, Strasbourg) and Christophe Ritzenthaler (IBMP, Strasbourg) are acknowledged for

providing the markers used in confocal microscopy and for reading the manuscript (M. H.). GFP antibodies were kindly provided by Danièle Scheidecker (IBMP, Strasbourg). We would also like to thank members of the experimental unit of INRA-Colmar for their valuable technical assistance with plant production. We are also grateful to Danica Goggin (University of Western Australia) for English proofreading of the manuscript. This work was financed by the French National Agency for research (ANR) in the frame of the ViroMouv project (ANR-08-GENM-016-003). C. R-M, D. G and S. C were financed through the ANR project.



**Fig. 1:** (A) Schematic representation of TuYV-ΔRT<sub>Cter</sub> with the position of the encoded structural proteins (CP and RT\*) and the full-length RT protein (RT) (arrows). The grey hatched area at the C-terminal part of the RT of TuYV-NM (Brault et al., 2005) has been deleted in TuYV-ΔRT<sub>Cter</sub>. Positions of the introduced restriction sites Nhel and Mlul in TuYV-NM and in TuYV-ΔRT<sub>Cter</sub> are indicated. (B) Western blot analysis of TuYV capsid proteins in transcript-infected *C. quinoa* protoplasts. Proteins extracted from 50000 protoplasts 72 h after inoculation were loaded onto a polyacrylamide gel. The upper portion of the blot was incubated with an antiserum raised against the ORF5-encoding protein and the CP protein was detected in the lower portion of the blot using antibodies raised against TuYV-CP (Reutenauer et al., 1993). Positions of the molecular weight markers are indicated on the left. Mock: Mock-inoculated protoplasts; Pur. Virus: Purified TuYV-WT.



**Fig. 2:** Interaction between the C-terminal part of the TuYV-RT protein and AtCIPK7 in yeast cells. The yeast strain Y2HGold was co-transformed with pGBKT7-RT<sub>cter</sub> and one of the following constructs: pGADT7-CIPK7<sub>346-429</sub>, pGAD.GH-CIPK7-FL<sub>1.429</sub>, pGADT7-CIPK7<sub>1.283</sub> or the empty pGADT7 and pGAD.GH vectors. Alternatively the pGAD-derived constructs were combined in yeast with the empty pGBKT7 vector. Ten-fold serial dilutions (from 1 to 10.4) of doubly transformed cells were allowed to grow on a medium missing leucine and tryptophan [-LW] before being transferred onto a selective medium deprived of leucine, tryptophane, histidine and adenine [-LWHA]. Yeast cells were allowed to grow for 8 days at 23°C.



**Fig. 3:** A) Accumulation of TuYV in *N. benthamiana* leaves infiltrated with TuYV and AtCIPK7 fused to GFP. AtCIPK7 was tagged to GFP at its N- or C-terminus (GFP:CIPK7 and CIPK7:GFP, respectively). Virus titer in agroinoculated leaves was analyzed by ELISA at 3 dpi. Each histogram represents the mean absorbance value at 405 nm of 10 plants. \*: The calculated P-value after Kruskal-Wallis analysis (R commander) to compare TuYV accumulation in leaves infiltrated with GFP:CIPK7 with virus accumulation in leaves infiltrated with GFP:CIPK7 with virus accumulation in leaves infiltrated with GFP:CIPK7 with virus accumulation in leaves infiltrated with the free GFP is below 0.05, meaning that virus accumulation is statistically different under these two conditions. N.I.: non-infiltrated leaves; B) Standard curve calibration made from serial dilutions of purified virus (TuYV). The absorbance values were measured 30 min after substrate incubation as in (A).



**Fig. 4:** qRT-PCR analysis of expression of AtCIPK7 mRNA in non-inoculated leaves of *A. thaliana* infected with TuYV. *A. thaliana* plants were infested with non-viruliferous aphids (non-infected plants) or viruliferous aphids (TuYV-infected plants). AtCIPK7 mRNA expression was analyzed 10 or 21 days post-aphid infestation (dpai) and normalized against the reference gene *EXPRESSED* (*At4g26410*). A value of 1 was assigned to AtCIPK7 mRNA levels in plants infested with non-viruliferous aphids. Data represent the mean value ± standard deviation of three biological replicates, each of them representing a pool of 3 plants.



Fig. 5: Subcellular localization of AtCIPK7 and TuYV-RT proteins in N. benthamiana. GFPor RFP-fusion proteins were transiently expressed in N. benthamiana leaves and epidermal cells were observed under confocal microscopy. (A) Infiltration of GFP:CIPK7 (first two panels). Co-infiltration of GFP:CIPK7 with the plasmodesmata marker PDLP1 (last three panels); (B) Infiltration of RFP:RT (first two panels). Infiltration of RFP:RT in transgenic N. benthamiana expressing the tubulin-alpha marker (TUA) (last three panels); (C) Coinfiltration of GFP:CIPK7 with RFP:RT. Each set of three pictures shown horizontally represents different subcellular co-localizations of the proteins. The left panels correspond to GFP:CIPK7 localization, the middle panels represent RFP:RT localization and the right panels a merge of the pictures; (D) Infiltration of GFP:CIPK7 with TuYV full-length infectious clone. Three pictures of different localizations of GFP:CIPK7 are presented vertically. Expression of the fusion proteins was confirmed by Western-blot (Fig. S2) using antibodies directed against GFP or RFP. Bars represent 5  $\mu$ M. The arrow head indicates the nucleolus (nu).

	M. per	foliata	A. thaliana Col-0		
	nb inf./total inoc. <sup>a</sup>	$OD \pm SD^b$	nb inf./total inoc. <sup>a</sup>	OD±SD <sup>b</sup>	
TuYV-ΔRT <sub>Cter</sub>	10/15	<sup>#</sup> 0.51±0.26	7/30	<sup>#</sup> 0.21±0.07	
TuYV-NM	14/15	1.61±0.12	/	/	
TuYV-WT	14/15	1.85±0.23	27/30	1.86±0.33	
Non-inoc. <sup>c</sup>	0/1	0.13	0/6	0.14±0.01	

**Table 1**: Virus accumulation of TuYV- $\Delta RT_{Cter}$  in non-inoculated leaves of *M. perfoliata* and *A. thaliana* following agroinoculation

<sup>a</sup>Number of infected plants/number of plants agroinoculated. A plant is considered infected when the ELISA value of the leaf extract is above the ELISA value of three non-infected plants + 3 times the standard deviation of these extracts. ELISA was done 4 wpi <sup>b</sup>Mean absorbance value at 405 nm of the infected plants  $\pm$  Standard Deviation <sup>c</sup>Non-inoculated plants. The OD value corresponds to the mean absorbance of all plants <sup>#</sup>the calculated /P/ value after Kruskal-Wallis analysis (R commander) to compare TuYV- $\Delta RT_{Cter}$  accumulation with TuYV-WT or -NM is below 0,05 meaning that accumulation of TuYV- $\Delta RT_{Cter}$  is statistically different from those of TuYV-WT and –NM

	TuY	V-WT	TuYV-∆RT <sub>Cter</sub>		non-inoc. <sup>d</sup>	
	nb plants		nb plants		nb plants	
dpc <sup>a</sup>	inf./total	OD±SD <sup>c</sup>	inf./total	$OD \pm SD^{c}$	inf./total	OD±SD <sup>c</sup>
	inoc. <sup>b</sup>		inoc. <sup>b</sup>		inoc. <sup>b</sup>	
0	0/10	0.25±0.02	0/10	0.25±0.03	0/1	0.24
4	1/10	2.12	0/10	0.14±0.01	0/1	0.15
7	4/10	2.13±0.45	0/10	0.15±0.04	0/1	0.14
11	6/10	1.76±0.57	0/10	0.14±0.00	0/1	0.16
14	7/10	1.65±0.37	0/10	0.17±0.03	0/1	0.14

**Table 2**: Kinetic of TuYV- $\Delta RT_{Cter}$  accumulation in non-inoculated *N. benthamiana* leaves

<sup>a</sup>Days post-cutting the inoculated leaves

<sup>b</sup>Number of infected plants/number of plants agroinoculated. A plant is considered infected when the ELISA value of the leaf extract is above the ELISA value of three non-infected plants + 3 times the standard deviation of these extracts

<sup>c</sup>Mean absorbance value at 405 nm of infected plants  $\pm$  Standard Deviation, except for plants infiltrated with TuYV- $\Delta RT_{Cter}$  for which the value represents the mean absorbance of all agroinoculated plants

<sup>d</sup>non-inoculated plants. The OD value corresponds to the absorbance of the non-inoculated plant

## Table S1: Virus accumulation in agroinfiltrated leaves of *N. benthamiana* and *M. perfoliata* measured by ELISA

	N. bentha	miana	M. perfoliata		
	nb inoc. plants <sup>a</sup>	loc. plants <sup>a</sup> OD±SD <sup>b</sup>		$OD\pmSD^{b}$	
TuYV- ΔRT <sub>Cter</sub>	27	<sup>#</sup> 1.13±0.17	10	<sup>#</sup> 1.89±0.21	
TuYV-NM	27	<sup>#</sup> 1.19±0.15	/	/	
TuYV-WT	27	1.05±0.10	10	1.70±0.22	
Non-inf. <sup>c</sup>	8	0.11±0.00	1	0.15	

<sup>a</sup>Number of plants agroinfiltrated with the virus-derived constructs

<sup>b</sup>Mean absorbance value at 405 nm of the agroinfiltrated leaves 5 days after inoculation ± Standard Deviation

<sup>c</sup>Non-infiltrated plants

<sup>#</sup>the calculated /P/ value after Kruskal-Wallis analysis (R commander) to compare TuYV-ΔRT<sub>Cter</sub> and -NM accumulation with TuYV-WT is above 0,05 meaning that accumulation of TuYV-ΔRTCter is not statistically different from those of TuYV-WT and -NM

### Table S3: TuYV accumulation in A. thaliana cipk7 mutant

	Ex	p. 1	Exp. 2		
	nb plants inf./total inoc. <sup>a</sup>	$OD \mathtt{\pm} SD^{\mathtt{b}}$	nb plants inf./total inoc.ª	$OD \pm SD^{\flat}$	
cipk7	13/15	<sup>#</sup> 1,42±0,34	11/15	<sup>#</sup> 0,86±0,27	
Col-0	11/15	1,36±0,21	10/15	0,72±0,22	
Non-inoc. <sup>c</sup>	Non-inoc. <sup>c</sup> 0/2		0/5	0,11±0,00	

<sup>a</sup>Number of infected plants/total number of plants inoculated. A plant is considered infected when the ELISA value of the leaf extract is above the ELISA value of three non-infected plants + 3 times the standard deviation of these extracts.

<sup>b</sup>Mean absorbance value at 405 nm of the infected plants ± Standard Deviation

<sup>c</sup>Non-inoculated plants

<sup>#</sup>the calculated /P/ value after Kruskal-Wallis analysis (R commander) to compare TuYV accumulation in *cipk7* mutant with Col-0 is above 0,05 meaning that TuYV accumulation in *cipk7* is not statistically different compared to Col-0

	2 wpi		4 wpi		6 wpi		8 wpi	
	nb plants inf./total inoc. <sup>a</sup>	OD±SD <sup>b</sup>	nb plants inf./total inoc. <sup>a</sup>	OD±SD <sup>b</sup>	nb plants inf./total inoc. <sup>a</sup>	OD±SD <sup>b</sup>	nb plants inf./total inoc. <sup>a</sup>	OD±SD <sup>b</sup>
	9/14 (I)	#1.29±0.30	9/14	#1.29±0.17	9/14	#0.97±0.26	9/14	#0.50±0.15
TuYV-ΔRT <sub>Cter</sub>	3/14 (II)	#0.46±0.14	5/14	#1.13±0.11	4/14	#0.66±0.15	5/14	#0.74±0.10
	10/15 (III) <sup>c</sup>	#0.60±0.26	10/15	0.51±0.26	11/15	#0.39±0.07	4/15	#0.43±0.02
TuYV-NM	14/15 (III)	1.95±0.20	14/15	1.61±0.12	14/15	0.73±0.09	14/15	#0.98±0.34
TuYV-WT	10/14 (I)	2.36±0.22	11/14	2.10±0.11	11/14	2.07±0.26	11/14	1.69±0.23
	10/14 (II)	1.53±0.24	12/14	1.79±0.26	12/14	1.59±0.36	12/14	1.36±0.13
	14/15 (III)	2.17±0.30	14/15	1.85±0.23	14/15	0.86±0.11	15/15	1.60±0.27
Non-inoc. <sup>d</sup>	0/1 (I)	0.12	0/1	0.13	0/1	0.13	0/1	0.16
	0/1 (II)	0.13	0/1	0.13	0/1	0.16	0/1	0.14
	0/1 (III)	0.06	0/1	0.13	0/1	0.12	0/1	0.14

#### Table S2: Kinetic of virus accumulation of TuYV-ART<sub>Cter</sub> in non-inoculated leaves of *M. perfoliata* following agroinoculation

<sup>a</sup>Number of infected plants/number of plants agroinoculated. Numbers in brackets correspond to different experiments. A plant is considered infected when the ELISA value of the leaf extract is above the ELISA value of three non-infected plants + 3 times the standard deviation of these extracts

<sup>b</sup>Mean absorbance value at 405 nm of the infected plants  $\pm$  Standard Deviation

°The data of experiment III corresponding to 4 wpi are those presented in Table 1

<sup>d</sup>Non-inoculated plants. The OD value corresponds to the absorbance of the non-inoculated plant

<sup>#</sup>the calculated /P/ value after Kruskal-Wallis analysis (R commander) to compare TuYV- $\Delta$ RT<sub>Cter</sub> accumulation with TuYV-WT or -NM is below 0,05 meaning that accumulation of TuYV- $\Delta$ RT<sub>Cter</sub> is statistically different from those of TuYV-WT and -NM

Agudelo-Romero P, Carbonell P, De La Iglesia F, *et al.*, 2008. Changes in the gene expression profile of Arabidopsis thaliana after infection with Tobacco etch virus. *Virol J* **5**, 92.

Ala-Poikela M, Goytia E, Haikonen T, Rajamaki ML, Valkonen JP, 2011. Helper component proteinase of the genus Potyvirus is an interaction partner of translation initiation factors eIF(iso)4E and eIF4E and contains a 4E binding motif. *J Virol* **85**, 6784-94.

Alamillo JM, Saenz P, Garcia JA, 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**, 217-27.

Albrecht V, Ritz O, Linder S, Harter K, Kudla J, 2001. The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca2+-regulated kinases. *Embo J* **20**, 1051-63.

Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, et al., 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. Science 301, 653-7.

Amari K, Boutant E, Hofmann C, et al., 2010. A family of plasmodesmal proteins with receptor-like properties for plant viral movement proteins. *PLoS Pathog* **6**, e1001119.

Anders S, Huber W, 2010. Differential expression analysis for sequence count data. Genome Biol 11, R106.

Andersen K, Johansen IE, 1998. A single conserved amino acid in the coat protein gene of pea seed-borne mosaic potyvirus modulates the ability of the virus to move systemically in Chenopodium quinoa. *Virology* **241**, 304-11.

Andrianifahanana M, Lovins K, Dute R, Sikora E, Murphy JF, 1997. Pathway for Phloem-Dependent Movement of Pepper Mottle Potyvirus in the Stem of Capsicum annuum. *Phytopathology* **87**, 892-8.

Asano T, Masumura T, Kusano H, *et al.*, 2002. Construction of a specialized cDNA library from plant cells isolated by laser capture microdissection: toward comprehensive analysis of the genes expressed in the rice phloem. *Plant J* **32**, 401-8.

Ascencio-Ibanez JT, Sozzani R, Lee TJ, et al., 2008. Global analysis of Arabidopsis gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiol* **148**, 436-54.

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, *et al.*, 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* **25**, 25-9.

Atabekov JG, 1975. Host specificity of plant viruses. Annu. Rev. Phytopathol. 13, 127-45.

Atreya PL, Lopez-Moya JJ, Chu M, Atreya CD, Pirone TP, 1995. Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. *J Gen Virol* **76** ( **Pt 2**), 265-70.

Atsumi G, Kagaya U, Kitazawa H, Nakahara KS, Uyeda I, 2009. Activation of the salicylic acid signaling pathway enhances Clover yellow vein virus virulence in susceptible pea cultivars. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 166-75.

Babu M, Griffiths JS, Huang TS, Wang A, 2008. Altered gene expression changes in Arabidopsis leaf tissues and protoplasts in response to Plum pox virus infection. *BMC Genomics* **9**, 325.

Baebler S, Stare K, Kovac M, et al., 2011. Dynamics of responses in compatible potato-Potato virus Y interaction are modulated by salicylic acid. *PLoS One* **6**, e29009.

Balachandran S, Xiang Y, Schobert C, Thompson GA, Lucas WJ, 1997. Phloem sap proteins from Cucurbita maxima and Ricinus communis have the capacity to traffic cell to cell through plasmodesmata. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14150-5.

Balestrini R, Gomez-Ariza J, Lanfranco L, Bonfante P, 2007. Laser microdissection reveals that transcripts for five plant and one fungal phosphate transporter genes are contemporaneously present in arbusculated cells. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 1055-62.

Banerjee AK, Chatterjee M, Yu Y, Suh SG, Miller WA, Hannapel DJ, 2006. Dynamics of a mobile RNA of potato involved in a long-distance signaling pathway. *Plant Cell* **18**, 3443-57.

Bargmann BO, Birnbaum KD, 2009. Positive fluorescent selection permits precise, rapid, and in-depth overexpression analysis in plant protoplasts. *Plant Physiol* **149**, 1231-9.

Batailler B, Lemaitre T, Vilaine F, et al., 2012. Soluble and filamentous proteins in Arabidopsis sieve elements. *Plant Cell Environ* **35**, 1258-73.

Batistic O, Kudla J, 2012. Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochim Biophys Acta* 1820, 1283-93.

Baulcombe DC, 1999. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr Opin Plant Biol* 2, 109-13.

Baumberger N, Tsai CH, Lie M, Havecker E, Baulcombe DC, 2007. The Polerovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr Biol* **17**, 1609-14.

Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I, 2001. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* **125**, 279-84.

Benning UF, Tamot B, Guelette BS, Hoffmann-Benning S, 2012. New aspects of Phloem-mediated longdistance lipid signaling in plants. *Front Plant Sci* **3**, 53. Bi JL, Castle SJ, Toscano NC, 2007. Amino acid fluctuations in young and old orange trees and their influence on glassy-winged sharpshooter (Homalodisca vitripennis) population densities. *J Chem Ecol* **33**, 1692-706.

Biles CL, Abeles FB, 1991. Xylem sap proteins. Plant Physiol 96, 597-601.

Birnbaum K, Shasha DE, Wang JY, et al., 2003. A gene expression map of the Arabidopsis root. Science **302**, 1956-60.

Blein JP, Coutos-Thevenot P, Marion D, Ponchet M, 2002. From elicitins to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends Plant Sci* **7**, 293-6.

Boissinot S, Erdinger M, Monsion B, Ziegler-Graff V, Brault V, 2014. Both structural and non-structural forms of the readthrough protein of cucurbit aphid-borne yellows virus are essential for efficient systemic infection of plants. *PLoS One* **9**, e93448.

Bortolamiol D, Pazhouhandeh M, Marrocco K, Genschik P, Ziegler-Graff V, 2007. The Polerovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Curr Biol* **17**, 1615-21.

Botha CEJ, Malcolm SB, Evert RF, 1977. An Investigation of Preferential Feeding Habit

in Four Asclepiadaceae by the Aphid, Aphis nerH. Protoplasma 92, 1-19.

Boyko V, Van Der Laak J, Ferralli J, Suslova E, Kwon MO, Heinlein M, 2000. Cellular targets of functional and dysfunctional mutants of tobacco mosaic virus movement protein fused to green fluorescent protein. *J Virol* **74**, 11339-46.

Brady SM, Orlando DA, Lee JY, *et al.*, 2007. A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science* **318**, 801-6.

Brand U, Grunewald M, Hobe M, Simon R, 2002. Regulation of CLV3 expression by two homeobox genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* **129**, 565-75.

Brault V, Bergdoll M, Mutterer J, *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**, 3247-56.

Brault V, Herrbach E, Reinbold C, 2007. Electron microscopy studies on luteovirid transmission by aphids. *Micron* **38**, 302-12.

Brault V, Mutterer J, Scheidecker D, *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**, 1140-8.

Brault V, Perigon S, Reinbold C, *et al.*, 2005. The polerovirus minor capsid protein determines vector specificity and intestinal tropism in the aphid. *J Virol* **79**, 9685-93.

Brault V, Van Den Heuvel JF, Verbeek M, et al., 1995. Aphid transmission of beet western yellows luteovirus requires the minor capsid read-through protein P74. Embo J 14, 650-9.

Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, *et al.*, 2008. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* **320**, 1185-90.

Brown CM, Dinesh-Kumar SP, Miller WA, 1996. Local and distant sequences are required for efficient readthrough of the barley yellow dwarf virus PAV coat protein gene stop codon. *J Virol* **70**, 5884-92.

Bruyère A, Brault V, Ziegler-Graff V, *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**, 323-34.

Buhtz A, Kolasa A, Arlt K, Walz C, Kehr J, 2004. Xylem sap protein composition is conserved among different plant species. *Planta* **219**, 610-8.

Buhtz A, Springer F, Chappell L, Baulcombe DC, Kehr J, 2008. Identification and characterization of small RNAs from the phloem of Brassica napus. *Plant J* **53**, 739-49.

Cao TL, Revers F, Cazenave C, 1994. Production of double-stranded RNA during synthesis of bromouracilsubstituted RNA by transcription with T7 RNA polymerase. *FEBS Lett* **351**, 253-6.

Carrington JC, Cary SM, Parks TD, Dougherty WG, 1989a. A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *EMBO J* **8**, 365-70.

Carrington JC, Dougherty WG, 1987. Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a protease. *J Virol* **61**, 2540-8.

Carrington JC, Freed DD, Sanders TC, 1989b. Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in Escherichia coli and in vitro. *J Virol* **63**, 4459-63.

Carrington JC, Jensen PE, Schaad MC, 1998. Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *Plant J* 14, 393-400.

Cavener DR, Ray SC, 1991. Eukaryotic start and stop translation sites. Nucleic Acids Res 19, 3185-92.

Chay CA, Gunasinge UB, Dinesh-Kumar SP, Miller WA, Gray SM, 1996. Aphid transmission and systemic plant infection determinants of barley yellow dwarf luteovirus-PAV are contained in the coat protein readthrough domain and 17-kDa protein, respectively. *Virology* **219**, 57-65.

Chen S, Petersen BL, Olsen CE, Schulz A, Halkier BA, 2001. Long-distance phloem transport of glucosinolates in Arabidopsis. *Plant Physiol* **127**, 194-201.

Cheng NH, Su CL, Carter SA, Nelson RS, 2000. Vascular invasion routes and systemic accumulation patterns of tobacco mosaic virus in Nicotiana benthamiana. *Plant J* 23, 349-62.

Cheng SL, Domier LL, D'arcy CJ, 1994. Detection of the readthrough protein of barley yellow dwarf virus. *Virology* **202**, 1003-6.

Chisholm ST, Mahajan SK, Whitham SA, Yamamoto ML, Carrington JC, 2000. Cloning of the Arabidopsis RTM1 gene, which controls restriction of long-distance movement of tobacco etch virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 489-94.

Chisholm ST, Parra MA, Anderberg RJ, Carrington JC, 2001. Arabidopsis RTM1 and RTM2 Genes Function in Phloem to Restrict Long-Distance Movement of Tobacco Etch Virus. *Plant Physiology* **127**, 1667-75.

Chrispeels MJ, Raikhel NV, 1991. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. Plant Cell 3, 1-9.

Christensen NM, Axelsen KB, Nicolaisen M, Schulz A, 2005. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends Plant Sci* 10, 526-35.

Chung BY, Miller WA, Atkins JF, Firth AE, 2008. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5897-902.

Citovsky V, Wong ML, Shaw AL, Prasad BV, Zambryski P, 1992. Visualization and characterization of tobacco mosaic virus movement protein binding to single-stranded nucleic acids. *Plant Cell* **4**, 397-411.

Clark MF, Adams AN, 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol* **34**, 475-83.

Clay NK, Adio AM, Denoux C, Jander G, Ausubel FM, 2009. Glucosinolate metabolites required for an Arabidopsis innate immune response. *Science* **323**, 95-101.

Cosson P, Schurdi-Levraud V, Le QH, *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.

Cosson P, Sofer L, Le QH, *et al.*, 2010a. 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, Sofer L, Schurdi-Levraud V, Revers F, 2010b. A member of a new plant gene family encoding a meprin and TRAF homology (MATH) domain-containing protein is involved in restriction of long distance movement of plant viruses. *Plant Signal Behav* **5**, 1321-3.

Cotton S, Grangeon R, Thivierge K, *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**, 10460-71.

Crawford KM, Zambryski PC, 2001. Non-targeted and targeted protein movement through plasmodesmata in leaves in different developmental and physiological states. *Plant Physiol* **125**, 1802-12.

Cronin S, Verchot J, Haldeman-Cahill R, Schaad MC, Carrington JC, 1995. Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* **7**, 549-59.

Csorba T, Lozsa R, Hutvagner G, Burgyan 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.

Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR, 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol* **139**, 5-17.

D'angelo C, Weinl S, Batistic O, *et al.*, 2006. Alternative complex formation of the Ca-regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic acid-dependent and independent stress responses in Arabidopsis. *Plant J* **48**, 857-72.

Dawson WO, Bubrick P, Grantham GL, 1988. Modifications of the tobacco mosaic virus coat protein gene affecting replication, movement and symptomatology. *Phytopathology* **78**, 783-9.

Deal RB, Henikoff S, 2010. A simple method for gene expression and chromatin profiling of individual cell types within a tissue. *Dev Cell* **18**, 1030-40.

Decroocq V, Salvador B, Sicard O, *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**, 1302-11.

Decroocq V, Sicard O, Alamillo JM, *et al.*, 2006. Multiple resistance traits control Plum pox virus infection in Arabidopsis thaliana. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 541-9.

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.

Deeken R, Geiger D, Fromm J, et al., 2002. Loss of the AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of Arabidopsis. *Planta* **216**, 334-44.

Derrien B, Baumberger N, Schepetilnikov M, *et al.*, 2012. Degradation of the antiviral component ARGONAUTE1 by the autophagy pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 15942-6.

Despres C, Delong C, Glaze S, Liu E, Fobert PR, 2000. The Arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* **12**, 279-90.

Diaz-Pendon JA, Ding SW, 2008. Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* **46**, 303-26.

Diaz-Pendon JA, Truniger V, Nieto C, Garcia-Mas J, Bendahmane A, Aranda MA, 2004. Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Mol Plant Pathol* **5**, 223-33.

Diener TO, 1991. Subviral pathogens of plants: viroids and viroidlike satellite RNAs. Faseb j 5, 2808-13.

Dinant S, 2008. Phloème, transport interorgane et signalisation à longue distance. *Comptes Rendus Biologies* **331**, 334-46.

Dinant S, Bonnemain JL, Girousse C, Kehr J, 2010. Phloem sap intricacy and interplay with aphid feeding. *C R Biol* **333**, 504-15.

Dinesh-Kumar SP, Miller WA, 1993. Control of start codon choice on a plant viral RNA encoding overlapping genes. *Plant Cell* **5**, 679-92.

Ding SW, Voinnet O, 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. Cell 130, 413-26.

Ding XS, Carter SA, Deom CM, Nelson RS, 1998. Tobamovirus and Potyvirus Accumulation in Minor Veins of Inoculated Leaves from Representatives of the Solanaceae and Fabaceae. *Plant Physiol.* **116**, 125-36.

Dobritsa AA, Shrestha J, Morant M, et al., 2009. CYP704B1 is a long-chain fatty acid omega-hydroxylase essential for sporopollenin synthesis in pollen of Arabidopsis. *Plant Physiol* **151**, 574-89.

Doering-Saad C, Newbury HJ, Bale JS, Pritchard J, 2002. Use of aphid stylectomy and RT-PCR for the detection of transporter mRNAs in sieve elements. *J Exp Bot* **53**, 631-7.

Dolja VV, Haldeman R, Robertson NL, Dougherty WG, Carrington JC, 1994. Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO J* **13**, 1482-91.

Donaire L, Barajas D, Martinez-Garcia B, Martinez-Priego L, Pagan I, Llave C, 2008. Structural and genetic requirements for the biogenesis of tobacco rattle virus-derived small interfering RNAs. *J Virol* **82**, 5167-77.

Dougherty WG, Allison RF, Dawn Parks T, Johnston RE, Feild MJ, Armstrong FB, 1985. Nucleotide sequence at the 3' terminus of pepper mottle virus genomic RNA: evidence for an alternative mode of potyvirus capsid protein gene organization. *Virology* **146**, 282-91.

Dunoyer P, Thomas C, Harrison S, Revers F, Maule A, 2004. A cysteine-rich plant protein potentiates Potyvirus movement through an interaction with the virus genome-linked protein VPg. *J Virol* **78**, 2301-9. Durrant WE, Dong X, 2004. Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* **42**, 185-209.

Ehlers K, Kollmann R, 2001. Primary and secondary plasmodesmata: structure, origin, and functioning. *Protoplasma* **216**, 1-30.

Endres MW, Gregory BD, Gao Z, *et al.*, 2010. Two plant viral suppressors of silencing require the ethyleneinducible host transcription factor RAV2 to block RNA silencing. *PLoS Pathog* **6**, e1000729.

English JJ, Davenport GF, Elmayan T, Vaucheret H, Baulcombe DC, 1997. Requirement of sense transcription for homology-dependent virus resistance and trans-inactivation. *Plant J* **12**, 597-603.

Espina V, Wulfkuhle JD, Calvert VS, et al., 2006. Laser-capture microdissection. Nature Protocols 1, 586-603.

Espinoza C, Medina C, Somerville S, Arce-Johnson P, 2007. Senescence-associated genes induced during compatible viral interactions with grapevine and Arabidopsis. *J Exp Bot* **58**, 3197-212.

Fan W, Dong X, 2002. In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**, 1377-89.

Field B, Cardon G, Traka M, Botterman J, Vancanneyt G, Mithen R, 2004. Glucosinolate and amino acid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiol* **135**, 828-39.

Filichkin SA, Lister RM, Mcgrath PF, Young MJ, 1994. In vivo expression and mutational analysis of the barley yellow dwarf virus readthrough gene. *Virology* **205**, 290-9.

Fischer WN, Kwart M, Hummel S, Frommer WB, 1995. Substrate specificity and expression profile of amino acid transporters (AAPs) in Arabidopsis. *J Biol Chem* 270, 16315-20.

Fukuda A, Fujimaki S, Mori T, *et al.*, 2005. Differential distribution of proteins expressed in companion cells in the sieve element-companion cell complex of rice plants. *Plant Cell Physiol* **46**, 1779-86.

Furch AC, Hafke JB, Schulz A, Van Bel AJ, 2007. Ca2+-mediated remote control of reversible sieve tube occlusion in Vicia faba. *J Exp Bot* **58**, 2827-38.

Garnier M, Foissac X, Gaurivaud P, et al., 2001. Mycoplasmas, plants, insect vectors: a matrimonial triangle. C R Acad Sci III **324**, 923-8.

Gaymard F, Pilot G, Lacombe B, *et al.*, 1998. Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K+ release into the xylem sap. *Cell* **94**, 647-55.

German-Retana S, Walter J, Le Gall O, 2008. Lettuce mosaic virus: from pathogen diversity to host interactors. *Mol Plant Pathol* **9**, 127-36.

Giavalisco P, Kapitza K, Kolasa A, Buhtz A, Kehr J, 2006. Towards the proteome of Brassica napus phloem sap. *Proteomics* **6**, 896-909.

Gifford ML, Dean A, Gutierrez RA, Coruzzi GM, Birnbaum KD, 2008. Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 803-8.

Gillespie T, Boevink P, Haupt S, *et al.*, 2002. Functional analysis of a DNA-shuffled movement protein reveals that microtubules are dispensable for the cell-to-cell movement of tobacco mosaic virus. *Plant Cell* **14**, 1207-22.

Gomez G, Pallas V, 2004. A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex in vivo with Hop stunt viroid RNA. *J Virol* **78**, 10104-10.

Gong D, Guo Y, Jagendorf AT, Zhu JK, 2002. Biochemical characterization of the Arabidopsis protein kinase SOS2 that functions in salt tolerance. *Plant Physiol* **130**, 256-64.

Gould GG, Jones CG, Rifleman P, Perez A, Coleman JS, 2007. Variation in Eastern cottonwood (Populus deltoides Bartr.) phloem sap content caused by leaf development may affect feeding site selection behavior of the aphid, Chaitophorous populicola Thomas (Homoptera: Aphididae). *Environ Entomol* **36**, 1212-25.

Gould N, Thorpe MR, Minchin PEH, Pritchard J, White PJ, 2004. Solute is imported to elongating root cells of barley as a pressure

driven-flow of solution. Functional Plant Biology 31, 391-7.

Gozzo F, Faoro F, 2013. Systemic acquired resistance (50 years after discovery): moving from the lab to the field. *J Agric Food Chem* **61**, 12473-91.

Grangeon R, Agbeci M, Chen J, Grondin G, Zheng H, Laliberte JF, 2012. Impact on the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus of turnip mosaic virus infection. *J Virol* **86**, 9255-65.

Grangeon R, Jiang J, Wan J, Agbeci M, Zheng H, Laliberte JF, 2013. 6K2-induced vesicles can move cell to cell during turnip mosaic virus infection. *Front Microbiol* **4**, 351.

Guelette BS, Benning UF, Hoffmann-Benning S, 2012. Identification of lipids and lipid-binding proteins in phloem exudates from Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot* **63**, 3603-16.

Guilley H, Wipf-Scheibel C, Richards K, Lecoq H, Jonard G, 1994. Nucleotide sequence of cucurbit aphidborne yellows luteovirus. *Virology* **202**, 1012-7.

Guo Y, Halfter U, Ishitani M, Zhu JK, 2001. Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell* **13**, 1383-400.

Haldeman-Cahill R, Daros JA, Carrington JC, 1998. Secondary structures in the capsid protein coding sequence and 3' nontranslated region involved in amplification of the tobacco etch virus genome. *J Virol* **72**, 4072-9.

Halfter U, Ishitani M, Zhu JK, 2000. The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3735-40.

Halkier BA, Gershenzon J, 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 303-33.

Hamburger D, Rezzonico E, Macdonald-Comber Petetot J, Somerville C, Poirier Y, 2002. Identification and characterization of the Arabidopsis PHO1 gene involved in phosphate loading to the xylem. *Plant Cell* **14**, 889-902.

Harries P, Ding B, 2011. Cellular factors in plant virus movement: at the leading edge of macromolecular trafficking in plants. *Virology* **411**, 237-43.

Haupt S, Stroganova T, Ryabov E, *et al.*, 2005. Nucleolar localization of potato leafroll virus capsid proteins. *J Gen Virol* **86**, 2891-6.

Haywood V, Yu TS, Huang NC, Lucas WJ, 2005. Phloem long-distance trafficking of GIBBERELLIC ACID-INSENSITIVE RNA regulates leaf development. *Plant J* **42**, 49-68.

Heiman M, Schaefer A, Gong S, et al., 2008. A translational profiling approach for the molecular characterization of CNS cell types. Cell 135, 738-48.

Heinlein M, Epel BL, 2004. Macromolecular transport and signaling through plasmodesmata. *Int Rev Cytol* **235**, 93-164.

Himber C, Dunoyer P, Moissiard G, Ritzenthaler C, Voinnet O, 2003. Transitivity-dependent and - independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *Embo j* **22**, 4523-33.

Hipper C, Brault V, Ziegler-Graff V, Revers F, 2013. Viral and cellular factors involved in Phloem transport of plant viruses. *Front Plant Sci* **4**, 154.

Hipper C, Monsion B, Bortolamiol-Becet D, Ziegler-Graff V, Brault V, 2014. Formation of virions is strictly required for turnip yellows virus long-distance movement in plants. *J Gen Virol* **95**, 496-505.

Hoad GV, 1995. Transport of hormones in the phloem of higher plants

. Plant Growth Regulation 16, 173-82.

Hoffmann K, Verbeek M, Romano A, Dullemans AM, Van Den Heuvel JF, Van Der Wilk F, 2001. Mechanical transmission of poleroviruses. *J Virol Methods* **91**, 197-201.

Holsters M, Silva B, Van Vliet F, *et al.*, 1980. The functional organization of the nopaline A. tumefaciens plasmid pTiC58. *Plasmid* **3**, 212-30.

Holub E, Beynon J, 1997. Symbiology of mouse-ear cress (Arabidopsis thaliana)

and oomycetes. Adv Bot Res 24, 227-73.

Hong Y, Hunt AG, 1996. RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* **226**, 146-51.

Howarth JR, Parmar S, Barraclough PB, Hawkesford MJ, 2009. A sulphur deficiency-induced gene, sdi1, involved in the utilization of stored sulphate pools under sulphur-limiting conditions has potential as a diagnostic indicator of sulphur nutritional status. *Plant Biotechnol J* **7**, 200-9.

Huh SU, Kim MJ, Ham BK, Paek KH, 2011. A zinc finger protein Tsip1 controls Cucumber mosaic virus infection by interacting with the replication complex on vacuolar membranes of the tobacco plant. *New Phytol* **191**, 746-62.

Hunt E, Gattolin S, Newbury HJ, *et al.*, 2010. A mutation in amino acid permease AAP6 reduces the amino acid content of the Arabidopsis sieve elements but leaves aphid herbivores unaffected. *J Exp Bot* **61**, 55-64.

Ibrahim A, Hutchens HM, Berg RH, Loesch-Fries LS, 2012. Alfalfa mosaic virus replicase proteins, P1 and P2, localize to the tonoplast in the presence of virus RNA. *Virology* **433**, 449-61.

Imlau A, Truernit E, Sauer N, 1999. Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell* **11**, 309-22.

Ishiwatari Y, Honda C, Kawashima I, *et al.*, 1995. Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap. *Planta* **195**, 456-63.

Islam MM, Tani C, Watanabe-Sugimoto M, *et al.*, 2009. Myrosinases, TGG1 and TGG2, redundantly function in ABA and MeJA signaling in Arabidopsis guard cells. *Plant Cell Physiol* **50**, 1171-5.

Ivashikina N, Deeken R, Ache P, *et al.*, 2003. Isolation of AtSUC2 promoter-GFP-marked companion cells for patch-clamp studies and expression profiling. *Plant J* **36**, 931-45.

Iwai H, Usui M, Hoshino H, et al., 2003. Analysis of sugars in squash xylem sap. Plant Cell Physiol 44, 582-7.

Jakubiec A, Notaise J, Tournier V, *et al.*, 2004. Assembly of turnip yellow mosaic virus replication complexes: interaction between the proteinase and polymerase domains of the replication proteins. *J Virol* **78**, 7945-57.

Jiao Y, Lori Tausta S, Gandotra N, *et al.*, 2009. A transcriptome atlas of rice cell types uncovers cellular, functional and developmental hierarchies. In. *Nature Genetics*. 258-63. (41.)

Jolly CA, Mayo MA, 1994. Changes in the amino acid sequence of the coat protein readthrough domain of potato leafroll luteovirus affect the formation of an epitope and aphid transmission. *Virology* **201**, 182-5.

Jossey S, Hobbs HA, Domier LL, 2013. Role of soybean mosaic virus-encoded proteins in seed and aphid transmission in soybean. *Phytopathology* **103**, 941-8.

Kalantidis K, Schumacher HT, Alexiadis T, Helm JM, 2008. RNA silencing movement in plants. *Biol Cell* **100**, 13-26.

Kamer G, Argos P, 1984. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res* **12**, 7269-82.

Kang HK, Yang SH, Lee YP, Park YI, Kim SH, 2012. A tobacco CBL-interacting protein kinase homolog is involved in phosphorylation of the N-terminal domain of the cucumber mosaic virus polymerase 2a protein. *Biosci Biotechnol Biochem* **76**, 2101-6.

Karimi M, Inze D, Depicker A, 2002. GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* **7**, 193-5.

Kasschau KD, Carrington JC, 2001. Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. *Virology* **285**, 71-81.

Kasschau KD, Cronin S, Carrington JC, 1997. Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology* **228**, 251-62.

Kaufmann A, Koenig R, Lesemann DE, 1992. Tissue print-immunoblotting reveals an uneven distribution of beet necrotic yellow vein and beet soil-borne viruses in sugarbeets. *Arch Virol* **126**, 329-35.

Kehr J, 2009. Long-distance transport of macromolecules through the phloem. F1000 Biol Rep 1, 31.

Kehr J, Buhtz A, 2008. Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *J Exp Bot* **59**, 85-92.

Kehr J, Buhtz A, Giavalisco P, 2005. Analysis of xylem sap proteins from Brassica napus. *BMC Plant Biol* **5**, 11.

Kerk NM, 2003. Laser Capture Microdissection of Cells from Plant Tissues. Plant Physiology 132, 27-35.

Kim I, Cho E, Crawford K, Hempel FD, Zambryski PC, 2005. Cell-to-cell movement of GFP during embryogenesis and early seedling development in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2227-31.

Kim M, Canio W, Kessler S, Sinha N, 2001. Developmental changes due to long-distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato. *Science* **293**, 287-9.

Kim SH, Ryabov EV, Kalinina NO, *et al.*, 2007. Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. *EMBO J* 26, 2169-79.

Kinkema M, Fan W, Dong X, 2000. Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell* **12**, 2339-50.

Klein PG, Klein RR, Rodriguez-Cerezo E, Hunt AG, Shaw JG, 1994. Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. *Virology* **204**, 759-69.

Klosterman SJ, Atallah ZK, Vallad GE, Subbarao KV, 2009. Diversity, pathogenicity, and management of verticillium species. *Annu Rev Phytopathol* 47, 39-62.

Klosterman SJ, Subbarao KV, Kang S, et al., 2011. Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens. *PLoS Pathog* 7, e1002137.

Kolukisaoglu U, Weinl S, Blazevic D, Batistic O, Kudla J, 2004. Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the Arabidopsis and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiol* **134**, 43-58.

Koonin EV, Dolja VV, 1993. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 28, 375-430.

Kopriva S, 2006. Regulation of sulfate assimilation in Arabidopsis and beyond. Ann Bot 97, 479-95.

Koprivova A, North KA, Kopriva S, 2008. Complex signaling network in regulation of adenosine 5'-phosphosulfate reductase by salt stress in Arabidopsis roots. *Plant Physiol* **146**, 1408-20.

Krause-Sakate R, Le Gall O, Fakhfakh H, *et al.*, 2002. Molecular and Biological Characterization of Lettuce mosaic virus (LMV) Isolates Reveals a Distinct and Widespread Type of Resistance-Breaking Isolate: LMV-Most. *Phytopathology* **92**, 563-72.

Kuang E, Qi J, Ronai Z, 2013. Emerging roles of E3 ubiquitin ligases in autophagy. *Trends Biochem Sci* **38**, 453-60.

Kudla J, Xu Q, Harter K, Gruissem W, Luan S, 1999. Genes for calcineurin B-like proteins in Arabidopsis are differentially regulated by stress signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4718-23.

Kuroha T, Kato H, Asami T, Yoshida S, Kamada H, Satoh S, 2002. A trans-zeatin riboside in root xylem sap negatively regulates adventitious root formation on cucumber hypocotyls. *J Exp Bot* **53**, 2193-200.

Kwart M, Hirner B, Hummel S, Frommer WB, 1993. Differential expression of two related amino acid transporters with differing substrate specificity in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **4**, 993-1002.

La Cour Petersen M, Hejgaard J, Thompson GA, Schulz A, 2005. Cucurbit phloem serpins are grafttransmissible and appear to be resistant to turnover in the sieve element-companion cell complex. *J Exp Bot* **56**, 3111-20.

Lain S, Martin MT, Riechmann JL, Garcia JA, 1991. Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection: nucleic acid-stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicaselike protein. *J Virol* **65**, 1-6.

Lain S, Riechmann JL, Garcia JA, 1990. RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic Acids Res* **18**, 7003-6.

Lakatos L, Csorba T, Pantaleo V, *et al.*, 2006. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J* **25**, 2768-80.

Lalonde S, Wipf D, Frommer WB, 2004. Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 341-72.

Lange M, Yellina AL, Orashakova S, Becker A, 2013. Virus-induced gene silencing (VIGS) in plants: an overview of target species and the virus-derived vector systems. *Methods Mol Biol* **975**, 1-14.

Lartey RT, Ghoshroy S, Citovsky V, 1998. Identification of an Arabidopsis thaliana mutation (vsm1) that restricts systemic movement of tobamoviruses. *Mol Plant Microbe Interact* **11**, 706-9.

Le Hir R, Bellini C, 2013. The plant-specific dof transcription factors family: new players involved in vascular system development and functioning in Arabidopsis. *Front Plant Sci* **4**, 164.

Le Hir R, Beneteau J, Bellini C, Vilaine F, Dinant S, 2008. Gene expression profiling: keys for investigating phloem functions. *Trends in Plant Science* **13**, 273-80.

Lebel E, Heifetz P, Thorne L, Uknes S, Ryals J, Ward E, 1998. Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in Arabidopsis. *Plant J* **16**, 223-33.

Lechner E, Achard P, Vansiri A, Potuschak T, Genschik P, 2006. F-box proteins everywhere. *Curr Opin Plant Biol* 9, 631-8.

Lecoq H, Bourdin D, Wipf-Scheibel C, *et al.*, 1992. A new yellowing disease of cucurbits caused by a luteovirus, cucurbit aphid-borne yellows virus. *Plant Pathology* **41**, 749-61.

Lee GJ, Vierling E, 2000. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol* **122**, 189-98.

Lee L, Palukaitis P, Gray SM, 2002. Host-dependent requirement for the Potato leafroll virus 17-kda protein in virus movement. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 1086-94.

Leiser RM, Ziegler-Graff V, Reutenauer A, *et al.*, 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 S, Plante D, Wittmann S, Daigneault N, Fortin MG, Laliberte JF, 2000. Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *J Virol* 74, 7730-7.

Leustek T, 2002. Sulfate metabolism. Arabidopsis Book 1, e0017.

Li W, Lewandowski DJ, Hilf ME, Adkins S, 2009a. Identification of domains of the Tomato spotted wilt virus NSm protein involved in tubule formation, movement and symptomatology. *Virology* **390**, 110-21.

Li X, Ryan MD, Lamb JW, 2000. Potato leafroll virus protein P1 contains a serine proteinase domain. *J Gen Virol* **81**, 1857-64.

Li XH, Valdez P, Olvera RE, Carrington JC, 1997. Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (NIb): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (NIa). *J Virol* **71**, 1598-607.

Li Z, Pogany J, Panavas T, *et al.*, 2009b. Translation elongation factor 1A is a component of the tombusvirus replicase complex and affects the stability of the p33 replication co-factor. *Virology* **385**, 245-60.

Lilly ST, Drummond RS, Pearson MN, Macdiarmid RM, 2011. Identification and validation of reference genes for normalization of transcripts from virus-infected Arabidopsis thaliana. *Mol Plant Microbe Interact* **24**, 294-304.

Lin MK, Lee YJ, Lough TJ, Phinney BS, Lucas WJ, 2009. Analysis of the pumpkin phloem proteome provides insights into angiosperm sieve tube function. *Mol Cell Proteomics* **8**, 343-56.

Liu J, Ishitani M, Halfter U, Kim CS, Zhu JK, 2000. The Arabidopsis thaliana SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3730-4.

Liu Y, Schiff M, Marathe R, Dinesh-Kumar SP, 2002. Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant J* **30**, 415-29.

Llave C, 2010. Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends Plant Sci* **15**, 701-7.

Love AJ, Geri C, Laird J, *et al.*, 2012. Cauliflower mosaic virus protein P6 inhibits signaling responses to salicylic acid and regulates innate immunity. *PLoS One* **7**, e47535.

Lucas WJ, Yoo BC, Kragler F, 2001. RNA as a long-distance information macromolecule in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 849-57.

Ma LJ, Van Der Does HC, Borkovich KA, *et al.*, 2010. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in Fusarium. *Nature* **464**, 367-73.

Mahajan SK, Chisholm ST, Whitham SA, Carrington JC, 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.

Malter D, Wolf S, 2011. Melon phloem-sap proteome: developmental control and response to viral infection. *Protoplasma* **248**, 217-24.

Manacorda CA, Mansilla C, Debat HJ, *et al.*, 2013. Salicylic acid determines differential senescence produced by two Turnip mosaic virus strains involving reactive oxygen species and early transcriptomic changes. *Mol Plant Microbe Interact* **26**, 1486-98.

Marathe R, Anandalakshmi R, Smith TH, Pruss GJ, Vance VB, 2000. RNA viruses as inducers, suppressors and targets of post-transcriptional gene silencing. *Plant Mol Biol* **43**, 295-306.

Marathe R, Guan Z, Anandalakshmi R, Zhao H, Dinesh-Kumar SP, 2004. Study of Arabidopsis thaliana resistome in response to cucumber mosaic virus infection using whole genome microarray. *Plant Mol Biol* **55**, 501-20.

Marschner H, Kirkby EA, Cakmak I, 1996. Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *J Exp Bot* **47 Spec No**, 1255-63.

Mas P, Beachy RN, 1999. Replication of tobacco mosaic virus on endoplasmic reticulum and role of the cytoskeleton and virus movement protein in intracellular distribution of viral RNA. *J Cell Biol* **147**, 945-58.

Maule AJ, Caranta C, Boulton MI, 2007. Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. *Mol Plant Pathol* **8**, 223-31.

Mauseth JD, Bowes BG, 2012. Structure des plantes.

Mavankal G, Rhoads RE, 1991. In vitro cleavage at or near the N-terminus of the helper component protein in the tobacco vein mottling virus polyprotein. *Virology* **185**, 721-31.

Mayers CN, Lee KC, Moore CA, Wong SM, Carr JP, 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**, 428-34.

Mayo MA, Ziegler-Graff V, 1996. Molecular biology of luteoviruses. Adv Virus Res 46, 413-60.

Mccaskill A, Turgeon R, 2007. Phloem loading in Verbascum phoeniceum L. depends on the synthesis of raffinose-family oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19619-24.

Merai Z, Kerenyi Z, Kertesz S, Magna M, Lakatos L, Silhavy D, 2006. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol* **80**, 5747-56.

Merits A, Guo D, Jarvekulg L, Saarma M, 1999. Biochemical and genetic evidence for interactions between potato A potyvirus-encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex. *Virology* **263**, 15-22.

Merits A, Guo D, Saarma M, 1998. VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato A potyvirus bind RNA in a sequence-unspecific manner. *J Gen Virol* **79** ( **Pt 12**), 3123-7.

Merits A, Rajamaki ML, Lindholm P, et al., 2002. Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells. J Gen Virol 83, 1211-21.

Mikkelsen MD, Hansen CH, Wittstock U, Halkier BA, 2000. Cytochrome P450 CYP79B2 from Arabidopsis catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *J Biol Chem* **275**, 33712-7.

Miller S, Krijnse-Locker J, 2008. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol* **6**, 363-74.

Miller WA, Dinesh-Kumar SP, Paul CP, 1995. Luteovirus Gene Expression. . Critical Review in Plant Sciences 14, 179-211.

Moghal SM, Francki RI, 1981. Towards a system for the identification and classification of potyviruses. II. Virus particle length, symptomatology, and cytopathology of six distinct viruses. *Virology* **112**, 210-6.

Mohr PG, Cahill DM, 2007. Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in Arabidopsis infected with Pseudomonas syringae pv. tomato. *Funct Integr Genomics* **7**, 181-91.

Moldrup ME, Salomonsen B, Geu-Flores F, Olsen CE, Halkier BA, 2013. De novo genetic engineering of the camalexin biosynthetic pathway. *J Biotechnol* **167**, 296-301.

Moreno A, Fereres A, 2012. Virus diseases in lettuce in the Mediterranean basin. Adv Virus Res 84, 247-88.

Moreno IM, Thompson JR, Garcia-Arenal F, 2004. Analysis of the systemic colonization of cucumber plants by Cucumber green mottle mosaic virus. *J Gen Virol* **85**, 749-59.

Murphy JF, Klein PG, Hunt AG, Shaw JG, 1996. Replacement of the tyrosine residue that links a potyviral VPg to the viral RNA is lethal. *Virology* **220**, 535-8.

Mustroph A, Juntawong P, Bailey-Serres J, 2009a. Isolation of plant polysomal mRNA by differential centrifugation and ribosome immunopurification methods. *Methods Mol Biol* **553**, 109-26.

Mustroph A, Zanetti ME, Jang CJ, *et al.*, 2009b. Profiling translatomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 18843-8.

Mutterer JD, Stussi-Garaud C, Michler P, Richards KE, 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** (Pt **10**), 2771-8.

Nadarasah G, Stavrinides J, 2011. Insects as alternative hosts for phytopathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **35**, 555-75.

Nafisi M, Goregaoker S, Botanga CJ, *et al.*, 2007. Arabidopsis cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3-acetaldoxime in camalexin synthesis. *Plant Cell* **19**, 2039-52.

Nakamoto H, Vigh L, 2007. The small heat shock proteins and their clients. Cell Mol Life Sci 64, 294-306.

Nakazono M, Qiu F, Borsuk LA, Schnable PS, 2003. Laser-capture microdissection, a tool for the global analysis of gene expression in specific plant cell types: identification of genes expressed differentially in epidermal cells or vascular tissues of maize. *Plant Cell* **15**, 583-96.

Naylor M, Murphy AM, Berry JO, Carr JP, 1998. Salicylic Acid Can Induce Resistance to Plant Virus Movement. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**, 860-8.

Neal CS, Fredericks DP, Griffiths CA, Neale AD, 2010. The characterisation of AOP2: a gene associated with the biosynthesis of aliphatic alkenyl glucosinolates in Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biol* **10**, 170.

Nebreda M, Moreno A, Perez N, Palacios I, Seco-Fernandez V, Fereres A, 2004. Activity of aphids associated with lettuce and broccoli in Spain and their efficiency as vectors of Lettuce mosaic virus. *Virus Res* **100**, 83-8.

Ng JC, Perry KL, 2004. Transmission of plant viruses by aphid vectors. Mol Plant Pathol 5, 505-11.

Nicolas O, Dunnington SW, Gotow LF, Pirone TP, Hellmann GM, 1997. Variations in the VPg protein allow a potyvirus to overcome va gene resistance in tobacco. *Virology* **237**, 452-9.

Nishizawa A, Yabuta Y, Yoshida E, Maruta T, Yoshimura K, Shigeoka S, 2006. Arabidopsis heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. *Plant J* **48**, 535-47.

Obayashi T, Nishida K, Kasahara K, Kinoshita K, 2011. ATTED-II updates: condition-specific gene coexpression to extend coexpression analyses and applications to a broad range of flowering plants. *Plant Cell Physiol* **52**, 213-9.

Oda A, Sakuta C, Masuda S, Mizoguchi T, Kamada H, Satoh S, 2003. Possible involvement of leaf gibberellins in the clock-controlled expression of XSP30, a gene encoding a xylem sap lectin, in cucumber roots. *Plant Physiol* **133**, 1779-90.

Ohta M, Guo Y, Halfter U, Zhu JK, 2003. A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11771-6.

Okumoto S, Schmidt R, Tegeder M, et al., 2002. High affinity amino acid transporters specifically expressed in xylem parenchyma and developing seeds of Arabidopsis. J Biol Chem 277, 45338-46.

Omid A, Keilin T, Glass A, Leshkowitz D, Wolf S, 2007. Characterization of phloem-sap transcription profile in melon plants. *J Exp Bot* **58**, 3645-56.

Oparka KJ, Turgeon R, 1999. Sieve elements and companion cells-traffic control centers of the phloem. *Plant Cell* **11**, 739-50.

Pagny G, Paulstephenraj PS, Poque S, et al., 2012. Family-based linkage and association mapping reveals novel genes affecting Plum pox virus infection in Arabidopsis thaliana. New Phytol **196**, 873-86.

Pajerowska-Mukhtar KM, Emerine DK, Mukhtar MS, 2013. Tell me more: roles of NPRs in plant immunity. *Trends Plant Sci* **18**, 402-11.

Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C, 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep* 24, 255-65.

Pazhouhandeh M, Dieterle M, Marrocco K, *et al.*, 2006. F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1994-9.

Peter KA, Gildow F, Palukaitis P, Gray SM, 2009. The C terminus of the polerovirus p5 readthrough domain limits virus infection to the phloem. *J Virol* **83**, 5419-29.

Peter KA, Liang D, Palukaitis P, Gray SM, 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.

Petzold HE, Zhao M, Beers EP, 2012. Expression and functions of proteases in vascular tissues. *Physiol Plant* 145, 121-9.

Pfeffer S, Dunoyer P, Heim F, Richards KE, Jonard G, Ziegler-Graff V, 2002. P0 of beet Western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J Virol* **76**, 6815-24.

Pieterse CM, Van Loon LC, 2004. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 456-64.

Pietro AD, Madrid MP, Caracuel Z, Delgado-Jarana J, Roncero MI, 2003. Fusarium oxysporum: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol Plant Pathol* **4**, 315-25.

Pirone TP, Blanc S, 1996. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* **34**, 227-47.

Portillo M, Lindsey K, Casson S, *et al.*, 2009. Isolation of RNA from laser-capture-microdissected giant cells at early differentiation stages suitable for differential transcriptome analysis. *Mol Plant Pathol* **10**, 523-35.

Postnikova OA, Nemchinov LG, 2012a. Comparative analysis of microarray data in Arabidopsis transcriptome during compatible interactions with plant viruses. *Virology Journal* **9**, 101.

Postnikova OA, Nemchinov LG, 2012b. Comparative analysis of microarray data in Arabidopsis transcriptome during compatible interactions with plant viruses. *Virol J* **9**, 101.

Pouwels J, Kornet N, Van Bers N, *et al.*, 2003. Identification of distinct steps during tubule formation by the movement protein of Cowpea mosaic virus. *J Gen Virol* **84**, 3485-94.

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 Acids Res* **27**, 421-5.

Puustinen P, Makinen K, 2004. Uridylylation of the potyvirus VPg by viral replicase NIb correlates with the nucleotide binding capacity of VPg. *J Biol Chem* **279**, 38103-10.

Quadt R, Kao CC, Browning KS, Hershberger RP, Ahlquist P, 1993. Characterization of a host protein associated with brome mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 1498-502.

Quan R, Lin H, Mendoza I, et al., 2007. SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect Arabidopsis shoots from salt stress. *Plant Cell* **19**, 1415-31.

Rajamaki ML, Valkonen JP, 1999. The 6K2 protein and the VPg of potato virus A are determinants of systemic infection in Nicandra physaloides. *Mol Plant Microbe Interact* **12**, 1074-81.

Rask L, Andreasson E, Ekbom B, Eriksson S, Pontoppidan B, Meijer J, 2000. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol Biol* **42**, 93-113.

Ratzka A, Vogel H, Kliebenstein DJ, Mitchell-Olds T, Kroymann J, 2002. Disarming the mustard oil bomb. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11223-8.

Reinbold C, Lacombe S, Ziegler-Graff V, *et al.*, 2013. Closely related poleroviruses depend on distinct translation initiation factors to infect Arabidopsis thaliana. *Mol Plant Microbe Interact* **26**, 257-65.

Reintanz B, Lehnen M, Reichelt M, *et al.*, 2001. Bus, a bushy Arabidopsis CYP79F1 knockout mutant with abolished synthesis of short-chain aliphatic glucosinolates. *Plant Cell* **13**, 351-67.

Rentsch D, Boorer KJ, Frommer WB, 1998. Structure and function of plasma membrane amino acid, oligopeptide and sucrose transporters from higher plants. *J Membr Biol* **162**, 177-90.

Rep M, Dekker HL, Vossen JH, *et al.*, 2002. Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato. *Plant Physiol* **130**, 904-17.

Reutenauer A, Ziegler-Graff V, Lot H, *et al.*, 1993. Identification of beet western yellows luteovirus genes implicated in viral replication and particle morphogenesis. *Virology* **195**, 692-9.

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

Revers F, Le Gall O, Candresse T, Maule AJ, 1999. New Advances in Understanding the Molecular Biology of Plant/Potyvirus Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**, 367-76.

Revollon S, Strub JM, Fitchette AC, *et al.*, 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.

Riechmann JL, Heard J, Martin G, *et al.*, 2000. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**, 2105-10.

Riens B, Lohaus G, Heineke D, Heldt HW, 1991. Amino Acid and sucrose content determined in the cytosolic, chloroplastic, and vacuolar compartments and in the Phloem sap of spinach leaves. *Plant Physiol* **97**, 227-33.

Ritzenthaler C, Laporte C, Gaire F, et al., 2002. Grapevine fanleaf virus replication occurs on endoplasmic reticulum-derived membranes. J Virol 76, 8808-19.

Roberts AG, Oparka KJ, 2003. Plasmodesmata and the control of symplastic transport. *Plant, Cell and Environment* 26, 103-24.

Rocher F, Chollet JF, Jousse C, Bonnemain JL, 2006. Salicylic acid, an ambimobile molecule exhibiting a high ability to accumulate in the phloem. *Plant Physiol* **141**, 1684-93.

Rodrigo G, Carrera J, Ruiz-Ferrer V, *et al.*, 2012. A meta-analysis reveals the commonalities and differences in Arabidopsis thaliana response to different viral pathogens. *PLoS One* 7, e40526.

Rodriguez-Cerezo E, Findlay K, Shaw JG, *et al.*, 1997. The coat and cylindrical inclusion proteins of a potyvirus are associated with connections between plant cells. *Virology* **236**, 296-306.

Rojas MR, Zerbini FM, Allison RF, Gilbertson RL, Lucas WJ, 1997. Capsid protein and helper componentproteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* **237**, 283-95.

Roland J, Roland F, H. EM-B, Bouteau F, 2008. Atlas de biologie végétale 2. Organisation des plantes à fleurs.

Rossmann MG, Johnson JE, 1989. Icosahedral RNA virus structure. Annu Rev Biochem 58, 533-73.

Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cazares B, Lucas WJ, 1999. Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development* **126**, 4405-19.

Ruzvidzo O, Donaldson L, Valentine A, Gehring C, 2011. The Arabidopsis thaliana natriuretic peptide AtPNP-A is a systemic regulator of leaf dark respiration and signals via the phloem. *J Plant Physiol* **168**, 1710-4.

Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD, 1996. Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **8**, 1809-19.

Saenz P, Salvador B, Simon-Mateo C, Kasschau KD, Carrington JC, Garcia JA, 2002. Host-specific involvement of the HC protein in the long-distance movement of potyviruses. *J Virol* **76**, 1922-31.

Sakuta C, Oda A, Yamakawa S, Satoh S, 1998. Root-specific expression of genes for novel glycine-rich proteins cloned by use of an antiserum against xylem sap proteins of cucumber. *Plant Cell Physiol* **39**, 1330-6.

Sakuta C, Satoh S, 2000. Vascular tissue-specific gene expression of xylem sap glycine-rich proteins in root and their localization in the walls of metaxylem vessels in cucumber. *Plant Cell Physiol* **41**, 627-38.

Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, et al., 2002. Genome sequence of the plant pathogen Ralstonia solanacearum. Nature 415, 497-502.

Salonen A, Ahola T, Kaariainen L, 2005. Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr Top Microbiol Immunol* **285**, 139-73.

Sasaki T, Chino M, Hayashi H, Fujiwara T, 1998. Detection of several mRNA species in rice phloem sap. *Plant Cell Physiol* **39**, 895-7.

Satoh S, 2006. Organic substances in xylem sap delivered to above-ground organs by the roots. *J Plant Res* **119**, 179-87.

Sauerbrunn N, Schlaich NL, 2004. PCC1: a merging point for pathogen defence and circadian signalling in Arabidopsis. *Planta* **218**, 552-61.

Sawchuk MG, Donner TJ, Head P, Scarpella E, 2008. Unique and overlapping expression patterns among members of photosynthesis-associated nuclear gene families in Arabidopsis. *Plant Physiol* **148**, 1908-24.

Schaad MC, Haldeman-Cahill R, Cronin S, Carrington JC, 1996. Analysis of the VPg-proteinase (NIa) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *J Virol* **70**, 7039-48.

Schaad MC, Jensen PE, Carrington JC, 1997a. Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J* 16, 4049-59.

Schaad MC, Lellis AD, Carrington JC, 1997b. VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *J Virol* **71**, 8624-31.

Schiex MaR, 2001. EuGene: An Eucaryotic Gene Finder that combines several sources of evidence. .

Schmid M, Davison TS, Henz SR, et al., 2005. A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. *Nat Genet* **37**, 501-6.

Schmitz J, Stussi-Garaud C, Tacke E, Prufer D, Rohde W, Rohfritsch O, 1997. In situ localization of the putative movement protein (pr17) from potato leafroll luteovirus (PLRV) in infected and transgenic potato plants. *Virology* **235**, 311-22.

Schott G, Mari-Ordonez A, Himber C, Alioua A, Voinnet O, Dunoyer P, 2012. Differential effects of viral silencing suppressors on siRNA and miRNA loading support the existence of two distinct cellular pools of ARGONAUTE1. *Embo j* **31**, 2553-65.

Schramm F, Ganguli A, Kiehlmann E, Englich G, Walch D, Von Koskull-Doring P, 2006. The heat stress transcription factor HsfA2 serves as a regulatory amplifier of a subset of genes in the heat stress response in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **60**, 759-72.

Schuhegger R, Nafisi M, Mansourova M, et al., 2006. CYP71B15 (PAD3) catalyzes the final step in camalexin biosynthesis. *Plant Physiol* **141**, 1248-54.

Schuster J, Knill T, Reichelt M, Gershenzon J, Binder S, 2006. Branched-chain aminotransferase4 is part of the chain elongation pathway in the biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**, 2664-79.

Seddas P, Boissinot S, Strub JM, Van Dorsselaer A, Van Regenmortel MH, 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.

Segarra S, Mir R, Martinez C, Leon J, 2010. Genome-wide analyses of the transcriptomes of salicylic aciddeficient versus wild-type plants uncover Pathogen and Circadian Controlled 1 (PCC1) as a regulator of flowering time in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* **33**, 11-22.

Senthil-Kumar M, Mysore KS, 2011. New dimensions for VIGS in plant functional genomics. *Trends Plant Sci* 16, 656-65.

Seo JK, Kang SH, Seo BY, Jung JK, Kim KH, 2010. Mutational analysis of interaction between coat protein and helper component-proteinase of Soybean mosaic virus involved in aphid transmission. *Mol Plant Pathol* **11**, 265-76.

Serrano C, Gonzalez-Cruz J, Jauregui F, *et al.*, 2008. Genetic and histological studies on the delayed systemic movement of Tobacco Mosaic Virus in Arabidopsis thaliana. *BMC Genet* **9**, 59.

Shah J, 2009. Plants under attack: systemic signals in defence. Curr Opin Plant Biol 12, 459-64.

Shapiro LR, Salvaudon L, Mauck KE, *et al.*, 2013. Disease interactions in a shared host plant: effects of preexisting viral infection on cucurbit plant defense responses and resistance to bacterial wilt disease. *PLoS One* **8**, e77393.

Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu JK, 2000. The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na+/H+ antiporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6896-901.

Simon-Buela L, Garcia-Arenal F, 1999. Virus particles of cucumber green mottle mosaic tobamovirus move systemically in the phloem of infected cucumber plants. *Mol Plant Microbe Interact* **12**, 112-8.

Simpson AJ, Reinach FC, Arruda P, *et al.*, 2000. The genome sequence of the plant pathogen Xylella fastidiosa. The Xylella fastidiosa Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. *Nature* **406**, 151-9.

Sjolund RD, Shih CY, Jensen KG, 1983. Freeze-fracture analysis of phloem structure in plant tissue cultures. III. P-Protein, sieve area pores, and wounding. *J Ultrastruct Res* **82**, 198-211.

Sokolova M, Prufer D, Tacke E, Rohde W, 1997. The potato leafroll virus 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C. *FEBS Lett* **400**, 201-5.

Sonderby IE, Geu-Flores F, Halkier BA, 2010. Biosynthesis of glucosinolates--gene discovery and beyond. *Trends Plant Sci* **15**, 283-90.

Spetz C, Valkonen JP, 2004. Potyviral 6K2 protein long-distance movement and symptom-induction functions are independent and host-specific. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 502-10.

Stadler R, Wright KM, Lauterbach C, *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**, 319-31.

Stanley Kim H, Yu Y, Snesrud EC, et al., 2005. Transcriptional divergence of the duplicated oxidative stress-responsive genes in the Arabidopsis genome. *Plant J* **41**, 212-20.

Tacke E, Prufer D, Schmitz J, Rohde W, 1991. The potato leafroll luteovirus 17K protein is a single-stranded nucleic acid-binding protein. *J Gen Virol* **72 ( Pt 8)**, 2035-8.

Tacke E, Schmitz J, Prufer 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.

Takano J, Noguchi K, Yasumori M, et al., 2002. Arabidopsis boron transporter for xylem loading. Nature **420**, 337-40.

Takeda A, Kaido M, Okuno T, 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**, 1751-61.

Taliansky M, Roberts IM, Kalinina N, *et al.*, 2003. An umbraviral protein, involved in long-distance RNA movement, binds viral RNA and forms unique, protective ribonucleoprotein complexes. *J Virol* **77**, 3031-40.

Taliansky ME, Brown JW, Rajamaki ML, Valkonen JP, Kalinina NO, 2010. Involvement of the plant nucleolus in virus and viroid infections: parallels with animal pathosystems. *Adv Virus Res* **77**, 119-58.

Tamborindeguy C, Bereman MS, Deblasio S, *et al.*, 2013. Genomic and Proteomic Analysis of Schizaphis graminum Reveals Cyclophilin Proteins Are Involved in the Transmission of Cereal Yellow Dwarf Virus. *PLoS One* **8**, e71620.

Tantikanjana T, Mikkelsen MD, Hussain M, Halkier BA, Sundaresan V, 2004. Functional analysis of the tandem-duplicated P450 genes SPS/BUS/CYP79F1 and CYP79F2 in glucosinolate biosynthesis and plant development by Ds transposition-generated double mutants. *Plant Physiol* **135**, 840-8.

Tavert-Roudet G, Abdul-Razzak A, Doublet B, *et al.*, 2012. The C terminus of lettuce mosaic potyvirus cylindrical inclusion helicase interacts with the viral VPg and with lettuce translation eukaryotic initiation factor 4E. *J Gen Virol* **93**, 184-93.

Taylor DN, Carr JP, 2000. The GCD10 subunit of yeast eIF-3 binds the methyltransferase-like domain of the 126 and 183 kDa replicase proteins of tobacco mosaic virus in the yeast two-hybrid system. *J Gen Virol* **81**, 1587-91.

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.

Textor S, De Kraker JW, Hause B, Gershenzon J, Tokuhisa JG, 2007. MAM3 catalyzes the formation of all aliphatic glucosinolate chain lengths in Arabidopsis. *Plant Physiol* **144**, 60-71.

Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL, 2009. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* **25**, 1105-11.

Trapnell C, Williams BA, Pertea G, *et al.*, 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* **28**, 511-5.

Turgeon R, 1989. The sink-source transition in leaves. Annu. Rev. Plant Physiol. 40, 119-38.

Turgeon R, Medville R, 1998. The absence of phloem loading in willow leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12055-60.

Turgeon R, Wolf S, 2009. Phloem Transport: Cellular Pathways and Molecular Trafficking. *Annual Review* of *Plant Biology* **60**, 207-21.

Uanschou C, Ronceret A, Von Harder M, *et al.*, 2013. Sufficient amounts of functional HOP2/MND1 complex promote interhomolog DNA repair but are dispensable for intersister DNA repair during meiosis in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**, 4924-40.

Urcuqui-Inchima S, Haenni AL, Bernardi F, 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res* 74, 157-75.

Valli A, Martin-Hernandez AM, Lopez-Moya JJ, Garcia JA, 2006. RNA silencing suppression by a second copy of the P1 serine protease of Cucumber vein yellowing ipomovirus, a member of the family Potyviridae that lacks the cysteine protease HCPro. *J Virol* **80**, 10055-63.

Van Bel AJ, 1996. Interaction between sieve element and companion cell and the consequences for photoassimilate distribution. Two structural hardware frames with associated physiological software packages in dicotyledons? *J Exp Bot* **47 Spec No**, 1129-40.

Van Den Heuvel JF, Bruyere A, Hogenhout SA, *et al.*, 1997. The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to Buchnera GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *J Virol* **71**, 7258-65.

Van Lent J, Wellink J, Goidbach R, 1990. Evidence for the involvement of the 58K and 48K proteins in the intercellular movement of cowpea mosaic virus

. Journal of General Virology 71, 219-23.

Veidt I, Bouzoubaa SE, Leiser RM, *et al.*, 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, et al., 1988. Nucleotide sequence of beet western yellows virus RNA. Nucleic Acids Res 16, 9917-32.

Verchot J, Carrington JC, 1995. Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. *J Virol* **69**, 3668-74.

Verchot J, Driskel BA, Zhu Y, Hunger RM, Littlefield LJ, 2001. Evidence that soilborne wheat mosaic virus moves long distance through the xylem in wheat. *Protoplasma* **218**, 57-66.

Verchot J, Koonin EV, Carrington JC, 1991. The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology* **185**, 527-35.

Vignard J, Siwiec T, Chelysheva L, et al., 2007. The interplay of RecA-related proteins and the MND1-HOP2 complex during meiosis in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet* **3**, 1894-906.

Vijayapalani P, Maeshima M, Nagasaki-Takekuchi N, Miller WA, 2012. Interaction of the trans-frame potyvirus protein P3N-PIPO with host protein PCaP1 facilitates potyvirus movement. *PLoS Pathog* **8**, e1002639.

Vogel F, Hofius D, Sonnewald U, 2007. Intracellular trafficking of Potato leafroll virus movement protein in transgenic Arabidopsis. *Traffic* **8**, 1205-14.

Voinnet O, 2005. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet* **6**, 206-20.

Voinnet O, Lederer C, Baulcombe DC, 2000. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in Nicotiana benthamiana. *Cell* **103**, 157-67.

Vuorinen AL, Kelloniemi J, Valkonen JP, 2011. Why do viruses need phloem for systemic invasion of plants? *Plant Sci* **181**, 355-63.

Waigmann E, Lucas WJ, Citovsky V, Zambryski P, 1994. Direct functional assay for tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1433-7.

Waigmann E, Ueki S, Trutnyeva K, Citovsky V, 2004. The Ins and Outs of Nondestructive Cell-to-Cell and Systemic Movement of Plant Viruses. *Critical Reviews in Plant Sciences* **23**, 195-250.

Waltermann A, Maiss E, 2006. Detection of 6K1 as a mature protein of 6 kDa in plum pox virus-infected Nicotiana benthamiana. *J Gen Virol* **87**, 2381-6.

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.

Wang JY, Chay C, Gildow FE, Gray SM, 1995. Readthrough protein associated with virions of barley yellow dwarf luteovirus and its potential role in regulating the efficiency of aphid transmission. *Virology* **206**, 954-62.

Wang RY, Nagy PD, 2008. Tomato bushy stunt virus co-opts the RNA-binding function of a host metabolic enzyme for viral genomic RNA synthesis. *Cell Host Microbe* **3**, 178-87.

Wang S, Guo L, Allen E, Miller WA, 1999. A potential mechanism for selective control of cap-independent translation by a viral RNA sequence in cis and in trans. *RNA* **5**, 728-38.

Wang X, Ullah Z, Grumet R, 2000. Interaction between zucchini yellow mosaic potyvirus RNA-dependent RNA polymerase and host poly-(A) binding protein. *Virology* **275**, 433-43.

Wang Y, Zhang WZ, Song LF, Zou JJ, Su Z, Wu WH, 2008. Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen germination and tube growth in Arabidopsis. *Plant Physiol* **148**, 1201-11.

Wang YH, Gehring C, Irving HR, 2011. Plant natriuretic peptides are apoplastic and paracrine stress response molecules. *Plant Cell Physiol* **52**, 837-50.

Wei T, Zhang C, Hong J, *et al.*, 2010. Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathog* **6**, e1000962.

Weinl S, Kudla J, 2009. The CBL-CIPK Ca(2+)-decoding signaling network: function and perspectives. *New Phytol* **184**, 517-28.

Wen RH, Hajimorad MR, 2010. Mutational analysis of the putative pipo of soybean mosaic virus suggests disruption of PIPO protein impedes movement. *Virology* **400**, 1-7.

Westwood JH, Groen SC, Du Z, et al., 2013. A trio of viral proteins tunes aphid-plant interactions in Arabidopsis thaliana. PLoS One 8, e83066.

Whitham S, Dinesh-Kumar SP, Choi D, Hehl R, Corr C, Baker B, 1994. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* **78**, 1101-15.

Whitham SA, Anderberg RJ, Chisholm ST, Carrington JC, 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**, 569-82.

Whitham SA, Quan S, Chang HS, *et al.*, 2003. Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible Arabidopsis thaliana plants. *Plant J* **33**, 271-83.

Whitham SA, Yamamoto ML, Carrington JC, 1999. Selectable viruses and altered susceptibility mutants in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 772-7.

Whitham SA, Yang C, Goodin MM, 2006. Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 1207-15.

Wittstock U, Burow M, 2010. Glucosinolate breakdown in Arabidopsis: mechanism, regulation and biological significance. *Arabidopsis Book* **8**, e0134.

Wooding FBP, 1967. Endoplasmic reticulum aggregates of ordered structure. Planta 76, 205-8.

Xiang HY, Dong SW, Shang QX, et al., 2011. Molecular characterization of two genotypes of a new polerovirus infecting brassicas in China. Arch Virol 156, 2251-5.

Yadeta KA, Bp JT, 2013. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Front Plant Sci* **4**, 97.

Yang C, Guo R, Jie F, *et al.*, 2007. Spatial analysis of arabidopsis thaliana gene expression in response to Turnip mosaic virus infection. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 358-70.

Yang X, Thannhauser TW, Burrows M, Cox-Foster D, Gildow FE, Gray SM, 2008. Coupling genetics and proteomics to identify aphid proteins associated with vector-specific transmission of polerovirus (luteoviridae). *J Virol* **82**, 291-9.

Yatusevich R, Mugford SG, Matthewman C, *et al.*, 2010. Genes of primary sulfate assimilation are part of the glucosinolate biosynthetic network in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **62**, 1-11.

Yoo BC, Kragler F, Varkonyi-Gasic E, et al., 2004. A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell* **16**, 1979-2000.

Yoon JY, Choi SK, Palukaitis P, Gray SM, 2011. Agrobacterium-mediated infection of whole plants by yellow dwarf viruses. *Virus Res* 160, 428-34.

Zander M, Chen S, Imkampe J, Thurow C, Gatz C, 2012. Repression of the Arabidopsis thaliana jasmonic acid/ethylene-induced defense pathway by TGA-interacting glutaredoxins depends on their C-terminal ALWL motif. *Mol Plant* **5**, 831-40.

Zanetti ME, Chang IF, Gong F, Galbraith DW, Bailey-Serres J, 2005. Immunopurification of polyribosomal complexes of Arabidopsis for global analysis of gene expression. *Plant Physiol* **138**, 624-35.

Zhang S, Sun L, Kragler F, 2009. The phloem-delivered RNA pool contains small noncoding RNAs and interferes with translation. *Plant Physiol* **150**, 378-87.

Zhang Y, Tessaro MJ, Lassner M, Li X, 2003. Knockout analysis of Arabidopsis transcription factors TGA2, TGA5, and TGA6 reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. *Plant Cell* **15**, 2647-53.

Zhang ZP, I.T. B, 1997. Transport of [2-14C]jasmonic acid from leaves to roots mimics wound-induced changes in endogenous jasmonic acid pools in Nicotiana sylvestris. *Planta* **203**, 436-41.

Zhao C, Craig JC, Petzold HE, Dickerman AW, Beers EP, 2005. The xylem and phloem transcriptomes from secondary tissues of the Arabidopsis root-hypocotyl. *Plant Physiol* **138**, 803-18.

Zhao J, Last RL, 1996. Coordinate regulation of the tryptophan biosynthetic pathway and indolic phytoalexin accumulation in Arabidopsis. *Plant Cell* **8**, 2235-44.

Zheng X, Zhu J, Kapoor A, Zhu JK, 2007. Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *Embo j* **26**, 1691-701.

Zhou CJ, Xiang HY, Zhuo T, Li DW, Yu JL, Han CG, 2012. Nucleotide sequence of a chickpea chlorotic stunt virus relative that infects pea and faba bean in China. *Arch Virol* **157**, 1393-6.

Zhou N, Tootle TL, Tsui F, Klessig DF, Glazebrook J, 1998. PAD4 functions upstream from salicylic acid to control defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 1021-30.

Ziegler-Graff V, Brault V, Mutterer J, *et al.*, 1996a. The coat protein of beet western yellows luteovirus is essential for systemic infection but the viral gene

product P29 and P19 are dispensable for systemic

infection and aphid transmission. Mol Plant Microbe

Interact 9, 501-10.

Ziegler-Graff V, Brault V, Mutterer J, *et al.*, 1996b. The coat protein of beet western yellows luteovirus is essential for systemic infection but the viral gene products P29 and P19 are dispensable for systemic infection and aphid transmission. *Mol Plant Microbe Interact* **9**, 501-10.

Zilian E, Maiss E, 2011. Detection of plum pox potyviral protein-protein interactions in planta using an optimized mRFP-based bimolecular fluorescence complementation system. *J Gen Virol* **92**, 2711-23.
## Chapitre 3 : Etude des gènes *RTM* dans le mouvement viral systémique

#### I. Gènes de résistance RTM et Potyvirus

Au cours de l'évolution, les plantes ont développé diverses voies de résistance en réponse aux pathogènes, comme les virus. Une des stratégies particulièrement efficace pour bloquer l'infection est d'empêcher le virus de se propager dans toute la plante et donc de le confiner à son site d'entrée. Plusieurs mécanismes de résistance active ont été caractérisés comme la réponse hypersensible qui est souvent contrôlée par des gènes dominants de résistance (gènes R) (Maule et al., 2007) mais aussi le mécanisme d'ARN interférence ou « RNA silencing » qui cible plus spécifiquement les ARN viraux (Voinnet, 2005). Il existe aussi des mécanismes passifs qui sont dus à une inadéquation dans les interactions entre le virus et l'hôte, ce qui conduit à un bloquage du virus à une des étapes de son cycle. Ce mécanisme implique la plupart du temps des gènes récessifs de résistance (Diaz-Pendon et al., 2004).

En 1998, Mahajan et al. (1998) ont établi un lien entre l'infection par certains *Potyvirus* et quelques gènes cellulaires qui sont capables de bloquer le mouvement viral à longue distance chez *A. thaliana*. Ce système de résistance n'implique aucun mécanisme cité précédemment. En effet, en étudiant plusieurs écotypes naturels et des mutants d'*A. thaliana*, il a été mis en évidence qu'au moins trois gènes dominants, *RTM1, RTM2*, et *RTM3* sont impliqués dans la restriction du mouvement à longue distance de certains *Potyvirus,* notamment le TEV (*Tobacco etch virus*) dans Col0 (Whitham et al., 1999), ce qui va donner le nom à ce groupe de gènes : *RTM* (restricted TEV movement). Il est intéressant de noter qu'une simple mutation dans un de ces gènes permet de lever le confinement du virus au niveau de son site d'inoculation et ainsi de conduire à l'infection systémique. Cette restriction s'est avérée efficace pour d'autres potyvirus : le PPV et le LMV (Decroocq et al., 2006). Mahajan et al. (1998) ont aussi démontré que cette résistance aux *Potyvirus* n'implique aucun des mécanismes habituels de défense comme la réponse hypersensible ou la voie de l'acide salicylique.

Les trois gènes *RTM* codent pour des protéines très différentes. Ainsi la protéine RTM1 est une lectine appartenant à la famille des jacalines, dont certains

membres sont connus pour être impliqués dans les mécanismes de défense de la plante contre des pathogènes (Chisholm et al., 2000). La protéine RTM2 présente des similitudes avec les petites « Heat Shock Protein », mais son expression n'est pas induite par la chaleur (Whitham et al., 2000). La protéine RTM3 appartient à une famille de protéines dont la fonction n'est pas encore connue et qui possède un domaine «Meprin and TRAF homology » (MATH) (Cosson et al., 2010a). Les protéines RTM1 et RTM3 sont capables d'interagir avec elles-mêmes (Chisholm et al., 2001, Cosson et al., 2010a) mais aussi entre elles (Cosson et al., 2010a). La protéine RTM2 n'interagit quant à elle avec aucune des autres protéines RTM. Même si la protéine de capside (CP) des *Potyvirus* semble être impliquée dans la résistance RTM (Decroocq et al., 2009), aucune interaction n'a été démontrée par double hybride (levures) entre les trois protéines RTM et la CP de deux isolats de PPV et de deux isolats de LMV (Cosson et al., 2010a). Les mécanismes mis en jeu dans cette restriction doivent donc impliquer d'autres modes d'action ou d'autres acteurs qu'il reste encore à découvrir. Récemment, deux nouveaux loci nommés RTM4 et RTM5 ont été identifiés par une approche d'alignement génétique, sur une lignée RIL (Recombinant Inbred Lines)(Holub & Beynon, 1997) infectée par la souche LMV AF199, lignée issue du croisement entre l'écotype Col-5, résistant à cette souche de virus et l'écotype Nd-1, sensible mais semblant posséder les trois autres gènes RTM fonctionnels (Cosson et al., 2012).

### II. Etude de l'action des gènes RTM sur l'infection par des *Polerovirus*

Alors que l'on connaît l'effet des protéines RTM sur le développement de l'infection par différents potyvirus (TEV, PPV, LMV), nous avons voulu tester si elles pouvaient avoir une action sur un autre genre de virus : les polérovirus. Nous avons agro-inoculé différents mutants d'*A. thaliana* affectés dans les gènes *RTM* avec le TuYV et le CABYV et comparé leur accumulation dans des plantes d'*A. thaliana* Col0. 28 jours après agro-infiltration, la présence des virus dans les feuilles systémiques des plantes a été analysée par des tests ELISA. Aucune différence d'accumulation des deux virus n'a été observée entre les plantes sauvages (Col0) et les plantes mutantes *rtm1* et *rtm2*, obtenues par mutagénèse EMS (Ethyl methanesulfonate) par Mahajan et al. (1998). Ces tests ont été confirmés par l'analyse des ARN extraits de ces plantes par northern blot en utilisant des sondes radioactives reconnaissant l'extrémité 3' des génomes du TuYV et du CABYV (**Figure 49**). J'ai également testé un deuxième mutant dans le gène *RTM1*, appelé *rtm1-2*, obtenu également par mutagénèse EMS (Chisholm et al., 2000) et des mutants knockout produits par insertion de T-DNA, dans les gènes *RTM2* et *RTM3* appelés KO *rtm2* (Salk) (Decroocq et al., 2006), KO *rtm3* (Gabi-Kat 801D05), KO *rtm3* (Salk\_017845) (Cosson et al., 2010a). L'analyse par ELISA des feuilles systémiques des plantes inoculées par le TuYV ou le CABYV a démontré qu'il n'y a aucun changement dans l'accumulation du virus dans les feuilles systémiques et donc que le complexe RTM ne semble pas agir sur le mouvement à longue distance de ces deux virus, contrairement aux potyvirus. Ceci suggère que les mouvements systémiques des *Polyvirus* et des *Polerovirus* ont des caractéristiques distinctes.



**Figure 49 : Accumulation de l'ARN viral du TuYV (A) et du CABYV (B) dans des** *A. thaliana* **KO** *RTM1* **et** *RTM2*. Les ARN sont détectés par des sondes ADN radioactives spécifiques à une séquence en 3' de chaque génome. Aucune différence d'accumulation n'est observée entre les plantes mutants et sauvage (Col0).

# III. Etude du mouvement à longue distance du LMV par extinction du gène de résistance RTM1 par VIGS

# **1. Extinction de gènes par la technique de VIGS (virus-induced gene silencing)**

La technique de VIGS utilise le principe de « RNA silencing » (Baulcombe, 1999) afin d'abolir l'expression d'un gène pour en étudier ses fonctions (Senthil-Kumar & Mysore, 2011, Lange et al., 2013). Ce mécanisme est activé par les virus lors de leur réplication par la formation d'ARN double brin qui sera ensuite clivé par une enzyme de type DCL (Dicer-like protein) en siARN (Llave, 2010). Un brin des siARN viraux va s'associer avec le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) contenant la protéine ARGONAUTE 1 (AGO1) pour apporter la spécificité d'homologie de séquence avec la cible (Llave, 2010). L'interaction entre le complexe RISC et l'ARN cible peut induire le clivage de ce dernier ou plus rarement chez les plantes, une inhibition de la traduction (Brodersen et al., 2008). Il s'agit dans ce cas de « posttranscriptional gene silencing» (PTGS). Si l'interaction entre le complexe RISC et l'ADN cible se déroule dans le noyau, il s'agit alors de TGS (transcriptional gene silencing) qui aboutit à une répression de la transcription due à des modifications de l'ADN et/ou des histones (Zheng et al., 2007). Le phénomène peut être amplifié par les protéines cellulaires RDR (RNA dependant-RNA polymerase), qui utilisent les ARN simple brin « aberrants » pour synthétiser de nouveaux ARN double brin qui maintiendront le cycle de dégradation (Donaire et al., 2008).

La technologie de VIGS nécessite la construction d'un virus recombinant, renfermant une séquence d'un gène-cible dont on cherche à inhiber l'expression par « RNA silencing ». Lors de l'infection, cette séquence intégrée au génome viral sera clivée par une enzyme DCL tout comme le reste du génome viral et les siARN qui en résulteront pourront guider la dégradation spécifique des gènes dont ils sont complémentaires. Un vecteur est donc construit à partir d'un génome viral placé sous le contrôle d'un promoteur procaryotique de type T7 RNApol permettant la synthèse *in vitro* des transcrits viraux, ou sous le contrôle d'un promoteur constitutif eucaryotique de type promoteur 35S du CaMV. Le génome viral aura été modifié de manière à comporter des sites de clonage afin d'y insérer une partie de la séquence du gène à cibler. Cette méthode a pour avantage d'être rapide (une à trois semaines

pour l'infection par le vecteur et la mise en place du « RNA silencing »), et d'être applicable à des plantes qui ne bénéficient pas encore de technique de transformation. Plusieurs types de vecteurs ont été construits à partir par exemple, du Tobravirus TRV ou de l'ASLV (*Apple latent spherical virus*) du genre *Cheravirus* (Igarashi et al., 2009). Ces deux vecteurs sont efficaces sur un grand nombre d'espèces végétales.

Par exemple, Liu et al. (2002) ont développé un vecteur VIGS à partir du TRV pour étudier le rôle des gènes dans la voie de signalisation contrôlée par le gène *N* du tabac qui confère une résistance à la plante contre le TMV (Whitham et al., 1994). Dans cette étude, un vecteur pTRV a été construit à partir de ce virus bipartite, formé de deux plasmides correspondant aux ARN1 et ARN2 du TRV, sous le contrôle du promoteur 35S du CaMV. Les gènes codant pour les protéines non essentielles de l'ARN2 (la protéine de capside et deux protéines hypothétiques encore jamais détectées) ont été remplacés par des sites de clonage pour insérer les séquences des gènes-cibles. Pour tester l'efficacité de leur vecteur pTRV, les auteurs ont inséré une séquence du gène *PDS* codant pour la phytoène désaturase impliquée dans la voie de biosynthèse des caroténoïdes. La mise en place de l'extinction du gène dans la plante est bien visible et se traduit par un blanchiment des feuilles qui est visible 5 jours post-infection dans les feuilles systémiques et qui persiste dans le temps (Figure 50). Liu et al. (2002) ont ensuite procédé à leur étude en insérant dans le vecteur des séquences des gènes homologue dans le tabac des gènes Rar1 (identifié dans l'orge), EDS1 et NPR1/NIM1 (identifiés dans A. thaliana) participant à la résistance médiée par le gène N contre le TMV. Après infiltration de ces vecteurs recombinants dans les *N. benthamiana* transgéniques exprimant le gène *N* du tabac, le TMV est inoculé 8 jours plus tard. Contrairement aux contrôles VIGS sans gène cible, le TMV est retrouvé dans les feuilles systémiques 10 jours post-infection, ce qui signifie que la résistance contrôlée par le gène N a été abolie suite à l'extinction des gènes Rar1, EDS1 et NPR1/NIM1 par le vecteur recombinant pTRV. Cette stratégie a permis de confirmer l'importance de ces gènes dans le mécanisme de résistance contrôlé par le gène *N* contre l'infection par le TMV.



**Figure 50 : Extinction du gène PDS (phytoene desaturase).** L'infection du TRV recombinant portant la séquene PDS permet l'extinction du gène PDS endogène dans *N. benthamiana* ce qui provoque l'inhibition de la biosynthèse de caroténoïdes et en conséquence, un phénotype de blanchiment. (Liu et *al.*, 2002)

#### 2. Stratégie développée avec le TuYV

Au laboratoire, la spécificité de restriction aux cellules phloémiennes des Polerovirus a été exploitée pour développer un vecteur viral capable d'éteindre certains gènes spécifiquement au niveau du phloème (voir publication ci-après). Ainsi le Dr. D. Bortolamiol-Bécet a construit un virus TuYV chimérique portant une séquence d'ADNc provenant d'un gène cellulaire, le gène *CHLI1* qui intervient dans le processus de biosynthèse de la chlorophylle. Lors de l'infection, le virus déclenche le mécanisme de «RNA silencing » qui va cibler le génome du TuYV et produire des siARN viraux, mais également des siARN dirigés contre l'ARN messager du gène *CHLI1.* Il en résulte une extinction du gène correspondant dans les cellules infectées mais également dans les cellules voisines en raison du mouvement de cellule en cellule du signal de RNA silencing (Himber et al., 2003). Le suppresseur de RNA silencing du TuYV agissant en aval de la production de siARN (Bortolamiol et al., 2007, Csorba et al., 2010), ceux-ci sont libres de passer dans les cellules voisines et d'être incorporés dans le complexe RISC pour dégrader l'ARNm du gène CHLI1. On observe un phénotype de jaunissement des nervures, jaunissement caractéristique de l'absence de chlorophylle. Plusieurs types de séquences (sens, antisens, tige-boucle...) ont été insérées au niveau de deux sites de restriction présents dans l'extrémité 3' non codante du génome du TuYV et testées pour leur efficacité de suppression. Il apparaît que c'est une construction sens de 81 pb qui possède l'effet le plus efficace et durable chez *A. thaliana* (Figure 51A). Le phénotype de jaunissement des nervures apparaît au bout de 9 jours et persiste plus d'un mois à ce niveau sans que ce phénotype ne s'étende à l'ensemble du limbe de la feuille (Figure 51B). Cette observation phénotypique a été confirmée par des expériences de qPCR par la diminution de l'accumulation du transcrit CHLI1 dans les plantes infectées par le virus TuYV-CHLI1, et non pas dans les plantes infectées par le TuYV sauvage (Figure 51C).



**Figure 51 : Construction de virus TuYV recombinants exprimant une séquence du gène** *CHLI1* **et validation fonctionnelle.** (A) Représentation schématique de l'extrémité 3' du génome du TuYV et localisation des sites de restriction introduits pour la construction de nouveaux recombinants. Les mutations sont indiquées en gras dans la séquence. (B) Exemples de symptômes de jaunissement des nervures, observés sur quatre des TuYV recombinants testés. L'extinction du gène *CHLI1* par ces vecteurs est donc fonctionnelle. (C) Quantification par qPCR des transcrits du gène *CHLI1* (jaune) et des ARN viraux lors de l'infection par une collection de TuYV (rouge) recombinants sauvages ou déficient pour leur protéine P0. La normalisation des valeurs a été réalisée par rapport à un échantillon de six ADNc de plantes infectées par le TuYV sauvage. Les chiffres entre parenthèse indique le nombre de plantes analysées. SucSUL: plante transgénique pSUC2::CHLI1, TuWT: TuYV sauvage, TuP0: TuYV n'exprimant pas le supresseur de RNA silencing P0, TuM1 et TuM2: insertion d'un site MluI (voir Figure A ci-dessus), TuM1hp, TuM1s81, TuM2hp, TuM2s80, TuM2s40, TuM2as40: TuYV recombinants.

L'efficacité de cet outil viral ayant été démontrée pour le gène *CHL11*, nous avons voulu tester cette même approche en insérant dans le génome du TuYV un fragment du gène *RTM1* afin de valider son efficacité sur le mouvement systémique du LMV. En effet, on sait que le LMV sauvage (AF199) est incapable de développer une infection systémique sur l'écotype Col0, contrairement au variant naturel appelé AFVAR1 (Decroocq et al., 2009), alors que tous deux infectent de manière systémique l'écotype C24. Ces deux variants de LMV diffèrent d'un acide aminé au niveau de la protéine de capside (CP), une glycine qui est remplacée par un acide aspartique chez le variant AFVAR1. Cette mutation permet au variant de contourner la résistance sur Col0 (Decroocq et al., 2009).

#### 3. Résultats

Sachant qu'une mutation dans un seul des gènes *RTM* est suffisante pour permettre l'infection par le LMV sauvage AF199, l'objectif de l'expérience visait l'extinction du gène *RTM1* dans des feuilles d'*A. thaliana* Col0 afin de permettre au LMV sauvage AF199 d'infecter la plante entière. Au laboratoire, le Dr. Kamal Hleibieh a construit un TuYV chimérique sur le modèle précédemment décrit en insérant une séquence de 82 pb du gène *RTM1* au niveau de l'extrémité 3' non codante du génome viral (**Figure 52**A). Ce virus a ensuite été agro-infiltré dans des *A. thaliana* Col0. En parallèle, le virus portant la séquence du gène *CHLI1* (TuYV-Sul 80) a été infiltré afin de pouvoir suivre l'infection virale au cours du temps en observant le jaunissement des nervures. 15 jours après agro-infiltration, l'extinction du messager *CHLI1* étant bien visible, les plantes ont été infectées mécaniquement par l'un des deux variants AF199 ou AFVAR1 du LMV. Des plantes témoins C24 ont été traitées de la même manière afin de confirmer le pouvoir infectieux de l'inoculum. Des analyses par ELISA sur les plantes infectées par les deux virus (TuYV et LMV) ont confirmé la présence du TuYV dans toutes les plantes agro-infiltrées (10/10).



**Figure 52 : Construction d'un virus TuYV recombinant exprimant une séquence du gène** *RTM1* **et validation fonctionnelle de sa capacité à réaliser du VIGS.** (A) Séquence du gènes *RTM1* avec la localisation du fragment inséré dans un virus TuYV-M2. (B) Quantification des transcrits du gène *RTM1* (jaune) et des ARN viraux: TuYV sauvage (Tu-WT) ou recombinant Tu-RTM1 (rouge) et LMV (vert) suite à une expérience d'infection double: TuWT ou Tu-RTM1 puis deux semaines plus tard LMV sauvage ou LMV contournant la résistance (LMV-VAR1). Les ARN ont été extraits trois semaines après l'infection par le LMV. L'infection a été réalisée sur Col0 (résistante au LMV AF199) ou C24 (sensible). Les valeurs ont été normalisées par rapport à un échantillon de plantes doublement infectées par le TuYV sauvage et le LMV-VAR1. Les chiffres entre parenthèse précisent le nombre de plantes analysées. (C) Cinétique d'expression du gène *RTM1* (jaune) et des ARN viraux: TuYV (rouge) et LMV (vert) à deux temps: 24 et 54 jours post-infection pour le TuYV, 29 et 53 jours post-infection pour le LMV.

Les ARN extraits des feuilles systémiques ont été analysés par qPCR, trois et sept semaines après l'infection par le LMV. Les résultats ont été normalisés en utilisant les gènes  $EF1\alpha$  et EXP comme gènes de référence dont l'expression est stable durant l'infection virale (Lilly et al., 2011). D'après les résultats obtenus par le Dr. B. Monsion (Figure 52B), il apparaît tout d'abord que l'expression du gène RTM1 a diminué d'un facteur 6 sur les plantes agro-infiltrées avec le TuYV portant la séquence RTM1, par rapport aux plantes infiltrées par le TuYV sauvage, confirmant la fonctionnalité du vecteur dérivé du TuYV en VIGS. La présence du TuYV dans toutes les plantes infiltrées est bien confirmée. Par contre, celle du LMV a été mise en évidence dans quatre plantes Col0 infectées par le virus sauvage LMV AF199 sur huit, tout d'abord très faiblement au premier temps (trois semaines post-infection) puis plus nettement à sept semaines post-infection (Figure 52C). La descendance virale présente dans les quatre plantes positives a été vérifiée par séquençage pour confirmer la présence du LMV sauvage AF199 et non pas d'un variant qui aurait pu apparaître naturellement ou par contamination.

Ainsi le virus chimérique TuYV portant une courte séquence du gène *RTM1* a permis d'éteindre partiellement son expression dans les cellules phloémiennes ce qui a permis au LMV AF199 de se propager aux feuilles supérieures non inoculées de l'écotype Col0. Le fait que l'extinction ne soit pas totale peut-être dû à la potentielle stabilité de la protéine RTM1 dans le phloème qui pourrait perdurer malgré l'arrêt de sa synthèse.

Ce projet « collectif » de validation fonctionnelle a été le résultat d'un travail dans lequel j'ai participé à la mise au point de la cinétique des infections par les deux virus et de l'analyse par qPCR.

Voici le manuscrit en préparation présentant ces résultats :

#### Phloem specific Virus-Induced Gene-Silencing using a Recombinant polerovirus

## Diane Bortolamiol-Bécet<sup>a</sup>, Baptiste Monsion<sup>a</sup>, Sophie Chapuis<sup>a</sup>, Kamal Hleibieh<sup>a</sup>, Véronique Brault<sup>b</sup> and Véronique Ziegler-Graff<sup>a</sup>\*

<sup>a</sup>Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, Laboratoire propre du CNRS conventionné avec l'Université de Strasbourg, 67084 Strasbourg, France

<sup>b</sup> UMR 1131 SVQV INRA-UDS, 28 rue de Herrlisheim, 68021 Colmar, France

\* = corresponding author

e-mail : veronique.ziegler-graff@ibmp-cnrs.unistra.fr

#### Abstract

Virus Induced Gene Silencing has proven to be a powerful tool for the study of gene function in plants. We have taken advantage of polerovirus phloem restriction to engineer a chimeric virus carrying a cDNA fragment from an endogenous plant gene to specifically silence the gene in vascular tissues. Sense (S), antisense (AS) and inverted-repeat (IR) sequences of a portion of the AtCHLI1 gene required for chlorophyll biosynthesis were inserted into the 3' non-coding region of Turnip yellows Virus (TuYV) and the corresponding viruses were agroinoculated to Arabidopsis thaliana. A vein chlorosis phenotype was observed as early as nine days post-inoculation for all chimeric viruses and further intensified with plant growth during the following weeks while remaining restricted to the vasculature. When similar constructs were introduced into virus carrying a knockout mutation in the silencing suppressor P0, a similar phenotype was observed following agroinoculation. Thus P0 does not have a strong effect on generation, propagation and action of short distance silencing signals in phloem cells. Interestingly a more durable phenotype was recorded with the S and AS constructs than with the IR containing viruses. Molecular analysis of the progeny virus revealed lower stability of the insert in the IR recombinant viruses. Experiments of transmission by aphids performed with either S or IR recombinant TuYV confirmed that only the S chimeric TuYV was able to generate extensive clearly visible vein chlorosis. Functionality of the VIGS process by TuYV recombinants was further proven by silencing the RTM1 transcript in order to allow infection by the potyvirus LMV-AF199, which is otherwise unable to infect Col0 plants

due to the RTM resistance. This study shows that a recombinant polerovirus TuYV containing a host gene sequence can be used to efficiently silence homologous genes specifically in phloem tissue. It constitutes the first example of a labeled and systemically infectious polerovirus where the spatial and temporal progression of the viral infection can be visually monitored.

#### Introduction

Virus-induced gene silencing (VIGS) is a valuable tool to produce rapid gene knockdown phenotypes that can be used in reverse-genetic approaches to assess plant gene function (Baulcombe, 1999; Ratcliff et al., 1999; Waterhouse and Helliwell, 2002). VIGS exploits RNA silencing that is induced by the delivery of double stranded RNA (dsRNA) to provoke a sequence-specific RNA degradation, resulting in silencing of a cellular target gene. In the case of viral infection in plants, and especially for positive sense single-stranded RNA viruses it was originally thought that the replicative form or/and imperfect intramolecular RNA duplexes represent the pool of dsRNA that triggers VIGS. Profiling experiments of viral siRNA (vsRNA) by deep sequencing showed that the vast majority of vsRNA originated predominantly from genomic sense RNA (Donaire et al., 2009; Qi et al, 2009, Szittya et al., 2010) although for some viruses, the vsRNA distribution was near symmetry of polarity (Garcia-Ruiz et al., 2010). Several reports have also identified hotspots generating vsRNA, but no correlation could be drawn with the presence of hairpin forming sequences at these sites (Donaire et al., 2009, Qi et al, 2009, Garcia-Ruiz et al., 2010).

VIGS can potentially target any endogenous gene after inserting part of its sequence into a viral vector. This approach has therefore been successfully applied to study rapid gene loss-of-function in many dicotyledonous (Waterhouse and Helliwell, 2002; Burch-Smith et al., 2004) and monocotyledonous plants (Scofield and Nelson, 2009) or both (Liou et al., 2014), using both RNA or DNA viruses (Burch-Smith et al., 2004; Kumar et al., 2014). However, up to now, no tissue specific silencing has been reported using a VIGS technology.

A particularly interesting feature of poleroviruses and other members of the *Luteoviridae* family is that virus infection is restricted to vascular tissue. Most plant viruses initially

infect mesophyll cells of their host. The infection then spreads from cell to cell until cells of the phloem compartment are attained, whereupon the virus is transported through the sieve elements to distant parts of the plant. Polerovirus multiplication, on the other hand, is normally confined to phloem cells (companion cells and phloem parenchyma cells). In nature these viruses cannot be mechanically inoculated but rely upon aphid vectors which specifically inject virions into the sieve elements along with saliva while feeding. In the laboratory, however, poleroviruses can be transmitted by agroinoculation of cloned viral cDNA (Leiser et al., 1992; Prüfer et al., 1996, Nurkiyanova et al., 2000) although virus proliferation is still confined to the vasculature.

The polerovirus genome is a monopartite single-stranded RNA that is packaged into isometric particles. It contains six to eight ORFs, some of them overlapping extensively and most being essential for systemic infection (Brault et al., 1995; Ziegler-Graff et al., 1996, Ashoub et al., 1998). Stable insertion of a complete foreign gene into a polerovirus genome has so far not been achieved, probably due to genome size packaging constraints of the icosaedric particles. An engineered *Potato leafroll virus (Polerovirus)* bearing a GFP fusion to the C-terminal part of the minor structural protein was reported to infect single cells but unable to spread systemically (Nurkiyanova et al., 2000). Comparable results were observed with a *Turnip yellows virus* (TuYV, formerly BWYV-FL1, *Beet western yellows virus*) construct containing a GFP-insertion in a similar location (Jérôme Mutterer, Céline Sorin and V. Ziegler-Graff, unpublished data).

In this report, we took advantage of the phloem restriction of poleroviruses to develop polerovirus-based vectors to specifically silence genes in the vascular tissue. In order to evade possible limitations in terms of insert size, we introduced short sequences originating from the *CHL11* gene in the 3' untranslated region of TuYV. *CHL11* encodes the nucleotide binding subunit of a magnesium chelatase involved in chlorophyll synthesis (Kjemtrup et al, 1998; Turnage et al., 2002). Its silencing induces tissue yellowing known as the "sulfur" phenotype (Kjemtrup et al, 1998). Small size inserts in either sense or antisense orientation or as an inverted-repeat designed to generate an hairpin structure were tested for silencing. We show that *Arabidopsis thaliana* plants inoculated with the aforesaid recombinant TuYV constructs all exhibited a distinct chlorotic phenotype appearing specifically along the vasculature. This study thus demonstrates that poleroviruses can be used as VIGS vectors to specifically target gene expression in phloem cells. Moreover, confirmation of the functionality of the silencing process was provided by

the infection of a TuYV-RTM1 recombinant which reduced the accumulation of the *RTM1* transcript, thereby promoting the systemic invasion by a wild-type LMV-AF199, which would be otherwise non-infectious. The recombinant TuYV cDNA clones represent the first example in the *Luteoviridae* family in which progression of the infection can be monitored spatially and temporarily *in planta* by simple visual observation.

#### Results

#### TuYV is a target of RNA silencing and can be used as a vector in VIGS experiments

In order to use a viral genome as an efficient VIGS vector, several conditions have to be fulfilled: (1) the virus has to induce the production of viral small RNAs (vsRNA) generated by DICER-Like enzymes from the viral and the endogenous-inserted sequences, (2) the vsRNA must efficiently target the endogenous mRNA and (3) the silencing suppressor activity of the engineered virus should not compromise its silencing activity. A previous study reported that poleroviruses displayed at least some resistance to degradation by RNA silencing (Brault et al., 2002). TuYV infection of transgenic *Nicotiana benthamiana* plants expressing a viral transgene originating from the same virus, triggered efficient RNA silencing of the transgene mRNA, while the viral genome was only poorly targeted by the plant defence mechanism. To evaluate the potential of TuYV to induce the production of vsRNA during infection, and therefore to be used as a VIGS vector, we undertook additional experiments in *A. thaliana*.

The silencing suppressor P0 encoded by the poleroviruses TuYV and CABYV (*Cucumber aphid borne yellows virus*) is known to act at a step downstream of vsRNA production by inhibiting the siRNA-guided cleavage activity of the RISC complex (RNA Induced Silencing Complex) (Bortolamiol et al. (2007). In particular the viral protein induces the degradation of the major actor of the RISC effector, the ARGONAUTE 1 protein (AGO1), in both transgenic P0 plants and in transient expression experiments (Bortolamiol et al., 2007; Baumberger et al., 2007). However no data are available concerning the generation of vsRNA and the fate of AGO1 during infection in the absence of P0. We therefore agro-infected FLAG-AGO1 arabidopsis plants expressing a functional epitope-tagged version of AGO1 (Baumberger and Baulcombe, 2005) with wild-type TuYV (TuWT) or with a P0-deficient TuYV (TuP0-, previously referred to as BW1.6346, Ziegler-Graff et al., 1996).

Three weeks after infection total extracts of small RNA from TuYV-infected Col0 and *FLAG-AGO1* plants were analysed and revealed the presence of vsRNA of two sizes (Figure 1A, lanes aT and bT), indicating that TuYV is effectively a target of DCL proteins generating vsRNA. In TuP0- infected *FLAG-AGO1* plants (Figure 1A, lane cT), the same vsRNA were detected confirming that P0 protein does not interfere with vsRNA generation (Bortolamiol et al., 2007). The lower level of siRNA observed in these plants is consistent with the reduction in viral accumulation of the P0 knock-out virus, as previously shown by Ziegler-Graff et al. (1996) and confirmed by the lower detection of the RT protein (minor structural protein) in total extracts of TuP0- infected plants compared to TuWT infected plants (Figure 1B, lanes bT and cT).

In order to check if these vsRNA were functional, we investigated their capacity to be loaded onto AGO1 protein. To this aim the FLAG-AGO1 proteins were immunoprecipitated using a FLAG antibody from mock or infected plant extracts and the short RNAs present on the silencing effector core protein were isolated by Tri-Reagent (MRC, Inc.) extraction. Small size RNA of viral origin (21 or 22 nts long) were detected in FLAG-AGO1 plants infected with both viruses (TuWT and TuP0-, Figure 1A, lanes IP b and c), in contrast to TuWT-infected Col0 plants where no co-immunoprecipitated vsRNA were found (Figure 1A, lane IP a). This is consistent with the absence of FLAG-AGO1 proteins in Col0 plants, as shown in Figure 1B (lane IP a) where a fraction of the immunoprecipitated proteins was analysed by Western-blot before extraction of the loaded sRNAs. As P0 has been shown to induce degradation of AGO1 (Bortolamiol et al., 2007; Baumberger et al., 2007), a reduced level of FLAG-AGO1 was expected in the vascular tissue of the transgenic infected plants compared to the transgenic mock-infected plants. As shown on Figure 1B however, no difference in the accumulation of FLAG-AGO was observed in the immunoprecipitated fraction from the various plant extracts (lanes IP b, c and d). Presumably, this is because the phloem cells infected by the virus represent only a minor proportion of the material in the total tissue extracts. A specific destabilisation effect on AGO1 in phloem cells would therefore be masked by the bulk of the proteins that has not been affected in other cell types.

These experiments demonstrate that virus-derived siRNA are produced in infected TuYV plants and are incorporated into the RISC complex. These vsRNA can potentially target both viral RNA and any endogenous mRNA destined to be silenced. These results prompted us to construct recombinant TuYV viruses to evaluate their silencing potential activity in VIGS experiments in arabidopsis.

#### Construction of the different TuYV-based VIGS vectors

TuYV-based VIGS vectors were designed to take into account several considerations mandatory for efficiency and stability of the vectors. First, poleroviruses require stable virions for systemic spread in *Nicotiana* species (Ziegler-Graff et al., 1996; Taliansky et al., 2003) and in arabidopsis plants (unpublished data). Increasing the viral genome size by inserting long foreign RNA sequences was detrimental to stability of the resulting constructs in infected plants (Nurkiyanova et al., 2000; our unpublished results on TuYV), presumably because of a size constraint for genome packaging into the isometric viral particles. We therefore restricted the size of the inserted fragments to about 100 nucleotides (nt). Furthermore, as most of the viral proteins encoded by TuYV are required to establish an efficient systemic infection (Brault et al., 1995; Ziegler-Graff et al., 1996) we selected the 3' non-translated region of the TuYV genome to insert the foreign sequences. Unique *Mlu*I restriction sites were introduced at two distinct sites in the 3' non-coding region of TuYV sequence, just after the ORF5 stop codon or 35 nt downstream of it, generating respectively mutants M1 and M2 (Figure 2A).

Among the most popular endogenous genes that have been successfully silenced in VIGS experiments is the *Chlorata 42/CHLI1* gene (Kjemtrup et al, 1998; Turnage et al., 2002) that encodes the nucleotide binding subunit of magnesium chelatase involved in chlorophyll synthesis. Silencing of this gene phenocopies the "*SULFUR*" phenotype of the *Chlorata 42* mutant in *Nicotiana benthamiana*, resulting in tissue yellowing. The *CHLI1* gene was targeted in a transgenic line of *A. thaliana* expressing an inverted repeat construct deriving from the gene under the phloem specific promoter *AtSUC2* (Himber et al., 2003). The resulting "*SULFUR*" phenotype consisted in a stable yellow chlorosis arising specifically along the vasculature. We therefore chose to conduct trial experiments in which small fragments of *CHLI1* cDNA were inserted into viral vectors.

Both *Mlu*I restriction sites were used to insert sequences deriving from the *CHLI1* gene (Figure 2B). Hairpin constructs M1hp and M2hp were generated by introducing a 42 nt-long inverted repeat separated by an 18nt loop sequence. This sequence has the ability to fold into a hairpin-like structure at the 3' end of the viral transcript. To produce the sense

constructs M1s81 and M2s81, an 81 nt-long direct sense-oriented sequence was introduced into the viral genome at the M1 and M2 sites, respectively. Shorter sense and antisense sequences (42 nt-long) corresponding to halves of the afore mentioned hairpin were introduced into the M2 construct to produce the sense M2s42 and the antisense M2as42 mutants (Figure 2B). All of the six aforesaid recombinant constructs were generated in the wild-type TuYV background and five of them in a P0 deficient mutant (P0-M1hp, P0-M1s81, P0-M2s81, P0-M2s42 and P0-M2as42; Figure 2C).

#### Infectivity and phenotype analysis of the different TuYV constructs

Arabidopsis Col0 plants were agroinfected with either wild-type (TuWT) or the modified M1 or M2 (containing only the MluI restriction site) or the various M1- and M2- derived VIGS constructs. Whereas TuWT and both the M1- and M2-infected plants remained symptomless (Figure 3 panels c and d), all recombinant constructs containing partial sequences of the CHLII gene in the TuWT background developed a discrete vein chlorosis phenotype (Figure 3 panels e-l). This phenotype resembled to the "SULFUR" phenotype observed on transgenic sucSUL plants that were transformed with a hairpin construct of the CHLI1 gene controlled by the companion cell-specific promoter AtSuc2 (Figure 3b; Himber et al., 2003), except that the pattern of vein decoloration induced by the TuYV constructs was consistently milder than that observed on sucSUL plants. Phenotype expression started as soon as nine days post infection (pi) in young emerging leaves of TuYV-infected plants. On the other hand, source leaves or leaves that were at the source/sink transition state at the time of virus inoculation remained symptomless. Among the plants infected with various recombinant constructs, only M2s42 infected plants displayed a significantly fainter vein yellowing phenotype compared to those produced by the other constructs (Figure 3, panels i and 1). Taken together these observations suggest that TuYV-VIGS vectors are able to trigger silencing of CHLI1 in phloem cells and presumably in cells in close proximity to the infected cells of the vasculature (Himber et al., 2003).

When the five recombinant constructs in the P0- background were inoculated to Arabidopsis plants, a similar vein clearing phenotype developed, although milder and with a delay of 3 to 4 days compared to the TuWT background constructs. This difference is

probably due to a lower level of accumulation of the P0- mutants in the infected plants as was originally shown by Ziegler-Graff (1996). This effect was even more attenuated in the case of the (P0-)M2s42 mutant, that showed a hardly visible phenotype (Figure 3, panels q and s). The infection rate and the silencing efficiency of the different VIGS constructs were compared on young and mature plants (about 5 and 8 weeks respectively). All recombinant viruses were highly infectious with an infectivity ranging between 78 and 100%. Globally, younger plants were more susceptible to infection and displayed a more intense phenotype than older plants (see Suppl. Data Table S1).

We then analyzed the durability of the vein yellowing phenotype induced by the TuYVrecombinant viruses by performing a time course experiment on plants infected with two of the TuYV vectors, namely M1hp and M1s81. The silencing phenotype on M1hpinfected plants developed slightly faster (one day earlier, data not shown) compared to M1s81-infected plants and continued to appear on new developing leaves till around 18 to 20 days pi (Figure 4A). Then, the silencing phenotype on M1hp-infected plants became less visible on the newly formed leaves while the established vein chlorosis in older leaves evolved into yellows spots along the vasculature (Figure 4A, see white arrows from 18 to 28 dpi). On the other hand, M1s81-infected plants produced distinct vein chlorosis in new leaves for a longer period and the phenotype remained stable up to 28 dpi (Figure 4B). After that, the phenotype became milder with a more subtle vein clearing and some chlorotic spots appearing along the veins (Figure 4B, 42 dpi). Thus, plants infected with M1hp displayed some heterogeneity in the maintenance of the induced phenotype while those infected with M1s81 exhibited a more stable and long lasting silencing response of the endogenous CHLI1 mRNA. This observation suggested an instability of the hairpincontaining virus over time.

#### Molecular analysis of the infected plants

In order to examine at the molecular level the fate of the targeted *CHL11* mRNA in plants infected with the different TuYV recombinants, total RNA was extracted 19 days pi from systemically infected leaves from two to five pools of two plants each and analysed by reverse transcription followed by real-time RT-PCR. When *CHL11* values of TuWT were normalised to the mock samples, it appeared that viral infection did not alter significantly

CHLI1 expression (data not shown). Therefore in order to treat all samples in the same way (both viral and CHLII RNA) we choose to normalise the data with the values obtained with a mixture of cDNA from 6 independent RNA samples extracted from TuYV-infected plants. Viral RNA accumulation of the various TuYV-CHLI1 recombinants in the WT background showed a high variability that seemed slightly lower than that of TuWT. The variations seemed not related to the position of the inserts (compare the virus accumulation of TuWT, TuM1 and TuM2 (Figure 5, lanes 4 and 5) with the corresponding mutants with insert (Figure 5, lanes 6 to 11). Similarly, no strict correlation could be drawn between the size of the insert and viral RNA accumulation, TuM2hp accumulating at a higher level than both TuM2s42 and TuM2as42, and even higher than TuM2 without insert (compare lane 8 with lanes 10 and 11 and even lane 5). However a good correlation was observed between the accumulation of the recombinant TuYV-CHL11 viruses and the level of the CHLI1 transcript. The accumulation of viral RNA influenced directly the silencing effect on the CHLI1 mRNA. This effect was independent of the type of insert (hairpin or sense fragment insertion). For comparison the level of CHL11 mRNA present in transgenic SUC2::SUL plants, which CHLI1 gene is constitutively silenced in companion cells (ref), was measured. Its reduction compared to mock-treated plants is about 4.5 fold, whereas the mean ratio measured in the recombinant TuYV-CHLI1-infected plants was about 2.4 fold lower. This experiment shows that the recombinant TuYV-CHLI1 viruses triggered efficiently silencing of the CHLI1 gene.

When VIGS was performed with TuYV deficient in the RSS (TuP0), silencing was also functional (Figure 5, compare lanes 12 and the following lanes 13 to 16) although much less efficient than with TuWT-derived recombinants (compare lanes 6 to 11 and lanes 13 to 16). The silencing efficiency of the P0-deficient recombinant viruses was about half of that obtained with the wild-type recombinant viruses. This effect was directly linked to the capacity of the P0-deficient viruses to multiply, as P0 has a stimulatory effect on viral multiplication (Ziegler-Graff et al.1996; Pfeffer et al., 2002). By qPCR TuP0 was measured to accumulate 8 to 9 times less than the TuWT, which is close to the estimation obtained by ELISA of five to seven-fold (Ziegler-Graff et al., 1996).

Viruses with an RNA genome are typically subject to a relatively high rate of mutation during replication (Domingo and Holland, 1997). Furthermore, this instability is often increased in the case of foreign sequences introduced into the viral genome (ref?), as such insertions may reduce the general fitness of the virus and lead to selection for rearrangements and deletions after several replication cycles (ref). To investigate possible rearrangements of the viral genome, RNA extracted from systemically infected leaves 18 days pi were subjected to RT-PCR to obtain cDNA fragments covering the inserted sequence. All the amplified fragments obtained from plants infected with the sense or antisense construct (M1s81, M2s81, M2s42 and M2as42) were of the expected size (Figure 6A, lanes 6, 7, 9 and 10) and the sequences obtained showed few if any modifications compared to the original inserted sequence (Figure 6B). Conversely analysis of RNA originating from plants infected with the hairpin constructs (M1hp and M2hp) generated several PCR fragments shorter than the reference DNA fragment (Figure 6A lanes 12-13) suggesting high levels of sequence rearrangement within the viral progeny. Sequence analysis of each of these individual PCR fragments revealed deletions in all sequenced fragments, ranging from 58 to 89 nts (of a total length of 108 nts). Surprisingly, although the inserted hairpin like structure was identical in both recombinant viruses, the viral progeny displayed a greater heterogeneity in M1hp-infected plants compared to M2hpinfected plants (Figure 6A lanes 12-13). Deletions that occurred in the M1hp progeny were almost perfectly symmetric starting from the loop. This effect could be explained by errors produced by the viral RNA polymerase. If during the replication the replicase encounters difficulties in denaturing the stem of the hairpin, it might "jump" from one side to the other at the basis of the hairpin.

Similar results were obtained with the progeny extracted from other plants infected with the hairpin recombinant viruses (data not shown). The sequence of the offspring of P0-deficient recombinants were also analysed and gave similar results to those obtained with the TuWT mutants, i.e. both sense and antisense recombinant viruses remained stable while the (P0-)M1hp mutant underwent large deletions (Figure S2).

#### Use of aphid transmission to assay stability of the engineered VIGS vectors

Aphid transmission requires encapsidated genomes of poleroviruses. Therefore aphid transmission can be considered as a filter/bottleneck for the selection of stable encapsidated viruses in a mixed offspring population. Comparing the silencing potential of the TuYV-*CHL11* recombinant viruses after aphid transmission should provide selection for the most stable VIGS vector.

Arabidopsis plants infected with either M1s81, M1hp (the constructs containing the longest inserts) or TuWT were used as source plants for virus acquisition by aphids. Aphids were then transferred to healthy arabidopsis plants that were tested by ELISA 3 weeks later. All the plants (xx out of xx inoculated with each recombinant mutant) became infected and displayed virus titers similar to those inoculated with the wild type virus (TuWT) (not shown). M1s81 produced on developing leaves of all aphid-inoculated plants a faint but clearly visible vein chlorosis phenotype, indicating that the encapsidated recombinant progeny picked up by the aphids in the virus source plants retained the ability to silence the endogenous *CHL11* gene (Figure 7A). Conversely the viral offspring that was efficiently transmitted by aphids from M1hp-infected plants produced very mild symptoms compared to those induced by M1s81 construct (Figure 7A) which were only recorded in some plants (4/10 infected plants displayed symptoms independently of the source plant). This observation suggests that only part of the M1s81 progeny was aphid-transmitted.

The fate of the insert present in the recombinant viruses delivered by the aphid was followed by RT-PCR and sequencing as described before for the viral progeny analysis of agro-infected plants. For all plants tested, M1s81 progeny showed only one single PCR band corresponding to the expected size (Figure 7B, left pannel) and no nucleotide changes were detected after sequencing except the one nt deletion already found in the agroinfected plants. No additional rearrangement was observed in the aphid-inoculated plants, suggesting that the sense M1s81 mutant is remarkably stable. The viral progeny in the test plants aphid-inoculated with M1hp mutant was more heterogeneous as can be observed by the different DNA fragments generated after RT-PCR (Figure 7B, left pannel). Once again, this result suggested appearance of DNA rearrangements in the viral progeny that was later confirmed by sequencing the different DNA fragments covering the insertion. All the PCR fragments deriving from aphid-transmitted M1hp mutant exhibited deletions in the inserted *CHL11* fragment (Figure 7B). Remarkably, one main deletion, previously identified in the M1hp-agroinoculated plants and spanning 58 nts, was reproducibly found in several M1hp aphid-infected plants.

#### Silencing of RTM1 by TuYV promotes LMV long distance movement

In order to validate functionally the silencing provided by recombinant TuYV, we investigated the capacity of TuYV to silence a gene essential in the resistance to systemic

movement of another virus, the potyvirus Lettuce mosaic virus (LMV). The RTM1 gene (Restricted-Tobacco etch virus Movement; At1g05760) is a dominant resistant gene against several potyviruses including Lettuce mosaic virus (LMV) (Mahajan et al., 1998; Revers et al., 2003; Decroocq et al., 2006) expressed in companion cells (Chisholm et al., 2001). RTM resistance is governed by at least five different genes (Cosson et al., 2012). If efficient, VIGS of RTM1 should alleviate the resistance and allow LMV to spread systemically to non-inoculated leaves of plants carrying a resistant RTM1 allele. The wildtype isolate LMV-AF199 (called here LMV) was shown to be restricted to inoculated leaves in Col-0 accession, while C24 accession was fully susceptible (Revers et al., 2003; Decroocq et al., 2006). To perform the VIGS experiment a 80 bp sequence from RTM1 gene was inserted into the former TuM2 at the MluI site to generate the recombinant Tu-RTM1. Tu-RTM1 was agroinoculated to Col0 plants two weeks before LMV was rubinoculated. TuYV infections were tested by ELISA three weeks later to discard the plants that escaped Tu-RTM1 infection before collecting the samples at 24 (T1) and 39 (T2) dpi relative to LMV inoculation. Tu-RTM1 was fully infectious as 90% of the inoculated plants were infected and showed viral titers similar to the TuWT-infected plants (measured by ELISA, data not shown). No symptoms were observed during the whole experiment. RNA were then extracted from individual plants and further treated for quantification by real-time PCR. qPCR values were normalised against the mean value of sample of a plant infected with both TuWT and LMV-VAR1 present on all plates. LMV-VAR1 is a point mutant variant of LMV-AF199 able to overcome the RTM resistance. Figure 8A shows the average of the values obtained from individual plants. This sample treatment explains the high variability in the measures obtained for both viruses. Accumulation of Tu-RTM1 was reduced of about three fold compared to TuWT (Figure 8A, compare lanes 3 and 4). Importantly the level of RTM1 transcripts decreased significantly about seven fold in Tu-RTM1 plants compared to mock-inoculated or TuWT infected plants, showing that silencing against RTM1 transcripts was particularly efficient (Figure 8A). From eight doubled-inoculated plants with Tu-RTM1 and LMV, all of them being infected by Tu-RTM1, only four proved to be infected with LMV, although at an extremely low titer (Figure 8A, lane 5). When the same plants were analysed 15 days later, accumulation of LMV RNA increased to higher levels, confirming that the four plants were really infected at the earlier time point (Figure 8B). Sequencing of the PCR fragment amplified from the viral progeny present in those plants showed that the LMV did not mutate to the variant isolate (data not shown). Compared to the viral titer observed in the sensitive C24

accession, LMV-VAR1 accumulated less in Col0 plants (Figure 8A, compare lanes 6 and 8). An intermediate situation was found when LMV-VAR1 was inoculated to Col0 plants infiltrated with control agrobacteria (Suppl. Data). Silencing of *RTM1* transcripts was the most efficient at 54 dpi, *RTM1* mRNA level being higher at 59 dpi (relative to Tu-RTM1 inoculation). However once the LMV started to multiply, the mild increase of *RTM1* transcripts had no major effect on the restriction of the virus.

In conclusion, this experiment showed that a gene specifically expressed in companion cells (Chisholm et al.2001) can be efficiently silenced by a recombinant TuYV. Such RNA silencing of *RTM1* by Tu-RTM1 in Col0 arabidopsis allowed LMV to develop a systemic infection.

#### **Discussion (in progress)**

In this work we have developed a new viral tool to perform VIGS specifically in the vascular tissue. The virus triggering silencing is derived from a polerovirus TuYV. The absence of any symptom developed upon infection in arabidopsis is a non negligeable advantage for VIGS assays. As a target gene we used the CHLI1 gene whose extinction develops visible yellowing phenotype due to the perturbation of chlorophyll synthesis.

In order to determine the most efficient vector to silence the target gene, we produced several clones of TuYV containing sequences of different lengths and of different types, sense, antisense and hairpin. Six constructs were tested and all were able to infect and develop vein yellowing on the challenged Arabidopsis plants. Neither the site of insertion, either right after the stop codon of ORF5 (M1) or further downstream in the 3' UTR (M2), or the type of sequence (hairpin or sense construct) did influence the silencing phenotype (compare Figure 3, lanes e-h) when the silencing sequence was of about 80 nt long. However when a shorter sequence (42 nt) was introduced at the M2 site, the sense of orientation seemed more important, the antisense construct M2as42 being more efficient to promote silencing than the sense construct M2s42. These observations were recorded at early time points but when molecular data were performed later (19 dpi), these differences were no longer measured by q-PCR.



Figure 1 : Analysis of TuYV-infected *Flag-AGO1/ago1-36* plants.

Control Col0 plants were agro-inoculated with (a) wild-type TuYV (TuWT). *Flag-AGO1/ago1-36* plants were agro-inoculated with (b) wild-type TuYV (TuWT) or (c) P0 knock-out mutant (TuP0-), or were (d) mock-inoculated.

- A. Northern analysis of total viRNA extracted from infected plants (T) or viRNA bound to Flag-AGO1 extracted after immunoprecipitation with Flag antibodies (IP). Hybridization was performed using a 3' TuYV probe.
- B. Protein input and immunoprecipitated (IP) Flag-AGO1 proteins analysed by Western-blot using Flag antibodies (upper part). Flag-AGO1 proteins were not directly detectable in a total protein extract.

Infection of plants was tested using antibodies specific to the TuYV minor capsid protein RT (RT<sup>Tu</sup>) (lower part).



Figure 2 : Description of the TuYV recombinant viruses used as VIGS vectors.

- A) Schematic representation of the TuYV genome. The two *Mlu*I restriction sites (M1 and M2) introduced into the 3' end of the TuTV genome are indicated. The mutated nucleotides are shown in bold. The arrows represent the oligonucleotides used for the RT-PCR shown in Fig.5 and 6 and their respective start position on the viral genome.
- B) Description of the *CHL11* fragments inserted into the TuYV genome to produce the recombinant viruses. Hp (hairpin), s81 (sense), s42 (sense) or as42(antisense) indicate the type of insert and orientation introduced into the corresponding *MluI* site.
- C) Summary of the viral clones produced. Only the combinations indicated by an "+" were obtained and analysed. M1 and M2 refers to the insertion site used to introduce the different CHLI1 fragments.

"-" refers to the mutants containing the *Mlu*I restriction site without any additional sequence. TuWT and TuP0- are the viral back-bones in which the different inserts were inserted. np: clone not constructed.



**Figure 3 :** Phenotypic analysis of Col0 arabidopsis plants agro-infected with the TuYV recombinant viruses either in wild-type (pannels c-l) or P0 deficient mutant back-ground (P0-) (pannels m-s). The names of the different recombinant viruses are mentioned on each picture. Symptoms were recorded 18 days after infection (c-t). (a) mock-inoculated plant, (b) transgenic non-infected *sucSUL* plant (Himber et al., 2003). Closer views are shown for phenotypic comparison between related mutants.





**Figure 4 :** Time course of evolution of the vein yellowing phenotype on M1hp (A) and M1s81 (B) infected plants over a 42 days period. The same plants were monitored at 11, 14, 18, 21 or 28 days pi (dpi). The last picture shows a closer view of the same plants at 42 days pi.

The white arrows show the evolution of the same leaves upon time. In the case of M1hp, leaves appearing early develop bright yellow vein labeling, while those appearing later (after 18 dpi) show only sparse vein yellowing. Conversely the phenotype development on M1s81 plant lasts for more than 4 weeks. In both types of infected plants, the mature leaves (source) present before infection never became labeled and infected (red arrows).



**Figure 5.** Silencing of the *CHL11* transcript by a collection of recombinant TuYV viruses in the wild-type (Tu) and the P0 deficient back-ground (TuP0-). The number of plants analysed is indicated in brackets.



Figure 6. Sequence analysis of recombinant TuYV offspring.

- Analysis on a 6% polyacrylamide gel of the PCR fragments obtained after reverse transcription performed on RNA extracted from plants agro-infected with TuWT (2) or the different mutants M1 (3), M2 (4), M1s81 (6), M2s81 (7), M2s42 (9) or M2as42 (10), M1hp (12) and M2hp (13). PCR size controls were produced from the corresponding plasmid DNA (lanes 1, 5, 8 and 11).
- B) Sequence analysis of the PCR fragments. For each virus (name on the left) are indicated in the first lane in bold the reference sequences where modified nucleotides are in capital letters and the inserted *CHL11* deriving sequence in italics. The sequence in lower case corresponds to the viral original sequence. The created *Mlu*I sites are underlined and the nucleotide mutations giving rise to the site are in capital letters.

The sequences obtained for the offspring of each recombinant virus are below the reference sequences. For TuWT, M1 and M2, only the wild-type reference sequence is given above the progenies. in grey: mismatches with the reference; dash: deletion. The black dots at the right of the two last M1hp sequences represent particular sequences that have been found repeatedly in the M1hp progeny after aphid transmission (see Fig.7B).

PCR products larger than the expected size were not sequenced because they also appear on the control PCR.

A	M1s81
В	VT etgaceetteeeggteesgatgsaceegteesaateateateategtesageesgggaetttaaaetggaaegaateegttttaeggataggeaaegagtgttttaegetgggagsaat CTOACEETTEEEGGTEEAGATGAAEEGGTEEAAATEATEATEGTEAAGEEAGGAETTAAAETGGAAEGAATEGTTTTAEGGAEGG
M1	381 etgscgcgccaasttcctgttaftgcgactaasattaataggstgatcttcctttgggtgcaacagagatagasttgfggaaccatcacgcgttscss
100	CTGACGCGCCA-GTECCTGETACTGCGACTAAGATTAATATGGTEGATCTTCCTTTGGGFGCAACAGAAGATAGAGTTGTGGAACCATCACGCGTTACAA
122	CTGACGCGCCA-GTTCCTGTTACTGCGACTAAGATTAATATGGTTGATCTTCCTTTGGGTGCAACAGAAGATAGAGTTTGTGGAACCATCACGCGTTACAA
- 12	CTGACGCGCCA-GTTCCTGTTATTGCGACTAAGATTJATATGGTTGATCTTCCTTTSGGTGCAACAGAAGATAGAGTTTGTGGAACCATCACGCGTTACAA
	CPUACGEGGEA-GTTCCTGTTATTGCGACTAAGATTAATATGGTTGATCTTCCTTTGGGTGCAACAGAAAATAGAGTTTGTGGAACCATCAGGGGTTACAA
	CTGACGCGCCA-GTTCCTGTTATTGCGACTAAGATTAATATGGTTGATCTTCCTTTGGGTGCAACAGAAGATAGAGTTGTGGAACCATCACGCGTTACAA
M1	Ор енgacycycrcuttrcuatastaacccaaasuatticcutsacacttacaaatuucastatcusuattutrastutcacusuaattuccittuusttactatcuaaacuaucusucgeyteaeaa
	CTGACGC-CTCOSTTCGATAGTAACC
	CTGACGC-CTCDTTTCGATAGTAACC
11	CTGACGC-CTCSTTTCGATAGTAACC
	CTGACGC-CTCGTTTGGATAGTAACC
	CTGACGC - CTCGTTTCGATAGTA CC
11	CTORGO-CTOUTTICAT CONCECTIONAL CTORGO-CTOUTTICATAGEARCHAG
1	CTGACGC-CTCSTTTCGATAGTAACCTTTACTATCGAAACGAG

Figure 7 : Analysis of recombinant TuYV progeny after aphid transmission.

A) Phenotypical analysis of a plant infected by M1s81 (left) or M1hp (right) 4 weeks after aphid transmission.

The source plants were agroinoculated either with TuWT, M1s81 or M1hp clones before aphids were fed on them.

B) Sequence analysis of PCR fragments (shown on the left in an upright position) obtained after reverse transcription on RNA extracted from plants infected either with TuWT, M1s81 or M1hp viruses. Five plants were analysed for each mutant, one for TuWT, and the different sequences (one, two or three) obtained after analysis of the extracted fragments are indicated opposite to the respective PCR fragment. For two M1hp-infected plants, two PCR reactions were performed (grouped by a bracket) on either yellow parts (upper fragment), or on green parts (lower fragment) of the leaves. In bold: the reference sequence, in grey: mismatches with the reference; dash: nucleotide deletion.



Figure 6. Silencing of RTM1 by TuM2-RTM1 and test of LMV systemic movement in A. thaliana Col-0.

- A. Individual plants were analysed at 24 dpi relative to LMV inoculation (39 dpi for TuYV (T1). The number of plants analysed is indicated in brackets.
- B. Accumulation of LMV and TuYV transcripts at 24 (T1) and 54 (T2) dpi for LMV and 39 (T1) and 59 (T2) dpi in individual plants.

# Conclusion générale

# Conclusion générale

#### • <u>Etudes transcriptomiques de protoplastes de CC infectés par le LMV ou le</u> <u>TuYV</u>

Les études transcriptomiques analysées par les technologies de RNAseq et de puces CATMA, sur des protoplastes de CC infectés par le LMV ou le TuYV, ont permis d'identifier des variations d'expression de certains gènes causées par les infections virales. Les résultats se sont avérés assez compliqué à analyser du fait d'un problème de reproductibilité entre les répétitions biologiques qui pourrait être dû à la multiplication des techniques utilisées, la durée de l'expérience ou encore à un manque de synchronisation de la réponse de la plante face à l'infection d'une expérience à l'autre. Néanmoins, 103 gènes dérégulés par le LMV (58 par RNAseq et 49 par puces CATMA dont 4 gènes communs) et 57 gènes dérégulés par le TuYV (33 par RNAseq et 26 par puces CATMA dont 2 gènes communs) ont été identifiés au final dans les protoplastes de CC. Le faible nombre de dérégulations est à mettre en parallèle avec le nombre également restreint de gènes exprimés dans les CC (Deeken et al., 2008). Il est également intéressant de noter le peu de gènes communs entre les deux technologies pour une même expérience qui pourrait s'expliquer par le degré de précision et la spécificité de chaque technologie : la « profondeur » du séquençage par RNAseq donne des informations très précises pour des gènes faiblement exprimés et les puces CATMA apportent des résultats très fiables pour des gènes d'expression moyenne. Ainsi, dans notre cas, en élargissant le champ des dérégulations géniques prises en compte, on peut considérer que les deux technologies étaient véritablement complémentaires. Enfin, la plupart des dérégulations que j'ai vérifiées par qPCR ont été confirmées.

Pour remédier au problème de reproductibilité entre répétitions biologiques, il pourrait être intéressant de mener une cinétique d'infection en multipliant le nombre de plantes pour disposer d'assez de matériel végétal à prélever à des temps plus précoces. Ceci permettrait de suivre l'évolution du transcriptome lors de
l'infection en limitant l'effet des facteurs extérieurs (variations des conditions de culture y compris les variations saisonnières). Dans ce cas, il serait préférable de se focaliser sur un seul virus en raison du nombre de plantes à traiter (surtout au cours des temps précoces). Enfin, afin de réduire les variations dues aux facteurs environnementaux, il faudrait regrouper autant que possible dans le temps les répétitions biologiques. A noter que j'ai tenté de suivre la dérégulation par le TuYV de certains gènes identifiés précédemment lors d'une cinétique sur plantes entières, mais l'effet de spécificité d'expression dans les CC s'est retrouvé dilué dans la réponse globale de la plante. Enfin les dérégulations des gènes identifiés encore non validés pourront également être vérifiées par qPCR et étudiées plus en détail.

Cette étude à permis de mettre en évidence plusieurs gènes, dérégulés dans les CC suite à l'infection par le LMV, participant à des processus biologiques communs comme l'assimilation du soufre et la réponse aux stress, et plus précisément le mécanisme de résistance systémique acquise. J'ai identifié sept gènes impliqués dans le métabolisme du soufre et réprimés dans nos analyses: les gènes APR1, APR2, APS1 qui codent pour des enzymes participant à l'assimilation du sulfate et les gènes LSU2, LSU3, LSU4, SDI1 qui sont exprimés lors de carences en soufre. Pour faciliter sa propagation dans la plante, le LMV tendrait à limiter l'expression de ces gènes pour restreindre la synthèse de métabolites secondaires soufrés impliqués dans la défense de la plante comme les glucosinolates ou la camaléxine. Les expériences d'infection par le LMV, de mutants d'*A. thaliana* touchés dans cette voie devraient être reproduits en privilégiant des plantes présentant des mutations dans plusieurs gènes d'une même famille afin de limiter le problème de redondance fonctionnelle. La mesure d'activité de certaines enzymes participant à l'assimilation du sulfate et le dosage de composés soufrés impliqués, devraient être renouvelés dans des plantes infectées par le LMV, en élargissant l'éventail des enzymes testées aux différents membres de la même famille, lorsque cela est possible (Koprivova et al., 2008).

J'ai également observé que l'infection par le LMV induit l'expression de neuf gènes impliqués dans le mécanisme de SAR dépendant de l'acide salicylique : les gènes *PR1, PR2, PR5, AT3G22600, AHP2, AT5G55450, PNP-A, PCC1* et *AT5G10760.* Il serait intéressant d'étudier l'accumulation du LMV dans des *A. thaliana* mutés dans

des gènes impliqués en amont de la cascade dans cette voie de défense, comme les gènes *NPR*, *TGA*. Un dosage de l'acide salicylique ou d'autres composés intervenant dans la SAR dans des plantes infectées pourrait également conforter l'hypothèse que ce mécanisme est bien mis en place par la plante suite à une infection par le LMV.

L'infection par le TuYV induit l'expression de neuf gènes impliqués dans le métabolisme des glucosinolates : sept gènes participant à leur synthèse : *CYP79F1, GSTU20, AOP2, BCAT4, CYP79B2, IMS2* et *MAM1* et deux gènes participant à leur dégradation : *TGG1* et *TGG2.* La plante pourrait répondre à une infection par le TuYV en synthétisant des GS pour se défendre. Des résultats préliminaires ont montré l'accumulation d'un certain nombre de GS dans des plantes infectées par le TuYV. Ces résultats nécessitent confirmation. Des expériences d'infection d'*A. thaliana* mutants *cyp79f1, cyp79b2, bcat4, aop2, tgg1* et *tgg2* et double mutants tgg1/tgg2, bcat3/bcat4 n'ont montré pour l'instant aucune différence d'accumulation de virus dans les feuilles sytémiques. D'autres *A. thaliana* mutants seront prochainement testés : un autre mutant *cyp79f1* ainsi que *cyp79f2* et le double mutant *cyp79f1/cyp79f2*.

Il est intéressant de noter que Westwood et al., (2013) ont constaté une augmentation importante du GS 4MI3M dans des plantes infectées par l'isolat Fny du CMV. Ce métabolite a un effet répulsif sur les pucerons et les dissuade de coloniser les plantes. L'hypothèse émise par les auteurs suggère que cet effet serait induit après une infection prolongée par le CMV, de manière à inciter les pucerons à quitter la plante infectée et à coloniser de nouvelles plantes hôtes. L'augmentation en 4MI3M a également été observée dans les plantes transgéniques exprimant la protéine 2b, le suppresseur de RNA silencing du CMV. Ainsi, bien que de fines régulations engendrées par d'autres gènes viraux semblent compliquer le contrôle du métabolisme de la plante, cette double approche à la fois transcriptomique et métabolomique, pourrait être également réalisée dans le cas du TuYV. Le gène candidat le plus intéressant pourrait être le suppresseur de RNA silencing la protéine P0. Des lignées de plantes exprimant la protéine sous contrôle d'un promoteur inductible ont déjà été produites (Bortolamiol et al., 2007).

# • Etude de l'interaction de la protéine CYPK7 avec la protéine RT du TuYV dans le mouvement à longue distance du virus

La protéine RT était connue de longue date pour est impliquée dans le mouvement viral à longue distance. Ce n'est que récemment que le Dr. Caren Rodriguez a précisé que l'extrémité C-terminale de la protéine RT du TuYV joue un rôle essentiel dans le processus. Un crible de banque d'ADNc spécifiques des CC a permis de révéler une interaction entre ce domaine C-terminal et la protéine CIPK7 en système double hybride de levure. Par microscopie confocale, la protéine CIPK7 a été localisée dans les plasmodesmes des cellules infiltrées. Lorsque la protéine CIPK7 et la protéine RT sont co-exprimées dans des *N. benthamiana*, la protéine CIPK7 est relocalisée partiellement au niveau du réseau de microtubules. Aucun changement dans l'accumulation de virus n'est observé dans des A. thaliana mutants knock out cipk7, ce qui peut être dû au grand nombre de gènes CIPK chez A. thaliana, dont certains pourraient se substituer au gène CIPK7. Dans des N. benthamiana surexprimant localement le gène *CIPK7*, une augmentation modérée du titre viral est observé dans les feuilles infiltrées. Au vu de sa localisation au niveau des plasmodesmes et de sa relocalisation au niveau du réseau de microtubules par la protéine RT, la protéine CIPK7 pourrait interférer avec le transport viral intercellulaire du virus. Il serait intéressant de poursuivre ce projet en testant la capacité de la protéine RT à être phosphorylée par la protéine CIPK7 et en étudiant les effets possibles de cette phosphorylation sur le comportement de celle-ci, notamment dans le mouvement à longue distance du TuYV.

#### • Etude des gènes RTM dans le mouvement systémique du TuYV et du LMV

Les gènes *RTM* sont des facteurs de la plante qui lui permettent de restreindre le mouvement à longue distance de certains *Potyvirus*. En analysant le titre en virus de plusieurs mutants affectés dans les gènes *RTM1* et *RTM2*, j'ai montré que ces gènes ne jouent aucun rôle dans le mouvement systémique des *Polerovirus* TuYV et du CABYV.

Un virus TuYV recombinant a été construit afin de servir de vecteur pour la méthode de VIGS. L'avantage de ce vecteur est qu'il permet l'extinction d'un gène cible spécifiquement dans les cellules du phloème. Ce vecteur a été utilisé pour

éteindre le gène *RTM1*, responsable de la restriction du mouvement à longue distance du LMV sauvage (AF199). L'extinction du gène n'est pas totale car on détecte encore une faible expression de celui-ci par qPCR. Néanmoins, cette diminution d'expression a permis au LMV d'établir une infection systémique: le LMV AF199 est bien présent au niveau des feuilles non-inoculées, ce qui atteste de la fonctionalité du vecteur Tu-RTM1 dans l'extinction de ce gène. L'utilité d'un tel vecteur TuYV dans une problématique de VIGS peut s'avérer précieuse lorsque l'on souhaite étudier localement au niveau du phloème, l'effet d'une « non-expression » d'un gène ou encore lorsque l'extinction d'un gène entraîne des modifications physiologiques sévères.

# Matériel et méthodes

### Matériel et méthodes

#### 1. Matériel

#### I. Milieux de culture

#### 1. Milieu LB (Lysogeny broth)

Milieu de culture pour *Agrobacterium tumefaciens*. (1% bactotryptone, 0,5% d'extrait de levure, 0,5% NaCl, pH 7,4).

#### **II. Bactéries**

#### 1. Agrobacterium tumefaciens

Nous utilisons la souche GV3101 pour les agro-infections dans *A. thaliana.* Les agrobactéries contiennent un chromosome portant notamment un gène de résistance à la rifampicine (pour la sélection), un plasmide Ti désarmé et le plasmide binaire (pBIN61) (Voinnet et al., 2000). Le plasmide Ti comprend les gènes de virulence *vir* dont les produits sont responsables de l'intégration en *trans* du T-DNA porté par le plasmide binaire dans le génome de la cellule-hôte. Le plasmide, pBIN61 (12,9 kb) est un dérivé du pBIN19. Son T-DNA comporte une cassette de clonage dont le promoteur et le terminateur proviennent de l'ARN 35S du CaMV. Le plasmide pBIN61 porte également deux gènes de résistance à la kanamycine, l'un dans le T-DNA et qui sera donc transféré dans le génome des plantes transformées, l'autre à l'extérieur du T-DNA, ce qui permettra de sélectionner les agrobactéries. Les plasmides pBIN utilisés dans nos études comportent soit le cDNA correspondant au génome complet du TuYV, et est donc appelé pBINTuYV, soit une cassette de clonage vide, et est donc appelé pBINvide ou pBINØ. Ce dernier sert de contrôle pour nos expériences.

#### **III. Virus**

#### 1. Turnip yellows virus (TuYV)

On utilise la souche FL1, isolée à partir de plants de laitues (Veidt et al., 1988). Le TuYV était appelé auparavant *Beet western yellows virus* (BWYV).

#### 2. Cucurbit aphid-borne yellow virus (CABYV)

On utilise le clone isolé à Nérac en 1989 par (Lecoq et al., 1992) à partir d'un plant de melon infecté, séquencé par (Guilley et al., 1994).

#### 3. Lettuce mosaic virus (LMV)

On utilise la souche AF199 (Krause-Sakate et al., 2002) capable d'infecter de manière systémique la plupart des écotypes d'*A. thaliana* sauf Columbia et un de ses variants, la souche AFVAR1, qui lui, se multiplie et se propage dans l'écotype (Decroocq et al., 2009).

#### **IV. Plantes**

#### 1. Lactuca sativa

On utilise la variété Trocadero pour la multiplication du LMV.

#### 2. Arabidopsis thaliana

D'une manière générale, l'écotype sauvage utilisé est Columbia (Col0). Des *A. thaliana* C24 transgéniques exprimant le gène de la GFP sous le contrôle d'un promoteur spécifique des cellules compagnes, le promoteur SUC2 (Imlau et al., 1999), ont été utilisés pour les études transcriptomiques.

	Mutant	Locus	Mutation	Références
Gènes <i>RTM</i>	rtm1	AT1G05760	EMS	(Mahajan et al., 1998)
	rtm2	AT5G04890	EMS	(Mahajan et al., 1998)
	rtm1-2	AT1G05760/AT5G04890	EMS	(Chisholm et al., 2000)
	KO rtm2 (Salk)	AT5G04890	T-DNA	(Decroocq et al., 2006)
	KO rtm3 (Salk_017845)	AT3G58350	T-DNA	(Cosson et al., 2010)
	KO rtm3 (GK-801D05)	AT3G58350	T-DNA	(Cosson et al., 2010)
	tgg1	AT5G26000	T-DNA	(Islam et al., 2009)
	tgg2	AT5G25980	T-DNA	(Islam et al., 2009)
	tgg1/tgg2	AT5G26000/AT5G25980	T-DNA	(Islam et al., 2009)
	bcat4 (Salk_020775C)	AT3G19710	T-DNA	
	bcat3/bcat	AT3G49680	T-DNA	
Candidate	(GK-03C02-030268)	AT3G19710		
	cyp79f1	AT1G16410	T-DNA	(Tantikanjana et al., 2004)
Tarv	cyp79f2	AT1G16400	T-DNA	(Tantikanjana et al., 2004)
	cyp79f1/cyp79f2	AT1G16410/AT1G16400	T-DNA	(Tantikanjana et al., 2004)
	cyp79b2 (Salk_130570C)	AT4G39950	T-DNA	
	aop2 (Salk_021561C)	AT4G03060	T-DNA	(Neal et al., 2010)
	hsfa2 (Salk_008978C)	AT2G26150	T-DNA	
	bag6 (Salk_047959C)	AT2G46240	T-DNA	
Candidats LMV	lsu2 (Salk_031648)	AT5G24660	T-DNA	
	sdi1 (Salk_145035)	AT5G48850	T-DNA	(Howarth et al., 2009)
	apr1/2	AT4G04610/AT1G62180	T-DNA	(Lee et al., 2011)
	pr5 (Salk_055063)	AT1G75040	T-DNA	
	AT5G10760 (Salk_111104)	AT5G10760	T-DNA	

De nombreux *A. thaliana* mutants ont été testés en infection par le LMV, le TuYV ou le CABYV. Leurs caractéristiquent sont résumés dans le tableau ci-dessous :

## 2. Méthodes

## I. Inoculations virales et analyse de l'infection

#### 1. Agro-infection pour le TuYV

Les agrobactéries portant le plasmide d'intérêt sont mises en culture, 48 heures environ, à 28°C, sous agitation, dans 5 ml de milieu LB contenant comme antibiotiques la rifampicine et la kanamycine à 100  $\mu$ g/ml. 500  $\mu$ l de cette préculture

servent à ensemencer 5 ml de milieu LB contenant les mêmes antibiotiques et l'acétosyringone à 40  $\mu$ M. Après une nuit de culture, à 28°C, sous agitations, les bactéries sont centrifugées à 6000 rpm pendant 15 minutes. Le culot est repris dans du milieu d'infiltration (MgCl<sub>2</sub> 10 mM, MES pH 5,6 10  $\mu$ M, acétosyringone 40  $\mu$ M) et la concentration bactérienne est ajustée à une DO de 0,5.

#### 2. Inoculation mécanique pour le LMV

200 mg de feuilles infectées par le LMV (laitues ou *A. thaliana*) sont broyées dans 1ml de tampon de broyage (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 35 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 15 mM) avec du carborandum. Le broyat est alors frotté délicatement sur de nouvelles feuilles.

#### 3. Détection virale par immuno-empreintes de pétioles

Pour vérifier la présence de virus dans les feuilles et donc l'infection, des feuilles sont prélevées en coupant le pétiole transversalement. Celui-ci est appliqué sur une membrane de nitrocellulose Whatman (Roth). Une fois toute les empreintes effectuées, la membrane est alors saturée, une heure, dans un tampon PBS-T (PBS 1x, Tween 0,5%) contenant 2,5% de lait. On ajoute ensuite l'anticorps primaire, à 4°C, toute la nuit. Pour détecter le LMV, j'ai utilisé un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine CP du virus (dilution  $1/1000^{\circ}$ )et pour le TuYV, un anticorps polyclonal dirigé contre la protéine RT ( $1/1000^{\circ}$ ). Après 3 lavages de 15 minutes avec du tampon PBS-Tween, l'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline est alors ajouté, pendant 2 heures, à température ambiante. La membrane est de nouveau lavée 3 fois 15 minutes avec du tampon PBS-Tween puis incubée 10 minutes dans du diéthanolamine (DEA 1x) 100mM pH 9,6, avant de mettre la solution de révélation contenant le substrat de la phosphatase alcaline (DEA 1x, NBT 100  $\mu$ g/ml, BCIP 50  $\mu$ g/ml, MgCl<sub>2</sub> 1mM). La révélation se fait alors au noir, pendant quelques heures.

#### 4. Détection virale par ELISA

La technique suivie est celle du double sandwich (DAS-ELISA, double-antibody enzyme-linked immunosorbent assay) (Clark & Adams, 1977). L'anticorps primaire utilisé pour détecter le TuYV est un anticorps polyclonal dirigé contre le BMYV (Loewe, Allemagne) qui est un virus très proche du TuYV. Cet anticorps dilué au 1/300<sup>e</sup> est déposé dans une plaque ELISA (Nunc) à 96 puits, dans du tampon de « coating » (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1,6 g/l, NaHCO<sub>3</sub> 2,92 g/l pH 9,6), pendant 4 heures, à 37°C. Pendant ce temps, les protéines sont extraites des échantillons en broyant 200 mg de feuilles dans 1 ml de tampon de broyage (PBS 1x, Tween 0,5%, PVP 2%), grâce à des rouleaux. La plaque est ensuite lavée 3 fois avec du tampon PBS-T (PBS 1x, Tween 0,5%) puis les échantillons sont déposés dans les puits et incubés toute la nuit, à 4°C. Après 3 nouveaux lavages au PBS-T, l'anticorps anti-BMYV conjugué à la phosphatase alcaline, dilué au 1/300<sup>e</sup> est ajouté à la plaque dans du tampon de conjugaison (PBS-T, PVP 2%, 0,2 % BSA) et laissé 4h30, à 32°C. Les plaques sont à nouveau lavées 3 dans du PBS-T puis le substrat de la fois phosphatase alcaline (paranitrophénylphosphate) est ajouté à la plaque dans du tampon « substrat » (diéthanolamine 9,7% pH 9,8), soit 1 mg de substrat par ml de tampon. La plaque est ensuite mise à l'obscurité, à 37°C, et les lectures de DO<sub>405nm</sub> sont faites après 30 minutes, 1 heure et 2 heures. Le seuil d'infection est calculé à partir de la moyenne des valeurs obtenues pour des témoins sains, additionnée de 3 fois son écart-type.

#### II. Préparation de protoplastes enrichis en cellules compagnes d'A. thaliana

50 jeunes feuilles d'*A. thaliana* ( après une croissance de 9-10 semaines en condition de lumière : 8 heures/jour et 16 heures/nuit) sont prélevées et nettoyées dans de l'éthanol 100% puis dans de l'eau RNase-free. Ces feuilles sont découpées en fines bandes transversales (0,5 à 1 mm), traversant la veine centrale puis placées dans du tampon de pré-incubation (Mannitol 0,6 M, DTT 1 mM, MES 25 mM pH 5,7), minimum 15 minutes. Les feuilles dilacérées sont ensuite transférées dans la solution enzymatique (Mannitol 0,4 M, KCl 0,1 M, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, MES 25 mM pH 5,7, 2% PVP, 0,5% BSA, 0,5% Cellulase RS Onozuka (Yakult Pharmaceutical, Japon), 0,03% Pectolyase Y23 (Kyowa chemical products) et incubées pendant 4 heures, à 25°C, dans le noir et sous une légère agitation. Après l'incubation, ce mélange est filtré avec un filtre de 50  $\mu$ m et est centrifugé 15 minutes, à 60g, sans frein. A partir de cette étape, les protoplastes sont à manipuler au froid. Le culot est repris très délicatement dans la solution de lavage (NaCl 154 mM, CaCl<sub>2</sub> 125 mM, KCl 5 mM, Glucose 5mM,

Mannitol 0,5 M) puis centrifugé à nouveau à 60g, 15 minutes. Le culot de protoplastes est repris dans 500  $\mu$ l de solution de resuspension (MgCl<sub>2</sub> 15 mM, MES 0,1%, Mannitol 0,4 M) pour être trier par FACS ou pour en extraire les ARN.

#### **III. Techniques histologiques**

#### 1. Préparations des échantillons utilisés en microdissection

- a. <u>Fixation</u>
  - Fixation Ethanol/ Acide acétique (EA)

Les pétioles ou tiges sont coupées transversalement en fragments d'environ 4 mm de long et sont immergées dans 10 ml de tampon de fixation (Éthanol 75%, acide acétique glacial 25%). Les pots contenant les tissus et le fixateur sont placés, ouverts, sous vide, 2 fois 15 minutes. Le fixateur est changé et les pots sont placés à 4°C pour la nuit. A température ambiante, le fixateur est alors remplacé par de l'éthanol 75%, 2 fois 1h30, puis par de l'éthanol 85%, 2 fois 1h30, puis par de l'éthanol 96%, 3 fois 1h. 1% d'éosine est ajouté au dernier bain afin de colorer les échantillons qui sont ensuite conservés à 4°C durant la nuit.

#### • Fixation formaldéhyde/éthanol/acide acétique (FEA)

Les échantillons sont préparés comme précédemment pour le premier jour mais immergés dans un fixateur composé de 50% d'éthanol, 5% d'acide acétique et 3,7% de formaldéhyde. Après la nuit, le fixateur est remplacé, à température ambiante, par de l'éthanol 50%, 2 fois 30 minutes puis par de l'éthanol 70%, 2 fois 30 minutes. Les échantillons sont alors placés à 4°C pour la nuit. Après 3 lavages à l'éthanol 96%, le dernier contenant 1% d'éosine, les échantillons sont conservés la nuit, à 4°C.

#### • Fixation « Methacarn » (Balestrini et al., 2007)

Les échantillons qui viennent d'être coupés sont directement fixés dans du fixateur Methacarn fraichement préparé (Méthanol 60%, chloroforme 40%, acide acétique 10%), à 4°C, toute la nuit. Les tissus sont ensuite déshydratés dans des bains

d'éthanol (50%, 70%, 90%, 100% deux fois) et d'isopropanol (deux fois), d'une heure chacun. L'isopropanol est alors progressivement remplacé par de la paraffine.

#### b. Inclusion

• Inclusion paraffine

A température ambiante, les échantillons fixés sont ensuite lavés 30 min dans de l'éthanol 96% puis 2 fois 1h dans de l'éthanol 100%. Après avoir transvasé les échantillons dans des pots en verre, ils sont ensuite baignés 15 min dans un mélange éthanol/xylène (3:1) puis 15 min dans un mélange (1:1) puis 15 minutes dans un mélange (1:3). Le mélange est alors remplacé par du xylène pur dans lequel les échantillons sont alors baignés 3 fois 20 minutes. Les échantillons sont ensuite incubés 1 à 2 heures dans un mélange xylène/paraffine fondu (Paraplast plus, Mc Cormick Scientific) (1:1) dans une étuve à 60°C puis dans de la paraffine fondue toute la nuit. Les échantillons sont gardés à 60°C dans de la paraffine pendant 2 jours, paraffine qui est changée 2 à 3 fois par jour. La paraffine est alors coulée dans un moule en plastique et les échantillons y sont placés au fond selon l'orientation désirée. Après montage sur un bloc en bois, l'échantillon est coupé au microtome (Leica RM2155) selon l'épaisseur désirée (entre 7 et 20 µm) et les coupes sont disposées sur des lames en verre qui sont mises à sécher à plat dans une étuve à 42°C toute la nuit. Les lames peuvent être conservées à 4°C. Avant observation, elles sont déparaffinées dans du xylène.

#### Inclusion « Steedman wax »

Après fixation, les échantillons sont baignés 2 fois 2 heures dans de l'éthanol 100%, à température ambiante. Après avoir enlevé la moitié de l'éthanol, les échantillons sont ensuite chauffés à 37°C pendant 10 minutes. La cire (90% Polyéthylène glycol 400 distéarate (Aldrich), 10% 1-hexadécanol (SAFC), chauffée à 65°C pour l'homogénéiser) est ajoutée à l'éthanol 100%, volume à volume et les échantillons sont gardés à 38°C toute la nuit. Le mélange éthanol/cire est ensuite remplacé par de la cire pure, 3 fois 2 heures. Les échantillons sont ensuite transférés dans des cassettes en plastique et conservés à -20°C jusqu'à la coupe. La coupe se fait au microtome très rapidement car la cire se ramollit à température ambiante. Les lames sont ensuite conservées à -20°C et débarrassées de leur cire dans un bain d'éthanol absolu avant observation.

#### • Inclusion pour coupe au cryostat

Après fixation dans un fixateur (EA ou FEA) ou par le froid, directement dans de l'azote liquide, les échantillons sont plongés dans un moule contenant du TissueTek OCT medium (Sakura) puis celui-ci est congelé dans de l'azote liquide. Les moules sont conservés à -80°C et placés à -20°C quelques heures avant la coupe au cryostat. Celle-ci se déroule -20°C, pour des coupes d'une épaisseur de 10 µm.

#### 2. Microdissection et capture laser (LCM)

Le système de microdissection laser utilisé est le laser PixCell® IIe (Arcturus). Ce système permet de disséquer un groupe de cellules très restreint en appliquant, grâce à un laser infrarouge, un film plastic thermosensible sur la zone d'intérêt. Une capsule (CapSure® Macro, Arcturus) recouverte de ce film est donc placée au-dessus de l'échantillon. Quand celle-ci est soulevée, les cellules sélectionnées sont alors retenues sur le film sous la capsule. On peut alors en extraire les ARN. Contrairement à la technologie utilisant les UV, le laser infrarouge n'altère ni la chimie des échantillons, ni la morphologie des tissus.

#### 3. Microscopie

#### a. Microscopie à épifluorescence

Les observations se font grâce à un microscope à épifluorescence Nikon E800.

#### b. Microscopie confocale

Les observations ont été effectuées à l'aide d'un microscope confocal à balayage laser Zeiss LSM 510. Un objectif à immersion à eau 63x, d'ouverture numérique 1,2 a été utilisé à la fois pour les images en contraste interférentiel différentiel (DIC) ou pour les observations en épifluorescence et confocale.

#### IV. Analyses moléculaires

#### 1. Extraction et analyses d'ARN

#### a. Extraction au trizol

100 mg de feuilles sont broyés dans de l'azote liquide avec 1 ml de trizol (Tris Reagent, MRC) ajouté en 2 fois. Les échantillons sont ensuite incubés 5 minutes à température ambiante puis centrifugés à 4°C, à 14000 rpm pendant 10 minutes pour éliminer les débris. Après un ajout de chloroforme puis une extraction au phénol/chloroforme, les ARN sont précipités par de l'isopropanol à température ambiante puis le culot est lavé à l'éthanol 70% et repris dans 30 μl d'eau RNase-free.

#### b. Extraction avec un kit RNeasy mini plant (Qiagen)

Les cellules triées par FACS sont directement récupérées dans 500  $\mu$ l de tampon RLT supplémenté de  $\beta$ -mercaptoéthanol 1% et refroidies à la fin du tri dans de la glace carbonique. Ces échantillons sont conservés à -80°C jusqu'au moment de l'extraction. Avant le passage sur colonne Qiashredder qui permet le nettoyage d'échantillons végétaux, le volume de chaque échantillon est ajusté à un volume de tampon RLT- $\beta$ -mercaptoéthanol 1% pour un volume de cellules triées. L'extraction et le traitement DNase (Qiagen) se font selon le protocole du fabricant. Les échantillons sont élués dans 30  $\mu$ l d'eau RNase-free. Leur concentration et leur qualité sont vérifiées au Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

#### c. Extraction avec un kit PicoPure (Arcturus)

Ce kit est utilisé pour l'extraction d'ARN provenant de très petites quantités de matériel donc par exemple, pour les échantillons issus de la microdissection et la capture laser. On ajoute 10 µl de tampon d'extraction sur la capsule portant les échantillons micro-disséqués puis un tube de 0,5 ml renversé par dessus. Ces tubes renversés sont placés dans un bloc d'incubation permettant le maintien des échantillons à 42°C pendant 30 minutes. Les tubes sont ensuite centrifugés à 800g pendant 2 minutes pour récupérer les échantillons contenus dans la capsule. Les tubes sont conservés à -80°C jusqu'au moment de finir l'extraction. La purification

des ARN se fait sur colonne selon les recommandations du fabricant et les échantillons sont élués dans 14 µl d'eau RNase-free. Un traitement DNase (Qiagen) a été effectué sur les échantillons.

d. Analyses des ARN au Bioanalyzer

La qualité des ARN utilisés pour les analyses transcriptomiques a été testée par Bioanalyzer (Agilent), sur des nanopuces ou des picopuces selon la quantité d'ARN estimée par Nanodrop. Les puces sont préparées selon les instructions du fabricant (Agilent RNA 6000 Nano ou Pico Kit).

#### e. <u>Rétrotranscription</u>

Entre 0,2 et 2 µg d'ARN sont utilisés comme matrice pour la retrotranscription. On leur ajoute 0,25 µl d'oligo (dT)<sub>18</sub> primers 50 µM (Thermo Scientific), 0,75 µl d'hexaprimers aléatoires 100 µM (Thermo Scientific) et 1 µl de dNTP. Ce mélange est incubé pendant 5 minutes à 65°C puis 1 minute dans la glace. Ensuite, on utilise le kit Superscript III selon le protocole du fabricant. Sont donc ajoutés au précédent mélange, 4 µl de tampon 5x, 1µl de DTT, 1µl de RNase out et 1 µl de l'enzyme SuperScript III. Après une incubation de 5 minutes, à température ambiante, les échantillons sont incubés une heure, à 50°C puis l'enzyme est désactivée à 70°C, pendant 15 minutes. Les cDNA ainsi obtenus sont alors testés par PCR pour vérifier que la retrotranscription se soit bien déroulée.

#### f. PCR quantitative en temps réel

Les réactions PCR se déroulent sur une plaque de 384 puits, dans un appareil Lightcycler LC480 (Roche). Le volume final de réaction est de 10 µl de SYBR Green Master mix (Roche) contenant 1µl de cDNA, 2 µl d'eau, 2µl d'oligo (2,5 µM) spécifiques du gène d'intérêt et 5 µl d'enzyme mix. Les cycles de PCR sont paramétrés comme suit : 95°C pendant 30s puis 40 cycles à 95°C pendant 5 s, 61°C pendant 5 s et 77°C pendant 5 s. L'analyse de la courbe de fusion est réalisée entre 55°C et 95°C (+0,5°C pour 5 s). L'efficacité d'amplification (E) est fixée à une valeur de 2. 3 répétitions techniques sont effectuées pour chaque réaction. La moyenne des trois valeurs seuil de cycle ( $C_T$ ) est normalisée par celles d'un à trois gènes de référence qui servent alors de contrôle interne. Ces gènes sont choisis spécifiquement car leur expression reste constante lors des différentes conditions testées (Lilly et al., 2011).

		Amorce sens	Amorce antisens
EXP	AT4G26410	gagetgaagtggettecatga	ggtccgacatacccatgatcc
TIP41	AT4G34270	gtgaaaactgttggagagaagcaa	tcaactggataccctttcgca
SAND family	AT2G28390	aactctatgcagcatttgatccact	tgattgcatatctttatcgccatc
EF1α	AT5G60390	caccactggaggttttgagg	tggagtatttgggggtggt
GAPDH	AT1G13440	ttggtgacaacag <gtcaagca< td=""><td>aaacttgtcgctcaatgcaatc</td></gtcaagca<>	aaacttgtcgctcaatgcaatc
FBOX	AT5G15710	tttcggctgagaggttcgagt	gattccaagacgtaaagcaga

Voici les différents gènes de référence utilisés selon leur taux d'expression. :

Les valeurs de  $C_T$  gènes candidats sont soustraites de celles des gènes de référence, permettant d'obtenir une variation de  $C_T$  ou  $\Delta C_T$ . L'expression relative des gènes candidats est calculée avec la méthode de  $\Delta\Delta C_T$ .

Les couples d'oligonucléotides spécifiques à nos gènes d'intérêt ont été conçus grâce à l'outil Design ProbeLibrary tool disponible sur le site internet de Roche Applied Science :

(http://lifescience.roche.com/shop/CategoryDisplay?catalogId=10001&tab=Assay+D esign+Center&identifier=Universal+Probe+Library&langId=-1)

Ces couples d'oligonucléotides sont regroupés dans le tableau ci dessous :

Gène	n° accession	oligo sens	oligo antisens
PR1	AT2G14610	gatgtgccaaagtgaggtgtaa	ttcacataattcccacgagga
PR2	AT1G62180	cctattcgacgcaaatctcgactc	ccgacaccacgatttccaac
PR5	AT1G75040	gtggcggtctaagatgtaacg	gccatcgcctactagagtgaa
AT3G22600	AT3G22600	ggtctgcctagggcttgtaa	tttggtgattctgcaggagag
AHP2	AT1G13330	ggtgcaaaaggcacttgatag	tgcttaccatactctttaaacgtga
AT5G55450	AT5G55450	cgggatagacccatctagagtc	ggcctgacttcagctcagtt
PNP-A	AT2G18660	cggaggtacagggttcgatg	cgataacccgaaaagcgtca
PCC1	AT3G22231	ccaattggttatccgactagaga	gccgcagcagaagatacact
AT5G10760	AT5G10760	gacttttcgacggtgttgct	gttgtttgcgccggtagt
APR1	AT4G04610	ctgtgaagatggcaatgtctg	acctcaacgaaccaatttgc

APR2	AT1G62180	gatggaagcatcgtacatcg	cggaatttcgccactttaac
LSU2	AT5G24660	gctctctcgtctttcttcagactc	gccgataagaggatacatcaaac
LSU3	LSU3 AT3G49570 gcggaagaagtggaggagtt		gccacagctgaaccatctct
LSU4	AT5G24655	cggaggtagaggagctacga	tcctccacaactgcaacatc
APS1	AT3G22890	accccgtcgctatcctcag	ccagcattagttatcgcctcgt
SDI1	AT5G48850	tgtcctcatcgacttatacaagaaa	ctgccttaatttcctcttcaaca
HSP17.4	AT3G46230	gagagtaagccggaggtcaa	gctttccaacttcagagttcct
HSP17.6B-CI	AT2G29500	tggattgaagaaggaggaagtt	ccacgtgtctctctccactg
PAD3	AT3G26830	ggtttctcgacagttccgttg	cccattgtcatccctggacatattc
<i>CYP71A12</i>	AT2G30750	cctcttccactaatacttcccagat	gatggcccaagcattgattatcac
CYP71A13	AT2G30770	attccctctcattgcatttccatc	agtgttgcatagcataacaaggtg
<i>CYP71A18</i>	AT1G11610	ttggcatggatagacaggatcaac	ctatacgctcgactcacttccac
AT1G26380	AT1G26380	atgccatctttaccgtcgat	cctcgtgtttttcgtgtatgac
DIN11	AT3G49620	ccaactgctggatacagagga	ccatgtttcccttgcttga
BAG6	AT2G46240	agaaggagattgttgttaatggaga	cctgaactctcttatactaggatgcaa
PCR2	AT1G14870	gtcgccgagattgtagatcg	gcacaaccagttactacggcta
WRKY75	AT5G13080	cgtcaagaacaacaagttcccta	ctttgcacttgcttcttcacat
CYP79F1	AT1G16410	ctccaaggagacggaatcac	ccggtgctaaacgagacaa
ATGSTU20	AT1G78370	ccttacgggagagctcagg	ttcccccataccttgaattg
AOP2	AT4G03060	cgctgataccggtgttaatga	ttcacagcaacattagaattgaca
BCAT4	AT3G19710	cgcaacctcttcctgtgagt	tccgtacgaacaaacttgaatg
CYP79B2	AT4G39950	cgtgtcgagctgatggagt	ggtcaccgaccataaccaac
IMS2	AT5G23020	ccgtgaacagtgttaagtacgc	cacccgcttttatcgattct
MAM1	AT5G23010	ccagtttgggtgcgaagatg	gtcacgagttccccgtattca
unknown	AT1G64370	aggccaacgcaatggttat	ctctggccatatccctcgt
thioredoxin	AT5G18600	atcgagcaggcgttgttg	tgacctcgttggctccac
TRAF family	AT4G00780	tcgtccttcaaccctgga	tccatataccctcttggatgaac
ATHSFA2	AT2G26150	ccaatggaagggcttaacg	ccggatcttccaccatttc
BAG6	AT2G46240	agaaggagattgttgttaatggaga	cctgaactctcttatactaggatgcaa
AT3G15610	AT3G15610	tggatgcacctcctacagaaa	cactcctcacatcccataacct
AT1G66090	AT1G66090	tcaacgaaacttgtgctcgta	tctcgatcatgtttgcctca
AT5G23035	AT5G23035	aggagggaagaaacgcttagagca	gggcaatgcaccgacgacga
AT1G06830	AT1G06830	tccgaaaaaggggtggttat	acttgaaccgcataggacaaa
TGG1	AT5G26000	tggtcaagactccttccaaaa	ggccatctatgagaccgttg
TGG2	AT5G25980	tgttgcatcttctgcttacca	gctccacctttctctgggta
CCR2	AT2G21660	atgggccactgatgacaga	ccttgatcttccagtctcacg
RTM1	AT1G05760	cgcccaaaaacagttctacc	ttcagcccagtacaatttttga
RTM2	AT5G04890	cgctaattaggaagctgcaag	ggcctcctcctttgctttag
SUC2	AT1G22710	gccattgtcgtccctcag	cgcaatcgctcctaacaca
AKT2	AT4G22200	acctcttcaaaggcgtctca	tggtggtatatactcagccttcatt
PP2-A1	AT4G19840	cgcagatcctccgatctct	gtttctctcgtccacccaata
AHA3	AT5G57350	gcctcgaggatatcgtgaac	gataaaccttctctgctgcatttc
LHCA6	AT1G19150	cgtcctttatggttccctggt	tgagggtgtccggatcaga
BRI1	AT4G39400	aatttctccggtccgattct	ctcctgcagagtgtttttaggg
EIN4	AT3G04580	gacaagaccatcgattaggagatca	tggaatttgaattcggatgttga
T	uYV	aagacaatctcgcggga	ggagacgaactccaaaatgac
LMV		cagctgctcttgtgggaac	tgcctctccgtgttctcttc
GFP		gtcaccaccttctcctacgg	cgtgcctcttcatgtggtc

g. Analyse des ARN par Northern blot

#### • <u>Gel</u>

Environ 2 µl d'ARN à 1 g/l (quantité estimée sur un gel natif d'agarose 1%) sont ajoutés à 18 µl de tampon de charge (Formamide désionisé 50%, Formaldéhyde désionisé 16%, tampon HEPES 1x, Glycérol 2,5%, bromure d'éthidium 1 µg/ml, bleu de bromophénol). Les échantillons sont chauffés 5 minutes à 65°C, refroidis sur de la glace puis déposés sur un gel dénaturant (Agarose 1%, tampon HEPES 1x, Formaldéhyde 16%). La migration a lieu dans du tampon HEPES 1x (20 mM HEPES, 1 mM EDTA, KOH 950 mg/l pH 7,8), à 80 V.

#### • Transfert sur membrane

Les ARN sont ensuite transférés pendant environ 24 heures, par capillarité, sur une membrane Hybond NX (GE-Healthcare) dans du tampon SSC 20x. Après un rinçage de la membrane avec du tampon SSC 4x, les ARN y sont fixés par des ultraviolets (Stratalinker).

#### • Synthèse de sondes ADN aléatoires

La sonde est synthétisée à partir d'un fragment PCR correspondant à une partie de l'ARN d'intérêt, à l'aide d'un kit « Prime-a-gene » (Promega) selon les instructions du fabricant. 31 µl d'eau sont ajoutés à 2 µl d'ADN puis la matrice est dénaturée 2 minutes, à 95°C et refroidie 5 minutes dans la glace. On ajoute ensuite 10 µl de tampon 5x, 2 µl du mélange de dNTP 0,5 mM (dATP, dGTP et dTCP), 2 µl de BSA, 2,5 µl de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP et 0,5 µl de DNA polymérase (Klenow). Après une incubation d'une heure à température ambiante, le mélange est passé sur une colonne Sephadex G50 pour éliminer les dNTP non incorporés. Après une dénaturation de 2 minutes à 95°C, la sonde est prête à être utilisée.

#### • <u>Hybridation</u>

La membrane est pré-hybridée dans un cylindre, dans du tampon d'hybridation (PerfectHyb Plus, SIGMA), environ 1 heure, à 60°C. La sonde est alors ajoutée au tampon d'hybridation et laissée sous agitation toute la nuit, à 55°C. La membrane est ensuite lavée, à 65°C, 2 fois 30 minutes, dans le tampon de lavage 1 (SSC 2x, SDS 0,1%) puis une fois 30 minutes, dans le tampon de lavage 2 (SSC 0,2%, SDS 0,1%). Les membranes sont révélées par autoradiographie.

#### 2. Extraction et analyse de protéines

#### a. <u>Extraction</u>

100 mg de feuilles sont broyés dans 200 μl de tampon de charge Laemmli 2x (Tris-HCl 123 mM pH 6,8, SDS 5%, Glycérol 20%, β-mercaptoéthanol 9,3%, bleu de bromophénol) dans l'azote liquide. L'échantillon est ensuite dénaturé à 95°C, pendant 5 minutes, puis centrifugé à 3000 rpm, 10 minutes pour éliminer les débris.

#### b. Analyse des protéines par Western-blot

#### • <u>Gel de polyacrylamide</u>

Les échantillons extraits sont déposés dans un gel de polyacrylamide dénaturant composé de deux parties : un gel de concentration qui concentre les échantillons sur un même front de migration et un gel de résolution qui permet la séparation des protéines en fonction de leur poids moléculaire. Sa composition en polyacrylamide dépend de la taille des protéines considérées. La migration se fait dans du tampon de migration (Tris-HCl 25 mM, Glycine 0,2 M, SDS 0,1%), à 110 V, pendant 4 heures.

#### • Transfert sur membrane

Les protéines ainsi séparées sont ensuite transférées sur une membrane Hybond-P (Amersham), préalablement trempée dans de l'éthanol 100% puis dans le tampon de transfert ((Tris-HCl 25 mM, Glycine 0,2 M), à 80 V, pendant 2 heures, à 4°C. Après le transfert, la membrane est ensuite saturée pendant une heure dans du tampon PBS 1x, Tween 0,5%, lait 5% et l'anticorps primaire est alors ajouté et laissé toute la nuit, à 4°C. Après 3 lavages de 15 minutes avec du PBS-T, l'anticorps secondaire couplé à la péroxydase est ajouté dans du PBS-T, lait 5% et laissé 2 heures, à température ambiante. La membrane est ensuite lavée 3 fois 15 minutes avec du PBS-T. La révélation des protéines d'intérêt se fait par chimioluminescence grâce à un kit LumiLightPlus Western Blotting (Roche) puis par autoradiographie

# Bibliographie

# Bibliographie

Agudelo-Romero P, Carbonell P, De La Iglesia F, *et al.*, 2008. Changes in the gene expression profile of Arabidopsis thaliana after infection with Tobacco etch virus. *Virol J* **5**, 92.

Agudelo-Romero P., Carbonell P., Perez-Amador M.A., S.F. E, 2008. Virus Adaptation by Manipulation of Host's Gene Expression. *PLoS One* **3(6)**:e2397.

Ala-Poikela M, Goytia E, Haikonen T, Rajamaki ML, Valkonen JP, 2011. Helper component proteinase of the genus Potyvirus is an interaction partner of translation initiation factors eIF(iso)4E and eIF4E and contains a 4E binding motif. *J Virol* **85**, 6784-94.

Alamillo JM, Saenz P, Garcia JA, 2006. Salicylic acidmediated and RNA-silencing defense mechanisms cooperate in the restriction of systemic spread of plum pox virus in tobacco. *Plant J* **48**, 217-27.

Albrecht V, Ritz O, Linder S, Harter K, Kudla J, 2001. The NAF domain defines a novel protein-protein interaction module conserved in Ca2+-regulated kinases. *Embo J* **20**, 1051-63.

Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, *et al.*, 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. *Science* **301**, 653-7.

Amari K, Boutant E, Hofmann C, *et al.*, 2010. A family of plasmodesmal proteins with receptor-like properties for plant viral movement proteins. *PLoS Pathog* **6**, e1001119.

Anders S, Huber W, 2010. Differential expression analysis for sequence count data. *Genome Biol* **11**, R106.

Anders, S., and Huber, W. (2010). Differential expression analysis for sequence count data. Genome Biol *11*, R106.

Andersen K, Johansen IE, 1998. A single conserved amino acid in the coat protein gene of pea seedborne mosaic potyvirus modulates the ability of the virus to move systemically in Chenopodium quinoa. *Virology* **241**, 304-11.

Andrianifahanana M, Lovins K, Dute R, Sikora E, Murphy JF, 1997. Pathway for Phloem-Dependent Movement of Pepper Mottle Potyvirus in the Stem of Capsicum annuum. *Phytopathology* **87**, 892-8.

Asano T, Masumura T, Kusano H, *et al.*, 2002. Construction of a specialized cDNA library from plant cells isolated by laser capture microdissection: toward comprehensive analysis of the genes expressed in the rice phloem. *Plant J* **32**, 401-8.

Ascencio-Ibanez JT, Sozzani R, Lee TJ, *et al.*, 2008. Global analysis of Arabidopsis gene expression uncovers a complex array of changes impacting pathogen response and cell cycle during geminivirus infection. *Plant Physiol* **148**, 436-54.

Ashburner M, Ball CA, Blake JA, *et al.*, 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* **25**, 25-9.

Ashburner, M., Ball, C.A., Blake, J.A., Botstein, D., Butler, H., Cherry, J.M., Davis, A.P., Dolinski, K., Dwight, S.S., Eppig, J.T., *et al.* (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. Nat Genet *25*, 25-29.

Astier SA., Albouy J.; Maury, Y.; Lecoq, H., 2001. Principes de virologie végétale. génome, pouvoir pathogène, écologie des virus.

Atabekov JG, 1975. Host specificity of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **13**, 127-45.

Atreya CD, Atreya PL, Thornbury DW, Pirone TP, 1992. Site-directed mutations in the potyvirus HC-Pro gene affect helper component activity, virus accumulation, and symptom expression in infected tobacco plants. *Virology* **191**, 106-11.

Atreya PL, Lopez-Moya JJ, Chu M, Atreya CD, Pirone TP, 1995. Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. *J Gen Virol* **76 ( Pt 2)**, 265-70.

Atsumi G, Kagaya U, Kitazawa H, Nakahara KS, Uyeda I, 2009. Activation of the salicylic acid signaling pathway enhances Clover yellow vein virus virulence in susceptible pea cultivars. *Mol Plant Microbe Interact* **22**, 166-75.

Babu M, Griffiths JS, Huang TS, Wang A, 2008. Altered gene expression changes in Arabidopsis leaf tissues and protoplasts in response to Plum pox virus infection. *BMC Genomics* **9**, 325.

Baebler S, Stare K, Kovac M, *et al.*, 2011. Dynamics of responses in compatible potato-Potato virus Y interaction are modulated by salicylic acid. *PLoS One* **6**, e29009.

Balachandran S, Xiang Y, Schobert C, Thompson GA, Lucas WJ, 1997. Phloem sap proteins from Cucurbita maxima and Ricinus communis have the capacity to traffic cell to cell through plasmodesmata. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 14150-5.

Balestrini R, Gomez-Ariza J, Lanfranco L, Bonfante P, 2007. Laser microdissection reveals that transcripts for five plant and one fungal phosphate transporter genes are contemporaneously present in arbusculated cells. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 1055-62.

Banerjee AK, Chatterjee M, Yu Y, Suh SG, Miller WA, Hannapel DJ, 2006. Dynamics of a mobile RNA of potato involved in a long-distance signaling pathway. *Plant Cell* **18**, 3443-57.

Bargmann BO, Birnbaum KD, 2009. Positive fluorescent selection permits precise, rapid, and indepth overexpression analysis in plant protoplasts. *Plant Physiol* **149**, 1231-9.

Batailler B, Lemaitre T, Vilaine F, *et al.*, 2012. Soluble and filamentous proteins in Arabidopsis sieve elements. *Plant Cell Environ* **35**, 1258-73.

Batistic O, Kudla J, 2012. Analysis of calcium signaling pathways in plants. *Biochim Biophys Acta* **1820**, 1283-93.

Baulcombe DC, 1999. Fast forward genetics based on virus-induced gene silencing. *Curr Opin Plant Biol* **2**, 109-13.

Baumberger N, Tsai CH, Lie M, Havecker E, Baulcombe DC, 2007. The Polerovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation. *Curr Biol* **17**, 1609-14.

Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I, 2001. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* **125**, 279-84.

Benjamini, Y., Drai, D., Elmer, G., Kafkafi, N., and Golani, I. (2001). Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. Behav Brain Res *125*, 279-284.

Benning UF, Tamot B, Guelette BS, Hoffmann-Benning S, 2012. New aspects of Phloem-mediated long-distance lipid signaling in plants. *Front Plant Sci* **3**, 53.

Bi JL, Castle SJ, Toscano NC, 2007. Amino acid fluctuations in young and old orange trees and their influence on glassy-winged sharpshooter (Homalodisca vitripennis) population densities. *J Chem Ecol* **33**, 1692-706.

Biles CL, Abeles FB, 1991. Xylem sap proteins. *Plant Physiol* **96**, 597-601.

Birnbaum K, Shasha DE, Wang JY, *et al.*, 2003. A gene expression map of the Arabidopsis root. *Science* **302**, 1956-60.

Blein JP, Coutos-Thevenot P, Marion D, Ponchet M, 2002. From elicitins to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends Plant Sci* **7**, 293-6.

Boissinot S, Erdinger M, Monsion B, Ziegler-Graff V, Brault V, 2014. Both structural and non-structural forms of the readthrough protein of cucurbit aphidborne yellows virus are essential for efficient systemic infection of plants. *PLoS One* **9**, e93448.

Bortolamiol D, Pazhouhandeh M, Marrocco K, Genschik P, Ziegler-Graff V, 2007. The Polerovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing. *Curr Biol* **17**, 1615-21.

Botha CEJ, Malcolm SB, Evert RF, 1977. An Investigation of Preferential Feeding Habit

Boyko V, Van Der Laak J, Ferralli J, Suslova E, Kwon MO, Heinlein M, 2000. Cellular targets of functional and dysfunctional mutants of tobacco mosaic virus movement protein fused to green fluorescent protein. *J Virol* **74**, 11339-46.

Brady SM, Orlando DA, Lee JY, *et al.*, 2007. A high-resolution root spatiotemporal map reveals dominant expression patterns. *Science* **318**, 801-6.

Brandt S, Kehr J, Walz C, Imlau A, Willmitzer L, Fisahn J, 1999. Technical Advance: A rapid method for detection of plant gene transcripts from single epidermal, mesophyll and companion cells of intact leaves. *Plant J* **20**, 245-50.

Brand U, Grunewald M, Hobe M, Simon R, 2002. Regulation of CLV3 expression by two homeobox genes in Arabidopsis. *Plant Physiol* **129**, 565-75.

Brault V, Bergdoll M, Mutterer J, *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**, 3247-56.

Brault V, Herrbach E, Reinbold C, 2007. Electron microscopy studies on luteovirid transmission by aphids. *Micron* **38**, 302-12.

Brault V, Mutterer J, Scheidecker D, *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**, 1140-8.

Brault V, Perigon S, Reinbold C, *et al.*, 2005. The polerovirus minor capsid protein determines vector specificity and intestinal tropism in the aphid. *J Virol* **79**, 9685-93.

Brault V, Van Den Heuvel JF, Verbeek M, *et al.*, 1995. Aphid transmission of beet western yellows luteovirus requires the minor capsid read-through protein P74. *Embo J* **14**, 650-9.

Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, *et al.*, 2008. Widespread translational

inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science* **320**, 1185-90.

Brown CM, Dinesh-Kumar SP, Miller WA, 1996. Local and distant sequences are required for efficient readthrough of the barley yellow dwarf virus PAV coat protein gene stop codon. *J Virol* **70**, 5884-92.

Bruyère A, Brault V, Ziegler-Graff V, *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**, 323-34.

Buhtz A, Kolasa A, Arlt K, Walz C, Kehr J, 2004. Xylem sap protein composition is conserved among different plant species. *Planta* **219**, 610-8.

Buhtz A, Springer F, Chappell L, Baulcombe DC, Kehr J, 2008. Identification and characterization of small RNAs from the phloem of Brassica napus. *Plant J* **53**, 739-49.

Cao TL, Revers F, Cazenave C, 1994. Production of double-stranded RNA during synthesis of bromouracil-substituted RNA by transcription with T7 RNA polymerase. *FEBS Lett* **351**, 253-6.

Carrington JC, Cary SM, Parks TD, Dougherty WG, 1989a. A second proteinase encoded by a plant potyvirus genome. *EMBO J* **8**, 365-70.

Carrington JC, Dougherty WG, 1987. Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a protease. *J Virol* **61**, 2540-8.

Carrington JC, Freed DD, Sanders TC, 1989b. Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in Escherichia coli and in vitro. *J Virol* **63**, 4459-63.

Carrington JC, Jensen PE, Schaad MC, 1998. Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *Plant J* **14**, 393-400.

Cavener DR, Ray SC, 1991. Eukaryotic start and stop translation sites. *Nucleic Acids Res* **19**, 3185-92.

Chay CA, Gunasinge UB, Dinesh-Kumar SP, Miller WA, Gray SM, 1996. Aphid transmission and systemic plant infection determinants of barley yellow dwarf luteovirus-PAV are contained in the coat protein readthrough domain and 17-kDa protein, respectively. *Virology* **219**, 57-65.

Chen S, Petersen BL, Olsen CE, Schulz A, Halkier BA, 2001. Long-distance phloem transport of glucosinolates in Arabidopsis. *Plant Physiol* **127**, 194-201.

Cheng NH, Su CL, Carter SA, Nelson RS, 2000. Vascular invasion routes and systemic accumulation patterns of tobacco mosaic virus in Nicotiana benthamiana. *Plant J* **23**, 349-62.

Cheng SL, Domier LL, D'arcy CJ, 1994. Detection of the readthrough protein of barley yellow dwarf virus. *Virology* **202**, 1003-6.

Chisholm ST, Mahajan SK, Whitham SA, Yamamoto ML, Carrington JC, 2000. Cloning of the Arabidopsis RTM1 gene, which controls restriction of longdistance movement of tobacco etch virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 489-94.

Chisholm ST, Parra MA, Anderberg RJ, Carrington JC, 2001. Arabidopsis RTM1 and RTM2 Genes Function in Phloem to Restrict Long-Distance Movement of Tobacco Etch Virus. *Plant Physiology* **127**, 1667-75.

Chrispeels MJ, Raikhel NV, 1991. Lectins, lectin genes, and their role in plant defense. *Plant Cell* **3**, 1-9.

Christensen NM, Axelsen KB, Nicolaisen M, Schulz A, 2005. Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends Plant Sci* **10**, 526-35.

Chung BY, Miller WA, Atkins JF, Firth AE, 2008. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 5897-902.

Citovsky V, Wong ML, Shaw AL, Prasad BV, Zambryski P, 1992. Visualization and characterization of tobacco mosaic virus movement protein binding to single-stranded nucleic acids. *Plant Cell* **4**, 397-411.

Clark MF, Adams AN, 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol* **34**, 475-83.

Clay NK, Adio AM, Denoux C, Jander G, Ausubel FM, 2009. Glucosinolate metabolites required for an Arabidopsis innate immune response. *Science* **323**, 95-101.

Cosson P, Schurdi-Levraud V, Le QH, *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.

Cosson P, Sofer L, Le QH, *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**, 222-32.

Cosson P, Sofer L, Schurdi-Levraud V, Revers F, 2010. A member of a new plant gene family encoding a meprin and TRAF homology (MATH) domain-containing protein is involved in restriction of long distance movement of plant viruses. *Plant Signal Behav* **5**, 1321-3.

Cotton S, Grangeon R, Thivierge K, *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**, 10460-71.

Crawford KM, Zambryski PC, 2001. Non-targeted and targeted protein movement through plasmodesmata in leaves in different developmental and physiological states. *Plant Physiol* **125**, 1802-12.

Cronin S, Verchot J, Haldeman-Cahill R, Schaad MC, Carrington JC, 1995. Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* **7**, 549-59.

Csorba T, Lozsa R, Hutvagner G, Burgyan 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.

Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR, 2005. Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in Arabidopsis. *Plant Physiol* **139**, 5-17.

D'angelo C, Weinl S, Batistic O, *et al.*, 2006. Alternative complex formation of the Ca-regulated protein kinase CIPK1 controls abscisic aciddependent and independent stress responses in Arabidopsis. *Plant J* **48**, 857-72.

Dawson WO, Bubrick P, Grantham GL, 1988. Modifications of the tobacco mosaic virus coat protein gene affecting replication, movement and symptomatology. *Phytopathology* **78**, 783-9.

Deal RB, Henikoff S, 2010. A simple method for gene expression and chromatin profiling of individual cell types within a tissue. *Dev Cell* **18**, 1030-40.

Decroocq V, Salvador B, Sicard O, *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**, 1302-11.

Decroocq V, Sicard O, Alamillo JM, *et al.*, 2006. Multiple resistance traits control Plum pox virus infection in Arabidopsis thaliana. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 541-9.

Decroocq, V., Salvador, B., Sicard, O., Glasa, M., Cosson, P., Svanella-Dumas, L., Revers, F., Garcia, J.A., and Candresse, T. (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.

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. Deeken R, Geiger D, Fromm J, *et al.*, 2002. Loss of the AKT2/3 potassium channel affects sugar loading into the phloem of Arabidopsis. *Planta* **216**, 334-44.

Deeken, R., Ache, P., Kajahn, I., Klinkenberg, J., Bringmann, G., and 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*, 746-759.

Derrien B, Baumberger N, Schepetilnikov M, *et al.*, 2012. Degradation of the antiviral component ARGONAUTE1 by the autophagy pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 15942-6.

Despres C, Delong C, Glaze S, Liu E, Fobert PR, 2000. The Arabidopsis NPR1/NIM1 protein enhances the DNA binding activity of a subgroup of the TGA family of bZIP transcription factors. *Plant Cell* **12**, 279-90.

Diaz-Pendon JA, Ding SW, 2008. Direct and indirect roles of viral suppressors of RNA silencing in pathogenesis. *Annu Rev Phytopathol* **46**, 303-26.

Diaz-Pendon JA, Truniger V, Nieto C, Garcia-Mas J, Bendahmane A, Aranda MA, 2004. Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Mol Plant Pathol* **5**, 223-33.

Diener TO, 1991. Subviral pathogens of plants: viroids and viroidlike satellite RNAs. *Faseb j* **5**, 2808-13.

Dinant S, 2008. Phloème, transport interorgane et signalisation à longue distance. *Comptes Rendus Biologies* **331**, 334-46.

Dinant S, Bonnemain JL, Girousse C, Kehr J, 2010. Phloem sap intricacy and interplay with aphid feeding. *C R Biol* **333**, 504-15.

Dinesh-Kumar SP, Miller WA, 1993. Control of start codon choice on a plant viral RNA encoding overlapping genes. *Plant Cell* **5**, 679-92.

Ding SW, Voinnet O, 2007. Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* **130**, 413-26.

Ding XS, Carter SA, Deom CM, Nelson RS, 1998. Tobamovirus and Potyvirus Accumulation in Minor Veins of Inoculated Leaves from Representatives of the Solanaceae and Fabaceae. *Plant Physiol.* **116**, 125-36.

Dobritsa AA, Shrestha J, Morant M, *et al.*, 2009. CYP704B1 is a long-chain fatty acid omegahydroxylase essential for sporopollenin synthesis in pollen of Arabidopsis. *Plant Physiol* **151**, 574-89.

Doering-Saad C, Newbury HJ, Bale JS, Pritchard J, 2002. Use of aphid stylectomy and RT-PCR for the detection of transporter mRNAs in sieve elements. *J Exp Bot* **53**, 631-7.

Dolja VV, Haldeman R, Robertson NL, Dougherty WG, Carrington JC, 1994. Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO J* **13**, 1482-91.

Dolja VV, Haldeman-Cahill R, Montgomery AE, Vandenbosch KA, Carrington JC, 1995. Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology* **206**, 1007-16.

Donaire L, Barajas D, Martinez-Garcia B, Martinez-Priego L, Pagan I, Llave C, 2008. Structural and genetic requirements for the biogenesis of tobacco rattle virus-derived small interfering RNAs. *J Virol* **82**, 5167-77.

Dougherty WG, Allison RF, Dawn Parks T, Johnston RE, Feild MJ, Armstrong FB, 1985. Nucleotide sequence at the 3' terminus of pepper mottle virus genomic RNA: evidence for an alternative mode of potyvirus capsid protein gene organization. *Virology* **146**, 282-91.

Dunoyer P, Thomas C, Harrison S, Revers F, Maule A, 2004. A cysteine-rich plant protein potentiates Potyvirus movement through an interaction with the virus genome-linked protein VPg. *J Virol* **78**, 2301-9.

Durrant WE, Dong X, 2004. Systemic acquired resistance. *Annu Rev Phytopathol* **42**, 185-209.

Ehlers K, Kollmann R, 2001. Primary and secondary plasmodesmata: structure, origin, and functioning. *Protoplasma* **216**, 1-30.

Endres MW, Gregory BD, Gao Z, *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.

English JJ, Davenport GF, Elmayan T, Vaucheret H, Baulcombe DC, 1997. Requirement of sense transcription for homology-dependent virus resistance and trans-inactivation. *Plant J* **12**, 597-603.

Espina V, Wulfkuhle JD, Calvert VS, *et al.*, 2006. Laser-capture microdissection. *Nature Protocols* **1**, 586-603.

Espinoza C, Medina C, Somerville S, Arce-Johnson P, 2007. Senescence-associated genes induced during compatible viral interactions with grapevine and Arabidopsis. *J Exp Bot* **58**, 3197-212.

Fan W, Dong X, 2002. In vivo interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in Arabidopsis. *Plant Cell* **14**, 1377-89.

Field B, Cardon G, Traka M, Botterman J, Vancanneyt G, Mithen R, 2004. Glucosinolate and amino acid biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Physiol* **135**, 828-39.

Filichkin SA, Lister RM, Mcgrath PF, Young MJ, 1994. In vivo expression and mutational analysis of the barley yellow dwarf virus readthrough gene. *Virology* **205**, 290-9.

Fischer WN, Kwart M, Hummel S, Frommer WB, 1995. Substrate specificity and expression profile of amino acid transporters (AAPs) in Arabidopsis. *J Biol Chem* **270**, 16315-20.

Flasinski S, Cassidy BG, 1998. Potyvirus aphid transmission requires helper component and homologous coat protein for maximal efficiency. *Arch Virol* **143**, 2159-72.

Fukuda A, Fujimaki S, Mori T, *et al.*, 2005. Differential distribution of proteins expressed in companion cells in the sieve element-companion cell complex of rice plants. *Plant Cell Physiol* **46**, 1779-86.

Furch AC, Hafke JB, Schulz A, Van Bel AJ, 2007. Ca2+mediated remote control of reversible sieve tube occlusion in Vicia faba. *J Exp Bot* **58**, 2827-38.

Garnier M, Foissac X, Gaurivaud P, *et al.*, 2001. Mycoplasmas, plants, insect vectors: a matrimonial triangle. *C R Acad Sci III* **324**, 923-8.

Gaymard F, Pilot G, Lacombe B, *et al.*, 1998. Identification and disruption of a plant shaker-like outward channel involved in K+ release into the xylem sap. *Cell* **94**, 647-55.

German-Retana S, Walter J, Le Gall O, 2008. Lettuce mosaic virus: from pathogen diversity to host interactors. *Mol Plant Pathol* **9**, 127-36.

Giavalisco P, Kapitza K, Kolasa A, Buhtz A, Kehr J, 2006. Towards the proteome of Brassica napus phloem sap. *Proteomics* **6**, 896-909.

Gifford ML, Dean A, Gutierrez RA, Coruzzi GM, Birnbaum KD, 2008. Cell-specific nitrogen responses mediate developmental plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 803-8.

Gillespie T, Boevink P, Haupt S, *et al.*, 2002. Functional analysis of a DNA-shuffled movement protein reveals that microtubules are dispensable for the cell-to-cell movement of tobacco mosaic virus. *Plant Cell* **14**, 1207-22.

Gomez G, Pallas V, 2004. A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex in vivo with Hop stunt viroid RNA. *J Virol* **78**, 10104-10.

Gong D, Guo Y, Jagendorf AT, Zhu JK, 2002. Biochemical characterization of the Arabidopsis protein kinase SOS2 that functions in salt tolerance. *Plant Physiol* **130**, 256-64.

Gould GG, Jones CG, Rifleman P, Perez A, Coleman JS, 2007. Variation in Eastern cottonwood (Populus deltoides Bartr.) phloem sap content caused by leaf

development may affect feeding site selection behavior of the aphid, Chaitophorous populicola Thomas (Homoptera: Aphididae). *Environ Entomol* **36**, 1212-25.

Gould N, Thorpe MR, Minchin PEH, Pritchard J, White PJ, 2004. Solute is imported to elongating root cells of barley as a pressure

Gozzo F, Faoro F, 2013. Systemic acquired resistance (50 years after discovery): moving from the lab to the field. *J Agric Food Chem* **61**, 12473-91.

Grangeon R, Agbeci M, Chen J, Grondin G, Zheng H, Laliberte JF, 2012. Impact on the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus of turnip mosaic virus infection. *J Virol* **86**, 9255-65.

Grangeon R, Jiang J, Wan J, Agbeci M, Zheng H, Laliberte JF, 2013. 6K2-induced vesicles can move cell to cell during turnip mosaic virus infection. *Front Microbiol* **4**, 351.

Guelette BS, Benning UF, Hoffmann-Benning S, 2012. Identification of lipids and lipid-binding proteins in phloem exudates from Arabidopsis thaliana. *J Exp Bot* **63**, 3603-16.

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 Y, Halfter U, Ishitani M, Zhu JK, 2001. Molecular characterization of functional domains in the protein kinase SOS2 that is required for plant salt tolerance. *Plant Cell* **13**, 1383-400.

Haldeman-Cahill R, Daros JA, Carrington JC, 1998. Secondary structures in the capsid protein coding sequence and 3' nontranslated region involved in amplification of the tobacco etch virus genome. *J Virol* **72**, 4072-9.

Halfter U, Ishitani M, Zhu JK, 2000. The Arabidopsis SOS2 protein kinase physically interacts with and is activated by the calcium-binding protein SOS3. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3735-40.

Halkier BA, Gershenzon J, 2006. Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu Rev Plant Biol* **57**, 303-33.

Hamburger D, Rezzonico E, Macdonald-Comber Petetot J, Somerville C, Poirier Y, 2002. Identification and characterization of the Arabidopsis PHO1 gene involved in phosphate loading to the xylem. *Plant Cell* **14**, 889-902.

Harries P, Ding B, 2011. Cellular factors in plant virus movement: at the leading edge of macromolecular trafficking in plants. *Virology* **411**, 237-43.

Haupt S, Stroganova T, Ryabov E, *et al.*, 2005. Nucleolar localization of potato leafroll virus capsid proteins. *J Gen Virol* **86**, 2891-6. Haywood V, Yu TS, Huang NC, Lucas WJ, 2005. Phloem long-distance trafficking of GIBBERELLIC ACID-INSENSITIVE RNA regulates leaf development. *Plant J* **42**, 49-68.

Heiman M, Schaefer A, Gong S, *et al.*, 2008. A translational profiling approach for the molecular characterization of CNS cell types. *Cell* **135**, 738-48.

Heinlein M, Epel BL, 2004. Macromolecular transport and signaling through plasmodesmata. *Int Rev Cytol* **235**, 93-164.

Himber C, Dunoyer P, Moissiard G, Ritzenthaler C, Voinnet O, 2003. Transitivity-dependent and - independent cell-to-cell movement of RNA silencing. *Embo j* **22**, 4523-33.

Hipper C, Brault V, Ziegler-Graff V, Revers F, 2013. Viral and cellular factors involved in Phloem transport of plant viruses. *Front Plant Sci* **4**, 154.

Hipper C, Monsion B, Bortolamiol-Becet D, Ziegler-Graff V, Brault V, 2014. Formation of virions is strictly required for turnip yellows virus long-distance movement in plants. *J Gen Virol* **95**, 496-505.

Hoad GV, 1995. Transport of hormones in the phloem of higher plants. *Plant Growth Regulation* **16**, 173-82.

Hoffmann K, Verbeek M, Romano A, Dullemans AM, Van Den Heuvel JF, Van Der Wilk F, 2001. Mechanical transmission of poleroviruses. *J Virol Methods* **91**, 197-201.

Hofius D, Herbers K, Melzer M, *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**, 529-43.

Holsters M, Silva B, Van Vliet F, *et al.*, 1980. The functional organization of the nopaline A. tumefaciens plasmid pTiC58. *Plasmid* **3**, 212-30.

Holub E, Beynon J, 1997. Symbiology of mouse-ear cress (Arabidopsis thaliana)

Hong Y, Hunt AG, 1996. RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* **226**, 146-51.

Howarth JR, Parmar S, Barraclough PB, Hawkesford MJ, 2009. A sulphur deficiency-induced gene, sdi1, involved in the utilization of stored sulphate pools under sulphur-limiting conditions has potential as a diagnostic indicator of sulphur nutritional status. *Plant Biotechnol J* **7**, 200-9.

Huet H, Gal-On A, Meir E, Lecoq H, Raccah B, 1994. Mutations in the helper component protease gene of zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility. *J Gen Virol* **75 ( Pt 6)**, 1407-14.

Huh SU, Kim MJ, Ham BK, Paek KH, 2011. A zinc finger protein Tsip1 controls Cucumber mosaic virus infection by interacting with the replication complex on vacuolar membranes of the tobacco plant. *New Phytol* **191**, 746-62.

Hunt E, Gattolin S, Newbury HJ, *et al.*, 2010. A mutation in amino acid permease AAP6 reduces the amino acid content of the Arabidopsis sieve elements but leaves aphid herbivores unaffected. *J Exp Bot* **61**, 55-64.

Ibrahim A, Hutchens HM, Berg RH, Loesch-Fries LS, 2012. Alfalfa mosaic virus replicase proteins, P1 and P2, localize to the tonoplast in the presence of virus RNA. *Virology* **433**, 449-61.

Igarashi A, Yamagata K, Sugai T, *et al.*, 2009. Apple latent spherical virus vectors for reliable and effective virus-induced gene silencing among a broad range of plants including tobacco, tomato, Arabidopsis thaliana, cucurbits, and legumes. *Virology* **386**, 407-16.

Imlau A, Truernit E, Sauer N, 1999. Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell* **11**, 309-22.

Ishiwatari Y, Honda C, Kawashima I, *et al.*, 1995. Thioredoxin h is one of the major proteins in rice phloem sap. *Planta* **195**, 456-63.

Islam MM, Tani C, Watanabe-Sugimoto M, *et al.*, 2009. Myrosinases, TGG1 and TGG2, redundantly function in ABA and MeJA signaling in Arabidopsis guard cells. *Plant Cell Physiol* **50**, 1171-5.

Ivashikina N, Deeken R, Ache P, *et al.*, 2003. Isolation of AtSUC2 promoter-GFP-marked companion cells for patch-clamp studies and expression profiling. *Plant J* **36**, 931-45.

Ivashikina, N., Deeken, R., Ache, P., Kranz, E., Pommerrenig, B., Sauer, N., and Hedrich, R. (2003). Isolation of AtSUC2 promoter-GFP-marked companion cells for patch-clamp studies and expression profiling. Plant J *36*, 931-945.

Iwai H, Usui M, Hoshino H, *et al.*, 2003. Analysis of sugars in squash xylem sap. *Plant Cell Physiol* **44**, 582-7.

Jakubiec A, Notaise J, Tournier V, *et al.*, 2004. Assembly of turnip yellow mosaic virus replication complexes: interaction between the proteinase and polymerase domains of the replication proteins. *J Virol* **78**, 7945-57.

Jenner CE, Wang X, Tomimura K, Ohshima K, Ponz F, Walsh JA, 2003. The dual role of the potyvirus P3 protein of Turnip mosaic virus as a symptom and avirulence determinant in brassicas. *Mol Plant Microbe Interact* **16**, 777-84.

Jiao Y, Lori Tausta S, Gandotra N, *et al.*, 2009. A transcriptome atlas of rice cell types uncovers cellular, functional and developmental hierarchies. In. *Nature Genetics.* 258-63. (41.)

Jolly CA, Mayo MA, 1994. Changes in the amino acid sequence of the coat protein readthrough domain of potato leafroll luteovirus affect the formation of an epitope and aphid transmission. *Virology* **201**, 182-5.

Jossey S, Hobbs HA, Domier LL, 2013. Role of soybean mosaic virus-encoded proteins in seed and aphid transmission in soybean. *Phytopathology* **103**, 941-8.

Kalantidis K, Schumacher HT, Alexiadis T, Helm JM, 2008. RNA silencing movement in plants. *Biol Cell* **100**, 13-26.

Kamer G, Argos P, 1984. Primary structural comparison of RNA-dependent polymerases from plant, animal and bacterial viruses. *Nucleic Acids Res* **12**, 7269-82.

Kang HK, Yang SH, Lee YP, Park YI, Kim SH, 2012. A tobacco CBL-interacting protein kinase homolog is involved in phosphorylation of the N-terminal domain of the cucumber mosaic virus polymerase 2a protein. *Biosci Biotechnol Biochem* **76**, 2101-6.

Karimi M, Inze D, Depicker A, 2002. GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* **7**, 193-5.

Kasschau KD, Carrington JC, 1995. Requirement for HC-Pro processing during genome amplification of tobacco etch potyvirus. *Virology* **209**, 268-73.

Kasschau KD, Carrington JC, 1998. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* **95**, 461-70.

Kasschau KD, Carrington JC, 2001. Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. *Virology* **285**, 71-81.

Kasschau KD, Cronin S, Carrington JC, 1997. Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper componentproteinase. *Virology* **228**, 251-62.

Kaufmann A, Koenig R, Lesemann DE, 1992. Tissue print-immunoblotting reveals an uneven distribution of beet necrotic yellow vein and beet soil-borne viruses in sugarbeets. *Arch Virol* **126**, 329-35. Kehr J, 2009. Long-distance transport of macromolecules through the phloem. *F1000 Biol Rep* **1**, 31.

Kehr J, Buhtz A, 2008. Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *J Exp Bot* **59**, 85-92.

Kehr J, Buhtz A, Giavalisco P, 2005. Analysis of xylem sap proteins from Brassica napus. *BMC Plant Biol* **5**, 11.

Kerk NM, 2003. Laser Capture Microdissection of Cells from Plant Tissues. *Plant Physiology* **132**, 27-35.

Kim I, Cho E, Crawford K, Hempel FD, Zambryski PC, 2005. Cell-to-cell movement of GFP during embryogenesis and early seedling development in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 2227-31.

Kim M, Canio W, Kessler S, Sinha N, 2001. Developmental changes due to long-distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato. *Science* **293**, 287-9.

Kim SH, Ryabov EV, Kalinina NO, *et al.*, 2007. Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection. *EMBO J* **26**, 2169-79.

Kinkema M, Fan W, Dong X, 2000. Nuclear localization of NPR1 is required for activation of PR gene expression. *Plant Cell* **12**, 2339-50.

Klein PG, Klein RR, Rodriguez-Cerezo E, Hunt AG, Shaw JG, 1994. Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. *Virology* **204**, 759-69.

Klosterman SJ, Atallah ZK, Vallad GE, Subbarao KV, 2009. Diversity, pathogenicity, and management of verticillium species. *Annu Rev Phytopathol* **47**, 39-62.

Klosterman SJ, Subbarao KV, Kang S, *et al.*, 2011. Comparative genomics yields insights into niche adaptation of plant vascular wilt pathogens. *PLoS Pathog* **7**, e1002137.

Kolukisaoglu U, Weinl S, Blazevic D, Batistic O, Kudla J, 2004. Calcium sensors and their interacting protein kinases: genomics of the Arabidopsis and rice CBL-CIPK signaling networks. *Plant Physiol* **134**, 43-58.

Koonin EV, Dolja VV, 1993. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **28**, 375-430.

Kopriva S, 2006. Regulation of sulfate assimilation in Arabidopsis and beyond. *Ann Bot* **97**, 479-95.

Koprivova A, North KA, Kopriva S, 2008. Complex signaling network in regulation of adenosine 5'-phosphosulfate reductase by salt stress in Arabidopsis roots. *Plant Physiol* **146**, 1408-20.

Krause-Sakate R, Le Gall O, Fakhfakh H, *et al.*, 2002. Molecular and Biological Characterization of Lettuce mosaic virus (LMV) Isolates Reveals a Distinct and Widespread Type of Resistance-Breaking Isolate: LMV-Most. *Phytopathology* **92**, 563-72.

Kuang E, Qi J, Ronai Z, 2013. Emerging roles of E3 ubiquitin ligases in autophagy. *Trends Biochem Sci* **38**, 453-60.

Kudla J, Xu Q, Harter K, Gruissem W, Luan S, 1999. Genes for calcineurin B-like proteins in Arabidopsis are differentially regulated by stress signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 4718-23.

Kuroha T, Kato H, Asami T, Yoshida S, Kamada H, Satoh S, 2002. A trans-zeatin riboside in root xylem sap negatively regulates adventitious root formation on cucumber hypocotyls. *J Exp Bot* **53**, 2193-200.

Kwart M, Hirner B, Hummel S, Frommer WB, 1993. Differential expression of two related amino acid transporters with differing substrate specificity in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **4**, 993-1002.

La Cour Petersen M, Hejgaard J, Thompson GA, 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.

Lain S, Martin MT, Riechmann JL, Garcia JA, 1991. Novel catalytic activity associated with positivestrand RNA virus infection: nucleic acid-stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicaselike protein. *J Virol* **65**, 1-6.

Lain S, Riechmann JL, Garcia JA, 1990. RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic Acids Res* **18**, 7003-6.

Lakatos L, Csorba T, Pantaleo V, *et al.*, 2006. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J* **25**, 2768-80.

Lalonde S, Wipf D, Frommer WB, 2004. Transport mechanisms for organic forms of carbon and nitrogen between source and sink. *Annu Rev Plant Biol* **55**, 341-72.

Lange M, Yellina AL, Orashakova S, Becker A, 2013. Virus-induced gene silencing (VIGS) in plants: an overview of target species and the virus-derived vector systems. *Methods Mol Biol* **975**, 1-14.

Lartey RT, Ghoshroy S, Citovsky V, 1998. Identification of an Arabidopsis thaliana mutation (vsm1) that restricts systemic movement of tobamoviruses. *Mol Plant Microbe Interact* **11**, 706-9.

Le Hir R, Bellini C, 2013. The plant-specific dof transcription factors family: new players involved in

vascular system development and functioning in Arabidopsis. *Front Plant Sci* **4**, 164.

Le Hir R, Beneteau J, Bellini C, Vilaine F, Dinant S, 2008. Gene expression profiling: keys for investigating phloem functions. *Trends in Plant Science* **13**, 273-80.

Lebel E, Heifetz P, Thorne L, Uknes S, Ryals J, Ward E, 1998. Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in Arabidopsis. *Plant J* **16**, 223-33.

Lechner E, Achard P, Vansiri A, Potuschak T, Genschik P, 2006. F-box proteins everywhere. *Curr Opin Plant Biol* **9**, 631-8.

Lecoq H, Bourdin D, Wipf-Scheibel C, *et al.*, 1992. A new yellowing disease of cucurbits caused by a luteovirus, cucurbit aphid-borne yellows virus. *Plant Pathology* **41**, 749-61.

Lee GJ, Vierling E, 2000. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant Physiol* **122**, 189-98.

Lee L, Palukaitis P, Gray SM, 2002. Host-dependent requirement for the Potato leafroll virus 17-kda protein in virus movement. *Mol Plant Microbe Interact* **15**, 1086-94.

Leiser RM, Ziegler-Graff V, Reutenauer A, *et al.*, 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.

Leiser, R.M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer, A., Herrbach, E., Lemaire, O., Guilley, H., Richards, K., and Jonard, G. (1992). Agroinfection as an alternative to insects for infecting plants with beet western yellows luteovirus. Proc Natl Acad Sci U S A *89*, 9136-9140.

Leonard S, Plante D, Wittmann S, Daigneault N, Fortin MG, Laliberte JF, 2000. Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *J Virol* **74**, 7730-7.

Leonard S, Viel C, Beauchemin C, Daigneault N, Fortin MG, Laliberte JF, 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**, 1055-63.

Leustek T, 2002. Sulfate metabolism. *Arabidopsis Book* **1**, e0017.

Li W, Lewandowski DJ, Hilf ME, Adkins S, 2009a. Identification of domains of the Tomato spotted wilt virus NSm protein involved in tubule formation, movement and symptomatology. *Virology* **390**, 110-21. Li X, Ryan MD, Lamb JW, 2000. Potato leafroll virus protein P1 contains a serine proteinase domain. *J Gen Virol* **81**, 1857-64.

Li XH, Valdez P, Olvera RE, Carrington JC, 1997. Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (NIb): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (NIa). *J Virol* **71**, 1598-607.

Li Z, Pogany J, Panavas T, *et al.*, 2009b. Translation elongation factor 1A is a component of the tombusvirus replicase complex and affects the stability of the p33 replication co-factor. *Virology* **385**, 245-60.

Lilly ST, Drummond RS, Pearson MN, Macdiarmid RM, 2011. Identification and validation of reference genes for normalization of transcripts from virusinfected Arabidopsis thaliana. *Mol Plant Microbe Interact* **24**, 294-304.

Lin MK, Lee YJ, Lough TJ, Phinney BS, Lucas WJ, 2009. Analysis of the pumpkin phloem proteome provides insights into angiosperm sieve tube function. *Mol Cell Proteomics* **8**, 343-56.

Liu J, Ishitani M, Halfter U, Kim CS, Zhu JK, 2000. The Arabidopsis thaliana SOS2 gene encodes a protein kinase that is required for salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3730-4.

Liu Y, Schiff M, Marathe R, Dinesh-Kumar SP, 2002. Tobacco Rar1, EDS1 and NPR1/NIM1 like genes are required for N-mediated resistance to tobacco mosaic virus. *Plant* **/ 30**, 415-29.

Llave C, 2010. Virus-derived small interfering RNAs at the core of plant-virus interactions. *Trends Plant Sci* **15**, 701-7.

Love AJ, Geri C, Laird J, *et al.*, 2012. Cauliflower mosaic virus protein P6 inhibits signaling responses to salicylic acid and regulates innate immunity. *PLoS One* **7**, e47535.

Lucas WJ, Yoo BC, Kragler F, 2001. RNA as a longdistance information macromolecule in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 849-57.

Ma LJ, Van Der Does HC, Borkovich KA, *et al.*, 2010. Comparative genomics reveals mobile pathogenicity chromosomes in Fusarium. *Nature* **464**, 367-73.

Mahajan SK, Chisholm ST, Whitham SA, Carrington JC, 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.

Malter D, Wolf S, 2011. Melon phloem-sap proteome: developmental control and response to viral infection. *Protoplasma* **248**, 217-24.

Manacorda CA, Mansilla C, Debat HJ, et al., 2013. Salicylic acid determines differential senescence produced by two Turnip mosaic virus strains involving reactive oxygen species and early transcriptomic changes. *Mol Plant Microbe Interact* **26**, 1486-98.

Mangeon A, Junqueira RM, Sachetto-Martins G, 2010. Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. *Plant Signal Behav* 5(2), 99-104.

Marathe R, Anandalakshmi R, Smith TH, Pruss GJ, Vance VB, 2000. RNA viruses as inducers, suppressors and targets of post-transcriptional gene silencing. *Plant Mol Biol* **43**, 295-306.

Marathe R, Guan Z, Anandalakshmi R, Zhao H, Dinesh-Kumar SP, 2004. Study of Arabidopsis thaliana resistome in response to cucumber mosaic virus infection using whole genome microarray. *Plant Mol Biol* **55**, 501-20.

Marschner H, Kirkby EA, Cakmak I, 1996. Effect of mineral nutritional status on shoot-root partitioning of photoassimilates and cycling of mineral nutrients. *J Exp Bot* **47 Spec No**, 1255-63.

Mas P, Beachy RN, 1999. Replication of tobacco mosaic virus on endoplasmic reticulum and role of the cytoskeleton and virus movement protein in intracellular distribution of viral RNA. *J Cell Biol* **147**, 945-58.

Mathur C, Jimsheena VK, Banerjee S, Makinen K, Gowda LR, Savithri HS, 2012. Functional regulation of PVBV Nuclear Inclusion protein-a protease activity upon interaction with Viral Protein genome-linked and phosphorylation. *Virology* **422**, 254-64.

Maule AJ, Caranta C, Boulton MI, 2007. Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. *Mol Plant Pathol* **8**, 223-31.

Mauseth JD, Bowes BG, 2012. Structure des plantes.

Mavankal G, Rhoads RE, 1991. In vitro cleavage at or near the N-terminus of the helper component protein in the tobacco vein mottling virus polyprotein. *Virology* **185**, 721-31.

Mayers CN, Lee KC, Moore CA, Wong SM, Carr JP, 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**, 428-34.

Mayo MA, Ziegler-Graff V, 1996. Molecular biology of luteoviruses. *Adv Virus Res* **46**, 413-60.

Mccaskill A, Turgeon R, 2007. Phloem loading in Verbascum phoeniceum L. depends on the synthesis of raffinose-family oligosaccharides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 19619-24.

Merai Z, Kerenyi Z, Kertesz S, Magna M, Lakatos L, Silhavy D, 2006. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J Virol* **80**, 5747-56. Merits A, Guo D, Jarvekulg L, Saarma M, 1999a. Biochemical and genetic evidence for interactions between potato A potyvirus-encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex. *Virology* **263**, 15-22.

Merits A, Guo D, Saarma M, 1998. VPg, coat protein and five non-structural proteins of potato A potyvirus bind RNA in a sequence-unspecific manner. *J Gen Virol* **79 (Pt 12)**, 3123-7.

Merits A, Kettunen R, Makinen K, *et al.*, 1999b. Virus-specific capping of tobacco mosaic virus RNA: methylation of GTP prior to formation of covalent complex p126-m7GMP. *FEBS Lett* **455**, 45-8.

Merits A, Rajamaki ML, Lindholm P, *et al.*, 2002. Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells. *J Gen Virol* **83**, 1211-21.

Mikkelsen MD, Hansen CH, Wittstock U, Halkier BA, 2000. Cytochrome P450 CYP79B2 from Arabidopsis catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid. *J Biol Chem* **275**, 33712-7.

Miller S, Krijnse-Locker J, 2008. Modification of intracellular membrane structures for virus replication. *Nat Rev Microbiol* **6**, 363-74.

Miller WA, Dinesh-Kumar SP, Paul CP, 1995. Luteovirus Gene Expression. *Critical Review in Plant Sciences* **14**, 179-211.

Moghal SM, Francki RI, 1981. Towards a system for the identification and classification of potyviruses. II. Virus particle length, symptomatology, and cytopathology of six distinct viruses. *Virology* **112**, 210-6.

Mohr PG, Cahill DM, 2007. Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in Arabidopsis infected with Pseudomonas syringae pv. tomato. *Funct Integr Genomics* **7**, 181-91.

Moldrup ME, Salomonsen B, Geu-Flores F, Olsen CE, Halkier BA, 2013. De novo genetic engineering of the camalexin biosynthetic pathway. *J Biotechnol* **167**, 296-301.

Moreno A, Fereres A, 2012. Virus diseases in lettuce in the Mediterranean basin. *Adv Virus Res* **84**, 247-88.

Moreno IM, Thompson JR, Garcia-Arenal F, 2004. Analysis of the systemic colonization of cucumber plants by Cucumber green mottle mosaic virus. *J Gen Virol* **85**, 749-59.

Murphy JF, Klein PG, Hunt AG, Shaw JG, 1996. Replacement of the tyrosine residue that links a potyviral VPg to the viral RNA is lethal. *Virology* **220**, 535-8. Mustroph A, Juntawong P, Bailey-Serres J, 2009a. Isolation of plant polysomal mRNA by differential centrifugation and ribosome immunopurification methods. *Methods Mol Biol* **553**, 109-26.

Mustroph A, Zanetti ME, Jang CJ, *et al.*, 2009. Profiling translatomes of discrete cell populations resolves altered cellular priorities during hypoxia in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 18843-8.

Mutterer JD, Stussi-Garaud C, Michler P, Richards KE, 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** (Pt 10), 2771-8.

Nadarasah G, Stavrinides J, 2011. Insects as alternative hosts for phytopathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **35**, 555-75.

Nafisi M, Goregaoker S, Botanga CJ, *et al.*, 2007. Arabidopsis cytochrome P450 monooxygenase 71A13 catalyzes the conversion of indole-3acetaldoxime in camalexin synthesis. *Plant Cell* **19**, 2039-52.

Nakamoto H, Vigh L, 2007. The small heat shock proteins and their clients. *Cell Mol Life Sci* **64**, 294-306.

Nakazono M, Qiu F, Borsuk LA, Schnable PS, 2003. Laser-capture microdissection, a tool for the global analysis of gene expression in specific plant cell types: identification of genes expressed differentially in epidermal cells or vascular tissues of maize. *Plant Cell* **15**, 583-96.

Naylor M, Murphy AM, Berry JO, Carr JP, 1998. Salicylic Acid Can Induce Resistance to Plant Virus Movement. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**, 860-8.

Neal CS, Fredericks DP, Griffiths CA, Neale AD, 2010. The characterisation of AOP2: a gene associated with the biosynthesis of aliphatic alkenyl glucosinolates in Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biol* **10**, 170.

Nebreda M, Moreno A, Perez N, Palacios I, Seco-Fernandez V, Fereres A, 2004. Activity of aphids associated with lettuce and broccoli in Spain and their efficiency as vectors of Lettuce mosaic virus. *Virus Res* **100**, 83-8.

Ng JC, Perry KL, 2004. Transmission of plant viruses by aphid vectors. *Mol Plant Pathol* **5**, 505-11.

Nicolas O, Dunnington SW, Gotow LF, Pirone TP, Hellmann GM, 1997. Variations in the VPg protein allow a potyvirus to overcome va gene resistance in tobacco. *Virology* **237**, 452-9.

Nishizawa A, Yabuta Y, Yoshida E, Maruta T, Yoshimura K, Shigeoka S, 2006. Arabidopsis heat shock transcription factor A2 as a key regulator in response to several types of environmental stress. *Plant J* **48**, 535-47.

Obayashi T, Nishida K, Kasahara K, Kinoshita K, 2011. ATTED-II updates: condition-specific gene coexpression to extend coexpression analyses and applications to a broad range of flowering plants. *Plant Cell Physiol* **52**, 213-9.

Obayashi, T., Nishida, K., Kasahara, K., and Kinoshita, K. (2011). ATTED-II updates: condition-specific gene coexpression to extend coexpression analyses and applications to a broad range of flowering plants. Plant Cell Physiol **52**, 213-219.

Oda A, Sakuta C, Masuda S, Mizoguchi T, Kamada H, Satoh S, 2003. Possible involvement of leaf gibberellins in the clock-controlled expression of XSP30, a gene encoding a xylem sap lectin, in cucumber roots. *Plant Physiol* **133**, 1779-90.

Ohta M, Guo Y, Halfter U, Zhu JK, 2003. A novel domain in the protein kinase SOS2 mediates interaction with the protein phosphatase 2C ABI2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 11771-6.

Okumoto S, Schmidt R, Tegeder M, *et al.*, 2002. High affinity amino acid transporters specifically expressed in xylem parenchyma and developing seeds of Arabidopsis. *J Biol Chem* **277**, 45338-46.

Omid A, Keilin T, Glass A, Leshkowitz D, Wolf S, 2007. Characterization of phloem-sap transcription profile in melon plants. *J Exp Bot* **58**, 3645-56.

Oparka KJ, Turgeon R, 1999. Sieve elements and companion cells-traffic control centers of the phloem. *Plant Cell* **11**, 739-50.

Pagny G, Paulstephenraj PS, Poque S, *et al.*, 2012. Family-based linkage and association mapping reveals novel genes affecting Plum pox virus infection in Arabidopsis thaliana. *New Phytol* **196**, 873-86.

Pajerowska-Mukhtar KM, Emerine DK, Mukhtar MS, 2013. Tell me more: roles of NPRs in plant immunity. *Trends Plant Sci* **18**, 402-11.

Passardi F, Cosio C, Penel C, Dunand C, 2005. Peroxidases have more functions than a Swiss army knife. *Plant Cell Rep* **24**, 255-65.

Pazhouhandeh M, Dieterle M, Marrocco K, *et al.*, 2006. F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 1994-9.

Peter KA, Gildow F, Palukaitis P, Gray SM, 2009. The C terminus of the polerovirus p5 readthrough domain limits virus infection to the phloem. *J Virol* **83**, 5419-29.

Peter KA, Liang D, Palukaitis P, Gray SM, 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.

Petzold HE, Zhao M, Beers EP, 2012. Expression and functions of proteases in vascular tissues. *Physiol Plant* **145**, 121-9.

Pfeffer S, Dunoyer P, Heim F, Richards KE, Jonard G, Ziegler-Graff V, 2002. P0 of beet Western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing. *J Virol* **76**, 6815-24.

Pieterse CM, Van Loon LC, 2004. NPR1: the spider in the web of induced resistance signaling pathways. *Curr Opin Plant Biol* **7**, 456-64.

Pietro AD, Madrid MP, Caracuel Z, Delgado-Jarana J, Roncero MI, 2003. Fusarium oxysporum: exploring the molecular arsenal of a vascular wilt fungus. *Mol Plant Pathol* **4**, 315-25.

Pirone TP, Blanc S, 1996. Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annu Rev Phytopathol* **34**, 227-47.

Portillo M, Lindsey K, Casson S, *et al.*, 2009. Isolation of RNA from laser-capture-microdissected giant cells at early differentiation stages suitable for differential transcriptome analysis. *Mol Plant Pathol* **10**, 523-35.

Postnikova OA, Nemchinov LG, 2012. Comparative analysis of microarray data in Arabidopsis transcriptome during compatible interactions with plant viruses. *Virol J* **9**, 101.

Postnikova OA, Nemchinov LG, 2012. Comparative analysis of microarray data in Arabidopsis transcriptome during compatible interactions with plant viruses. *Virology Journal* **9**, 101.

Pouwels J, Kornet N, Van Bers N, *et al.*, 2003. Identification of distinct steps during tubule formation by the movement protein of Cowpea mosaic virus. *J Gen Virol* **84**, 3485-94.

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 Acids Res* **27**, 421-5.

Puustinen P, Makinen K, 2004. Uridylylation of the potyvirus VPg by viral replicase NIb correlates with the nucleotide binding capacity of VPg. *J Biol Chem* **279**, 38103-10.

Quadt R, Kao CC, Browning KS, Hershberger RP, Ahlquist P, 1993. Characterization of a host protein associated with brome mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 1498-502.

Quan R, Lin H, Mendoza I, *et al.*, 2007. SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts

with the protein kinase SOS2 to protect Arabidopsis shoots from salt stress. *Plant Cell* **19**, 1415-31.

Rajamaki ML, Valkonen JP, 1999. The 6K2 protein and the VPg of potato virus A are determinants of systemic infection in Nicandra physaloides. *Mol Plant Microbe Interact* **12**, 1074-81.

Rask L, Andreasson E, Ekbom B, Eriksson S, Pontoppidan B, Meijer J, 2000. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. *Plant Mol Biol* **42**, 93-113.

Ratzka A, Vogel H, Kliebenstein DJ, Mitchell-Olds T, Kroymann J, 2002. Disarming the mustard oil bomb. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 11223-8.

Reinbold C, Lacombe S, Ziegler-Graff V, *et al.*, 2013. Closely related poleroviruses depend on distinct translation initiation factors to infect Arabidopsis thaliana. *Mol Plant Microbe Interact* **26**, 257-65.

Reintanz B, Lehnen M, Reichelt M, *et al.*, 2001. Bus, a bushy Arabidopsis CYP79F1 knockout mutant with abolished synthesis of short-chain aliphatic glucosinolates. *Plant Cell* **13**, 351-67.

Rentsch D, Boorer KJ, Frommer WB, 1998. Structure and function of plasma membrane amino acid, oligopeptide and sucrose transporters from higher plants. *J Membr Biol* **162**, 177-90.

Rep M, Dekker HL, Vossen JH, *et al.*, 2002. Mass spectrometric identification of isoforms of PR proteins in xylem sap of fungus-infected tomato. *Plant Physiol* **130**, 904-17.

Reutenauer A, Ziegler-Graff V, Lot H, *et al.*, 1993. Identification of beet western yellows luteovirus genes implicated in viral replication and particle morphogenesis. *Virology* **195**, 692-9.

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

Revers F, Le Gall O, Candresse T, Maule AJ, 1999. New Advances in Understanding the Molecular Biology of Plant/Potyvirus Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **12**, 367-76.

Revollon S, Strub JM, Fitchette AC, *et al.*, 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.

Riechmann JL, Heard J, Martin G, *et al.*, 2000. Arabidopsis transcription factors: genome-wide comparative analysis among eukaryotes. *Science* **290**, 2105-10. Riens B, Lohaus G, Heineke D, Heldt HW, 1991. Amino Acid and sucrose content determined in the cytosolic, chloroplastic, and vacuolar compartments and in the Phloem sap of spinach leaves. *Plant Physiol* **97**, 227-33.

Ritzenthaler C, Laporte C, Gaire F, *et al.*, 2002. Grapevine fanleaf virus replication occurs on endoplasmic reticulum-derived membranes. *J Virol* **76**, 8808-19.

Roberts AG, Oparka KJ, 2003. Plasmodesmata and the control of symplastic transport. *Plant, Cell and Environment* **26**, 103-24.

Rocher F, Chollet JF, Jousse C, Bonnemain JL, 2006. Salicylic acid, an ambimobile molecule exhibiting a high ability to accumulate in the phloem. *Plant Physiol* **141**, 1684-93.

Rodrigo G, Carrera J, Ruiz-Ferrer V, *et al.*, 2012. A meta-analysis reveals the commonalities and differences in Arabidopsis thaliana response to different viral pathogens. *PLoS One* **7**, e40526.

Rodriguez-Cerezo E, Findlay K, Shaw JG, *et al.*, 1997. The coat and cylindrical inclusion proteins of a potyvirus are associated with connections between plant cells. *Virology* **236**, 296-306.

Rojas MR, Zerbini FM, Allison RF, Gilbertson RL, Lucas WJ, 1997. Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-tocell movement proteins. *Virology* **237**, 283-95.

Roland J, Roland F, H. EM-B, Bouteau F, 2008. Atlas de biologie végétale 2. Organisation des plantes à fleurs.

Rossmann MG, Johnson JE, 1989. Icosahedral RNA virus structure. *Annu Rev Biochem* **58**, 533-73.

Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cazares B, Lucas WJ, 1999. Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants. *Development* **126**, 4405-19.

Ruzvidzo O, Donaldson L, Valentine A, Gehring C, 2011. The Arabidopsis thaliana natriuretic peptide AtPNP-A is a systemic regulator of leaf dark respiration and signals via the phloem. *J Plant Physiol* **168**, 1710-4.

Ryals JA, Neuenschwander UH, Willits MG, Molina A, Steiner HY, Hunt MD, 1996. Systemic Acquired Resistance. *Plant Cell* **8**, 1809-19.

Saenz P, Salvador B, Simon-Mateo C, Kasschau KD, Carrington JC, Garcia JA, 2002. Host-specific involvement of the HC protein in the long-distance movement of potyviruses. *J Virol* **76**, 1922-31.

Sakuta C, Oda A, Yamakawa S, Satoh S, 1998. Rootspecific expression of genes for novel glycine-rich proteins cloned by use of an antiserum against xylem sap proteins of cucumber. *Plant Cell Physiol* **39**, 1330-6.

Sakuta C, Satoh S, 2000. Vascular tissue-specific gene expression of xylem sap glycine-rich proteins in root and their localization in the walls of metaxylem vessels in cucumber. *Plant Cell Physiol* **41**, 627-38.

Salanoubat M, Genin S, Artiguenave F, *et al.*, 2002. Genome sequence of the plant pathogen Ralstonia solanacearum. *Nature* **415**, 497-502.

Salonen A, Ahola T, Kaariainen L, 2005. Viral RNA replication in association with cellular membranes. *Curr Top Microbiol Immunol* **285**, 139-73.

Sasaki T, Chino M, Hayashi H, Fujiwara T, 1998. Detection of several mRNA species in rice phloem sap. *Plant Cell Physiol* **39**, 895-7.

Satoh S, 2006. Organic substances in xylem sap delivered to above-ground organs by the roots. *J Plant Res* **119**, 179-87.

Sauerbrunn N, Schlaich NL, 2004. PCC1: a merging point for pathogen defence and circadian signalling in Arabidopsis. *Planta* **218**, 552-61.

Sawchuk MG, Donner TJ, Head P, Scarpella E, 2008. Unique and overlapping expression patterns among members of photosynthesis-associated nuclear gene families in Arabidopsis. *Plant Physiol* **148**, 1908-24.

Schaad MC, Haldeman-Cahill R, Cronin S, Carrington JC, 1996. Analysis of the VPg-proteinase (NIa) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *J Virol* **70**, 7039-48.

Schaad MC, Jensen PE, Carrington JC, 1997a. Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulumtargeted viral protein. *EMBO J* **16**, 4049-59.

Schaad MC, Lellis AD, Carrington JC, 1997b. VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *J Virol* **71**, 8624-31.

Schiex MaR, 2001. EuGene: An Eucaryotic Gene Finder that combines several sources of evidence.

Schiex, M.a.R. (2001). EuGene: An Eucaryotic Gene Finder that combines several sources of evidence. , Vol LNCS 2066, Eds. O. Gascuel and M-F. Sagot edn.

Schmid M, Davison TS, Henz SR, *et al.*, 2005. A gene expression map of Arabidopsis thaliana development. *Nat Genet* **37**, 501-6.

Schmitz J, Stussi-Garaud C, Tacke E, Prufer D, Rohde W, Rohfritsch O, 1997. In situ localization of the putative movement protein (pr17) from potato leafroll luteovirus (PLRV) in infected and transgenic potato plants. *Virology* **235**, 311-22.
Schobert C, Komor E, 1989. The differential transport of amino acids into the phloem of Ricinus communis L. seedlings as shown by the analysis of sieve-tube sap. *Planta* **177**, 342-9.

Schott G, Mari-Ordonez A, Himber C, Alioua A, Voinnet O, Dunoyer P, 2012. Differential effects of viral silencing suppressors on siRNA and miRNA loading support the existence of two distinct cellular pools of ARGONAUTE1. *Embo j* **31**, 2553-65.

Schramm F, Ganguli A, Kiehlmann E, Englich G, Walch D, Von Koskull-Doring P, 2006. The heat stress transcription factor HsfA2 serves as a regulatory amplifier of a subset of genes in the heat stress response in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* **60**, 759-72.

Schuhegger R, Nafisi M, Mansourova M, *et al.*, 2006. CYP71B15 (PAD3) catalyzes the final step in camalexin biosynthesis. *Plant Physiol* **141**, 1248-54.

Schuster J, Knill T, Reichelt M, Gershenzon J, Binder S, 2006. Branched-chain aminotransferase4 is part of the chain elongation pathway in the biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in Arabidopsis. *Plant Cell* **18**, 2664-79.

Seddas P, Boissinot S, Strub JM, Van Dorsselaer A, Van Regenmortel MH, 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.

Segarra S, Mir R, Martinez C, Leon J, 2010. Genomewide analyses of the transcriptomes of salicylic aciddeficient versus wild-type plants uncover Pathogen and Circadian Controlled 1 (PCC1) as a regulator of flowering time in Arabidopsis. *Plant Cell Environ* **33**, 11-22.

Senthil-Kumar M, Mysore KS, 2011. New dimensions for VIGS in plant functional genomics. *Trends Plant Sci* **16**, 656-65.

Seo JK, Kang SH, Seo BY, Jung JK, Kim KH, 2010. Mutational analysis of interaction between coat protein and helper component-proteinase of Soybean mosaic virus involved in aphid transmission. *Mol Plant Pathol* **11**, 265-76.

Serrano C, Gonzalez-Cruz J, Jauregui F, *et al.*, 2008. Genetic and histological studies on the delayed systemic movement of Tobacco Mosaic Virus in Arabidopsis thaliana. *BMC Genet* **9**, 59.

Shah J, 2009. Plants under attack: systemic signals in defence. *Curr Opin Plant Biol* **12**, 459-64.

Shapiro LR, Salvaudon L, Mauck KE, *et al.*, 2013. Disease interactions in a shared host plant: effects of pre-existing viral infection on cucurbit plant defense responses and resistance to bacterial wilt disease. *PLoS One* **8**, e77393.

Shi H, Ishitani M, Kim C, Zhu JK, 2000. The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na+/H+ antiporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6896-901.

Simon-Buela L, Garcia-Arenal F, 1999. Virus particles of cucumber green mottle mosaic tobamovirus move systemically in the phloem of infected cucumber plants. *Mol Plant Microbe Interact* **12**, 112-8.

Simpson AJ, Reinach FC, Arruda P, *et al.*, 2000. The genome sequence of the plant pathogen Xylella fastidiosa. The Xylella fastidiosa Consortium of the Organization for Nucleotide Sequencing and Analysis. *Nature* **406**, 151-9.

Sjolund RD, Shih CY, Jensen KG, 1983. Freezefracture analysis of phloem structure in plant tissue cultures. III. P-Protein, sieve area pores, and wounding. *J Ultrastruct Res* **82**, 198-211.

Sokolova M, Prufer D, Tacke E, Rohde W, 1997. The potato leafroll virus 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C. *FEBS Lett* **400**, 201-5.

Sonderby IE, Geu-Flores F, Halkier BA, 2010. Biosynthesis of glucosinolates--gene discovery and beyond. *Trends Plant Sci* **15**, 283-90.

Spetz C, Valkonen JP, 2004. Potyviral 6K2 protein long-distance movement and symptom-induction functions are independent and host-specific. *Mol Plant Microbe Interact* **17**, 502-10.

Stadler R, Wright KM, Lauterbach C, *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**, 319-31.

Stanley Kim H, Yu Y, Snesrud EC, *et al.*, 2005. Transcriptional divergence of the duplicated oxidative stress-responsive genes in the Arabidopsis genome. *Plant J* **41**, 212-20.

Tacke E, Prufer D, Schmitz J, Rohde W, 1991. The potato leafroll luteovirus 17K protein is a single-stranded nucleic acid-binding protein. *J Gen Virol* **72** (Pt 8), 2035-8.

Tacke E, Schmitz J, Prufer 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.

Takano J, Noguchi K, Yasumori M, *et al.*, 2002. Arabidopsis boron transporter for xylem loading. *Nature* **420**, 337-40. Takeda A, Kaido M, Okuno T, 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**, 1751-61.

Taliansky M, Roberts IM, Kalinina N, *et al.*, 2003. An umbraviral protein, involved in long-distance RNA movement, binds viral RNA and forms unique, protective ribonucleoprotein complexes. *J Virol* **77**, 3031-40.

Taliansky ME, Brown JW, Rajamaki ML, Valkonen JP, Kalinina NO, 2010. Involvement of the plant nucleolus in virus and viroid infections: parallels with animal pathosystems. *Adv Virus Res* **77**, 119-58.

Tamborindeguy C, Bereman MS, Deblasio S, *et al.*, 2013. Genomic and Proteomic Analysis of Schizaphis graminum Reveals Cyclophilin Proteins Are Involved in the Transmission of Cereal Yellow Dwarf Virus. *PLoS One* **8**, e71620.

Tantikanjana T, Mikkelsen MD, Hussain M, Halkier BA, Sundaresan V, 2004. Functional analysis of the tandem-duplicated P450 genes SPS/BUS/CYP79F1 and CYP79F2 in glucosinolate biosynthesis and plant development by Ds transposition-generated double mutants. *Plant Physiol* **135**, 840-8.

Tavert-Roudet G, Abdul-Razzak A, Doublet B, *et al.*, 2012. The C terminus of lettuce mosaic potyvirus cylindrical inclusion helicase interacts with the viral VPg and with lettuce translation eukaryotic initiation factor 4E. *J Gen Virol* **93**, 184-93.

Taylor DN, Carr JP, 2000. The GCD10 subunit of yeast eIF-3 binds the methyltransferase-like domain of the 126 and 183 kDa replicase proteins of tobacco mosaic virus in the yeast two-hybrid system. *J Gen Virol* **81**, 1587-91.

Tegeder M, 2012. Transporters for amino acids in plant cells: some functions and many unknowns. *Curr Opin Plant Biol* **15**, 315-21.

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.

Textor S, De Kraker JW, Hause B, Gershenzon J, Tokuhisa JG, 2007. MAM3 catalyzes the formation of all aliphatic glucosinolate chain lengths in Arabidopsis. *Plant Physiol* **144**, 60-71.

Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL, 2009. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* **25**, 1105-11.

Trapnell C, Williams BA, Pertea G, *et al.*, 2010. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* **28**, 511-5. Trapnell, C., Pachter, L., and Salzberg, S.L. (2009). TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. Bioinformatics *25*, 1105-1111.

Trapnell, C., Williams, B.A., Pertea, G., Mortazavi, A., Kwan, G., van Baren, M.J., Salzberg, S.L., Wold, B.J., and Pachter, L. (2010). Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. Nat Biotechnol *28*, 511-515.

Turgeon R, 1989. The sink-source transition in leaves. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **40**, 119-38.

Turgeon R, Medville R, 1998. The absence of phloem loading in willow leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 12055-60.

Turgeon R, Wolf S, 2009. Phloem Transport: Cellular Pathways and Molecular Trafficking. *Annual Review of Plant Biology* **60**, 207-21.

Uanschou C, Ronceret A, Von Harder M, *et al.*, 2013. Sufficient amounts of functional HOP2/MND1 complex promote interhomolog DNA repair but are dispensable for intersister DNA repair during meiosis in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**, 4924-40.

Urcuqui-Inchima S, Haenni AL, Bernardi F, 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res* **74**, 157-75.

Vallade J, 2001. Structure et développement de la plante.

Valli A, Martin-Hernandez AM, Lopez-Moya JJ, Garcia JA, 2006. RNA silencing suppression by a second copy of the P1 serine protease of Cucumber vein yellowing ipomovirus, a member of the family Potyviridae that lacks the cysteine protease HCPro. *J Virol* **80**, 10055-63.

Van Bel AJ, 1996. Interaction between sieve element and companion cell and the consequences for photoassimilate distribution. Two structural hardware frames with associated physiological software packages in dicotyledons? *J Exp Bot* **47 Spec No**, 1129-40.

Van Den Heuvel JF, Bruyere A, Hogenhout SA, *et al.*, 1997. The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to Buchnera GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *J Virol* **71**, 7258-65.

Van Der Wilk F, Verbeek M, Dullemans AM, Van Den Heuvel JF, 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.

Van Lent J, Wellink J, Goidbach R, 1990. Evidence for the involvement of the 58K and 48K proteins in the intercellular movement of cowpea mosaic virus. *Journal of General Virology* **71**, 219-23. Veidt I, Bouzoubaa SE, Leiser RM, *et al.*, 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, *et al.*, 1988. Nucleotide sequence of beet western yellows virus RNA. *Nucleic Acids Res* **16**, 9917-32.

Verchot J, Carrington JC, 1995. Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. *J Virol* **69**, 3668-74.

Verchot J, Driskel BA, Zhu Y, Hunger RM, Littlefield LJ, 2001. Evidence that soilborne wheat mosaic virus moves long distance through the xylem in wheat. *Protoplasma* **218**, 57-66.

Verchot J, Koonin EV, Carrington JC, 1991. The 35kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology* **185**, 527-35.

Vignard J, Siwiec T, Chelysheva L, *et al.*, 2007. The interplay of RecA-related proteins and the MND1-HOP2 complex during meiosis in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet* **3**, 1894-906.

Vijayapalani P, Maeshima M, Nagasaki-Takekuchi N, Miller WA, 2012. Interaction of the trans-frame potyvirus protein P3N-PIPO with host protein PCaP1 facilitates potyvirus movement. *PLoS Pathog* **8**, e1002639.

Vogel F, Hofius D, Sonnewald U, 2007. Intracellular trafficking of Potato leafroll virus movement protein in transgenic Arabidopsis. *Traffic* **8**, 1205-14.

Voinnet O, 2005. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet* **6**, 206-20.

Voinnet O, Lederer C, Baulcombe DC, 2000. A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in Nicotiana benthamiana. *Cell* **103**, 157-67.

Vuorinen AL, Kelloniemi J, Valkonen JP, 2011. Why do viruses need phloem for systemic invasion of plants? *Plant Sci* **181**, 355-63.

Waigmann E, Lucas WJ, Citovsky V, Zambryski P, 1994. Direct functional assay for tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein and identification of a domain involved in increasing plasmodesmal permeability. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 1433-7.

Waigmann E, Ueki S, Trutnyeva K, Citovsky V, 2004. The Ins and Outs of Nondestructive Cell-to-Cell and Systemic Movement of Plant Viruses. *Critical Reviews in Plant Sciences* **23**, 195-250. Waltermann A, Maiss E, 2006. Detection of 6K1 as a mature protein of 6 kDa in plum pox virus-infected Nicotiana benthamiana. *J Gen Virol* **87**, 2381-6.

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.

Wang JY, Chay C, Gildow FE, Gray SM, 1995. Readthrough protein associated with virions of barley yellow dwarf luteovirus and its potential role in regulating the efficiency of aphid transmission. *Virology* **206**, 954-62.

Wang RY, Nagy PD, 2008. Tomato bushy stunt virus co-opts the RNA-binding function of a host metabolic enzyme for viral genomic RNA synthesis. *Cell Host Microbe* **3**, 178-87.

Wang S, Guo L, Allen E, Miller WA, 1999. A potential mechanism for selective control of cap-independent translation by a viral RNA sequence in cis and in trans. *RNA* **5**, 728-38.

Wang X, Ullah Z, Grumet R, 2000. Interaction between zucchini yellow mosaic potyvirus RNA-dependent RNA polymerase and host poly-(A) binding protein. *Virology* **275**, 433-43.

Wang Y, Zhang WZ, Song LF, Zou JJ, Su Z, Wu WH, 2008. Transcriptome analyses show changes in gene expression to accompany pollen germination and tube growth in Arabidopsis. *Plant Physiol* **148**, 1201-11.

Wang YH, Gehring C, Irving HR, 2011. Plant natriuretic peptides are apoplastic and paracrine stress response molecules. *Plant Cell Physiol* **52**, 837-50.

Wei T, Zhang C, Hong J, *et al.*, 2010. Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathog* **6**, e1000962.

Weinl S, Kudla J, 2009. The CBL-CIPK Ca(2+)decoding signaling network: function and perspectives. *New Phytol* **184**, 517-28.

Wen RH, Hajimorad MR, 2010. Mutational analysis of the putative pipo of soybean mosaic virus suggests disruption of PIPO protein impedes movement. *Virology* **400**, 1-7.

Westwood JH, Groen SC, Du Z, *et al.*, 2013. A trio of viral proteins tunes aphid-plant interactions in Arabidopsis thaliana. *PLoS One* **8**, e83066.

Whitham S, Dinesh-Kumar SP, Choi D, Hehl R, Corr C, Baker B, 1994. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell* **78**, 1101-15.

Whitham SA, Anderberg RJ, Chisholm ST, Carrington JC, 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**, 569-82.

Whitham SA, Quan S, Chang HS, *et al.*, 2003. Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible Arabidopsis thaliana plants. *Plant J* **33**, 271-83.

Whitham SA, Yamamoto ML, Carrington JC, 1999. Selectable viruses and altered susceptibility mutants in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 772-7.

Whitham SA, Yang C, Goodin MM, 2006. Global impact: elucidating plant responses to viral infection. *Mol Plant Microbe Interact* **19**, 1207-15.

Whitham, S.A., Quan, S., Chang, H.S., Cooper, B., Estes, B., Zhu, T., Wang, X., and Hou, Y.M. (2003). Diverse RNA viruses elicit the expression of common sets of genes in susceptible Arabidopsis thaliana plants. Plant J *33*, 271-283.

Wittstock U, Burow M, 2010. Glucosinolate breakdown in Arabidopsis: mechanism, regulation and biological significance. *Arabidopsis Book* **8**, e0134.

Wooding FBP, 1967. Endoplasmic reticulum aggregates of ordered structure. *Planta* **76**, 205-8.

Xiang HY, Dong SW, Shang QX, *et al.*, 2011. Molecular characterization of two genotypes of a new polerovirus infecting brassicas in China. *Arch Virol* **156**, 2251-5.

Yadeta KA, Bp JT, 2013. The xylem as battleground for plant hosts and vascular wilt pathogens. *Front Plant Sci* **4**, 97.

Yang C, Guo R, Jie F, *et al.*, 2007. Spatial analysis of arabidopsis thaliana gene expression in response to Turnip mosaic virus infection. *Mol Plant Microbe Interact* **20**, 358-70.

Yang X, Thannhauser TW, Burrows M, Cox-Foster D, Gildow FE, Gray SM, 2008. Coupling genetics and proteomics to identify aphid proteins associated with vector-specific transmission of polerovirus (luteoviridae). *J Virol* **82**, 291-9.

Yatusevich R, Mugford SG, Matthewman *C, et al.*, 2010. Genes of primary sulfate assimilation are part of the glucosinolate biosynthetic network in Arabidopsis thaliana. *Plant J* **62**, 1-11.

Yoo BC, Kragler F, Varkonyi-Gasic E, *et al.*, 2004. A systemic small RNA signaling system in plants. *Plant Cell* **16**, 1979-2000.

Yoon JY, Choi SK, Palukaitis P, Gray SM, 2011. Agrobacterium-mediated infection of whole plants by yellow dwarf viruses. *Virus Res* **160**, 428-34. Zander M, Chen S, Imkampe J, Thurow C, Gatz C, 2012. Repression of the Arabidopsis thaliana jasmonic acid/ethylene-induced defense pathway by TGA-interacting glutaredoxins depends on their C-terminal ALWL motif. *Mol Plant* **5**, 831-40.

Zanetti ME, Chang IF, Gong F, Galbraith DW, Bailey-Serres J, 2005. Immunopurification of polyribosomal complexes of Arabidopsis for global analysis of gene expression. *Plant Physiol* **138**, 624-35.

Zhang S, Sun L, Kragler F, 2009. The phloemdelivered RNA pool contains small noncoding RNAs and interferes with translation. *Plant Physiol* **150**, 378-87.

Zhang Y, Tessaro MJ, Lassner M, Li X, 2003. Knockout analysis of Arabidopsis transcription factors TGA2, TGA5, and TGA6 reveals their redundant and essential roles in systemic acquired resistance. *Plant Cell* **15**, 2647-53.

Zhang ZP, I.T. B, 1997. Transport of [2-14C]jasmonic acid from leaves to roots mimics wound-induced changes in endogenous jasmonic acid pools in Nicotiana sylvestris. *Planta* **203**, 436-41.

Zhao C, Craig JC, Petzold HE, Dickerman AW, Beers EP, 2005. The xylem and phloem transcriptomes from secondary tissues of the Arabidopsis root-hypocotyl. *Plant Physiol* **138**, 803-18.

Zhao J, Last RL, 1996. Coordinate regulation of the tryptophan biosynthetic pathway and indolic phytoalexin accumulation in Arabidopsis. *Plant Cell* **8**, 2235-44.

Zheng X, Zhu J, Kapoor A, Zhu JK, 2007. Role of Arabidopsis AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *Embo j* **26**, 1691-701.

Zhou CJ, Xiang HY, Zhuo T, Li DW, Yu JL, Han CG, 2012. Nucleotide sequence of a chickpea chlorotic stunt virus relative that infects pea and faba bean in China. *Arch Virol* **157**, 1393-6.

Zhou N, Tootle TL, Tsui F, Klessig DF, Glazebrook J, 1998. PAD4 functions upstream from salicylic acid to control defense responses in Arabidopsis. *Plant Cell* **10**, 1021-30.

Ziegler-Graff V, Brault V, Mutterer J, *et al.*, 1996. The coat protein of beet western yellows luteovirus is essential for systemic infection but the viral gene products P29 and P19 are dispensable for systemic infection and aphid transmission. *Mol Plant Microbe Interact* **9**, 501-10.

Zilian E, Maiss E, 2011. Detection of plum pox potyviral protein-protein interactions in planta using an optimized mRFP-based bimolecular fluorescence complementation system. *J Gen Virol* **92**, 2711-23.

## Annexes

## Annexes

Annexe 1 : Intensités de fluorescence mesurées sur les puces CATMA pour la détection des gènes codant pour la GFP et la résistance à la kanamycine (la résistance à la kanamycine étant utilisée pour sélectionner les plantes transgéniques pSUC2::GFP). Le premier tableau correspond aux valeurs du LMV et le second, à celle du TuYV. Toutes les valeurs sont supérieures à la valeur du signal moyen de la puce pour chaque échantillon indiquant l'expression de ces gènes sauf pour un des fragments PCR détectant le transcrit de la GFP dans l'échantillon TuYV de l'expérience Exp1.

		Exp1		Exp3		Exp4		Moyenne	
LMV	fonction	LMV	T- LMV	LMV	T- LMV	LMV	T- LMV	LMV	T- LMV
GFP 1	Green Fluorescent Protein	7,01	7,08	7,70	6,88	7,96	7,77	7,55	7,24
GFP 2	Green Fluorescent Protein	7,09	7,13	7,74	7,17	7,67	7,57	7,50	7,29
Kanamycine 1	kanamycin:neomycin phosphotransferase	8,29	8,24	9,79	9,34	8,12	8,75	8,73	8,78
Kanamycine 2	kanamycin:neomycin phosphotransferase	8,60	8,50	10,79	10,28	8,93	9,52	9,44	9,43
Signal moyen de la puce		6,55	6,54	6,64	6,62	6,47	6,46	6,55	6,54

		Exp1		Exp3		Exp4		Моуе	enne
TuYV	fonction	TuYV	pBIN vide	TuYV	pBIN vide	TuYV	pBIN vide	TuYV	pBIN vide
GFP 1	Green Fluorescent Protein	6,96	6,96	8,41	7,32	7,64	7,65	7,67	7,31
GFP 2	Green Fluorescent Protein	6,60	6,90	8,19	7,19	7,62	7,62	7,47	7,24
Kanamycine 1	kanamycin:neomycin phosphotransferase	7,88	8,21	9,77	7,34	8,03	8,61	8,56	8,06
Kanamycine 2	kanamycin:neomycin phosphotransferase	7,86	8,07	10,50	8,14	8,74	9,48	9,03	8,56
Signal moyen de la puce		6,69	6,69	6,63	6,61	6,64	6,63	6,65	6,64

Annexe 2 : Tableau LMVtot regroupant l'ensemble des gènes identifiés par RNAseq et puces CATMA. Les quatre gènes sur fond bleu au milieu sont les gènes communs aux deux analyses.

	Gènes	Description	GO Fonction moléculaire	GO Processus biologique	GO composant cellulaire
	AT4G04610	APR1 (5'-adenylylsulfate reductase 1)	adenylyl-sulfate reductase activity	sulfate assimilation, sulfate reduction	chloroplast
	AT1G62180	APR2 (5'-adenylylsulfate reductase 2)	adenylyl-sulfate reductase and phosphoadenylyl-sulfate reductase (thioredoxin) activity	oxidation-reduction process, sulfate assimilation, phosphoadenylyl sulfate reduction	chloroplast
	AT5G24660	LSU2 (response to low sulfur 2)	/	regulation of defense response	/
	AT3G49570	LSU3 (response to low sulfur 3)	/	/	/
	AT5G24655	LSU4 (response to low sulfur 4)	/	/	/
	AT3G22890	APS1 (ATP sulfurylase 1)	sulfate adenylyltransferase (ATP) activity	response to cadmium ion, selenium compound metabolic process	chloroplast
	AT5G48850	ATSDI1 (Sulphur deficiency-induced 1)	binding	cellular response to sulfur starvation, regulation of sulfur utilization	/
	AT3G46230	HSP17.4 (heat shock protein 17.4)	/	response to heat	/
	AT2G29500	HSP17.6B-CI (17.6 kDa class I small hsp)	/	response to heat, oxidative stress	cytoplasm
	ATCG00790	RPL16 (ribosomal protein L16)	structural constituent of ribosome	translation	chloroplast
Bucoc	AT1G31930	XLG3 (extra-large GTP- binding protein 3)	signal transducer activity	signal transduction	nucleus
	ATCG00340	PSAB	chlorophyll binding	photosynthesis, light harvesting in photosystem I and II	chloroplast
	ATCG00300	YCF9	/	photosynthesis	chloroplast
CATMA	AT5G24420	PGL5 (6-phospho gluconolactonase 5)	carbohydrate metabolic process	carbohydrate metabolic process, pentose-phosphate shunt	/
	ATCG00280	PSBC	chlorophyll binding	photosynthesis, light reaction	chloroplast
	AT4G38470	ACT-like protein tyrosine kinase family protein	protein kinase activity, protein serine/threonine/tyrosine kinase activity	protein phosphorylation	cytoplasm
	ATCG00480	ATPB (ATP synthase subunit beta)	ATP biosynthetic process	ATP synthesis coupled proton transport, defense response to fungus, response to cold	chloroplast
	ATCG00380	RPS4 (chloroplast ribosomal protein S4)	structural constituent of ribosome	translation	chloroplast
	AT5G52640	HSP81-1 (HEAT SHOCK PROTEIN 81-1)	protein binding	defense response to bacterium, response to heat	/
	AT3G49620	DIN11 (DARK INDUCIBLE 11)	iron ion binding	aging, cellular response to starvation, oxidation- reduction process	/
	AT4G38620	MYB4 (myb domain protein 4)	DNA binding	negative regulation of transcription, response to jasmonic acid stimulus	/
	AT4G11130	RDR2 (RNA-dependant RNA polymerase 2)	RNA-directed RNA polymerase activity	long-distance posttranscriptional gene silencing, production of siRNA	nucleolus
	AT3G55970	JRG21 (jasmonate- regulated protein)	iron ion binding	oxidation-reduction process	/
	ATCG00800	/	structural constituent of ribosome	translation	chloroplast
	ATCG00710	PSBH (photosystem II reaction center protein H)	phosphate ion binding	photosynthesis, light harvesting in photosystem II	chloroplast

	AT1G75270	DHAR2 (dehydro ascorbate reductase 2)	glutathione binding	oxidation-reduction process, protein glutathionylation	cytoplasm, plasma
		,			membrane
	AT3G56200	amino acid transporter family protein	amino acid transmembrane transporter activity	amino acid transmembrane transport, amino acid transport	membrane
	AT2G46240	BAG6 (BCL-2-associated athanogene 6)	calmodulin binding	defense response to fungus, induction of programmed cell death. response to heat	plasmodesma
	ATCG00040	MATK (maturase K)	RNA binding	RNA splicing, metabolic process	chloroplast
	AT1G75280	Isoflavone reductase-P3	binding	response to cadmium ion, to oxidative stress	plasma membrane
	AT1G14870	PCR2 (cadmium resistance protein 2)	/	response to oxidative stress	plasma membrane
	AT2G47480	/	/	/	/
	AT5G57560	TCH4 (TOUCH 4)	hydrolase activity	response to auxin stimulus, to brassinosteroid stimulus, to cold, to heat	cell wall
	AT2G38170	CAX1 (Cation Exchanger 1)	calcium ion transmembrane transporter activity	calcium ion transport response to salt stress	membrane, vacuole
	AT1G11610	CYP71A18 (cytochrome P450 71A18)	heme binding, iron ion binding, oxygen binding	oxidation-reduction process	/
	AT5G35525	PLAC8 family protein	/	/	/
	AT4G24570	DIC2 (dicarboxylate carrier 2)	dicarboxylic acid transmembrane transporter activity	transmembrane transport	mitochondria
	AT1G74450	/	/	/	/
	AT5G03210	G03210 DIP2 (DBP-interacting protein 2) / defense response to virus		/	
	AT5G02130	NDP1 (kinesin light chain- like protein)	binding	/	/
	AT5G10380	RING1 (E3 ubiquitin- protein ligase)	ubiquitin-protein ligase activity	programmed cell death, response to bacterium	plasma membrane
	AT3G16770	EBP (ethylene-responsive transcription factor RAP2- 3)	DNA binding, protein binding	cell death, response to ethylene stimulus, to jasmonic acid stimulus, to other organism, to stress	cytoplasm, nucleus, plasma membrane
	AT1G14880	PCR1 (cadmium resistance protein 1)	/	/	vacuole
	AT1G13330	AHP2 (homologous- pairing protein 2)	/	chiasma assembly	/
	AT5G55450	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	lipid binding	lipid transport, response to other organism	endoplasmic reticulum
Gènes	AT3G22600	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	lipid binding	lipid transport	anchored to membrane
communs puces	AT2G14610	PR1 (pathogenesis- related protein 1)	/	defense response, response to vitamin B1, systemic acquired resistance	cell wall, extracellular region
RNAseq	AT1G75040	PR5 (pathogenesis- related protein 5)	protein binding	response to virus, systemic acquired resistance	apoplast, cell wall, vacuole
	AT1G26380	FAD-binding and BBE domain-containing protein	catalytic activity, electron carrier activity, oxidoreductase activity	cellular response to hypoxia, oxidation-reduction process	endoplasmic reticulum
	AT1G48598	CPuORF31 (Conserved peptide upstream open reading frame 31)	/	/	/
	AT3G60140	DIN2 (dark inducible 2)	cation binding	aging, metabolic process	/
RNAseq	AT3G16670	Pollen Ole e 1 (allergen and extensin family protein)	/	response to oxidative stress	/
	AT1G73602	CPuORF32 (Conserved peptide upstream open reading frame 32)	/	/	mitochondria
	AT5G64395		/	/	/

AT1G52400	BGL1 (beta glucosidase 18) BCAT-1 (branched-chain	catalytic activity, cation binding, hydrolase activity, branched-chain-amino-acid	defense response to fungus, response to abiotic stimulus, to abscisic acid stimulus branched-chain amino acid	chloroplast, ER, nucleus, peroxisome, plasmodesma, vacuole
AT1G10060	amino acid transaminase 1)	transaminase activity, catalytic activity	metabolic process, toxin catabolic process	cytoplasm, mitochondria
AT5G24770	VSP2 (vegetative storage protein 2)	acid phosphatase activity	defense response to insect, response to jasmonic acid stimulus, response to oxidative stress	chloroplast, cytosolic ribosome, vacuole
AT5G46730	glycine-rich protein	/	/	/
AT1G13340	Regulator of Vps4 activity in the MVB pathway protein,	1	innate immune response, response to oxidative stress, salicylic acid biosynthetic process	cytoplasm
AT5G49730	ATFRO6 (ferric reduction oxidase 6)	ferric-chelate reductase activity	oxidation-reduction process, response to light stimulus	nucleus, plasma membrane
AT3G57260	BGL2 (beta-1,3-glucanase 2) or PR2 (pathogenesis- related protein 2)	catalytic activity, cation binding, cellulase activity, glucan exo- 1,3-beta-glucosidase activity, hydrolase activity	defense response to bacterium and fungus, regulation of response to biotic stimulus, systemic acquired resistance, salicylic acid mediated signaling pathway	apoplast, cell wall, chloroplast, vacuole
AT3G22620	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein,	lipid binding	lipid transport, nitrate transport, response to nitrate	chloroplast envelope, plasma membrane
AT3G60120	BGLU27 (beta glucosidase 27)	catalytic activity, cation binding, hydrolase activity	carbohydrate metabolic process	nucleus
AT5G13080	WRKY75 (WRKY DNA- binding protein 75)	sequence-specific DNA binding, transcription factor activity	regulation of DNA-dependent transcription in response to stress, regulation of transcription, response to ethylene stimulus	nucleus
AT1G74590	GSTU10 (glutathione S- transferase TAU 10)	glutathione transferase activity	response to cyclopentenone, toxin catabolic process	cytoplasm
AT4G23700	ATCHX17 (cation/H+ exchanger 17)	monovalent cation:hydrogen antiporter activity	cation transport, protein targeting to vacuole, regulation of pH	membrane, late endosome, nucleus
AT2G30770	CYP71A13 (cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 13)	electron carrier activity, oxidoreductase activity	camalexin biosynthetic process, defense response to bacterium, defense response to fungus, jasmonic acid response to ethylene stimulus, salicylic acid biosynthetic process, systemic acquired resistance	/
ATCG00020	PSBA (photosystem II reaction center protein A)	electron transporter, protein binding	photosynthetic electron transport in photosystem II, photosystem II assembly	chloroplast
AT5G46050	ATPTR3 (peptide transporter 3)	dipeptide and tri peptide transporter activity	defense response to bacterium, response to jasmonic acid stimulus, response to salicylic acid stimulus, response to wounding, dipeptide and tripeptide transport	plasma membrane

AT3G26830	PAD3 (Cytochrome P450 superfamily protein) or CYP71B15	electron carrier activity, oxidoreductase activity	camalexin biosynthetic process, defense response to fungus, jasmonic acid mediated signaling pathway, response to abscisic acid stimulus,response to ethylene stimulus, salicylic acid biosynthetic process, systemic acquired resistance	endoplasmic reticulum
AT1G24040	Acyl-CoA N- acyltransferases (NAT) superfamily protein	N-acetyltransferase activity	/	chloroplast
ATCG00590	ORF31 electron carriers	electron carrier activity	DNA-dependent transcription, photosynthesis	chloroplast
AT1G13520	Protein of unknown function (DUF1262)	/	/	/
AT3G18250	Putative membrane lipoprotein	/	amino acid import	endoplasmic reticulum
AT2G30750	CYP71A12 (cytochrome P450, family 71, subfamily A, polypeptide 12)	electron carrier activity, oxidoreductase activity	oxidation-reduction process, response to bacterium	/
AT1G06137	/	/	/	/
AT3G15534	/	/	/	extracellular region
ATCG00510	PSAI (photsystem I subunit I)	/	DNA-dependent transcription, photosynthesis	chloroplast
AT3G11000	DCD (Development and Cell Death) domain protein	/	meristem development, regulation of anthocyanin biosynthetic process, specification of floral organ identity	nucleus
AT5G13181	/	/	/	/
AT5G40180	/	/	/	/
AT1G13480	Protein of unknown function (DUF1262)	/	/	/
AT1G24735	/	O-methyltransferase activity	/	cytoplasm
AT5G42203	/	/	/	/
AT3G48298	/	/	/	/
AT2G31018	/	/	/	/
AT1G32650	/	/	/	mitochondria
AT3G52302	/	/	/	mitochondria
AT2G45161	/	/	/	mitochondria
AT4G35589	/	/	/	mitochondria
AT3G26539	/	/	/	mitochondria
AT2G20784	/	/	/	/
AT1G65541	/	/	/	/
AT2G07684	/	/	/	/
AT1G18220	ATPUP9 (purine permease 9)	purine nucleobase transmembrane transporter activity	nucleobase-containing compound transport, purine nucleobase transport	membrane
AT1G07885	/	/	/	/
AT5G12450	FBD-like domain family protein	/	/	/
AT3G17845	/	/	/	mitochondria
AT4G28088	Low temperature and salt responsive protein family	/	/	membrane
AT1G05220	Transmembrane protein 97, predicted	/	/	mitochondria
AT2G26511	/	/	/	mitochondria
AT2G36632	/	/	/	/
AT3G45851	/	/	/	nucleus

Annexe 3 : Taux d'enrichissement en termes d'ontologie dans les analyses de RNAseq des trois expériences de protoplastes de CC infectés par le LMV. Cette recherche a été effectuée sur les résultats de RNAseq avec un FDR < 10%. Ne sont considérés dans ces tableaux que les enrichissements dans les processus biologiques.

Exp1	Terme de GO	Nom	Taux d'enrichissement
1	GO:0034976	response to endoplasmic reticulum stress	202
2	GO:0010120	camalexin biosynthetic process	50,5
3	GO:0000103	sulfate assimilation	38
4	GO:0009644	response to high light intensity	29,5
5	GO:0006534	cysteine metabolic process	25,33333333
6	GO:0009408	response to heat	20,79411765
7	GO:0009642	response to light intensity	16,85714286
8	GO:0009069	serine family amino acid metabolic process	13,466666667
9	GO:0045454	cell redox homeostasis	10,58139535
10	GO:0042542	response to hydrogen peroxide	10,11428571
11	GO:0050832	defense response to fungus	9,730769231
12	GO:0006457	protein folding	8,518072289
13	GO:0000302	response to reactive oxygen species	8,428571429
14	GO:0009620	response to fungus	7,973684211
15	GO:0006979	response to oxidative stress	7,551724138
16	GO:0019725	cellular homeostasis	6,408450704
17	GO:0009266	response to temperature stimulus	6,215384615
18	GO:0009617	response to bacterium	4,72
19	GO:0006970	response to osmotic stress	4,105691057
20	GO:0009651	response to salt stress	3,99122807
21	GO:0051707	response to other organism	3,258064516
22	GO:0009607	response to biotic stimulus	3,177142857
23	GO:0006952	defense response	2,688212928

Exp2	Terme de GO	Nom	Taux d'enrichissement
1	GO:0009772	photosynthetic electron transport in photosystem II	63,5
2	GO:0009269	response to desiccation	25,4
3	GO:0009767	photosynthetic electron transport chain	25,3
4	GO:0015979	photosynthesis	14,80701754
5	GO:0019684	photosynthesis, light reaction	9,833333333
6	GO:0022900	electron transport chain	8,85483871
7	GO:0006790	sulfur compound metabolic process	5,462962963

Exp3	Terme de GO	Nom	Taux d'enrichissement
1	GO:0009627	systemic acquired resistance	62,5
2	GO:0009814	defense response, incompatible interaction	25
3	GO:0006857	oligopeptide transport	19,04761905
4	GO:0015833	peptide transport	18,18181818
5	GO:0042742	defense response to bacterium	9,090909091
6	GO:0009617	response to bacterium	8
7	GO:0045087	innate immune response	7,692307692
8	GO:0006955	immune response	6,542056075
9	GO:0051707	response to other organism	6,451612903
10	GO:0009607	response to biotic stimulus	6,32183908

Moyenne	Terme de GO	Nom	Taux d'enrichissement
1	GO:0009700	indole phytoalexin biosynthetic process	125
2	GO:0010120	camalexin biosynthetic process	125
3	GO:0009627	systemic acquired resistance	41,666666667
4	GO:0051707	response to other organism	7,258064516
5	GO:0009607	response to biotic stimulus	6,428571429

Annexe 4 : Taux d'enrichissement en termes d'ontologie dans les analyses de puces CATMA des trois expériences de protoplastes de CC infectés par le LMV. Ne sont considérés dans ces tableaux que les enrichissements dans les processus biologiques.

Exp1	Terme de GO	Nom	Taux d'enrichissement
1	GO:0009652	thigmotropism	109
2	GO:0043068	positive regulation of programmed cell death	109
3	GO:0034976	response to endoplasmic reticulum stress	72,33333333
4	GO:0010942	positive regulation of cell death	54,5
5	GO:0010252	auxin homeostasis	40,75
6	GO:0009644	response to high light intensity	39,54545455
7	GO:0009408	response to heat	32,28125
8	GO:0006534	cysteine metabolic process	27,16666667
9	GO:0009642	response to light intensity	27,15
10	GO:0009765	photosynthesis, light harvesting	24,1111111
11	GO:0043067	regulation of programmed cell death	20,375
12	GO:0009615	response to virus	18,08333333
13	GO:0009809	lignin biosynthetic process	16,69230769
14	GO:0016998	cell wall macromolecule catabolic process	16,3
15	GO:0009767	photosynthetic electron transport chain	14,81818182
16	GO:0009069	serine family amino acid metabolic process	14,46666667
17	GO:0042542	response to hydrogen peroxide	12,79411765
18	GO:0019684	photosynthesis, light reaction	12,66666667
19	GO:0015979	photosynthesis	11,98305085
20	GO:0009808	lignin metabolic process	11,42105263
21	GO:0006979	response to oxidative stress	10,74418605
22	GO:0000302	response to reactive oxygen species	10,35714286
23	GO:0006457	protein folding	9,819277108
24	GO:0009266	response to temperature stimulus	9,765625
25	GO:0045454	cell redox homeostasis	8,636363636
26	GO:0009617	response to bacterium	7,337837838
27	GO:0006790	sulfur compound metabolic process	7,037037037
28	GO:0042742	defense response to bacterium	6,909090909
29	GO:0009699	phenylpropanoid biosynthetic process	6,634146341
30	GO:0019725	cellular homeostasis	6,041666667
31	GO:0009416	response to light stimulus	5,659722222
32	GO:0019748	secondary metabolic process	5,554744526
33	GO:0009314	response to radiation	5,506756757
34	GO:0006970	response to osmotic stress	5,344262295
35	GO:0009743	response to carbohydrate stimulus	5,344262295
36	GO:0046686	response to cadmium ion	5,323529412
37	GO:0009651	response to salt stress	5,292035398
38	GO:0051707	response to other organism	4,941558442
39	GO:0009607	response to biotic stimulus	4,710982659
40	GO:0010038	response to metal ion	4,414634146
41	GO:0009725	response to hormone stimulus	3,020833333

Exp4	Terme de GO	Nom	Taux d'enrichissement
1	GO:0080028	nitrile biosynthetic process	303
2	GO:0008535	respiratory chain complex IV assembly	151,5
3	GO:0019760	glucosinolate metabolic process	58,30769231
4	GO:0015886	heme transport	50,5
5	GO:0015992	proton transport	30,31428571
6	GO:0006790	sulfur compound metabolic process	22,4444444
7	GO:0007568	aging	20,68181818
8	GO:0006164	purine nucleotide biosynthetic process	19,29090909
9	GO:0006163	purine nucleotide metabolic process	18,61403509
10	GO:0009259	ribonucleotide metabolic process	18,61403509
11	GO:0009165	nucleotide biosynthetic process	16,07575758
12	GO:0009117	nucleotide metabolic process	15,86046512
13	GO:0016052	carbohydrate catabolic process	14,94366197
14	GO:0055085	transmembrane transport	13,43037975
15	GO:0022900	electron transport chain	9,46875
16	GO:0019748	secondary metabolic process	8,782608696
17	GO:0044262	cellular carbohydrate metabolic process	6,469512195
18	GO:0006812	cation transport	6,204678363
19	GO:0006811	ion transport	5,826923077

Moyenne	Terme de GO	Nom	Taux d'enrichissement
1	GO:0043068	positive regulation of programmed cell death	377
2	GO:0010942	positive regulation of cell death	188,5
3	GO:0000103	sulfate assimilation	141,5
4	GO:0009612	response to mechanical stimulus	94,25
5	GO:0009408	response to heat	25,48648649
6	GO:0015979	photosynthesis	15,45901639
7	GO:0006790	sulfur compound metabolic process	13,72727273
8	GO:0009266	response to temperature stimulus	8,511278195
9	GO:0009605	response to external stimulus	7,924369748
10	GO:0051707	response to other organism	7,256410256
11	GO:0009607	response to biotic stimulus	6,468571429

Exp3	Terme de GO	Nom	Taux d'enrichissement
1	GO:0010310	regulation of hydrogen peroxide metabolic process	33
2	GO:0000103	sulfate assimilation	22,33333333
3	GO:0019253	reductive pentose-phosphate cycle	22,33333333
4	GO:0009269	response to desiccation	20,75
5	GO:0001666	response to hypoxia	16,75
6	GO:0009612	response to mechanical stimulus	16,75
7	GO:0019685	photosynthesis, dark reaction	16,75
8	GO:0009862	systemic acquired resistance, salicylic acid mediated signaling pathway	16,66666667
9	GO:0009631	cold acclimation	13,4
10	GO:0006536	glutamate metabolic process	12,5
11	GO:0009765	photosynthesis, light harvesting	12,5

12	GO:0009627	systemic acquired resistance	12,5
13	GO:0080010	regulation of oxygen and reactive oxygen species metabolic process	12,5
14	GO:0019722	calcium-mediated signaling	12,5
15	GO:0015977	carbon fixation	11,16666667
16	GO:0009063	cellular amino acid catabolic process	9,666666667
17	GO:0009626	plant-type hypersensitive response	9,666666667
18	GO:0018298	protein-chromophore linkage	9,571428571
19	GO:0009863	salicylic acid mediated signaling pathway	9,571428571
20	GO:0010193	response to ozone	9,571428571
21	GO:0009069	serine family amino acid metabolic process	9,5
22	GO:0034050	host programmed cell death induced by symbiont	8,923076923
23	GO:0015979	photosynthesis	7,872727273
24	GO:0010200	response to chitin	7,861111111
25	GO:0009853	photorespiration	6,916666667
26	GO:0009820	alkaloid metabolic process	6,823529412
27	GO:0009081	branched chain family amino acid metabolic process	6,7
28	GO:0006779	porphyrin-containing compound biosynthetic process	6,44444444
29	GO:0015995	chlorophyll biosynthetic process	6,384615385
30	GO:0019760	glucosinolate metabolic process	6,384615385
31	GO:0019684	photosynthesis, light reaction	6,310344828
32	GO:0031347	regulation of defense response	6,25
33	GO:0009743	response to carbohydrate stimulus	5,842105263
34	GO:0033014	tetrapyrrole biosynthetic process	5,8
35	GO:0006790	sulfur compound metabolic process	5,549019608
36	GO:0042742	defense response to bacterium	5,442307692
37	GO:0009814	defense response, incompatible interaction	5,357142857
38	GO:0009617	response to bacterium	5,154929577
39	GO:0043043	peptide biosynthetic process	5,115384615
40	GO:0009611	response to wounding	4,901960784
41	GO:0001539	ciliary or flagellar motility	4,882352941
42	GO:0009239	enterobactin biosynthetic process	4,833333333
43	GO:0009642	response to light intensity	4,761904762
44	GO:0006970	response to osmotic stress	4,547008547
45	GO:0009620	response to fungus	4,486486486
46	GO:0046686	response to cadmium ion	4,418367347
47	GO:0009751	response to salicylic acid stimulus	4,255813953
48	GO:0010038	response to metal ion	4,228813559
49	GO:0009408	response to heat	4,166666667
50	GO:0009651	response to salt stress	4,119266055
51	GO:0009607	response to biotic stimulus	4,083832335
52	GO:0051707	response to other organism	4,020134228
53	GO:0009873	ethylene mediated signaling pathway	3,921568627
54	GO:0008652	cellular amino acid biosynthetic process	3,857142857
55	GO:0006007	glucose catabolic process	3,846153846
56	GO:0009415	response to water	3,773584906
57	GO:0022900	electron transport chain	3,758064516

58	GO:0019320	hexose catabolic process	3,75
59	GO:0006096	glycolysis	3,741935484
60	GO:0006520	cellular amino acid metabolic process	3,698412698
61	GO:0015992	proton transport	3,69444444
62	GO:0009605	response to external stimulus	3,649122807
63	GO:0009409	response to cold	3,580645161
64	GO:0019725	cellular homeostasis	3,571428571
65	GO:0045087	innate immune response	3,550561798
66	GO:0009416	response to light stimulus	3,539007092
67	GO:0009723	response to ethylene stimulus	3,454545455
68	GO:0009314	response to radiation	3,44137931
69	GO:0009266	response to temperature stimulus	3,356589147
70	GO:0006955	immune response	3,355769231
71	GO:0006006	glucose metabolic process	3,333333333
72	GO:0016052	carbohydrate catabolic process	3,328571429
73	GO:0009414	response to water deprivation	3,254901961
74	GO:0000160	two-component signal transduction system (phosphorelay)	3,223880597
75	GO:0055085	transmembrane transport	3,205128205
76	GO:0009753	response to jasmonic acid stimulus	3,191489362
77	GO:0008219	cell death	3,166666667
78	GO:0012501	programmed cell death	3,148648649
79	GO:0006979	response to oxidative stress	3,022727273
80	GO:0006725	cellular aromatic compound metabolic process	2,992805755
81	GO:0009308	amine metabolic process	2,824242424
82	GO:0019748	secondary metabolic process	2,816176471
83	GO:0006519	cellular amino acid metabolic process	2,801980198
84	GO:0009737	response to abscisic acid stimulus	2,77777778
85	GO:0009117	nucleotide metabolic process	2,709302326
86	GO:0006952	defense response	2,643410853
87	GO:0009755	hormone-mediated signaling pathway	2,633093525
88	GO:0044262	cellular carbohydrate metabolic process	2,583850932
89	GO:0006066	alcohol metabolic process	2,449612403
90	GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	2,415686275
91	GO:0009725	response to hormone stimulus	2,345070423
92	GO:0007242	intracellular signal transduction	1,865384615
93	GO:0006811	ion transport	1,859223301

Annexe 5 : Tableau TuYVtot regroupant l'ensemble des gènes identifiés par RNAseq et puces CATMA. Les deux gènes sur fond rouge au milieu sont les gènes communs aux deux analyses.

	Gènes	Description	GO Fonction moléculaire	GO Processus biologique	GO composant cellulaire
	AT2G21660	CCR2 (Cold, circadian rhythm, and RNA binding 2)	nucleic acid binding, nucleotide binding	circadian rhythm, gluconeogenesis, glycolysis, innate immune response, mRNA export from nucleus,response to abiotic stress	chloroplast, cytoplasm, mitochondria, nucleus, peroxisome, plasmodesma
	AT2G05380	GRP3S (Glycine-rich protein 3 short isoform)	protein binding	glucosinolate biosynthetic process, indoleacetic acid biosynthetic process	extracellular region
	ATCG00340	PSAB	chlorophyll binding	DNA-dependent transcription, photosynthesis	chloroplast
	AT2G16586	/	/	/	/
	AT2G01021	/	/	/	/
	AT1G23650	/	/	/	mitochondria
	AT2G05530	Glycine-rich protein	/	/	extracellular region
	AT2G24180	CYP71B6 (Cytochrome P450 71B6)	electron carrier activity, oxidoreductase activity	oxidation-reduction process	Golgi apparatus, ER, membrane, mitochondria
	AT2G22660	Protein of unknown function (DUF1399)	/	/	cytoplasm, nucleus, plasma membrane
	AT4G35630	PSAT (Phosphoserine aminotransferase)	O-phospho-L-serine:2- oxoglutarate aminotransferase activity, catalytic activity, pyridoxal phosphate binding	L-serine biosynthetic process, metabolic process, systemic acquired resistance	chloroplast
САТМА	AT2G05520	GRP-3 (Glycine-rich protein 3)	protein binding	glucosinolate biosynthetic process, regulation of defense response, response to abscisic acid to ethylene, to salicylic acid stimulus, systemic acquired resistance	extracellular region
	AT1G59510	CF9 (Carbohydrate-binding protein)	/	/	mitochondria
	AT2G46240	BAG6 (BCL-2-associated athanogene 6)	calmodulin binding	defense response to fungus, heat acclimation, induction of programmed cell death, protein folding	nucleus, plasmodesma
	AT1G24030	protein kinase family protein	ATP binding, kinase activity, transferase activity	cellular cell wall macromolecule metabolic process, protein phosphorylation	plasma membrane
	AT4G12400	НОР3	/	heat acclimation, protein folding, response to stress	/
	AT1G68250	/	/	terpenoid biosynthetic process	nucleus
	AT3G26060	ATPRX Q (peroxiredoxin Q)	antioxidant activity, oxidoreductase activity, peroxiredoxin activity, protein binding	carotenoid and chlorophyll biosynthesis, glucosinolate biosynthesis, oxidation- reduction, rRNA processing	chloroplast
	AT5G20240	PI (PISTILLATA)	DNA binding, protein binding	ovule development, regulation of transcription, DNA-dependent	cytoplasm, nucleus
	AT1G07350	SR45A (serine/arginine rich- like protein 45A)	nucleic acid binding, nucleotide binding	RNA splicing, response to high light intensity	/
	AT4G24390	AFB4 (auxin signaling F-BOX 4)	ubiquitin-protein ligase activity	response to molecule of bacterial origin, ubiquitin- dependent protein catabolic process	nucleus
	AT1G66090	TIR-NBS class of disease resistance protein	ADP binding, nucleoside- triphosphatase activity, nucleotide binding	defense response to fungus, jasmonic acid mediated signaling, salicylic acid biosynthesis	chloroplast
	AT5G23035	DEFL (defensin-like protein)	/	/	extracellular region
	AT5G26000	TGG1 (myrosinase 1)	catalytic activity, cation binding, hydrolase activity,	defense response to insect, glucosinolate catabolic process, response to abscisic	apoplast, chloroplast, cytosolic ribosome, peroxisome, cell wall,
			thogracosidase activity	acid stimulus	vacuole

	AT5G25980	TGG2 (myrosinase 2)	catalytic activity, cation binding, hydrolase activity, thioglucosidase activity	defense response to insect, glucosinolate catabolic process, response to abscisic acid stimulus	apoplast, chloroplast, cytosolic ribosome, peroxisome, plasmodesma, vacuole
Gènes communs	AT3G19710	BCAT4 (Branched-chain aminotransferase4)	branched-chain-amino-acid transaminase activity, methionine-oxo-acid transaminase activity	glucosinolate biosynthetic process, response to light stimulus, to wounding, toxin catabolic process	cytoplasm
CATMA- RNAseq	AT1G78370	GSTU20 (Glutathione S- transferase Tau 20)	enzyme binding, glutathione transferase activity	IAA biosynthetic process, maltose metabolic process, positive regulation of catalytic activity	apoplast, chloroplast, cytoplasm, nucleus
	AT5G01300	PEBP (phosphatidylethanolamine -binding protein) family	phosphatidylethanolamine binding	positive regulation of transcription	cytoplasm
	AT3G15605	/	nucleic acid binding	/	mitochondria
	AT4G28050	TET7 (tetraspanin 7)	/	aging, microtubule nucleation	membrane, plasmodesma
	AT3G45851	/	/	/	nucleus
	AT5G25840	Protein of unknown function (DUF1677),	/	/	nucleus
	AT3G16670	Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein	/	response to oxidative stress	extracellular region
	AT2G31141	/	/	/	mitochondria
	ATCG00560	PSBL (photosystem II reaction center protein L)	/	DNA-dependent transcription, photosynthesis	chloroplast
	AT3G60318	/	/	/	nucleus
	AT1G64370	/	/	positive regulation of flavonoid biosynthetic process	cytoplasm
	AT3G02020	AK3 (aspartate kinase 3)	amino acid binding, aspartate kinase activity	aspartate family amino acid biosynthetic process	chloroplast
	AT5G18600	Thioredoxin superfamily protein	arsenate reductase (glutaredoxin) activity	methylglyoxal catabolic process to D-lactate	/
	AT1G16410	CYP79F1 (cytochrome P450 79F1)	electron carrier activity, oxidoreductase activity	glucosinolate biosynthetic process, oxidation-reduction process	chloroplast, endoplasmic reticulum
RNAseq	AT4G03060	AOP2 (alkenyl hydroxalkyl producing 2)	/	glucosinolate biosynthetic process	/
	AT1G06830	Glutaredoxin family protein	electron carrier activity, protein disulfide oxidoreductase activity	anther development, cell redox homeostasis	cytoplasm
	AT1G72600	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein	/	/	/
	AT3G15610	Transducin/WD40 repeat- like superfamily protein	nucleotide binding	/	CUL4-RING ubiquitin ligase complex,
	AT5G62998	/	/	/	/
	AT5G42053	/	/	/	/
	AT3G12835	/	/	/	/
	AT1G18220	permease 9)	transporter activity	purine nucleobase transport	membrane
	AT1G53542	/	/	/	mitochondria
	AT4G05091	/	/	/	/
	AT5G57181	/	/	/	/
	AT1G66553	/	/	/	/ mitochondria
	AT4G19829	/	/	/ carpel mornhogenesis	
	AT1G44941	/ /	/	/	, mitochondria
	AT1G17560	, HLL, HUELLENLOS	structural constituent of ribosome	, DNA-dependent transcription, elongation, translation	chloroplast, ribosome
	AT1G28281	/	/	/	extracellular region
	AT2G41082	/	/	/	chloroplast

**Annexe 6 : Taux d'enrichissement en termes d'ontologie dans les analyses de RNAseq de l'expérience Exp2 de protoplastes de CC infectés par le TuYV**. Cette recherche a été effectuée sur les résultats de RNAseq avec un FDR < 10%. Ne sont considérés dans ces tableaux que les enrichissements dans les processus biologiques. Seule cette expérience a révélée un enrichissment en terme de GO pour les échantillons TuYV analysés en RNAseq.

Exp2	Terme de GO	Nom	Taux d'enrichissement
1	GO:0012502	induction of programmed cell death	109
2	GO:0043068	positive regulation of programmed cell death	109
3	GO:0009772	photosynthetic electron transport in photosystem II	82
4	GO:0010942	positive regulation of cell death	54,5
5	GO:0009410	response to xenobiotic stimulus	41
6	GO:0009631	cold acclimation	32,8
7	GO:0018298	protein-chromophore linkage	31,28571429
8	GO:0009767	photosynthetic electron transport chain	24,81818182
9	GO:0019760	glucosinolate metabolic process	21
10	GO:0043067	regulation of programmed cell death	20,5
11	GO:0006826	iron ion transport	18,2222222
12	GO:0015979	photosynthesis	14,13793103
13	GO:0051260	protein homooligomerization	12,16666667
14	GO:0022900	electron transport chain	10,58064516
15	GO:0019684	photosynthesis, light reaction	8,806451613
16	GO:0006790	sulfur compound metabolic process	7,092592593

Annexe 7: Taux d'enrichissement en termes d'ontologie dans les analyses de puces CATMA des trois expériences de protoplastes de CC infectés par le TuYV. Ne sont considérés dans ces tableaux que les enrichissements dans les processus biologiques.

Exp1	Terme de GO	Nom	Taux d'enrichissement
1	GO:0046685	response to arsenic-containing substance	61,5
2	GO:0001666	response to hypoxia	46,25
3	GO:0048574	long-day photoperiodism, flowering	41
4	GO:0009744	response to sucrose stimulus	16,81818182
5	GO:0010228	vegetative to reproductive phase transition of meristem	11,22727273
6	GO:0042742	defense response to bacterium	10,2962963
7	GO:0008643	carbohydrate transport	8,517241379
8	GO:0009408	response to heat	8,351351351
9	GO:0016052	carbohydrate catabolic process	7,942857143
10	GO:0046686	response to cadmium ion	7,940594059
11	GO:0006007	glucose catabolic process	7,725
12	GO:0019320	hexose catabolic process	7,725
13	GO:0009617	response to bacterium	7,513513514
14	GO:0010038	response to metal ion	7,140495868
15	GO:0006006	glucose metabolic process	6,717391304
16	GO:0019318	hexose metabolic process	6,166666667
17	GO:0015979	photosynthesis	6,06557377
18	GO:0042254	ribosome biogenesis	5,684210526
19	GO:0009266	response to temperature stimulus	5,143939394
20	GO:0006970	response to osmotic stress	5,057377049
21	GO:0044262	cellular carbohydrate metabolic process	4,950617284
22	GO:0009651	response to salt stress	4,920353982
23	GO:0009409	response to cold	4,547368421
24	GO:0019748	secondary metabolic process	4,471014493
25	GO:0051707	response to other organism	4,380645161
26	GO:0009607	response to biotic stimulus	4,25862069
27	GO:0006952	defense response	3,285171103

Exp4	Terme de GO	Nom	Taux d'enrichissement
1	GO:0009765	photosynthesis, light harvesting	51,1111111
2	GO:0019684	photosynthesis, light reaction	18,5483871
3	GO:0010200	response to chitin	17,69230769
4	GO:0015979	photosynthesis	17,23333333
5	GO:0009743	response to carbohydrate stimulus	13,41666667
6	GO:0009408	response to heat	12,43243243
7	GO:0009611	response to wounding	10,8490566
8	GO:0009723	response to ethylene stimulus	8,734177215
9	GO:0009605	response to external stimulus	6,822033898
10	GO:0009416	response to light stimulus	5,51369863
11	GO:0009314	response to radiation	5,366666667

12	GO:0009725	response to hormone stimulus	4,788194444
Moyenne	Terme de GO	Nom	Taux d'enrichissement
1	GO:0019760	glucosinolate metabolic process	82,42857143
2	GO:0051260	protein homooligomerization	60,73684211
Exp3	Terme de GO	Nom	Taux d'enrichissement
1	GO:0006986	response to unfolded protein	47
2	GO:0034620	cellular response to unfolded protein	47
3	GO:0080028	nitrile biosynthetic process	31
4	GO:0006916	anti-apoptosis	31
5	GO:0009750	response to fructose stimulus	23,5
6	GO:0034976	response to endoplasmic reticulum stress	20,66666667
7	GO:0009644	response to high light intensity	20,2
8	GO:0019760	glucosinolate metabolic process	17
9	GO:0006551	leucine metabolic process	15,5
10	GO:0010286	heat acclimation	15,5
11	GO:0009408	response to heat	14,5
12	GO:0009642	response to light intensity	12,9444444
13	GO:0009269	response to desiccation	12,4
14	GO:0009081	branched chain family amino acid metabolic process	12,1111111
15	GO:0009612	response to mechanical stimulus	11,75
16	GO:0042981	regulation of apoptotic process	11,75
17	GO:0010193	response to ozone	11,14285714
18	GO:0009082	branched chain family amino acid biosynthetic process	10,33333333
19	GO:0006954	inflammatory response	8,857142857
20	GO:0018298	protein-chromophore linkage	7,75
21	GO:0043067	regulation of programmed cell death	7,75
22	GO:0009658	chloroplast organization	7,266666667
23	GO:0009407	toxin catabolic process	7,153846154
24	GO:0031407	oxylipin metabolic process	6,88888889
25	GO:0009636	response to toxin	6,5
26	GO:0009611	response to wounding	6,346938776
27	GO:0051260	protein homooligomerization	6,055555556
28	GO:0009063	cellular amino acid catabolic process	6
29	GO:0009741	response to brassinosteroid stimulus	6
30	GO:0006972	hyperosmotic response	5,571428571
31	GO:0042542	response to hydrogen peroxide	5,5
32	GO:0006979	response to oxidative stress	5,178571429
33	GO:0006779	porphyrin-containing compound biosynthetic process	5,166666667
34	GO:0000302	response to reactive oxygen species	4,926829268
35	GO:0006790	sulfur compound metabolic process	4,788461538
36	GO:0009657	plastid organization	4,769230769
37	GO:0033014	tetrapyrrole biosynthetic process	4,65
38	GO:0009620	response to fungus	4,621621622
39	GO:0009266	response to temperature stimulus	4,6

40	GO:0015979	photosynthesis	4,551724138
41	GO:0015992	proton transport	4,457142857
42	GO:0022900	electron transport chain	4,327868852
43	GO:0009607	response to biotic stimulus	4,21686747
44	GO:0008652	cellular amino acid biosynthetic process	4,160714286
45	GO:0051707	response to other organism	4,101351351
46	GO:0009753	response to jasmonic acid stimulus	4,065217391
47	GO:0006164	purine nucleotide biosynthetic process	4,037037037
48	GO:0008380	RNA splicing	4
49	GO:0009605	response to external stimulus	3,991150442
50	GO:0006163	purine nucleotide metabolic process	3,963636364
51	GO:0009259	ribonucleotide metabolic process	3,963636364
52	GO:0009651	response to salt stress	3,853211009
53	GO:0006970	response to osmotic stress	3,822033898
54	GO:0042742	defense response to bacterium	3,740740741
55	GO:0009117	nucleotide metabolic process	3,658823529
56	GO:0009165	nucleotide biosynthetic process	3,640625
57	GO:0010200	response to chitin	3,58974359
58	GO:0045454	cell redox homeostasis	3,545454545
59	GO:0009414	response to water deprivation	3,489795918
60	GO:0006520	cellular amino acid metabolic process	3,42519685
61	GO:0009617	response to bacterium	3,410958904
62	GO:0016052	carbohydrate catabolic process	3,328571429
63	GO:0009415	response to water	3,288461538
64	GO:0009308	amine metabolic process	3,245398773
65	GO:0009743	response to carbohydrate stimulus	3,116666667
66	GO:0046686	response to cadmium ion	3,079207921
67	GO:0019725	cellular homeostasis	3,070422535
68	GO:0009416	response to light stimulus	2,957746479
69	GO:0006952	defense response	2,91796875
70	GO:0019748	secondary metabolic process	2,881481481
71	GO:0009314	response to radiation	2,876712329
72	GO:0010038	response to metal ion	2,826446281
73	GO:0044262	cellular carbohydrate metabolic process	2,81875
74	GO:0006457	protein folding	2,773809524
75	GO:0019752	carboxylic acid metabolic process	2,703557312
76	GO:0006955	immune response	2,666666667
77	GO:0006519	cellular amino acid metabolic process	2,60591133
78	GO:0009723	response to ethylene stimulus	2,58974359
79	GO:0009755	hormone-mediated signaling pathway	2,352517986
80	GO:0006812	cation transport	2,023668639
81	GO:0006811	ion transport	1,961165049
82	GO:0009725	response to hormone stimulus	1,84965035

## Annexe 8 : Dérégulations de l'expression de gènes dans nos analyses, observées grâce une méthode biostatistique différente. (Dr G. Thébaud, BGPI Montpellier).

САТМА	Gènes	Description	GO Fonction moléculaire	GO Processus biologique	GO composant cellulaire	p-value
Induction	AT3G22600	protease inhibitor/seed storage/lipid transfer protein (LTP) family protein	lipid binding	lipid transport	anchored to membrane	0.001124454
	AT4G04610	APR1 (5'-adenylylsulfate reductase 1)	adenylyl-sulfate reductase activity	sulfate assimilation, sulfate reduction	chloroplast	0.0007099099
	ATCG00790	RPL16 (ribosomal protein L16)	structural constituent of ribosome	translation	chloroplast	0.0008435082
	AT3G49570	LSU3 (response to low sulfur 3)	/	/	/	0.0010247488
	AT5G24660	LSU2 (response to low sulfur 2)	/	regulation of defense response	/	0.0018364046
	AT5G24655	LSU4 (response to low sulfur 4)	/	/	/	0.0025549994
Répression	ATCG00300	YCF9	/	photosynthesis	chloroplast	0.0042549428
	ATCG00280	PSBC Photosystem II reaction center protein C	electron transporter	photosynthesis	chloroplast	0.0068607754
	AT1G62180	APR2 (5'-adenylylsulfate reductase 2)	adenylyl-sulfate reductase and phosphoadenylyl- sulfate reductase (thioredoxin) activity	oxidation-reduction process, sulfate assimilation, phosphoadenylyl sulfate reduction	chloroplast	0.0158589217
	ATCG00330	RPS14	structural constituent of ribosome	translation	chloroplast	0.0275187042
	AT2E05040	/	/	/	/	0.0381846685

RNAseq	Gènes	Description	GO Fonction moléculaire	GO Processus biologique	GO composant cellulaire	p-value
Induction	AT1G51890	/	protein kinase activity	protein phosphorylation		0.02163676
	AT5G43640	/				0.02601709
	AT3G61650	/				0.04749907

RNAseq	Gènes	Description	GO Fonction moléculaire	GO Processus biologique	GO composant cellulaire	p-value
Induction	AT3G15610	Transducin/WD40 repeat- like superfamily protein	nucleotide binding	/	CUL4-RING ubiquitin ligase complex	<0.0007
	AT3G59670	/	/	/	/	0.1698333
	AT4G40010	/	/	/	/	0.2004452
Répression	AT3G15605	/	nucleic acid binding	/	mitochondria	0.0006471654



Contribution à l'étude du mouvement systémique de deux phytovirus : analyse comparative du transcriptome de cellules compagnes infectées et saines

## Sophie CHAPUIS

Les phytovirus empruntent les vaisseaux du phloème pour envahir leur plante hôte de manière systémique. Ce mouvement étant très mal connu, l'objectif de cette étude était d'identifier par une approche transcriptomique, des gènes spécifiquement dérégulés dans les cellules compagnes (CC) suite à l'infection virale par un *Polerovirus*, le *Turnip yellows virus* (TuYV) ou par un *Potyvirus*, le *Lettuce mosaic virus* (LMV). Pour ce faire, des protoplastes de CC ont été préparés et triés par la technologie de FACS. Les ARN extraits ont ensuite été traités par RNAseq et hybridation sur puces CATMA. Malgré d'importantes variations entre les expériences, nous avons identifié des processus biologiques communs affectés par les infections virales : la voie d'assimilation du soufre et le mécanisme de résistance systémique acquise (SAR) pour le LMV, et la voie de biosynthèse des glucosinolates pour le TuYV. Pour compléter cette étude, une banque d'ADNc spécifique des CC a été construite et criblée en utilisant le domaine C-terminal de la protéine RT du TuYV. Une interaction avec la protéine CIPK7 a été détectée et le rôle potentiel de cette interaction dans le cycle viral a été étudié *in planta.* 

Phytoviruses invade systemically their host plant through the phloem. As this viral step remains poorly understood, the aim of this work was to identify, using a transcriptomic approach, genes specifically deregulated in companion cell (CC) during infection with the *Polerovirus Turnip yellows virus* (TuYV) and the *Potyvirus Lettuce mosaic virus* (LMV). CC protoplasts were prepared and sorted by FACS technology. Extracted RNA were further analyzed by RNAseq and CATMA microarrays. Although considerable variations between the experiments were observed, we were able to identify common biological processes affected by viral infections: sulfate assimilation and systemic acquired resistance (SAR) mechanism for LMV and glucosinolate biosynthesis for TuYV. To complete this study on systemic viral movement, a CC-specific cDNA library was constructed and screened using the TuYV RT C-terminal domain as a bait. An interaction with the AtCIPK7 protein was retrieved, a protein kinase interacting with calcineurin B-like proteins. The potential role of this interaction in the viral cycle *in planta* was further investigated *in planta*.