

POTYVIRUS : COMMENT LE PUCERON ACTIVE SA TRANSMISSION ?

E. BERTHELOT^(1,2), M. KHELIFA⁽²⁾, S. BLANC⁽¹⁾, M. DRUCKER⁽¹⁾

⁽¹⁾ INRA, UMR BGPI, TA A-54/K, 34398 MONTPELLIER CEDEX 5, FRANCE

⁽²⁾ FN3PT/RD3PT 43-45 RUE DE NAPLES, 75008 PARIS, FRANCE

RÉSUMÉ

Les potyvirus constituent le genre viral le plus représenté parmi les virus de plantes et affectent de nombreuses cultures d'intérêt agronomique. Ils sont propagés par les pucerons mais le manque de connaissances sur leur processus de transmission constitue un frein pour le développement de méthodes de lutte efficaces. C'est dans ce contexte que nous avons caractérisé les premières étapes amenant à la transmission des potyvirus. Nos résultats indiquent que leur acquisition nécessite la participation active de la cellule végétale infectée. Ainsi, le blocage de la signalisation calcique inhibe la transmission et l'application d'espèces réactives de l'oxygène la stimule. Ceci corrèle avec une altération de l'état des protéines virales dans la cellule. Nos résultats pourraient permettre, à terme, d'envisager de nouvelles stratégies de lutte contre les potyvirus.

Mots-clés : *Potyvirus*, transmission, puceron, signalisation calcique, espèce réactive de l'oxygène.

ABSTRACT

POTYVIRUS: HOW THE APHID ACTIVATES THEIR TRANSMISSION?

Potyviruses are the most important viral genus among plant viruses and affect many crops of agronomic interest. They are spread by aphids but the lack of knowledge about their transmission process is a hindrance to the development of effective control methods. It is in this context that we characterized the steps leading to the transmission of potyviruses. Our results indicate that their acquisition requires the active participation of the infected plant cell. Thus, the blocking of calcium signalling pathway inhibits the transmission and the application of reactive oxygen species stimulates it. This correlates with an alteration of the viral proteins state in the cell. Our results could allow, in the long term, to consider new strategies to control the potyviruses.

Keywords: *Potyvirus*, transmission, aphid, calcium signalling, reactive oxygen specie.

INTRODUCTION

Les Potyvirus constituent le genre viral le plus représenté parmi les virus de plantes. A lui seul, il comprend environ 30% des virus de plantes actuellement connus et cause des dégâts importants sur un large panel de cultures ayant de lourdes conséquences économiques sur l'agriculture mondiale (Revers et García, 2015). Des traitements curatifs n'étant pas disponibles, la méthode principale de lutte s'appuie sur l'utilisation d'insecticides visant à réduire les populations d'arthropodes qui constituent les principaux vecteurs de virus de plantes. Si l'application préventive des insecticides peut donner de bons résultats, la lutte intégrée, quant à elle, reste inefficace compte tenu du fait qu'une très faible densité de population de vecteurs suffit à transmettre les potyvirus efficacement et enclencher des épidémies virales. De plus, selon leurs compositions, les produits phytopharmaceutiques peuvent avoir des effets négatifs sur l'environnement. De ce fait, il est nécessaire de développer des méthodes de lutte alternatives.

Les potyvirus sont transmis par des arthropodes ayant un comportement alimentaire dit « piqueurs-suceurs » dont les pucerons sont les plus représentatifs. Les potyvirus sont acquis lorsque les pucerons s'alimentent sur une plante infectée. Ils s'accrochent à leurs pièces buccales et sont ainsi transportés et déposés dans une nouvelle plante hôte. Ce mode de transmission est appelé « non-circulant » (Hogenhout *et al.*, 2008). Deux protéines des potyvirus interviennent dans cette transmission : la capsid (CP) et le facteur assistant de la transmission (HC-Pro). HC-Pro permet de faire le lien entre les stylets du puceron et la CP (Blanc *et al.*, 1997 ; Blanc *et al.*, 1998). La formation du complexe HC-Pro/CP est indispensable pour que la transmission des potyvirus par les pucerons puissent se faire. Comprendre le processus de cette transmission non-circulante peut révéler un ou plusieurs talons d'Achille qui offrirait de nouvelles alternatives dans les stratégies de lutte en interférant, par exemple, avec l'acquisition virale ou le comportement alimentaire des vecteurs.

La transmission non-circulante a souvent été considérée comme résultant d'une contamination accidentelle des pièces buccales du vecteur lorsque ce dernier s'alimente. Mais des résultats ont montré que l'acquisition d'un virus modèle, le *Cauliflower mosaic virus* (CaMV, genre des *Caulimovirus*) dépend des interactions spécifiques entre le virus, le vecteur et la plante hôte (Bak *et al.*, 2013a, 2013b ; Martinière *et al.*, 2013). Le CaMV répond à l'arrivée de son vecteur puceron en formant à ce moment précis et de manière réversible des complexes transmissibles du virus, obligatoires pour la transmission. En effet, en empêchant ou en stimulant leur formation de manière artificielle, la transmission par les pucerons est inhibée ou activée. Ce phénomène dénommé « activation de la transmission (AT) » montre que la transmission du CaMV n'est pas accidentelle mais qu'elle est contrôlée par le virus lui-même qui manipule la plante hôte pour permettre une transmission optimale par les pucerons. Le challenge pour l'avenir est, d'une part, identifier les mécanismes moléculaires et cellulaires de l'AT du CaMV, et d'autre part, déterminer s'il s'agit d'un phénomène général, c'est-à-dire si d'autres phytovirus font aussi appel à l'AT pour leurs transmissions (Drucker and Then, 2015).

Cette dernière question est d'une importance primordiale tant au niveau fondamental qu'appliqué. En effet, une généralité du phénomène serait extrêmement originale et ouvrirait, d'un point de vue appliqué, de nouvelles perspectives pour les stratégies de lutte, visant à interrompre spécifiquement le processus de l'AT. Dans cette optique, nous avons testé un virus non apparenté au CaMV, le *Turnip mosaic virus* (TuMV), appartenant au genre des *Potyvirus* et causant d'innombrables dégâts sur les cultures de crucifères.

MATERIEL ET MÉTHODE

MATERIEL BIOLOGIQUE

Les plants de navet (*Brassica rapa* cultivar Just Right) ont été cultivés en serre à 24/15°C jour/nuit avec une photopériode de 14/10 heures. Des plants de navet âgés de deux semaines ont été inoculés mécaniquement à l'aide de l'abrasif carbure de silicium avec la souche C42J du TuMV (Ohshima *et al.*, 2007). Les plantes ont été utilisées pour des expériences 14 jours après l'inoculation (dpi).

PREPARATION DES PROTOPLASTES DE FEUILLES DE NAVETS

Les protoplastes sont des cellules végétales sans paroi. Leur réalisation a été faite à partir de feuilles saines âgées d'un mois ou de feuilles infectées par les souches du TuMV depuis quinze jours. Une fois les feuilles sélectionnées, leur nervure principale leur est enlevée. Les feuilles sont ensuite trempées une minute dans du Domestos dilué à 5% avec de l'eau, afin de perméabiliser leur couche de cuticule, puis rincées abondamment à l'eau. Après rinçage, les feuilles sont déposées, face inférieure, dans une boîte de pétri contenant 10mL de tampon de protoplastation (0,5 M de mannitol, 10 mM de MES pH 5,6 et 1 mM de CaCl_2), complété de 0,5% de cellulase R-10 et 0,05% de macerozyme R-10. Les boîtes de pétri sont ensuite refermées avec du Parafilm®, puis incubées à 25°C, sur la nuit et à l'abri de la lumière pour digérer les parois. Le lendemain, les protoplastes sont libérés des tissus par agitation légère. La solution dans laquelle se trouvent les protoplastes est ensuite filtrée à l'aide d'un filtre de Miracloth, puis rincée deux fois cinq minutes avec le tampon de protoplastation par centrifugation à 80 g, accélération 5 et décélération 1 à 25°C dans un rotor swing-out. Le dernier culot est ensuite resuspendu dans 2 à 3 mL de tampon de protoplastation de façon à obtenir une suspension de protoplastes bien concentrée. Les protoplastes sont conservés sous faible agitation (5 tr/min). Pour les western blot, les échantillons ont été lysés dans un tampon sans agents réducteurs afin de conserver les ponts disulfure.

PREPARATION DES EXTRAITS CELLULAIRES INFECTES

Les extraits cellulaires ont été réalisés à partir de protoplastes issus de feuilles de navets infectés par le TuMV. Un culot de protoplastes est resuspendu avec 2 à 3 mL de tampon SAKO (500 mM de KPO_4 pH 8,5 et 10 mM de MgCl_2) adapté (Sako et Ogata, 1981). Du sucrose est ajouté de façon à en obtenir une concentration finale de 15%, puis la suspension est vortexée une minute de façon à obtenir des protoplastes éclatés et non viables.

TRAITEMENT DES PROTOPLASTES ET VIABILITE

Les protoplastes ont été traités avec une espèce réactive de l'oxygène (ROS), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). La production de H_2O_2 intervient dans les mécanismes de défenses précoces de la plante suite à la reconnaissance d'un agent pathogène. La quantité de H_2O_2 finale est de 2 mM avec une durée de traitement de 5 minutes. D'autres protoplastes ont été traités avec un bloqueur de la signalisation calcique, le lanthanum(III) chloride (LaCl_3). La signalisation calcique est un processus de signalisation mis en place par la plante suite à la détection d'un agent pathogène. La quantité de LaCl_3 finale est de 1 mM avec une durée de traitement de 5 minutes. Un troisième traitement a été utilisé pour réduire les ponts disulfures, il s'agit du dithiothreitol (DTT). La quantité de DTT finale est de 5 mM avec une durée de traitement de 30 minutes. Les traitements ont été réalisés dans 500 μL de protoplastes puis ont été incubés à température ambiante sous faible agitation (5 tr/min). Pour chaque condition, la viabilité des protoplastes a été déterminée avec le test FDA (Widholm, 1972).

TESTS DE TRANSMISSION

Des pucerons ont été mis à jeûner dans des anneaux couverts d'un Parafilm® étiré une heure avant le test. Puis, 300 μL de suspension contenant des protoplastes ou des extraits cellulaires sont déposés sur les Parafilm® et couverts avec des lamelles. L'ensemble du dispositif d'acquisition est mis en chambre humide et les pucerons disposent d'une période d'acquisition de 15 min où ils s'alimentent en insérant leurs stylets à travers la membrane du Parafilm® dans la suspension de protoplastes ou d'extraits cellulaires. Les pucerons sont transférés sur les plantules pendant 3 heures avant d'être éliminés par un traitement à insecticide de Pirimor® G à 0,1%. Les résultats du test sont révélés après 20 jours en comptant les plantes tests présentant les symptômes caractéristiques TuMV. Chaque test a été réalisé à partir de trois expériences indépendantes dans lesquelles 360 plantes au total ont été utilisées par condition. Chaque expérience comportait six répétitions pour chaque condition et 20 plantes tests par répétition.

DUOLINK® PROXIMITY LIGATION ASSAY (PLA)

Afin d'identifier comment l'AT du TuMV se manifeste dans les cellules infectées. Nous avons voulu valider notre hypothèse en étudiant l'effet de cette activation ou inhibition sur l'association de la HC-Pro aux particules virales, formant les complexes transmissibles indispensables à la transmission.

Pour visualiser ces complexes HC-Pro/CP *in situ*, nous avons eu recours à la technique Duolink® (Söderberg *et al.*, 2006), permettant la détection d'interactions protéine/protéine.

Les protoplastes ont été fixés avec du paraformaldehyde à 3% dans un tampon de cacodylate 100 mM (pH 7,2) ou un tampon phosphate 100 mM (pH 7,4). Les protoplastes fixés ont été immobilisés sur des lames revêtues de L-polylysine. Une incubation avec les anticorps primaires anti-TuMV lapin et anti-HC-Pro de souris, une ligation et une amplification par sonde ont été réalisées selon les instructions du fabricant. Les lames ont été montées avec un support de montage *in situ* Duolink® avec DAPI (www.sigmaaldrich.com).

Les images Duolink® ont été acquises avec un microscope confocal Zeiss LSM700 (zeiss.com) fonctionnant en mode séquentiel. Les sondes Duolink® et la chlorophylle ont été excitées avec le laser à 488 nm et la fluorescence a été collectée entre 490-540 nm ou 560-735 nm. Les images brutes ont été traitées à l'aide du logiciel ZEN ou ImageJ. La quantification des interactions de Duolink® a été réalisée sur des projections d'intensité maximale avec la macro Analyse_Spots_Per_Protoplast pour ImageJ, développée pour cette expérience (Baecker, 2016).

SDS-PAGE ET WESTERN BLOT

Afin d'identifier d'éventuelles modifications post-traductionnelles des protéines HC-Pro et CP, la technique du SDS-PAGE/Western blot a été utilisée. Les échantillons ont été préparés à partir de protoplastes. Après la durée d'incubation des traitements, 20 µL de protoplastes sont prélevés et le traitement est arrêté par l'ajout de 20 µL de tampon Laemmli sans β-mercaptoéthanol (4% de SDS, 100 mM de Tris pH 6,8, 50% de glycérol et 0,02% de bleu de bromophénol).

Les protéines sont séparées par un gel SDS-PAGE à 10% d'acrylamide pour le gel de séparation et 6% pour le gel de tassement puis transférées du gel sur une membrane de nitrocellulose en conditions semi-sec. L'efficacité du transfert et le dépôt de charge de chaque échantillon sont vérifiés par coloration des protéines sur la membrane avec le rouge Ponceau. Ensuite, la membrane est incubée sous agitation une heure dans du TS-L (tampon TS : 20 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7,4 avec 5% de lait écrémé en poudre). Après saturation, la membrane est incubée dans l'anticorps primaire anti-HC-Pro lapin, ou anti-TuMV lapin, dilué au millièrme dans du TS-L. L'incubation dure une heure trente à 37°C. S'en suit 3 rinçages de la membrane, sous agitation, avec du tampon TS. Elle est ensuite incubée, dans les mêmes conditions que celles de l'anticorps primaire, dans l'anticorps secondaire anti lapin, lié à une phosphatase alcaline, dilué au deux-millièrme dans du TS-L. La membrane subit à nouveau des rinçages au TS avant sa révélation. La détection des protéines se fait à l'aide de NBT (Nitro-Blue Tetrazolium chloride) et de BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolylphosphate P-toluidine salt). Les bandes sont révélées en quelques minutes puis la réaction est stoppée avec de l'eau.

TESTS STATISTIQUES

Les statistiques et les box plots ont été calculés avec la version 3.4.0 du logiciel R (r-project.org). Les taux de transmission, la viabilité et les expériences Duolink® ont été analysés avec des modèles linéaires généralisés (GLM). Aucune valeur aberrante n'a été supprimée des jeux de données. Des distributions quasi binomiales ont été utilisées pour prendre en compte la surdispersion et les valeurs p ont été corrigées avec la méthode de Holm pour tenir compte des comparaisons multiples.

L'analyse des expériences Duolink® a nécessité le calcul de l'intensité de fluorescence totale (F_{tot}) des foyers marqués comme suit :

$$F_{tot} = \frac{n \times \bar{s} \times \bar{I}}{A}$$

où n est le nombre de foyers marqués, $\bar{s}$ est la taille moyenne d'un foyer, $\bar{I}$ est l'intensité moyenne de fluorescence d'un foyer et A correspond à la taille du protoplaste. F_{tot} a été log-transformée (pour normaliser la distribution) et analysée avec des modèles linéaires en utilisant "traitement" et "réplicat" comme variables explicatives catégorielles.

RESULTATS

H₂O₂ ACTIVE ET LA CL₃ INHIBE LA TRANSMISSION

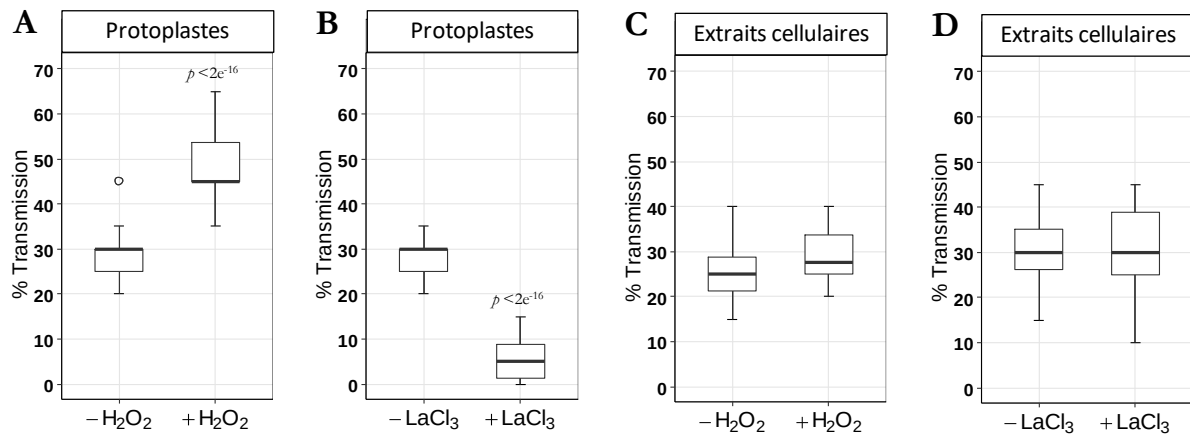
Les tests de transmission par pucerons réalisés à partir de protoplastes traités avec H₂O₂ ont montré une augmentation drastique de la transmission du TuMV (Figure 1A), tandis que le traitement des protoplastes avec du LaCl₃ a entraîné une forte réduction de la transmission (Figure 1B).

L'augmentation de la transmission par H_2O_2 et l'inhibition par $LaCl_3$ sont clairement un effet biologique nécessitant des cellules vivantes, car aucun effet n'a été observé lorsque les expériences ont été réalisées à partir d'extraits cellulaires (Figure 1C et 1D). Ces expériences indiquent également que H_2O_2 et $LaCl_3$ n'ont pas modifié le comportement alimentaire des pucerons et la viabilité des protoplastes. Prises ensemble, nos données montrent que la transmission du TuMV peut être artificiellement améliorée ou inhibée, comme cela a été montré précédemment pour le CaMV, mais avec des molécules activant d'autres voies de signalisation. Par conséquent, nous postulons que le phénomène d'AT existe pour le TuMV et que les ROS et la signalisation calcique sont impliqués dans sa mise en place.

Figure 1: Effet des traitements H_2O_2 et $LaCl_3$ sur la transmission du TuMV par les pucerons.

Effect of H_2O_2 and $LaCl_3$ on TuMV transmission by aphids.

Protoplastes incubés avec H_2O_2 (A) ou $LaCl_3$ (B). Les moyennes des plantes infectées (barres noires horizontales dans les box plots) sont calculées à partir des trois expériences indépendantes réalisées pour chaque test. p désigne les p-values obtenues par l'analyse GLM (voir matériel et méthodes).



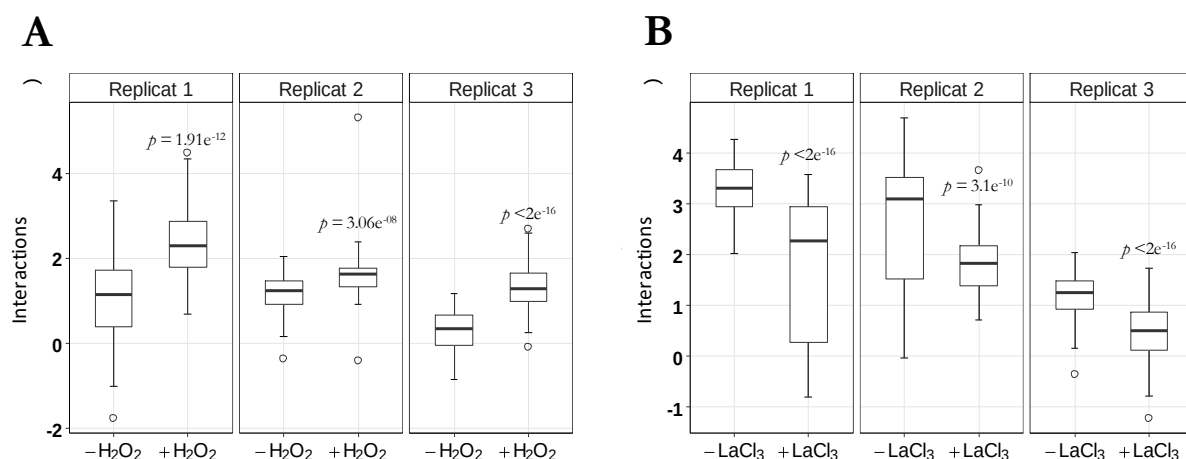
H_2O_2 ACTIVE ET $LaCl_3$ INHIBE LA FORMATION DES COMPLEXES HC-PRO/CP

L'expérience de visualisation des interactions HC-Pro/CP a montré que le traitement H_2O_2 augmentait significativement les interactions HC-Pro/CP (Figure 2A). En revanche, l'incubation des protoplastes avec $LaCl_3$ a diminué de manière significative le nombre de complexes transmissibles (Figure 2B). Ainsi, l'augmentation et la diminution des interactions HC-Pro/CP, déclenchées respectivement par l'application de ROS ou d'un bloqueur des canaux calciques, sont en corrélation avec l'augmentation et la diminution de la transmission (Figures 1 et 2).

Figure 2: PLA *in situ* sur des protoplastes de navet infectés par le TuMV.

In situ PLA on turnip protoplasts infected with TuMV.

Protoplastes incubés avec H_2O_2 (A) ou $LaCl_3$ (B). Les box plots présentent les données de trois expériences indépendantes pour chaque condition. Les axes des ordonnées montrent les interactions HC-Pro/CP présentée sous la forme d'une intensité de fluorescence totale (voir matériel et méthodes). p désigne les p-values obtenues par l'analyse GLM (voir matériel et méthodes).



H₂O₂ ACTIVE ET LA CL₃ INHIBE LA FORMATION DES OLIGOMERES DE HC-PRO

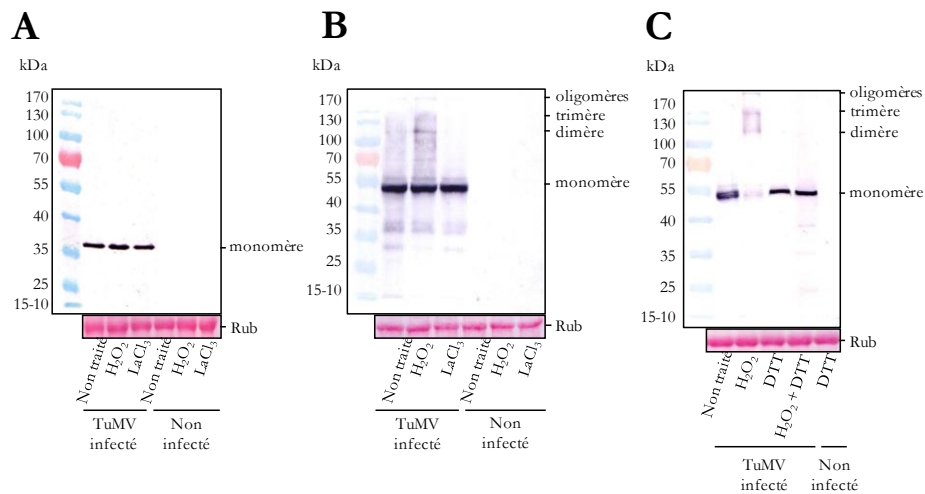
Suite aux résultats obtenus, la nouvelle question qui se pose est : comment HC-Pro et les particules virales peuvent passer rapidement de formes "libres" à des complexes transmissibles ? Comme les ROS modifient directement ou indirectement le potentiel d'oxydo-réduction (rédox) cellulaire, la formation de complexes transmissibles HC-Pro/CP pourrait être contrôlée par l'état rédox de HC-Pro et CP, qui contiennent toutes deux des cystéines pouvant former des ponts disulfures. Par conséquent, nous avons effectué des SDS-PAGE/Western blot non réducteurs pour détecter si les profils de migration de HC-Pro et de CP étaient altérés par des ponts disulfures. Les traitements H₂O₂ et LaCl₃ n'ont pas modifié le profil de migration de la CP (Figure 3A). Cependant, le traitement H₂O₂ a augmenté la quantité d'oligomères de HC-Pro et en particulier de sa forme dimère (Figure 3B), forme supposée active dans la transmission (Plisson *et al.*, 2003 ; Ruiz-Ferrer *et al.*, 2005 ; Thornbury *et al.*, 1985). Au contraire, le traitement LaCl₃ a eu l'effet inverse et a diminué la quantité d'oligomères de HC-Pro (Figure 3B). Pour établir que la formation des ponts disulfures entre les monomères HC-Pro est à l'origine de l'oligomérisation, les protoplastes infectés ont été traités avec du dithiothreitol (DTT), un agent réducteur des liaisons disulfures. La figure 3C montre que le traitement DTT a supprimé l'apparition des oligomères de HC-Pro induits par H₂O₂ en SDS-PAGE/Western blot. Ceci suggère que l'oligomérisation de HC-Pro nécessite l'établissement de ponts disulfures intermoléculaires. L'augmentation de la transmission induite par H₂O₂ peut ainsi être corrélée non seulement avec la formation des complexes HC-Pro/CP, mais également avec l'apparition des oligomères de HC-Pro liés entre eux par des ponts intermoléculaires entre cystéines.

Figure 3 : Analyse par SDS-PAGE / Western blot non réducteur de HC-Pro et de CP à partir de protoplastes de navet infectés par le TuMV.

Non-reducing SDS-PAGE/Western blotting analysis of HC-Pro and CP from TuMV-infected turnip protoplasts.

Profil de migration de la protéine CP (A), profil de migration des oligomères de HC-Pro (B) et profil de migration des oligomères de HC-Pro après réduction des ponts disulfures (C). La coloration au

rouge Ponceau de la RuBisCO (Rub) montre une quantité équivalente de protoplastes. Le marqueur de tailles et les masses moléculaires en kDa sont indiqués à gauche de chaque membrane.

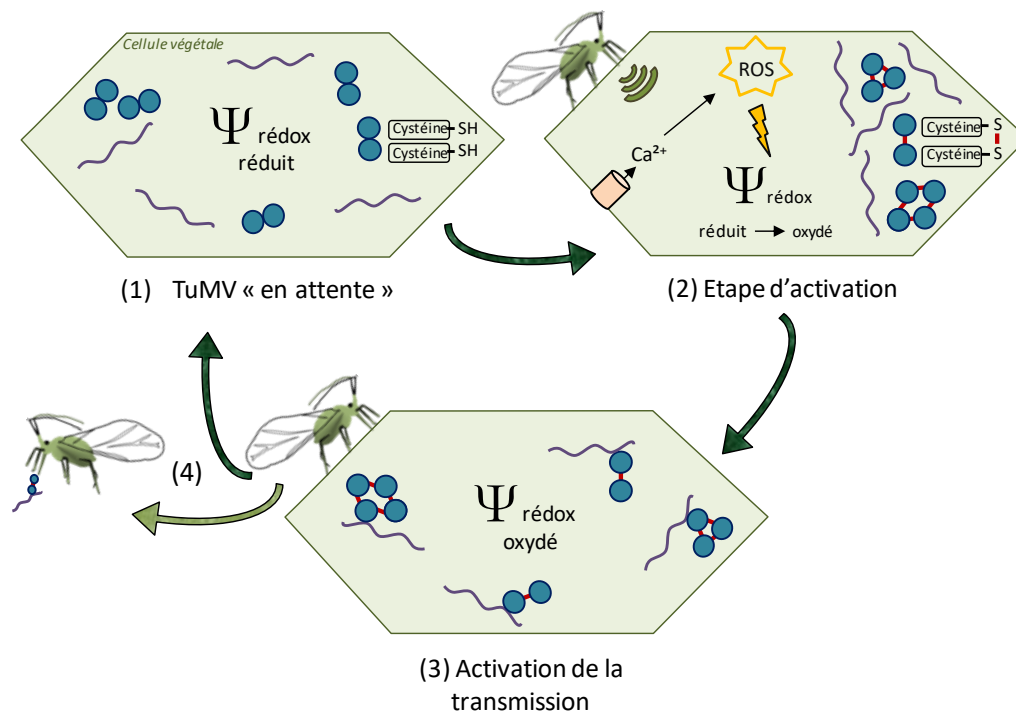


DISCUSSION

Dans cette étude, nous démontrons que l'AT du TuMV existe et qu'elle est induite par le ROS H₂O₂ et inhibée par le bloqueur des canaux calciques LaCl₃. Nous avons réalisé un modèle de l'AT du TuMV, correspondant à la figure 4. Dans cette figure, les différentes étapes de l'AT du TuMV sont représentées. Avant l'arrivée du puceron, le potentiel rédox du cytosol des cellules infectées par le TuMV est réduit. La protéine HC-Pro (cercles bleus) est sous une forme réduite ne contenant aucun pont disulfure intermoléculaire et probablement non associée à des particules virales (lignes sinueuses pourpres) (1). Lorsqu'un puceron se nourrit d'une feuille infectée par le TuMV, un éliciteur inconnu est reconnu par la cellule végétale et induit l'ouverture des canaux calciques (cylindre rose), ce qui déclenche la production de ROS dans la cellule. Pendant cette phase d'activation, les ROS dans le cytoplasme modifient (éclair jaune) le potentiel rédox du cytoplasme cellulaire et oxyde un ou plusieurs groupes thiol libres (-SH) des cystéines de HC-Pro. Cette oxydation génère des ponts disulfure (lignes rouges) entre les molécules HC-Pro, soit son oligomérisation, ou modifie la conformation des oligomères existants (2). Quoi qu'il en soit, l'oxydation de HC-Pro entraîne un changement fonctionnel de la protéine et permet l'interaction avec la CP, correspondant aux complexes transmissibles du TuMV. A ce moment là, la cellule infectée passe en mode transmission permettant une transmission efficace du TuMV (3). Le puceron acquiert les complexes transmissibles et transmet le TuMV lors des prochaines ponctions sur une autre plante. Après le départ du vecteur, le potentiel redox du cytoplasme cellulaire diminue à nouveau. HC-Pro est réduit, ce qui change sa conformation et induit la dissociation des complexes transmissibles, laissant HC-Pro libre de remplir ses autres fonctions lors de l'infection (4).

Les ROS et la signalisation calcique sont importants dans la perception précoce des parasites, y compris les insectes (Zebelo et Maffei, 2015) et plus récemment, des études ont mis en évidence que les piqûres de pucerons induisaient une élévation rapide du calcium autour des sites d'alimentation (Vincent *et al.*, 2017). Étant donné que les ROS et la signalisation calcique sont souvent interconnectés (Lachaud *et al.*, 2011), l'AT du TuMV détourne probablement une de ces deux voies. L'événement initial de déclenchement de ce processus reste inconnu, comme pour le CaMV. Il pourrait s'agir d'un effet direct des ROS contenus dans la salive de pucerons ou des peroxydases productrices de ROS (Miles, 1999) qui sont injectées dans les cellules au cours de l'activité d'alimentation. Aussi, un facteur végétal induit par le puceron ou une protéine du puceron pourrait provoquer une réaction immunitaire classique avec un récepteur moléculaire (PRR) (Jones et Dangl, 2006), provoquant des événements en aval liés au calcium et aux ROS. Les ROS sont également importants pour d'autres virus. Une étude récente a démontré que le virus de la mosaïque nécrotique du trèfle rouge (RCNMV) nécessite des ROS pour sa réplication (Hyodo *et al.*, 2017). Les auteurs ont proposé de manière intéressante que les virus des plantes puissent avoir développé un mécanisme complexe pour manipuler les ROS afin d'améliorer leur infectiosité.

Figure 4 : Modèle d'acquisition du TuMV par les pucerons.
Model of TuMV acquisition by aphids.



CONCLUSION

Un défi pour l'avenir sera de caractériser davantage l'AT du TuMV et du CaMV, les seuls phytovirus pour qui ce phénomène est décrit afin d'identifier le ou les éliciteurs initiaux. Il sera également essentiel de rechercher l'AT dans d'autres virus et d'explorer la diversité des moyens moléculaires et cellulaires que les virus pourraient utiliser, en fonction du type de relation qu'ils entretiennent avec leurs vecteurs et leurs hôtes. Tous les processus seront, à terme, essentiels pour développer de nouvelles stratégies de contrôle des virus, en ciblant par exemple les voies de la plante hôte qui étaient jusqu'à présent insoupçonnées et réduire ainsi la transmission virale.

REMERCIEMENTS

Nous remercions Takii Europe d'avoir fourni des graines de navet. Notre travail est financé par la subvention 12-BSV7-005-01 de l'Agence Nationale de la Recherche (ANR), par la subvention RGP0013/2015 du Programme Human Frontier Science (HFSP) et par la bourse CIFRE N°2015/1115, financée par l'Association Nationale Recherche Technologie (ANRT) en collaboration avec Semences Innovation Protection Recherche (SIPRE) et la Fédération Nationale des Producteurs de Pomme de Terre (FN3PT). Nous remercions Albin Teulet pour son aide avec les box plot, Romain Gallet et Gaël Thébaud pour les analyses statistiques, Jean-Luc Macia pour les élevages de pucerons, Sophie Le Blaye pour la préparation des plantes et Marie Ducouso pour les expériences de Duolink®.

BIBLIOGRAPHIE

- Baecker V., 2016 - Analyse Spots Per Protoplast - ImageJ-macros - MRI's Redmine. Retrieved June 22, 2018, http://dev.mri.cnrs.fr/projects/imagej-macros/wiki/Analyse_Spots_Per_Protoplast.
- Bak A., Gargani D., Macia J.-L., Malouvet E., Vernerey M.-S., Blanc S., and Drucker M., 2013a - Virus factories of cauliflower mosaic virus are virion reservoirs that engage actively in vector transmission. *Journal of Virology*, 87, 12207–12215.
- Bak A., Martinière A., Blanc S., and Drucker M., 2013b - Early interactions during the encounter of plants, aphids and arboviruses. *Plant Signal. Behav.*, 8, e24225.

Blanc S., López-Moya J.J., Wang R., García-Lampasona S., Thornbury D.W., Pirone T.P., 1997 - A specific interaction between CP and HC-Pro correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology*, 231, 1, 141-147.

Blanc S., Ammar E.D., Garcia-Lampasona S., Dolja V.V., Llave C., Baker J., Pirone T.P., 1998 - Mutations in the potyvirus Helper Component Protein : effects on interactions with virions and aphid stylets. *Journal of general virology*, 79, 3119-3122.

Drucker M., Then C., 2015 - Transmission activation in non-circulative virus transmission: a general concept? *Curr. Opin. Virol.*, 15, 63-68.

Hogenhout S.A., Ammar E.-D., Whitfield A.E., Redinbaugh M.G., 2008 - Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.*, 46, 327-359.

Hyodo K., Hashimoto K., Kuchitsu K., Suzuki N., Okuno T., 2017 - Harnessing host ROS-generating machinery for the robust genome replication of a plant RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 114, 7, E1282-E1290.

Jones J.D.G., Dangl, J.L., 2006 - The plant immune system. *Nature*, 444, 7117, 323-329.

Lachaud C., Da Silva D., Amelot N., Béziat C., Brière C., Cotellet V., Graziana A., Grat S., Mazars C., Thuleau P., 2011 - Dihydrosphingosine-induced programmed cell death in tobacco BY-2 cells is independent of H₂O₂ production. *Molecular Plant*, 4, 2, 310-318.

Martinière A., Bak A., Macia J.-L., Lautredou N., Gargan, D., Doumayrou J., Garzo E., Moreno A., Fereres A., Blanc S., Drucker M., 2013 - A virus responds instantly to the presence of the vector on the host and forms transmission morphs. *eLife* 2, e00183.

Miles, P. W., 1999 - Aphid Saliva. *Biological Reviews*, 74, 1, 41-85.

Ohshima K., Tomitaka Y., Wood J. T., Minematsu Y., Kajiyama H., Tomimura K., Gibbs A. J., 2007 - Patterns of recombination in turnip mosaic virus genomic sequences indicate hotspots of recombination. *The Journal of General Virology*, 88, 298-315.

Plisson C., Drucker M., Blanc S., German-Retana S., Le Gall O., Thomas D., Bron, P., 2003 - Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. *J. Biol. Chem.*, 278, 26, 23753-23761.

Revers F., García J.A., 2015 - Molecular biology of potyviruses. *Advances in virus research*, 92, 101-99.

Ruiz-Ferrer V., Boskovic J., Alfonso C., Rivas G., Llorca O., López-Abella D., López-Moya J. J., 2005. Structural analysis of tobacco etch potyvirus HC-pro oligomers involved in aphid transmission. *Journal of Virology*, 79, 6, 3758-3765.

Sako N., Ogata K., 1981 - Different helper factors associated with aphid transmission of some potyviruses. *Virology*, 112, 2, 762-765.

Söderberg O., Gullberg M., Jarvius M., Ridderstråle K., Leuchowius K.J., Jarvius J., Wester K., Hydbring P., Bahram F., Larsson L.G., Landegren U., 2006 - Direct observation of individual endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nature Methods*, 3, 12, 995-1000.

Thornbury D. W., Hellmann G. M., Rhoads R. E., Pirone, T. P., 1985 - Purification and characterization of potyvirus helper component. *Virology*, 144, 1, 260-267.

Vincent T. R., Avramova M., Canham J., Higgins P., Bilkey N., Mugford S. T., Sanders D., 2017 - Interplay of Plasma Membrane and Vacuolar Ion Channels, Together with BAK1, Elicits Rapid Cytosolic Calcium Elevations in Arabidopsis during Aphid Feeding. *The Plant Cell*, 29, 6, 1460-1479.

Widholm J. M., 1972 - The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of cultured plant cells. *Stain Technology*, 47, 4, 189-194.

Zebelo S. A., Maffei, M. E., 2015 - Role of early signalling events in plant-insect interactions. *Journal of Experimental Botany*, 66, 2, 435-448.