

**Université de Strasbourg**

**ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE**

**Doctorat de Biologie**

# Rôle des modifications post- traductionnelles des particules virales du CABYV dans la transmission par puceron

Sébastien REVOLLON

*Thèse dirigée par Véronique Brault, Directrice de Recherche*

Soutenue en février 2010

Jury :

Mme Sylvie German-Retana (Chargée de Recherches)

Rapporteur

M. Emmanuel Jacquot (Chargé de Recherches)

Rapporteur

M. David Gilmer (Professeur)

Rapporteur

Mme Sylvie Dinant (Chargée de Recherches)

Examinatrice

M. Yvan Rahbé (Directeur de Recherches)

Examineur



# Remerciements

---

*Par ordre d'apparition : Véronique, Sylvaine, la grande Monique, Cathy, la petite Monique, Louis, Pascale, Jean, Caroline, Bouchaïb, Baptiste, Caren.*

*A l'INRA et à la région Alsace qui ont financé ce projet durant ces 3 années.*

*Et Virginie qui a su m'encourager tout du long.*





# Table des matières

---

<b>Introduction Générale.....</b>	<b>1</b>
<b>I - Les Polérovirus .....</b>	<b>2</b>
A - Généralités.....	2
B - Symptomatologie et épidémiologie du CABYV .....	3
C - Fonctions des protéines .....	5
1) La protéine P0 : suppresseur de l'ARN «silencing ».....	5
2) P1 et P1-P2 : réplication.....	6
a) Domaine protéase.....	6
b) Domaine VPg .....	6
c) Domaine polymérase .....	7
d) Domaine hélicase .....	7
3) P3 : protéine majeure de capside.....	7
4) P4 : protéine de mouvement.....	8
5) P5 : protéine de readthrough .....	10
6) Autres protéines : Rap1, P6, P7 .....	11
<b>II - Les différents modes de transmission par hémiptères chez les virus de plantes....</b>	<b>12</b>
A - Les différents modes de transmission .....	12
B - Transmission non persistante .....	13
1) <i>Bromoviridae</i> .....	13
2) <i>Potyviridae</i> .....	15
C - Transmission semi-persistante .....	16
1) <i>Caulimoviridae</i> .....	16
2) <i>Closteroviridae</i> .....	17
D - Transmission circulante non réplivative.....	18
1) <i>Luteoviridae</i> .....	18
2) <i>Nanoviridae</i> .....	20
E - Transmission circulante réplivative .....	21
1) <i>Rhabdoviridae</i> .....	21
F - Protéines d'insectes impliquées dans les interactions virus-vecteur .....	22
<b>III - Rôles des modifications post-traductionnelles chez les virus .....</b>	<b>25</b>
A - La phosphorylation.....	25
1) Rôle dans la réplication virale.....	26
2) Rôle dans le mouvement .....	29
3) Formation de structures spécialisées.....	30
B - La glycosylation .....	30



1) Glycosylation de protéines virales de virus enveloppés .....	31
2) Glycosylation de protéines virales de virus non-enveloppés .....	32
C - Autres modifications post-traductionnelles.....	33
a) Tyrosine-O-sulfation.....	34
b) Myristoylation et Palmitoylation .....	34
<b>Objectifs de la thèse.....</b>	<b>37</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>39</b>
<b>I - Analyse de la glycosylation des protéines de structure des polérovirus.....</b>	<b>40</b>
A - Analyse in silico.....	40
B - Pouvoir infectieux des mutants dans les sites potentiels de N-glycosylation dans les protoplastes et dans les plantes.....	41
1) Analyse de la réplication des mutants dans les protoplastes.....	41
2) Analyse du pouvoir infectieux et de la stabilité des mutants dans les plantes.....	42
a) Accumulation des mutants dans les plantes .....	42
b) Test de stabilité des particules virales.....	43
c) Analyse de la conservation des mutations introduites dans la descendance virale .....	45
3) Tests de transmissibilité par pucerons .....	45
C - Détection des résidus glycosylés sur les protéines de structure des polérovirus par approche biochimique .....	47
D - Détection des glycanes oligomannosidiques et des glycanes complexes sur les protéines de structure des polérovirus .....	48
1) Détection des glycanes oligomannosidiques.....	48
2) Immunodétection des glycanes complexes .....	49
E - Détection des résidus glycosylés sur les protéines de structure des polérovirus par spectrométrie de masse.....	50
<b>II - Analyse de la phosphorylation des protéines de structure des polérovirus.....</b>	<b>52</b>
A - Analyse in silico.....	52
B - Détection des résidus phosphorylés sur les protéines de structure des polérovirus par approche biochimique .....	53
C - Détection des résidus phosphorylés sur les protéines de structure des polérovirus par spectrométrie de masse.....	54
D - Analyse du comportement des polérovirus dans des plantes affectées dans l'expression des gènes codant pour la sous unité régulatrice de la CK $\beta$ 2.....	55
1) Evaluation de l'efficacité du VIGS .....	56
2) Accumulation virale dans les plantes silencées .....	56
3) Analyse de la transmissibilité .....	57
<b>III - Rôle de la P90 dans la transmission du CABYV par puceron.....</b>	<b>57</b>
A - Immunocapture des particules virales avec des anticorps dirigés contre la P90.....	58
B - Effet de l'incubation des virons avec les anticorps anti-P90 sur la transmission du virus par puceron .....	59
C - Analyse du comportement du CABYV et du TuYV dans le mutant d'insertion de la $\beta$ -xylosidase 1 (mutant Bx11) .....	60
1) Caractérisation du mutant Bx11.....	60



2) Accumulation du CABYV et du TuYV dans le mutant Bx11 et transmissibilité par puceron à partir des plantes infectées .....	60
<b>IV - Recherche de partenaires phloémiens du CABYV : rôle des lectines dans le cycle viral et la transmission par puceron .....</b>	<b>62</b>
A - Etude du comportement des polérovirus dans des mutants d' <i>A. thaliana</i> affectés dans l'expression du gène de l'At-PP2-A1 .....	63
1) Accumulation des virus dans les mutants d' <i>A. thaliana</i> .....	63
2) Transmissibilité des virus par puceron à partir des mutants d' <i>A. thaliana</i> .....	64
B - Analyse de l'effet de protéines purifiées (autres que les lectines) sur la transmission du CABYV par puceron .....	65
C - Devenir des particules virales en présence de l'At-PP2-A1 .....	65
1) Effet de l'addition d'At-PP2-A1 sur l'internalisation des virions dans le puceron .	65
2) Effet de l'addition d'At-PP2-A1 sur l'agrégation des virions .....	66
<b>V - Résultats complémentaires .....</b>	<b>67</b>
A - Mouvement à longue distance des polérovirus dans les plantes : quelle(s) forme(s) virale(s) chemine(nt) dans les tubes criblés ? .....	67
1) Suivi de l'accumulation de mutants viraux présentant un défaut d'encapsidation ..	68
<b>Discussion, Conclusion Générale et Perspectives .....</b>	<b>70</b>
<b>I - Recherche de modifications post-traductionnelles sur les protéines de structure du CABYV : résultats directs et indirects de l'étude .....</b>	<b>71</b>
<b>II - Rôle des protéines de plantes dans la transmission .....</b>	<b>76</b>
<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>79</b>
<b>I - Matériel .....</b>	<b>80</b>
A - Milieux de culture .....	80
1) Milieu complet Luria Bertani (LB) .....	80
2) Milieu de culture Yeast Extract Broth (YEB) .....	80
B - Bactéries .....	80
1) <i>Escherichia coli</i> , souche DH5 $\alpha$ .....	80
2) <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , souche C58C1 .....	80
C - Plasmides .....	81
1) Plasmide Bluescript KS .....	81
2) Plasmide binaire .....	81
D - Virus .....	81
1) <i>Cucurbit aphid borne yellows virus</i> (CABYV) .....	81
2) <i>Beet western yellows virus</i> (BWYV) .....	82
E - Matériel végétal et inoculation des plantes par agroinfection .....	82
1) <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	82
2) <i>Montia perfoliata</i> .....	82
3) <i>Cucumis sativus</i> .....	82
4) Inoculation des plantes par la technique d'agroinfection .....	82
F - Pucerons et expériences de transmission .....	83



1) <i>Myzus persicae</i> .....	83
2) <i>Aphis gossypii</i> .....	83
3) Expériences de transmission par puceron .....	83
a) À partir de plantes agroinfectées.....	83
b) À partir de virus purifié .....	83
<b>II - Méthodes.....</b>	<b>84</b>
A - Biologie Moléculaire.....	84
1) Mutagenèse dirigée sur des fragments d'ADN par la technique de PCR et clonage du fragment mutagénisé dans un vecteur .....	84
a) PCR.....	84
b) Analyse des fragments d'ADN sur gel d'agarose .....	84
c) Digestion par des enzymes de restriction.....	84
d) Purification des fragments d'ADN .....	85
e) Ligation.....	85
f) Transformation de bactéries .....	85
g) Extraction des plasmides des bactéries recombinantes.....	85
h) Construction des mutants du CABYV .....	86
B - Protéines .....	86
1) Détection des virus par la technique ELISA .....	86
2) Purification de virus à partir de plantes agroinfectées .....	87
3) Préparation des échantillons de protéines .....	88
a) À partir de protoplastes.....	88
b) À partir de plantes.....	88
4) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE) .....	88
5) Coloration au bleu de Coomassie.....	88
6) Western blot .....	88
C - Analyse des acides nucléiques .....	89
1) Extraction d'ARN à partir de protoplastes ou de plants de <i>M. perfoliata</i> .....	89
2) Extraction d'ARN à partir de concombre .....	89
3) Préparation de sondes à ARN marquées à la digoxygénine.....	89
4) Northern blot .....	90
5) Test de sensibilité aux RNases.....	90
a) Extraction des ARN totaux .....	90
b) Extraction des ARN encapsidés.....	91
6) Analyse de la descendance virale par RT-PCR .....	91
7) qRT-PCR.....	91
D - Analyse de la glycosylation .....	92
1) Par l'utilisation du kit ProQ Emerald.....	92
E - Divers.....	92
1) Analyse <i>in silico</i> des protéines .....	92
8) Immunoprécipitation .....	92
9) IC-RT-PCR .....	93



**Références** ..... 94

**Annexes** ..... 107

**I - Article 1 : Phloem protein partners of *Curcurbit aphid borne yellows virus*: possible involvement of phloem proteins in virus transmission by aphids (en revision MPMI) ..... 108**

B. Bencharki, S. Boissinot, S. Revollon, V. Ziegler-Graff, M. Erdinger, L. Wiss, S. Dinant, D. Renard, M. Beuve, C. Lemaitre-Guillier, et V. Brault

**II - Article 2 : 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 (soumis *Virology*)..... 108**

S. Revollon, J.M. Strub, A-C. Fitchette, L. Wiss, V. Gomord, A. Van Dorsselaer et V. Brault





# Abréviations

---

ARN : acide ribonucléique  
ADN : acide désoxyribonucléique  
BET : bromure d'éthidium  
BSA : bovine serum albumine  
CP : protéine de capsid  
DAS: double antibody sandwich  
dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate  
DRT : domaine de readthrough  
DO : densité optique  
DTT : dithiothréitol  
EC : écart-type  
EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique  
ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay  
g : gramme  
GSA : glandes salivaires accessoires  
GFP : green fluorescent protein  
kb : kilobase  
kDa : kilodalton  
KO : knock-out  
M : molaire  
MES : acide morpholino-éthane-sulfonique  
MET : microscopie électronique à transmission  
MP : protéine de mouvement  
Min : minute  
NLS : nuclear localization signal  
nt : nucléotides  
ORF : open reading frame, phase ouverte de lecture  
PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide  
Pb : paires de bases  
pBin : plasmide binaire  
PCR : polymérase chain reaction  
PEG : polyéthylène glycol  
RNP : ribonucléoprotéique  
Rpm : rotation par minute  
RT : protéine de readthrough  
SDS : sodium dodecyl sulfate  
Sec : secondes  
SSC : saline sodium citrate  
UV : ultraviolet  
VIGS : virus induced gene silencing  
V : volt  
Vol : volume  
VPg : viral protein genome linked





# Abréviations de virus

---

BYDV-PAV : *Barley yellow dwarf virus*  
BMV : *Beet mild yellowing virus*  
BWYV : *Beet western yellows virus*  
BYV : *Beet yellows virus*  
CABYV : *Cucurbit aphid-borne yellows virus*  
CaMV : *Cauliflower mosaic virus*  
CMV : *Cucumber mosaic virus*  
CNV : *Cucumber necrosis virus*  
CPMV : *Cowpea mosaic virus*  
CTV : *Citrus tristeza virus*  
CuYV : *Cucumber yellows virus*  
CYDV : *Cereal yellow dwarf virus*  
DEN-2 : *Virus de la dengue de type 2*  
FBNY : *Faba bean necrotic yellows virus*  
HCV : *Hepatitis C virus*  
LIYV : *Lettuce infectious yellows virus*  
LNYV : *Lettuce necrotic yellows virus*  
MABYV : *Melon aphid-borne yellows virus*  
PEMV : *Pea enation mosaic virus*  
PPV : *Plum pox virus*  
PRLV : *Potato leafroll virus*  
PVY : *Potato virus Y*  
PYDV : *Potato yellow dwarf virus*  
RYMV : *Rice yellow mottle virus*  
SbDV : *Soybean dwarf virus*  
SCYLV : *Sugarcane yellow leaf virus*  
SeMV : *Sesbania mottle virus*  
TMV : *Tobacco mosaic virus*  
TRV : *Tobacco rattle virus*  
TuYV : *Turnip yellows virus (précédemment BWYV-FL1)*  
TYMV : *Turnip yellow mosaic virus*  
VIH : *Virus de l'immunodéficience humaine*  
WNV : *West Nile Virus*  
VV : *Vaccinia virus*  
VZV : *Varicella-zoster virus*



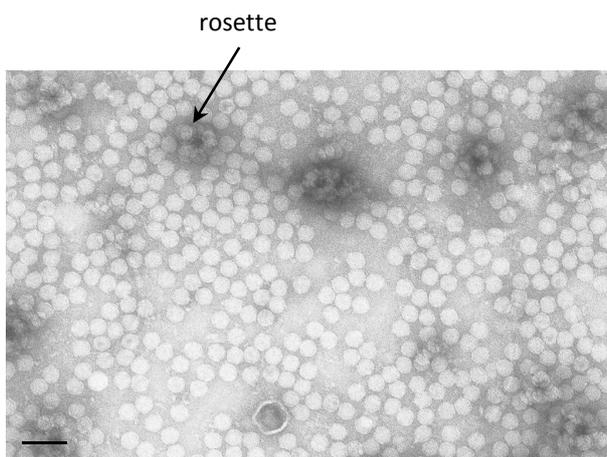


# Introduction Générale

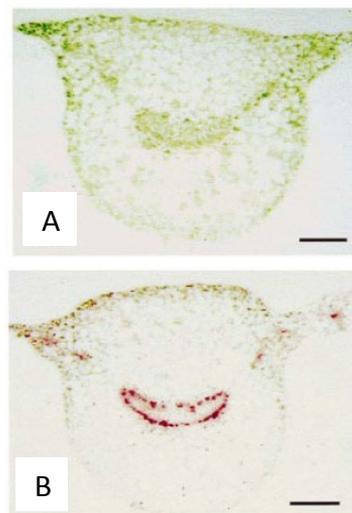


Genre	Espèce
<i>Enamovirus</i>	<b><i>Pea enation mosaic virus-1</i></b> (PEMV-1)
<i>Luteovirus</i>	<i>Barley yellow dwarf virus-MAV</i> (BYDV-MAV) <i>Barley yellow dwarf virus-PAS</i> (BYDV-PAS) <b><i>Barley yellow dwarf virus-PAV</i></b> (BYDV-PAV) <i>Bean leafroll virus</i> (BLRV) <i>Rose spring dwarf-associated virus</i> (RSDaV) <i>Soybean dwarf virus</i> (SbDV)
<i>Polerovirus</i>	<i>Beet chlorosis virus</i> (BChV) <i>Beet mild yellowing virus</i> (BMYV) <i>Beet western yellows virus</i> (BWYV) <i>Carrot red leaf virus</i> (CtRLV) <i>Cereal yellow dwarf virus-RPS</i> (CYDV-RPS) <i>Cereal yellow dwarf virus-RPV</i> (CYDV-RPV) <i>Chickpea chlorotic stunt virus</i> (CpCSV) <i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i> (CABYV) <i>Melon aphid-borne yellows virus</i> (MABYV) <b><i>Potato leafroll virus</i></b> (PLRV) <i>Sugarcane yellow leaf virus</i> (SCYLV) <i>Tobacco vein distorting virus</i> (TVDV) <i>Turnip yellows virus</i> (TuYV, anciennement BWYV-FL1)
Non classés	<i>Barley yellow dwarf virus-GPV</i> (BYDV-GPV) <i>Barley yellow dwarf virus-RMV</i> (BYDV-RMV) <i>Barley yellow dwarf virus-SGV</i> (BYDV-SGV) <i>Chickpea stunt disease associated virus</i> (CpSDaV) <i>Groundnut rosette assistor virus</i> (GRAV) <i>Indonesian soybean dwarf virus</i> (ISDV) <i>Sweet potato leaf speckling virus</i> (SPLSV) <i>Tobacco necrotic dwarf virus</i> (TVDV)

**Tableau 1** : Classification de la famille des *Luteoviridae*. D'après l'ICTV Virus Taxonomy 2009. En gras les membres types de chaque genre ; en rouge les polérovirus fréquemment utilisés au laboratoire.



**Figure 1** : Particules virales du CABYV, de la famille des *Luteoviridae*. Les particules présentent une symétrie icosaédrique et leur diamètre est d'environ 25 nm (C. Reinbold). On observe sur ce cliché des arrangements des virions en « rosettes » caractéristiques du CABYV. La barre correspond à 100nm



**Figure 2** : Restriction des *Luteoviridae* au tissu phloémien. Immuno-marquage des protéines structurales du TuYV sur une section transversale des pétioles de *N. clelandii* sur (A) une plante saine et (B) une plante infectée. D'après Mutterer *et al.*, 1999.

# I - Les Polérovirus

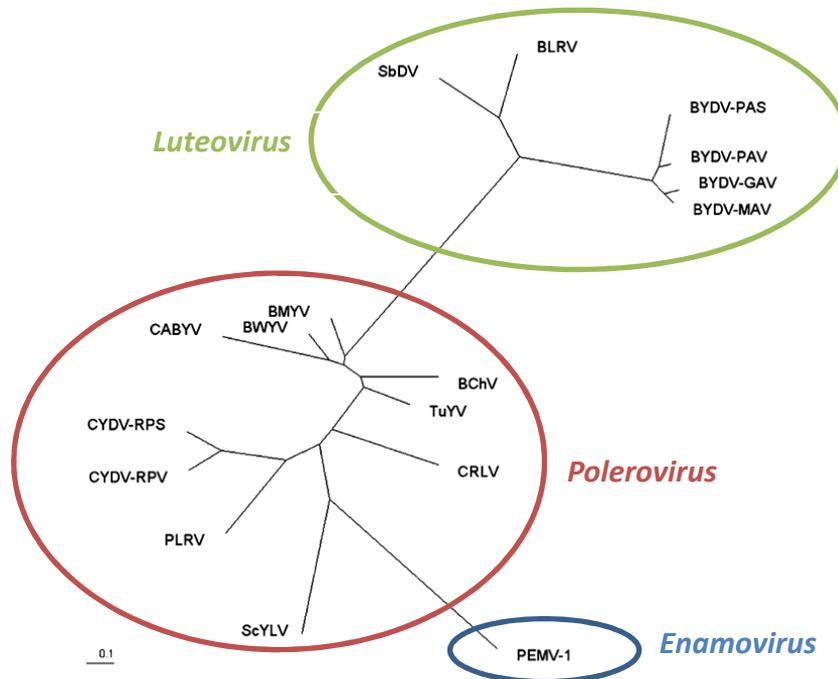
Les virus transmis par puceron qui sont étudiés au laboratoire sont le *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) ou « virus de la jaunisse des cucurbitacées transmis par puceron » et le *Turnip yellows virus* (TuYV) ou « virus de la jaunisse du navet » précédemment nommé *Beet western yellows virus* isolat FL1 (BWYV-FL1) ou « virus de la jaunisse occidentale de la betterave » [Graichen et Rabenstein, 1996]. Ces deux virus appartiennent au genre *Polerovirus*, famille des *Luteoviridae*. Les *Luteoviridae* ont comme caractéristiques communes de former des particules virales icosaédriques d'un diamètre compris entre 25 et 30 nm (figure 1), un mode de transmission par puceron de type circulant non-répliatif, et une restriction aux cellules du phloème dans la plante hôte (figure 2).

Nous allons voir en détail les particularités de cette famille, en nous intéressant plus spécifiquement au CABYV sur lequel a porté la majeure partie du travail de thèse. Nous présenterons successivement les origines de sa découverte, les symptômes induits sur les plantes hôtes ainsi que certaines caractéristiques épidémiologiques.

## A - Généralités

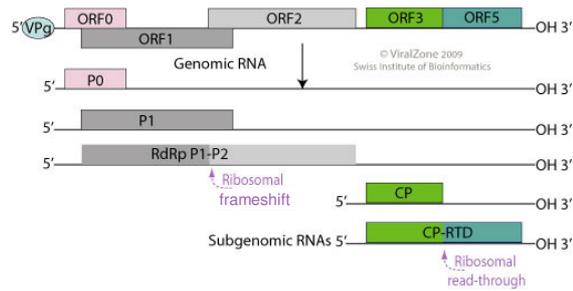
La famille des *Luteoviridae* (tableau 1) est définie sur la base des propriétés biologiques des virus la composant qui partagent tous un mode de transmission par puceron et sur les similarités de séquence de leurs protéines de capsid. Ce type de classification n'est pas usuel, les virus étant généralement classés selon leurs homologies au niveau de la séquence des ARN polymérases. En ce qui concerne les membres de cette famille, les séquences codant pour les polymérases sont à l'inverse fort divergentes. Trois genres partageant des homologies de séquences (figure 3) y sont définis sur la base de la longueur de la séquence non codante, la présence ou l'absence de protéine VPg et la séquence de la polymérase (figure 4).

Le genre *Luteovirus* (le nom du genre provient des jaunisses apparaissant sur les plantes infectées ; en latin *luteo* signifie jaune), dont le membre type est la souche PAV du *Barley yellow dwarf virus* (BYDV-PAV), se caractérise par le fait que les protéines impliquées dans la réplication (P1 et P1-P2) présentent une parenté phylogénétique avec les protéines impliquées dans la réplication des *Carmovirus* suggérant des relations au

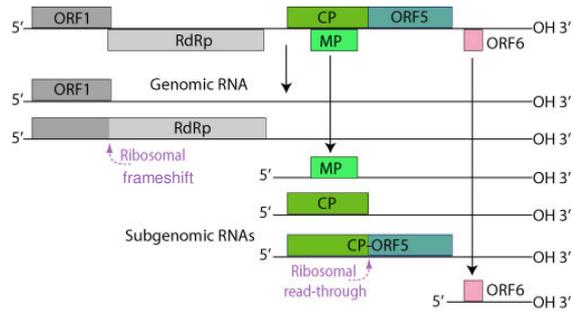


**Figure 3 : Arbre phylogénétique des virus appartenant à la famille des *Luteoviridae*.** Cet arbre a été réalisé à partir des séquences nucléotidiques des génomes complets des virus. On observe la répartition des virus en trois clades correspondant aux trois genres. L'échelle indique la longueur de la branche. D'après Huang *et al.*, 2005.

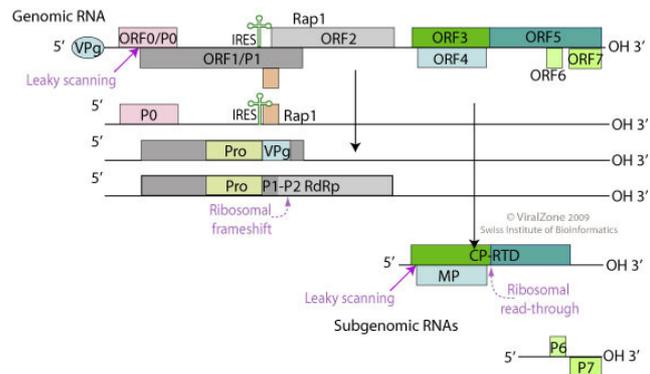
***Enamovirus***



***Luteovirus***



***Polerovirus***



**Figure 4 : Organisation génomique des 3 genres appartenant à la famille des *Luteoviridae*.** D'après ViralZone, 2009 (<http://www.expasy.org/viralzone/>) IRES: international ribosome entry site; VPg: viral genome-linked protein

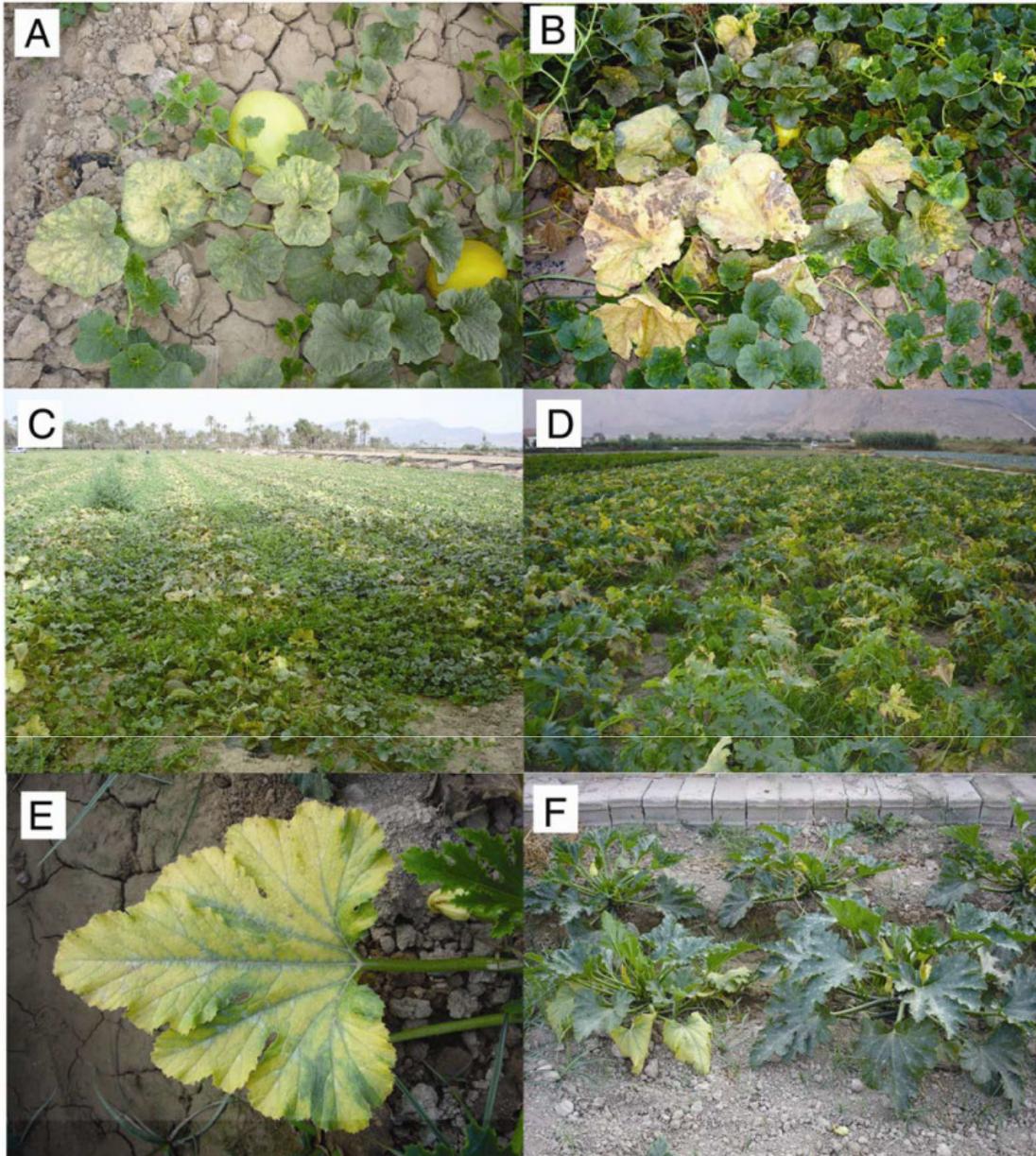
niveau évolutif. La séquence non codante présente entre la 2<sup>ème</sup> phase ouverte de lecture (ORF : Open Reading Frame) et la 3<sup>ème</sup> est d'environ 100 nucléotides. D'autre part, aucune protéine VPg (genome-linked viral protein) se liant à l'extrémité 5' du génome viral n'a pu être mise en évidence, et la traduction de l'ARN génomique se fait très probablement par un mécanisme qui n'est pas lié à la présence d'une coiffe mais qui fait intervenir des éléments de traduction situés dans la partie 5' de la région non-codante [Kneller, Rakotondrafara *et al.*, 2006] ainsi que dans la partie 3' du génome [Allen, Wang *et al.*, 1999].

Dans le genre *Polerovirus*, le membre type est le **Potato leafroll virus** (PLRV) dont est dérivé le nom de ce genre. Ce genre se distingue des *Luteovirus* par la présence d'une ORF0 en 5' de leur génome et d'une protéine VPg liée l'extrémité 5' de l'ARN génomique. Concernant les protéines impliquées dans la réplication, elles sont plus proches de celles des *Sobemovirus*. La longueur de la séquence non codante entre les ORF2 et 3 est d'environ 200 nucléotides.

Enfin, le genre *Enamovirus* est le troisième genre de la famille, il est composé d'un seul membre : le **Pea enation mosaic virus-1** (PEMV1) qui, lui aussi, a donné son nom à ce genre. Comme pour les *Polerovirus*, le génome de ce virus code pour une protéine VPg et possède une ORF0 en 5'. Cependant, il ne possède pas l'ORF4 qui code pour une protéine de mouvement et son ORF5 est plus courte de 600 nucléotides par rapport à celle des autres membres de cette famille. Le PEMV1 peut se multiplier dans des protoplastes de cellules isolées, mais est incapable d'envahir la plante entière. L'infection systémique de la plante nécessite la présence du PEMV2, un *Umbravirus*, qui permet au PEMV1 d'infecter les cellules du mésophylle et lui confère aussi la possibilité d'être inoculé mécaniquement. Le PEMV2 étant dépourvu de protéine de capsidation, il dépend du PEMV1 pour son encapsidation et sa transmission par puceron.

## ***B - Symptomatologie et épidémiologie du CABYV***

Le CABYV a été décrit pour la première fois en 1992 [Lecoq, Bourdin *et al.*, 1992], alors que l'apparition d'une nouvelle maladie causant des jaunisses sur les cultures de cucurbitacées en France avait déjà été observée depuis 1988. Le virus était probablement présent depuis plus longtemps dans les cultures, mais les symptômes ont été incorrectement attribués à des déficiences en nutriments, à la sénescence des plants, ou bien à d'autres virus, tel que le *Lettuce infectious yellow virus* (LIYV) ou le *Cucumber yellows virus* (CuYV) qui induisent, eux aussi, des jaunisses mais sont transmis par aleurodes. Depuis,

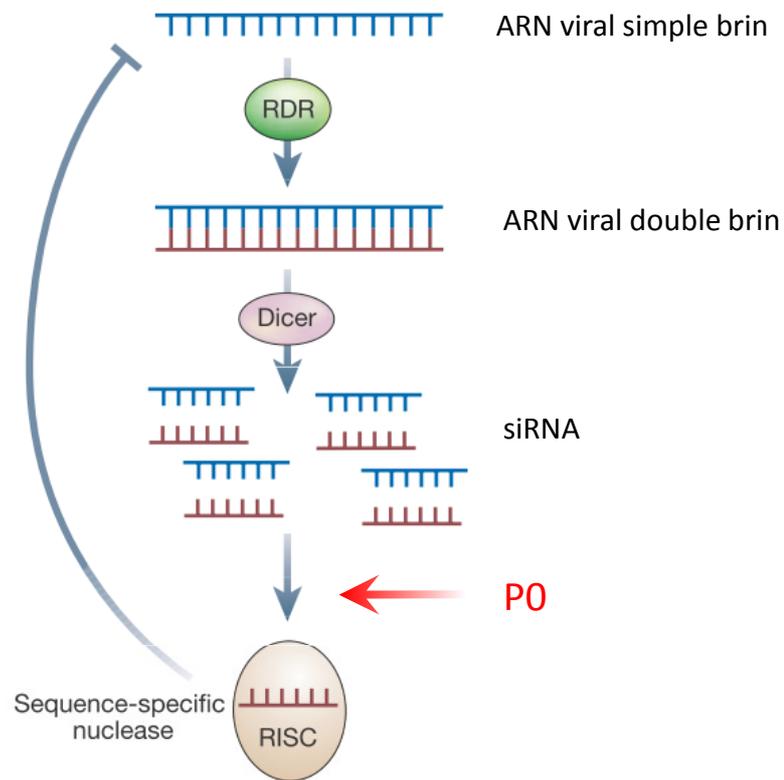


**Figure 5 : Symptômes sur plantes infectées par le CABYV.** Chez le melon on observe un jaunissement et un épaississement des feuilles basales (A) et des nécroses des feuilles basales sur les plantes plus âgées (B). Champs de melons (C) et de courgettes (D) infectés à près de 100 % par le CABYV en Espagne. Chez la courgette les symptômes du CABYV sont des jaunissements des feuilles basales (E), et une réduction de la croissance (F) comparée à des plantes saines (sur la droite). D'après Kassem *et al.*, 2007.

le virus a été détecté dans la majorité des pays producteurs de cucurbitacées : aux Etats-Unis en Californie [Lemaire, Gubler *et al.*, 1993], dans les pays du bassin méditerranéen (Italie [Tomassoli et Meneghini, 2007], en Espagne [Juarez, Truniger *et al.*, 2004], en Turquie [Yardimci et Ozgonen, 2007], à Chypre [Papayiannis, Ioannou *et al.*, 2005], en Grèce [Boubourakas, Avgelis *et al.*, 2006], en Tunisie [Mnari Hattab, Kummert *et al.*, 2005], au Liban [Abou-Jawdah, Sobh *et al.*, 1997]), ainsi qu'en Chine [Xiang, Shang *et al.*, 2008]. À noter qu'en Chine, une autre espèce du genre *Polerovirus* infectant les cucurbitacées a été trouvée en co-infection avec le CABYV : le *Melon aphid-borne yellows virus* (MABYV). Deux espèces de pucerons vectrices du CABYV ont été mises en évidence au cours de ces études épidémiologiques [Lecoq, Bourdin *et al.*, 1992] : *Myzus persicae* et *Aphis gossypii*. La gamme d'hôte du CABYV établie par Lecoq, montre qu'il est capable d'infecter certaines espèces hôtes pour le TuYV (*Capsella bursa-pastoris*, *Montia perfoliata* et *Senecio vulgaris*) à l'exception de celles appartenant à la famille des *Solanaceae* (*Physalis floridana* et *Nicotiana clevelandii*) ou à celle des *Leguminosae* (*Pisum sativum*). Par contre, le CABYV se multiplie chez quatre espèces appartenant à la famille des *Cucurbitaceae* qui ne sont pas infectées par le TuYV [Lecoq, Bourdin *et al.*, 1992]. Au laboratoire, les plantes utilisées pour multiplier le CABYV sont *Arabidopsis thaliana*, *M. perfoliata* et *Cucumis sativus*.

Les symptômes que produit le CABYV sur les cucurbitacées sont un jaunissement des feuilles les plus âgées (figure 5), sans atteinte des fruits, ce qui permet leur commercialisation. Par contre, il est responsable d'un fort taux d'avortement des fleurs de cucurbitacées, conduisant à des pertes de rendement de l'ordre de 50 % [Lecoq, Bourdin *et al.*, 1992].

Pour le moment, le principal moyen de lutte contre l'infection par le CABYV, est l'utilisation de pesticides pour contrôler les populations de pucerons. Cette méthode, peu respectueuse de l'environnement, comporte des effets négatifs tels que la sélection de populations de pucerons résistantes. Chez le melon, deux types de résistance au CABYV ont été mises en évidence : une résistance au virus lui-même, gouvernée par deux gènes récessifs complémentaires : *cab-1* et *cab-2* (*cucurbit aphid-borne yellows virus resistance-1 et 2*) qui n'ont pour l'instant pas été introgressés dans les variétés cultivées [Dogimont, Bussemakers *et al.*, 1997] ; et une résistance à l'un de ses vecteurs, *A. gossypii*, gouvernée par un seul gène dominant, le gène *Vat* [Lecoq, Cohen *et al.*, 1979]. La résistance à *A. gossypii* conférée par le gène *Vat* entraîne une résistance élevée aux virus transmis selon le mode



**Figure 6 : Schématisation des principales étapes du mécanisme de l'ARN «silencing».**

L'ARN viral double brin (intermédiaire de réplication) est reconnu par Dicer qui génère des siRNA dont un brin est incorporé dans le complexe RISC qui guide la dégradation spécifique de toute séquence d'ARN complémentaire. La protéine P0 suppresseur de l'ARN «silencing» des polérovirus agit en aval de Dicer au niveau de la protéine AGO1 qui fait partie du complexe RISC. *RDR* : RNA-dependent replicase ; *RISC* : RNA-induced gene silencing. D'après Baulcombe *et al.*, 2004

non persistant alors qu'elle n'induit qu'un retard d'une semaine dans le développement de l'infection dans le cas du CABYV [Lecoq, Cohen *et al.*, 1979].

## **C - Fonctions des protéines**

Le génome du CABYV contient six phases ouvertes de lectures (figure 4), deux phases supplémentaires (ORF 6 et ORF7) n'ayant été mises en évidence qu'*in silico* [Ashoub, Rohde *et al.*, 1998]. Les données sur la fonction des protéines codées par ces ORFs sont restreintes concernant le CABYV. Ainsi, d'autres exemples portant sur des virus appartenant au même genre (*Polerovirus*) seront également cités pour décrire la fonction des protéines virales.

### **1) La protéine P0 : suppresseur de l'ARN «silencing»**

La première phase de lecture chez les polérovirus, située à l'extrémité 5' du génome, code pour la protéine P0. Elle avait tout d'abord été caractérisée comme un facteur de pathogénicité car, exprimée dans des plants de pomme de terre transgéniques, la P0 du PLRV produisait des symptômes semblables à ceux observés lors d'une infection virale. Depuis, il a été montré qu'elle possède une activité de suppression de l'ARN «silencing», système conservé à la fois chez les plantes et les animaux, pouvant agir comme un mécanisme antiviral [Pfeffer, Dunoyer *et al.*, 2002]. L'ARN «silencing», ou «RNA interférence» chez les animaux, est un système universel chez les organismes multicellulaires [Baulcombe, 2004] qui permet de réduire spécifiquement l'expression des ARN au niveau post-transcriptionnel par un processus complexe impliquant des petits ARN (figure 6). Parmi ceux-ci, les «small interfering RNAs» (siRNA) de 21 à 24 nucléotides (nt) sont générés par Dicer, une ribonucléase de type III, à partir d'ARN double brin. Un brin de ce siRNA peut-être incorporé dans un complexe RISC (RNA induced silencing complex) et sert de guide pour la dégradation de d'ARN contenant une séquence complémentaire. Le composant principal du complexe RISC est une protéine Argonaute (Ago).

La protéine P0 du CABYV, comme celle du TuYV, contient un domaine «F-box-like» nécessaire à l'activité de suppression de l'ARN «silencing». Ce domaine permettrait à la protéine P0, via son interaction avec la protéine SKP1, de faire partie du complexe SCF E3 ubiquitine ligase qui permet l'ubiquitination de substrat spécifique [Pazhouhandeh, Dieterle *et al.*, 2006]. Il a été montré que les protéines P0 agissent en déstabilisant la protéine Argonaute1 (Ago1) impliquée dans la voie de l'ARN «silencing» [Bortolamiol, Pazhouhan-

deh *et al.*, 2007]. Cette déstabilisation de Ago1 n'est cependant pas due à une dégradation de la protéine par le protéasome [Baumberger, Tsai *et al.*, 2007], car l'inhibition de l'ARN « silencing » est maintenue en présence d'inhibiteur du protéasome. Une propriété des protéines P0 du CABYV, du TuYV et du PLRV est leur capacité à supprimer l'ARN « silencing » local mais pas systémique. Cette particularité est due au fait que la protéine P0 agit sur Ago1 en aval de la protéine Dicer responsable de la production des siRNA qui peuvent se déplacer dans la plante et induire le « silencing » dans les cellules autres que celles infectées par le virus.

## 2) P1 et P1-P2 : réplication

Le codon d'initiation de la protéine P0 est situé dans un contexte défavorable, ce qui conduit le ribosome à poursuivre la lecture du génome jusqu'à l'AUG suivant. Ce mécanisme nommé « leaky scanning », va permettre l'expression de l'ORF1. Nous décrivons ensemble les protéines P1 et P1-P2 étant donné que la protéine P1-P2 résulte d'un mécanisme de décalage de la phase de lecture en -1 de l'ORF1 qui aboutit à la protéine de fusion P1-P2. Le décalage de la phase de lecture a lieu au niveau d'une séquence consensus du type XXXYYYZ (avec X=A,U,G,C ; Y=A,U ; Z=A,U,C) et est favorisé par la présence en aval d'une région fortement structurée dénommée « pseudo-nœud ». Les protéines P1 et P1-P2 sont des polyprotéines intervenant dans la réplication du virus, qui contiennent plusieurs domaines fonctionnels.

### a) Domaine protéase

Le premier domaine de l'ORF1 du PLRV correspond à une protéase à sérine, et le motif protéase **HX<sub>29-34</sub>[D/E]X<sub>62-63</sub>TXKGYSG** (en gras les acides aminés composant le site catalytique) est retrouvé chez tous les virus du genre *Polerovirus*. Ce domaine est responsable du clivage en *trans* de la de la partie C-terminale de la protéine P1 contenant le domaine VPg.

### b) Domaine VPg

La protéine VPg (viral protein genome linked), nécessaire pour la réplication virale, se lie à l'extrémité 5' de l'ARN génomique. Chez le *Rice yellow mottle virus* (RYMV) et le *Sesbania mottle virus* (SeMV), des sobémovirus, il a été montré que leurs VPg possèdent des domaines intrinsèquement désordonnés [Hebrard, Bessin *et al.*, 2009]. Ces domaines

n'ont pas de structure tridimensionnelle unique en condition physiologique, mais existent sous un ensemble dynamique de conformations. Cette propriété permettrait à ces protéines d'interagir avec un grand nombre de partenaires de l'hôte lors de la réplication virale.

### **c) Domaine polymérase**

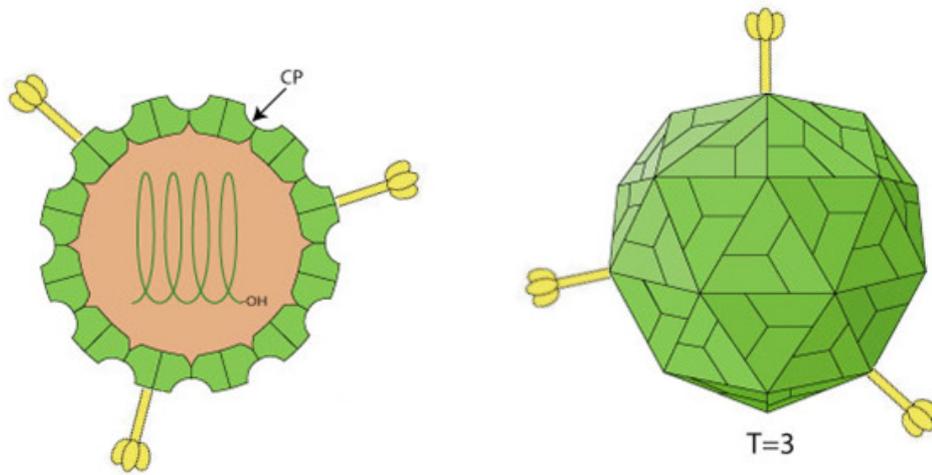
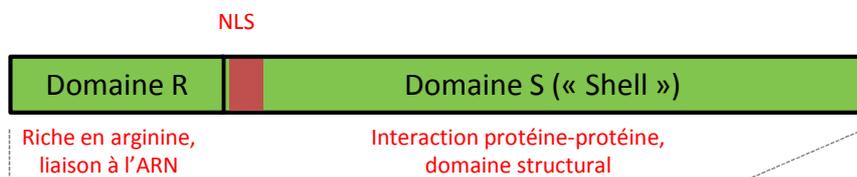
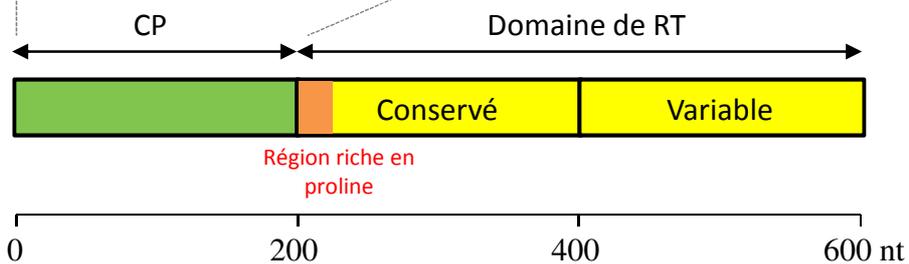
Au niveau de la partie C-terminale de la protéine P1-P2 on trouve une séquence en acides aminés ( $GX_3TX_3NX_{25-40}GDD$ ) présente dans toutes les séquences des ARN-polymérases ARN-dépendantes. Le lieu exact de la réplication des polérovirus, ainsi que celui des autres membres de cette famille, est encore inconnu. Cependant, comme chez tous les virus possédant un génome à ARN simple brin positif [Ahluquist, Noueiry *et al.*, 2003], le complexe de réplication du *Cereal yellow dwarf virus* (CYDV, *Polerovirus*), comprenant l'ARN-polymérase ARN-dépendante est lié à une membrane, qui n'a pas été caractérisée. L'activité du complexe de réplication semble dépendante de la fixation à ces structures membranaires.

### **d) Domaine hélicase**

La présence de motifs caractéristiques d'un domaine hélicase a été mise en évidence chez les *Luteoviridae* [Habibi et Symons, 1989]. L'activité hélicase permet de dérouler l'ARN quand il est sous la forme de duplex et de dissocier également les interactions ARN-protéine.

## **3) P3 : protéine majeure de capsid**

La protéine majeure de capsid (CP) est exprimée à partir d'un ARN subgénomique tout comme les protéines P4 et P5. La protéine P3 est nécessaire pour l'infection systémique de la plante hôte. Sa séquence est extrêmement conservée chez tous les membres de la famille des *Luteoviridae* (50 à 90 % d'identité entre les différents virus). La protéine P3 est le composant majeur de la particule virale formée d'environ 180 sous-unités de CP selon une symétrie d'ordre T=3 (figure 7A). La partie N-terminale de la protéine, riche en arginine, serait située dans la partie intérieure de la particule virale et interagirait avec l'ARN viral (figure 7B). Dans cette région on trouve un signal de localisation nucléaire (NLS) qui est conservé sur toutes les séquences de CP des polérovirus. Ce motif serait responsable de l'adressage préférentiel de la protéine de CP du PLRV au

**A****B****C**

**Figure 7 :** (A) Structure icosaédrique des particules virales des *Luteoviridae*. (B) Domaines fonctionnels de la protéine majeure de capsid. On trouve le domaine R de liaison à l'ARN et le domaine S qui constitue la partie structurale de la capsid. *NLS* : signal de localisation nucléaire. (C) Domaines fonctionnels de la protéine mineure de capsid. Le domaine « conservé » et le domaine « variable » ont été définis sur la base des homologues de séquences de cette région entre les différents membres de la famille des *Luteoviridae*.

niveau du nucléole [Haupt, Stroganova *et al.*, 2005]. Sur la séquence de la CP on trouve ensuite le domaine S (shell) constitué de deux feuilletés bêta, chacun formé de quatre brins, agencés en une structure en « jelly-roll » qui constitue la partie structurale de la protéine. À ce jour, aucune structure cristallographique de la particule virale n'a été obtenue pour aucun des membres de la famille des *Luteoviridae*. Seuls les modèles structuraux du PLRV [Terradot, Souchet *et al.*, 2001] et du BWYV [Brault, Bergdoll *et al.*, 2003] créés sur la base d'homologies de séquences avec des virus dont la structure est connue, sont disponibles.

La protéine CP joue aussi un rôle dans la transmission des virus par pucerons sur lequel nous reviendrons dans le paragraphe II - D - 1)

#### **4) P4 : protéine de mouvement**

Avant de présenter ce que nous savons du mouvement des *Luteoviridae* dans la plante, nous présenterons brièvement les connaissances actuelles sur le mouvement des virus dans les plantes. Afin de générer une infection dans sa plante hôte, un virus doit envahir des endroits distants du point d'inoculation. Il existe deux formes de migration des virus dans la plante : le mouvement à courte distance de cellule à cellule et le mouvement à longue distance via les vaisseaux conducteurs. Le mouvement à courte distance implique des protéines de mouvement virales ainsi que des composants de l'hôte [Carrington, Kasschau *et al.*, 1996]. Différents mécanismes ont été mis en évidence pour le mouvement de cellule à cellule. Dans le cas du TMV, la protéine de mouvement (MP) interagit avec les plasmodesmes pour augmenter leur taille limite d'exclusion [Wolf, Deom *et al.*, 1989], et interagit aussi avec l'ARN viral pour former un complexe ribonucléoprotéique (RNP) [Citovsky et Zambryski, 1991] qui est véhiculé à travers les plasmodesmes. Pour d'autres virus, tel que le CPMV, la MP forme des structures tubulaires à travers les plasmodesmes [van Lent, Storms *et al.*, 1991], pour permettre le passage de cellule à cellule du virus sous la forme de virions. Chez plusieurs virus, il a été montré que les MP peuvent à la fois former des structures tubulaires, mais aussi se lier à l'ARN [Jansen, Wolfs *et al.*, 1998; Canto et Palukaitis, 1999], ce qui suggère que les mouvements de cellule à cellule sous la forme de complexes RNP ou sous la forme de virions peuvent coexister, et que les virus peuvent utiliser les différents mécanismes selon la plante hôte ou le tissu où ils se trouvent. Les mécanismes du mouvement à longue distance sont moins connus. On ne sait pas exactement comment le virus entre, se déplace et sort du système vasculaire. Cependant, la protéine de capsid est généralement essentielle pour ce type de mouvement des virus qui se déplacent sous

forme de virions ou de complexes RNP. Lorsque la CP n'est pas strictement indispensable pour l'infection systémique, le mouvement du virus est cependant ralenti ce qui suggère l'implication d'autres protéines virales et cellulaires dans le mécanisme de transport à longue distance [Scholthof, Scholthof *et al.*, 1995]. Un cas particulier est celui des umbravirus qui ne possèdent pas de CP et ne forment pas de particules virales conventionnelles. La protéine codée par l'ORF3 est impliquée dans le mouvement à longue distance de ces virus [Ryabov, Robinson *et al.*, 1999]. Elle participe à la formation de complexes RNP avec probablement l'intervention d'une protéine cellulaire, la fibrillarine [Kim, MacFarlane *et al.*, 2007].

Le mouvement à courte distance des *Luteoviridae* se limite à un déplacement des virions entre les cellules compagnes et les cellules du parenchyme phloémien alors que le déplacement systémique du virus se fait via les cellules des tubes criblés. Des particules virales ont été observées dans les plasmodesmes connectant les cellules compagnes aux tubes criblés, ainsi que dans la sève [Mutterer, Stussi-Garaud *et al.*, 1999; Taliansky et Robinson, 2003], suggérant un transport à longue distance via les virions encapsidés. Une autre hypothèse serait que ces virus puissent également se déplacer dans les tissus systémiques sous forme de complexes ribonucléoprotéiques comme cela a été montré chez les *Umbravirus* [Taliansky, Roberts *et al.*, 2003].

Chez les *Luteoviridae*, l'expression de la protéine de mouvement, résulte d'un mécanisme de « leaky scanning » du ribosome sur l'ARN subgénomique qui continue sa lecture après le premier AUG de l'ORF3. D'après ses propriétés biochimiques et sa localisation subcellulaire, la protéine P4 serait une protéine de mouvement. A part chez le PEMV1, où elle est absente, la séquence de la protéine P4 est bien conservée chez les autres *Luteoviridae* (42 à 90 % d'homologie).

La partie N-terminale de cette protéine, formée de trois hélices  $\alpha$ , est responsable de sa dimérisation du fait d'interaction protéine-protéine favorisée par cet agencement [Tacke, Schmitz *et al.*, 1993]. De plus, la partie C-terminale chargée positivement, et formée de feuillets  $\beta$ , est capable d'interagir de manière non-spécifique avec l'ARN et l'ADN simple brin. Cette protéine aurait donc potentiellement la possibilité de favoriser le mouvement de complexes RNP. Il a également été mis en évidence, chez le PLRV, que cette protéine était sous une forme majoritairement phosphorylée ; phosphorylation due à une kinase présente au niveau de la membrane des plasmodesmes [Sokolova, Prüfer *et al.*, 1997]. La phosphorylation de la protéine P4 pourrait jouer un rôle sur la localisation de la protéine P4

au niveau des plasmodesmes ou bien sur son interaction avec l'ARN viral. La protéine P4 possède également la propriété d'augmenter la taille limite d'exclusion des plasmodesmes des cellules du mésophylle qui peut alors passer d'une taille inférieure à 1 kDa à 12 kDa [Hofius, Herbers *et al.*, 2001]. Des études de localisation subcellulaire ont permis d'observer cette protéine seulement au niveau des plasmodesmes branchés (présents dans les feuilles sources) et non dans les plasmodesmes simples (présents dans les feuilles puits) [Schmitz, Stussi-Garaud *et al.*, 1997; Vogel, Hofius *et al.*, 2007]. Cette protéine servirait donc principalement à l'export des virions ou des complexes ribonucléoprotéiques des feuilles sources vers les feuilles puits.

L'étude de mutants du PLRV [Lee, Palukaitis *et al.*, 2002] n'exprimant pas cette protéine a montré qu'elle était nécessaire pour l'initiation d'une infection systémique chez *S. tuberosum* et *P. floridana*, mais pas chez *N. benthamiana* et *N. clevelandii* où même, en son absence, une infection systémique de la plante est observée. Des études similaires ont été faites avec le TuYV [Ziegler-Graff, Brault *et al.*, 1996] pour lequel un mutant touché dans l'ORF4 est toujours capable d'infecter *N. clevelandii*, mais de façon moins efficace la laitue, un hôte pourtant naturel de ce virus. Ainsi, la protéine de mouvement P4 serait hôte dépendante.

## 5) P5 : protéine de readthrough

La protéine P5 n'est pas exprimée en tant que telle mais sous la forme d'une protéine de fusion avec la CP grâce à un mécanisme de translecture du codon stop de la protéine P3. Cette protéine de fusion, également nommée protéine de « readthrough » (RT) contient la CP dans sa partie N-terminale ce qui lui permet de s'enchâsser dans la capsid (figure 7C). La partie C-terminale de la protéine de RT, appelée domaine de readthrough ou DRT, est, quant à elle exposée en surface des virions [Bahner, Lamb *et al.*, 1990]. Le nombre exact de protéines de RT dans les virions est inconnu mais est estimé à environ 10 %.

La partie juste en aval du codon stop de P3 est constituée d'une queue de proline (7 à 13 résidus) qui est suivie d'une séquence d'environ 200 acides aminés très conservée chez les *Luteoviridae* [Guilley, Wipf-Scheibel *et al.*, 1994]. Ce domaine contient des signaux importants pour le mécanisme d'incorporation de la protéine P5 au niveau de la capsid.

D'autre part au niveau de la séquence nucléotidique on trouve deux motifs nécessaires à l'induction du mécanisme de translecture.

La partie C-terminale du DRT est très divergente chez les *Luteoviridae*. Cette partie n'est pas strictement nécessaire pour l'infection systémique chez les plantes [Brault, Van den Heuvel *et al.*, 1995; Bruyère, Brault *et al.*, 1997], ni pour la transmission par puceron. Elle jouerait cependant un rôle dans l'efficacité des deux mécanismes. Il a cependant été récemment montré que la partie 3' terminale de la protéine de RT pourrait intervenir dans la restriction du PLRV au phloème [Peter, Gildow *et al.*, 2009]. La partie N-terminale du DRT est, quant à elle, très conservée chez les *Luteoviridae*, impliquée dans le mouvement du virus dans la plante et indispensable à la transmission du virus par les pucerons [Bruyère, Brault *et al.*, 1997].

A noter que dans les purifications virales, on ne retrouve la protéine de RT que sous une forme tronquée de 55 kDa, que l'on nomme la RT\* et qui est dépourvue de la partie C-terminale de la protéine de RT.

La protéine de RT joue donc un rôle crucial dans le mouvement du virus dans la plante ainsi que dans la transmission par puceron. Nous verrons plus en détail son implication dans ces deux mécanismes dans le paragraphe II - D - 1) .

## 6) Autres protéines : Rap1, P6, P7

L'étude *in silico* des séquences génomiques des polérovirus suggère l'existence des protéines P6 et P7 pour le PLRV et CABYV ou seulement de la P7 pour le BMYV et le TuYV. Ces protéines seraient exprimées à partir d'un ARN subgénomique couvrant l'extrémité 3' de l'ARN viral [Ashoub, Rohde *et al.*, 1998]. Peu de données sont disponibles quant à la fonction assurée par ces protéines. Il a seulement été montré, chez le PLRV, que la protéine P7 a la capacité de se lier *in vitro* à l'ARN viral. Chez le PLRV, une autre protéine (Rap 1) a également été identifiée dans la partie 5' du génome, dans la séquence codant pour la protéine P1 mais dans une autre phase de lecture. Cette protéine assurerait un rôle de cofacteur indispensable pour la réplication du PLRV [Jaag, Kawchuk *et al.*, 2003].

Dans le genre *Luteovirus* une ORF6 d'environ 150 nucléotides est également présente à l'extrémité 3' du génome qui permet, à partir d'un ARN subgénomique, l'expression d'une protéine P6 intervenant dans la réplication [Ashoub, Rohde *et al.*, 1998].

## II - Les différents modes de transmission par hémiptères chez les virus de plantes

La majorité des virus de plantes est dépendante d'un vecteur pour une dispersion efficace de plante à plante. Bien qu'il existe une grande variété d'organismes vecteurs (champignons, nématodes, arthropodes), les hémiptères, et plus particulièrement les pucerons, représentent les vecteurs transmettant la majorité des virus de plantes (55 %) [Hogenhout, Ammar el *et al.*, 2008].

### A - Les différents modes de transmission

Le système de classification des mécanismes de transmission a été fortement modifié au cours des 50 dernières années, et la classification actuelle résulte de la synthèse de plusieurs systèmes qui ont été revus et complétés par l'apport de nouvelles connaissances. Ainsi, l'une des premières tentatives de classification proposée par Watson et Roberts [Watson et Roberts, 1939] introduisit les notions de transmission « non-persistante », « semi-persistante » et « persistante » sur la base de critères quantitatifs tels que la durée d'acquisition et d'inoculation du virus par le vecteur, ainsi que la durée de rétention du virus dans le vecteur. Cependant, avec cette classification, le vecteur est une véritable « boîte noire » où le virus entre et sort, sans savoir ce qui se passe exactement dans le corps du vecteur. Ainsi, Kennedy [Kennedy, Day *et al.*, 1962] puis Harris [Harris, 1977] ont proposé les termes qualitatifs de transmission « circulante » et « non-circulante » selon que le virus effectue un cycle passant par l'hémolymphe du vecteur ou non. Finalement, Nault [Nault, 1997] a proposé une synthèse de ces différents systèmes pour décrire simultanément les mécanismes de rétention et de transmission des virus de plantes transmis par les hémiptères. Ainsi on distingue (voir tableau 2) :

1. La transmission non persistante
2. La transmission semi-persistante
3. La transmission persistante, circulante
4. La transmission persistante, répliquative

Nous allons maintenant voir en détail ces différentes stratégies de transmission utilisées par les différentes familles de virus de plantes.

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

**Tableau 2** : Caractéristiques des différents types de transmission par hémiptères.  
D'après Nault *et al.*, 1997.

## ***B - Transmission non persistante***

Décrites comme étant de type « piqueur-suceur », les pièces buccales du puceron permettent une acquisition efficace de la sève chez les plantes, mais sont aussi le lieu d'acquisition et d'inoculation des virus de plantes. Dans le cas des virus transmis de manière non persistante, les stylets sont le lieu de rétention du virus. A ce jour, ce type de transmission n'a été mis en évidence que chez les pucerons et pas chez d'autres vecteurs.

Lorsqu'ils sont en vol, les pucerons ne peuvent pas distinguer et identifier les plantes hôtes sur lesquels ils pourront se nourrir et se reproduire. De ce fait, dès qu'ils atterrissent sur une plante ils procèdent à plusieurs « piqûres d'essais » qui durent de quelques secondes à une minute. Ces piqûres d'essais se limitent principalement aux cellules de l'épiderme et permettent au puceron de déterminer s'il est en présence ou non d'une plante hôte. Pendant une piqûre d'essai sur une plante déjà infectée, les stylets du puceron peuvent entrer en contact avec l'intérieur d'une cellule contenant des virions. Ces virions retenus à l'extrémité distale des stylets peuvent ensuite être transmis à une plante non infectée lors de piqûres d'essais ultérieures. Ainsi, même si la plante ne convient pas au puceron, le mécanisme de transmission peut quand-même avoir lieu. Nous allons voir des exemples de virus utilisant ce mode de transmission et dont les mécanismes intervenant dans la transmission sont connus.

### ***1) Bromoviridae***

Dans cette famille, nous nous intéresserons au *Cucumber mosaic virus* (CMV), le membre type du genre *Cucumovirus*, dont les virions de type icosaédrique ont une taille d'environ 30 nm et renferment un génome segmenté de 3 ARN simples brin de polarité positive. Le CMV a été très étudié et la transmission de ce virus par puceron utilise la « stratégie capsidale ». Cette stratégie décrit le fait que les déterminants viraux nécessaires à la transmission sont uniquement présents au niveau de la capsidale virale.

Afin de mettre en évidence les déterminants viraux du CMV impliqués dans la transmission, plusieurs caractéristiques/propriétés de ce virus ont été utilisées :

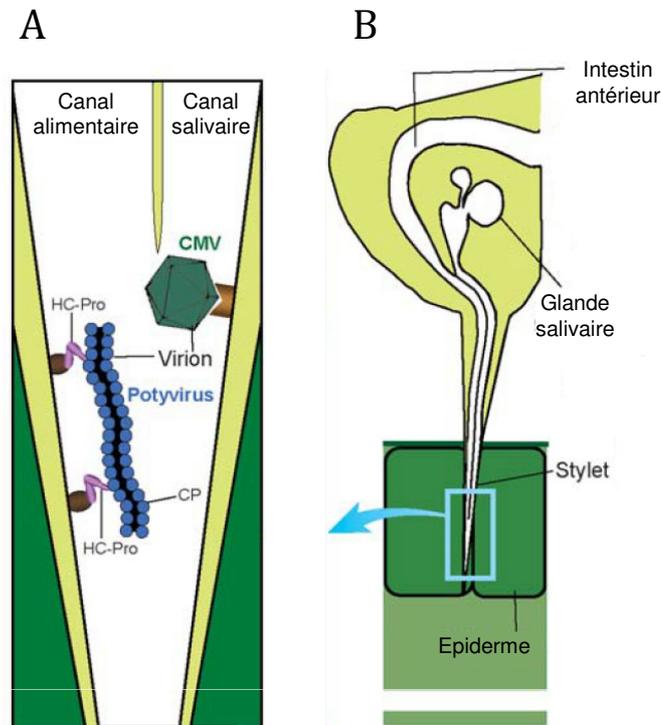
- La disponibilité d'isolats naturels du CMV transmis de manière efficace par puceron tel que le CMV-Q et le CMV-T, ainsi que l'occurrence de mutants sponta-

nés non transmis par une ou plusieurs espèces de puceron tel le CMV-6 et le CMV-M

- La possibilité de réassembler les différents composés de l'ARN génomique (l'ARN 1, 2 et 3) entre différents isolats du CMV pour former des « pseudo-recombinants »
- La possibilité d'assembler *in vitro* des particules virales biologiquement actives et infectieuses à partir d'ARN et de protéines de capsidie libres.

L'utilisation d'inoculum composé de l'ARN 1 et 2 d'une souche, et de l'ARN 3 d'une autre souche, a montré que la transmission par puceron était sous le contrôle de l'ARN 3 qui code pour la protéine de capsidie [Mossop et Francki, 1977]. D'autre part, des expériences d'hétéro-encapsidation où l'on a mélangé des protéines de capsidie d'une souche transmissible par puceron (CMV-T) avec l'ARN d'une souche faiblement transmissible (CMV-6), ou bien l'inverse (CP du CMV-6 avec l'ARN du CMV-T), ont montré que le phénotype de la transmission était dépendant de la souche dont est issue la protéine de capsidie [Gera, Loebenstein *et al.*, 1979]. D'autres expériences d'hétéro-encapsidation utilisant deux espèces de *Cucumovirus* ont également été réalisées [Chen et Francki, 1990] avec la souche CMV-M non transmise par *M. persicae*, et le *Tomato aspermy cucumovirus* souche V (TAV-V) transmissible par *M. persicae*. Ainsi, seules les particules virales assemblées avec la protéine de capsidie du TAV-V étaient transmissibles et non celles assemblées à partir de la CP du CMV-V. De plus, les expériences de transmission à partir de virus purifié, ont montré que le virus était toujours transmis par puceron [Pirone, 1964; Gera, Loebenstein *et al.*, 1979]. L'ensemble de ces expériences montre que la transmissibilité du CMV est conférée par la protéine de capsidie et qu'aucun autre facteur viral ou cellulaire n'est impliqué (figure 8).

Des expériences réalisées à partir de virus chimériques obtenus entre le CMV-M non transmissible par *A. gossypii* et *M. persicae*, et la souche CMV-Fny transmissible par les deux pucerons, ont identifié deux régions importantes pour la transmission par *A. gossypii* [Perry, Zhang *et al.*, 1994] au niveau de la CP. Seuls trois acides aminés sont différents dans ces régions entre les deux souches, et l'introduction de deux mutations ponctuelles (leucine<sub>129</sub> mutée en proline et thréonine<sub>162</sub> en alanine) dans le gène de la CP du CMV-M permet la restauration de la transmissibilité par *A. gossypii* [Perry, Zhang *et al.*, 1994]. Une étude supplémentaire a montré que, pour restaurer la transmissibilité par *M. persicae* du CMV-M, trois autres mutations ponctuelles dans la CP sont nécessaires [Perry, Zhang *et al.*, 1998]. Ces



**Figure 8 : Les deux stratégies de transmission chez les virus non-circulants. (A)** est un agrandissement de la zone du stylet encadrée en bleu **(B)**. Le virion du CMV s'associe directement avec le récepteur localisé au niveau des stylets du puceron. Il s'agit de la stratégie « capsid », illustrée dans la partie droite de **(A)**. La stratégie « helper », quant à elle, nécessite un facteur viral supplémentaire, le « helper component » (HC) ou facteur assistant de la transmission (FAT), permettant la formation d'un pont moléculaire entre le récepteur et la particule virale. Dans ce schéma, cette stratégie est illustrée dans la partie gauche de **(A)** par l'accrochage d'un virus appartenant à la famille des *Potyviridae* au récepteur via le facteur assistant HC-Pro. D'après Ng et Falk, 2006.

études suggèrent que les sites d'attachement du virus dans les différents vecteurs sont différents ou bien que la stabilité des particules virales peut être différemment affectée dans l'une ou l'autre espèce de puceron vectrice. En effet, les acides aminés identifiés sont soit en surface de la particule virale et donc potentiellement susceptibles d'interagir avec les récepteurs présents chez le puceron, soit à l'intérieur de la particule et interviendraient alors sur la stabilité des virions.

## 2) *Potyviridae*

Les membres de cette famille forment des particules virales filamenteuses et possèdent un génome à ARN simple brin monopartite d'environ 10 kb qui code pour une unique polyprotéine. La nécessité d'un facteur assistant pour la transmission (FAT) des potyvirus (figure 8) a été démontrée par des expériences de complémentation. En effet, la souche C du *Potato virus Y* (PVY-C) non transmissible par puceron, retrouvait sa transmissibilité lorsque les pucerons étaient nourris au préalable sur une plante infectée par une souche transmissible du PVY [Kassanis et Govier, 1971]. Lorsque l'ordre d'acquisition était inversé, la souche PVY-C n'était plus transmise. Ces premières expériences suggèrent donc la présence dans les plantes infectées d'un facteur nécessaire à la transmission mais n'en identifiaient cependant pas sa nature. Il a fallu des expériences supplémentaires [Govier, Kassanis *et al.*, 1977; Thornbury, Hellmann *et al.*, 1985; Maia, Haenni *et al.*, 1996] pour montrer que le FAT était un déterminant viral obtenu par deux clivages en *cis* de la polyprotéine libérant ainsi une protéine d'environ 50 kDa. Cette protéine, dénommée HC-Pro (pour **H**elper **C**omponent **P**rotéinase), possède une activité enzymatique qui est responsable de son clivage. Cette protéine multifonctionnelle est impliquée dans la transmission par puceron, mais intervient aussi dans l'amplification du génome [Kasschau, Cronin *et al.*, 1997], le mouvement à longue distance [Cronin, Verchot *et al.*, 1995] et la suppression du mécanisme de l'ARN « silencing » [Anandalakshmi, Pruss *et al.*, 1998; Brigneti, Voinnet *et al.*, 1998; Kasschau et Carrington, 1998].

Les domaines spécifiques nécessaires à la transmission ont été identifiés à la fois chez la protéine de capsid et la protéine HC-Pro du PVY. La comparaison des séquences de souches transmissibles ou non de PVY a mis en évidence une séquence fortement conservée chez les isolats transmis au niveau de la protéine de capsid : le triplet DAG [Harrison, Robinson *et al.*, 1988]. Ce triplet, situé 10-15 acides aminés en aval de l'extrémité N-terminale de la CP des potyvirus, peut interagir avec des composés de l'environnement extérieur, car les extrémités N- et C-terminales de la CP sont à la surface de la particule

virale [Allison, Dougherty *et al.*, 1985; Shukla, Strike *et al.*, 1988]. Toujours par comparaison de séquences entre souches transmises ou non par puceron, deux autres séquences nécessaires à la transmission ont été identifiées sur la protéine HC-Pro : il s'agit du motif KITC localisé dans la partie N-terminale de la protéine qui interagirait avec le récepteur localisé sur les stylets [Blanc, Ammar *et al.*, 1998] et du motif PTK situé dans la partie centrale de la protéine HC-Pro responsable de la fixation au triplet DAG de la CP [Peng, Kadoury *et al.*, 1998]. Notons que les séquences DAG, KITC et PTK ne sont pas conservées de manière stricte chez les potyvirus, mais correspondent aux séquences retrouvées le plus fréquemment.

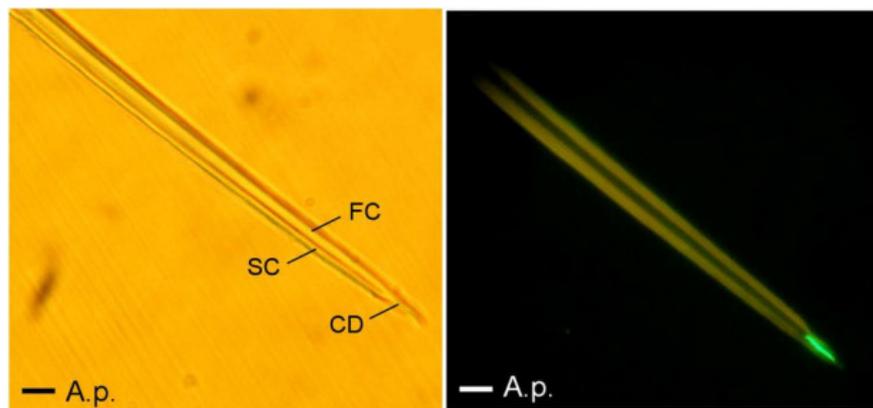
### ***C - Transmission semi-persistante***

La différence entre le mode de transmission non-persistant et la transmission semi-persistante est la durée de rétention du virus dans le puceron. Alors que pour la transmission non-persistante elle est de quelques minutes, elle est de plusieurs heures pour la transmission semi-persistante. De plus, ce mode de transmission est décrit pour différents vecteurs : aleurode, puceron et cicadelle. Pour ce type de transmission, les deux stratégies capsidique et facteur assistant de la transmission ont été mises en évidence (figure 8).

#### ***1) Caulimoviridae***

Dans cette famille, le membre type est le *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) qui forme des particules icosaédriques d'environ 50 nm de diamètre contenant un génome à ADN double brin circulaire. Ce virus utilise aussi pour sa transmission une stratégie de type FAT, mais plus complexe que celle décrite chez le PVY, puisque deux facteurs assistants sont requis, en plus de la protéine de capsidique.

Les déterminants viraux et cellulaires impliqués dans la transmission ont été étudiés en détail chez le CaMV. Du côté viral, un système à trois composants a été mis en évidence : il comprend la protéine P2 de 18 kDa capable d'interagir avec le récepteur du puceron, la protéine P3 de 15 kDa qui est ancrée dans la particule virale, et enfin la protéine P4 formant la capsidique [Drucker, Froissart *et al.*, 2002]. La protéine P2 interagit par sa partie C-terminale avec le domaine N-terminal de la protéine P3 via une interaction de type coiled-coil [Plisson, Uzest *et al.*, 2005] alors que sa partie N-terminale reconnaît le récepteur localisé à l'extrémité des stylets [Moreno, Hebrard *et al.*, 2005]. Quant à la partie C-terminale de la protéine P3, elle est responsable de son association avec la particule virale [Leh, Jacquot *et al.*, 2001].



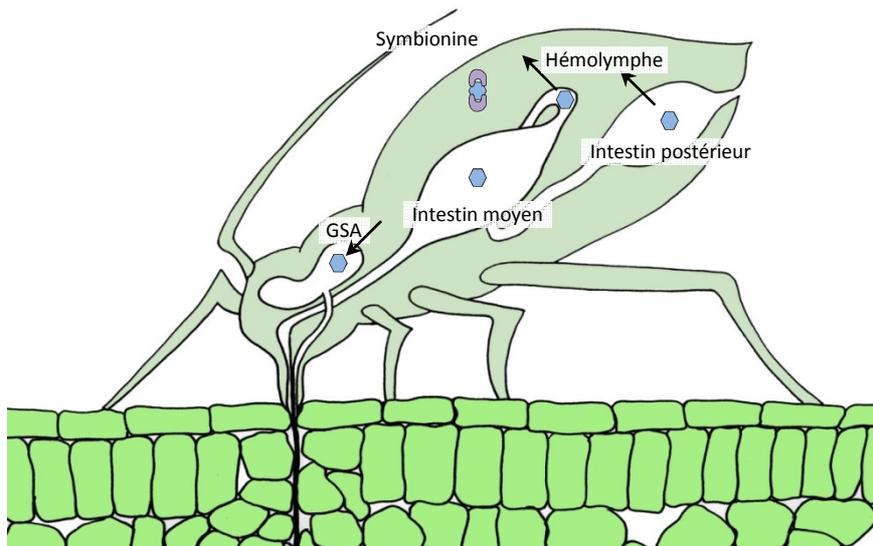
**Figure 9 : Localisation des sites d'attachement du FAT du CaMV (P2) dans les stylets maxillaires du puceron.** (A) Vue en lumière transmise d'un stylet maxillaire du puceron vecteur *Acyrthosiphon pisum*. On distingue le canal alimentaire (FC), le canal salivaire (SC) et le canal commun (CD) à la pointe du stylet. (B) Les stylets disséqués sont incubés avec la protéine recombinante P2::GFP. Cette protéine s'associe spécifiquement à la pointe des stylets, dans le canal commun. D'après Uzest *et al.*, 2007.

Au niveau de la plante hôte, les cellules infectées par le CaMV développent deux types de corps d'inclusion : le corps dense (edIB : electron dense inclusion bodies, dans lequel on retrouve 95 % des virions complexés à P3) et le corps clair (elIB : electron lucent inclusion bodies), qui contient la totalité de la protéine P2 co-agrégée avec P3 et les 5 % restants des virions. Un modèle d'acquisition séquentielle a été proposé par Drucker et al [Drucker, Froissart *et al.*, 2002] qui consiste à une première ingestion du contenu des corps clairs qui en se dissociant hors contexte cellulaire entraînent l'accrochage de la protéine P2 au niveau des stylets. Une deuxième ingestion soit d'un corps dense dans la même cellule ou dans une autre, soient des virions présents dans les tubes criblés associés à P3 permet la reconstitution du complexe transmissible du CaMV. Il faut signaler que cette acquisition séquentielle permet de compléter des virus déficients pour la transmission puisque l'acquisition du FAT peut se faire dans une première plante infectée par un virus transmissible alors que l'acquisition du complexe virion-P3 peut éventuellement avoir lieu au niveau d'une deuxième plante infectée par un virus non transmissible.

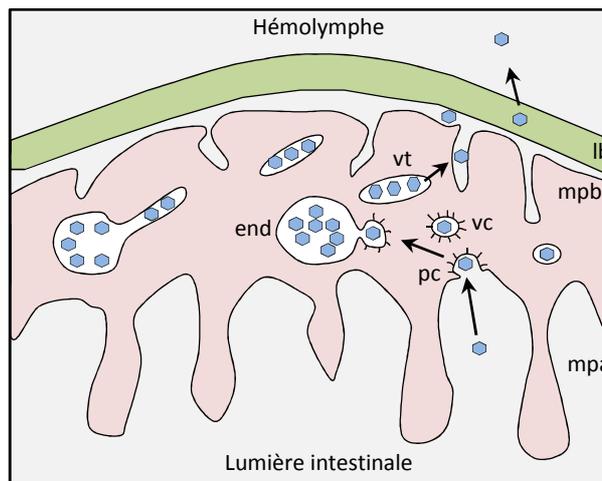
Une étude récente a montré que le récepteur du CaMV était localisé dans la partie distale des stylets où les canaux alimentaire et salivaire se rejoignent en un seul canal [Uzest, Gargani *et al.*, 2007] (figure 9). Différents traitements enzymatiques de stylets disséqués ont permis de montrer que le récepteur était de nature protéique et se trouvait enchâssé dans la couche de chitine recouvrant les stylets.

## 2) *Closteroviridae*

Le mode de transmission semi-persistant est également retrouvé chez les virus de la famille des *Closteroviridae*, composée de trois genres : *Closterovirus*, *Crinivirus* et *Ampelovirus*. Les virus de cette famille forment des particules filamenteuses de 950 à 2200 nm de longueur et 10 à 13 nm de diamètre, et possèdent un génome à ARN simple brin de polarité positive. Les virus du genre *Closterovirus* sont transmis par puceron ou par cochenille, ceux du genre *Crinivirus* par aleurode et certains *Ampelovirus* par cochenille. Dans le genre *Closterovirus*, on retrouve les virus *Beet yellows closterovirus* (BYV) et *Citrus tristeza closterovirus* (CTV) dont la transmission par puceron et l'épidémiologie ont été intensivement étudiées [Bar-Joseph, Marcus *et al.*, 1989]. Les études sur le BYV ont montré qu'il peut être retenu plusieurs jours chez son vecteur mais pas au-delà de la mue. Bien que le BYV et le CTV ne soient pas transmissibles lorsqu'ils sont acquis à partir de virus purifié, la stratégie de transmission utilisée par ces virus (stratégie capsidique ou existence d'un



**Figure 10 : Transport des virions de la famille des *Luteoviridae* dans les pucerons vecteurs.** Le transport des particules des *Luteoviridae* à travers les cellules intestinales se fait soit au niveau de l'intestin moyen, soit au niveau de l'intestin postérieur, soit au niveau des deux épithéliums. Dans l'hémolymphe les particules virales se lient à la symbionine. *GSA* : glandes salivaires accessoires.



**Figure 11 : Schéma de la transcytose des virions au niveau de l'épithélium intestinal.**

Les particules sont internalisées au niveau de la membrane plasmique apicale (**mpa**) dans des puits à clathrine (**pc**). Ils se retrouvent ensuite dans des vésicules recouvertes de clathrine (**vc**) qui fusionnent pour donner des vésicules tubulaires (**vt**) ou des vésicules plus larges appelées endosomes (**end**). Les vésicules tubulaires fusionnent avec la membrane plasmique basale (**mpb**) permettant ainsi la libération des virions dans l'espace extracellulaire. Ceux-ci traversent ensuite la lamelle basale (**lb**) pour se retrouver dans l'hémolymphe. Le mécanisme de transport des virions au travers des cellules des GSA se fait par un mécanisme identique opérant en sens inverse puisque les virions sont acheminés de la lamelle basale jusqu'à la membrane plasmique apicale.

facteur assistant) ne peut être établie seulement sur la base de ces données négatives. En effet, une absence de transmission à partir de virus purifié peut également provenir d'une instabilité des virions liée à la méthode de purification non adaptée. Des expériences supplémentaires sont donc nécessaires pour définir avec certitude la stratégie de transmission de ces virus.

### ***D - Transmission circulante non répllicative***

Les virus transmis selon ce mode sont transportés au travers de différents épithéliums dans le vecteur, mais ne s'y répliquent jamais. Les virions sont ingérés avec la sève phloémienne lors de la prise de nourriture du vecteur puis traversent les cellules épithéliales de l'intestin vers l'hémocèle (phase d'acquisition). Les particules virales diffusent ensuite dans l'hémolymphes jusqu'aux cellules des glandes salivaires accessoires (GSA) qu'elles traversent pour se retrouver dans la salive du puceron puis dans la plante hôte lors d'une nouvelle prise alimentaire (phase d'inoculation) (figure 10).

#### ***1) Luteoviridae***

Chez cette famille de virus, l'ingestion du virus commence avec la pénétration des stylets dans les tissus du phloème, suivie d'une phase d'alimentation du puceron. Le passage du virus au niveau de l'intestin nécessite la reconnaissance des virions par des récepteurs spécifiques des cellules épithéliales du tube digestif. Le virus est transporté activement par endocytose dans des vésicules à couverture de clathrine pour être ensuite relargué par exocytose dans l'hémocèle du puceron (figure 11). Le même mécanisme d'endocytose/exocytose via des récepteurs se produit en sens inverse pour le passage de l'hémocèle vers le canal salivaire des cellules des glandes salivaires accessoires. Il faut signaler qu'au cours de la transcytose, les virions se retrouvent toujours dans des vésicules et jamais libres dans le cytoplasme [Gildow, 1999; Brault, Herrbach *et al.*, 2007] ce qui suggère, qu'à part pour l'étape de reconnaissance au niveau du récepteur externe de la cellule, aucun contact direct ne s'établit avec les composés cytoplasmiques. La comparaison du transcriptome de pucerons virulifères ou non a récemment confirmé qu'aucune dérégulation majeure au niveau intestinal n'était induite par l'internalisation du virus [Brault, Tanguy *et al.*, 2010]. Bien que cette étude ne porte que sur 20 % de l'ensemble des gènes du puceron [The International Aphid Genomics, 2010], ceci suggère que le virus emprunte

une voie constitutive d'endocytose-exocytose [Tamborindéguy, 2010] sans perturber profondément le métabolisme du puceron.

Une reconnaissance du virus au niveau de l'épithélium intestinal est le pré-requis pour l'acquisition du virus, bien que cette barrière apparaisse moins sélective que celle des GSA [Gray et Gildow, 2003]. En effet certains virus sont retrouvés dans l'hémolymphe de pucerons non vecteurs [Gildow et Gray, 1993]. Au niveau des GSA, deux barrières ont été mises en évidence, celle de la lamelle basale, membrane entourant ces cellules et composée principalement de collagène et de laminine, et celle de la membrane plasmique basale [Gray et Gildow, 2003]. Il a également été montré que les virus appartenant à cette famille ont un tropisme intestinal différent selon le virus considéré : Alors que les différentes souches de BYDV, le CYDV et le SbDV, sont reconnues spécifiquement au niveau de l'intestin postérieur, le PLRV et le TuYV sont internalisés dans les cellules de l'intestin moyen. Le CABYV constitue un cas particulier puisqu'il traverse à la fois les cellules de l'intestin moyen et postérieur [Reinbold, Herrbach *et al.*, 2003].

Des analyses de mutagenèse dirigée couplées à l'étude de la transmissibilité des mutants et à leur localisation dans le puceron ont permis de dresser un schéma hypothétique de l'internalisation des virus dans le vecteur. Alors que la protéine de RT n'est pas strictement essentielle à la transcytose des cellules intestinales, elle intervient cependant dans l'efficacité du mécanisme [Chay, Gunasinge *et al.*, 1996; Reinbold, Gildow *et al.*, 2001]. Des études supplémentaires ont montré que seule la protéine de CP est nécessaire pour le passage de la barrière intestinale [Gildow, Reavy *et al.*, 2000]. La protéine de RT est cependant essentielle pour le maintien du virus dans l'hémolymphe (probablement via sa liaison avec la symbionine, voir plus loin) et est indispensable pour le passage des cellules des GSA [Van den Heuvel, Bruyere *et al.*, 1997]. Certains acides aminés sur la protéine de RT, essentiels au passage des cellules des GSA, ont été identifiés [Brault, Mutterer *et al.*, 2000]. L'utilisation de virus recombinants entre le TuYV et le CABYV, qui possèdent des vecteurs et un tropisme intestinal différents, ont permis de montrer que la protéine de RT contrôle la spécificité vectrice ainsi que le tropisme intestinal [Brault, Perigon *et al.*, 2005]. D'autres études menées sur le SbDV [Gildow, Damsteegt *et al.*, 2000; Terauchi, Honda *et al.*, 2003] avec des souches transmises soit par *Aulacorthum solani* soit par *Acyrtosiphon pisum* montrent également que la spécificité vectrice est contrôlée par la partie N-terminale de la protéine de RT.

Ces études de mutagenèse dirigée ont permis d'identifier des séquences spécifiques en acides aminés au niveau de la protéine de CP et de RT intervenant probablement dans la reconnaissance par les récepteurs dans le corps du puceron, bien qu'aucune séquence consensus n'ait pu être déduite de ces nombreux travaux [Jolly et Mayo, 1994; Brault, Van den Heuvel *et al.*, 1995; Chay, Gunasinge *et al.*, 1996; Bruyere, Brault *et al.*, 1997; Brault, Mutterer *et al.*, 2000; Papura, Jacquot *et al.*, 2002; Brault, Bergdoll *et al.*, 2003; Peter, Liang *et al.*, 2008].

Les pucerons, comme l'ensemble des hémiptères, hébergent des bactéries endosymbiotiques du genre *Buchnera*. Ces bactéries produisent de très fortes quantités d'une protéine nommée symbionine, homologue de la protéine chaperon GroEL d'*Escherichia coli* [Baumann, Baumann *et al.*, 1995]. Il a été montré que les particules virales de différents *Luteoviridae* sont capables de se lier *in vitro* à la symbionine [van den Heuvel, Verbeek *et al.*, 1994; Van den Heuvel, Bruyere *et al.*, 1997]. En éliminant les endosymbiontes des pucerons par un traitement antibiotique, une diminution de la transmissibilité des virus a été observée. Cependant, ces résultats doivent être interprétés avec précaution car la destruction des endosymbiontes a certainement des effets dramatiques sur le métabolisme interne et la physiologie des pucerons. En étudiant l'affinité des virions de six espèces virales de la famille des *Luteoviridae* [Van den Heuvel, Bruyere *et al.*, 1997] avec la symbionine provenant de pucerons vecteurs et non vecteurs, aucune corrélation entre la capacité de liaison à la symbionine et la transmission n'a pu être mise en évidence. Cela suggère que, si la symbionine joue un rôle dans la transmission, elle n'intervient pas dans la spécificité du vecteur. Une analyse de la capacité de liaison symbionine/virion testée *in vitro* avec une série de mutants viraux contenant des délétions dans la RT, indique que la partie N-terminale du DRT contient les déterminants de l'interaction protéique. Les virions qui ne contiennent pas la protéine de RT ne se lient pas à la symbionine *in vitro* et persistent moins longtemps dans l'hémolymphe des pucerons que la souche sauvage de virus. L'ensemble de ces études suggèrent l'existence d'une interaction spécifique entre les virus de la famille des *Luteoviridae* et les homologues de GroEL synthétisés par les bactéries endosymbiotiques. Cette interaction aurait une influence sur la stabilité des virions dans l'hémolymphe des pucerons.

## 2) *Nanoviridae*

La famille des *Nanoviridae* est composée de deux genres : les *Nanovirus* et les *Babuvirus*. Les virus de cette famille forment des particules virales icosaédriques d'un dia-

mètre allant de 17 à 22 nm. Ces virus ont un génome à ADN segmenté (6 à 11 segments). Les molécules d'ADN simple brin sont circulaires, d'une taille d'environ 1 kb et codent généralement pour une seule protéine, dont les masses varient de 5 à 33 kDa. Ces virus sont uniquement transmis par des pucerons.

Le virus type du genre *Nanovirus* est le *Faba bean necrotic yellows virus (FBNYV)*. Comme le FBNYV purifié n'est pas transmissible par puceron, l'implication d'un facteur assistant a été suggérée. Des expériences de complémentation [Franz, van der Wilk *et al.*, 1999] utilisant deux souches de virus, ont montré que le virus purifié était transmis par puceron seulement si le puceron s'était nourri sur une plante infectée par l'autre souche de FBNYV. A l'inverse de ce qui est connu pour les virus appartenant aux familles des *Potyviridae* et des *Caulimoviridae*, le FAT agirait au niveau de l'hémolymphe pour le passage du virus vers les GSA du puceron. L'identification de ce FAT n'a depuis jamais été reportée et son existence reste donc toujours hypothétique.

### ***E - Transmission circulante réplivative***

Dans le cas de la transmission circulante réplivative, le virus se réplique dans le corps de son vecteur et tous les virus enveloppés de plantes sont transmis de cette manière. Ils appartiennent aux familles des *Bunyaviridae*, transmis par thrips, et des *Rhabdoviridae* transmis par pucerons, cicadelles et fulgoriformes.

#### ***1) Rhabdoviridae***

La famille des *Rhabdoviridae* est très large, et les différents membres peuvent infecter les vertébrés, les invertébrés ainsi que les plantes. Les virus infectant les plantes sont regroupés dans les genres *Nucleorhabdovirus* et *Cytorhabdovirus* se différenciant par leur localisation intracellulaire où a lieu la morphogénèse du virus. Ainsi, pour les *Cytorhabdovirus* la maturation a lieu dans le cytoplasme de la cellule hôte au niveau de viroplasmes dans le réticulum endoplasmique, tandis que pour les *Nucleorhabdovirus* elle a lieu dans le noyau. On assiste ensuite à un bourgeonnement de la membrane nucléaire puis à une migration vers l'espace périplasmique de la cellule hôte. La plupart de ces virus ont une forme de type bacilliforme. Leur génome à ARN de polarité négative est protégé par une nucléocapside formée par un assemblage de sous-unités de la protéine de nucléocapside (N) entourée d'une double couche lipidique. Dans cette membrane lipidique sont enchâssées la glycoprotéine (G) et la protéine de matrice (M) virale.

Cette dernière interagit à la fois avec la protéine N et les composés viraux présents dans la double couche lipidique. Deux autres protéines virales sont associées avec le génome à ARN : la phosphoprotéine (P) et la protéine L (large) qui sont nécessaires à la synthèse des ARN viraux.

Après ingestion par le vecteur, ces virus passent de l'intestin moyen dans l'hémolymphe. De là, ils peuvent atteindre un grand nombre de tissus de différents organes (cerveau, ganglions nerveux, ovaires, corps gras, muscles, glandes salivaires accessoires et principales) où ils se répliquent. Ils sont transmis à une nouvelle plante hôte via la salive après leur passage dans les glandes salivaires. D'autre part, certains de ces virus, tel que le *Lettuce necrotic yellows virus* (LNYV) [Randles, 1983], peuvent passer la barrière transovarienne et peuvent, de ce fait, être transmis à la descendance.

La glycoprotéine (G) semble avoir une fonction importante pour la reconnaissance des virus par les récepteurs situés au niveau des cellules de l'insecte. En effet, dans le cas du *Potato yellow dwarf virus* (PYDV), il a été montré que lorsque les particules virales sont incubées avec des anticorps spécifiques de cette glycoprotéine, l'infectivité des cellules d'insectes est réduite de manière drastique, sans affecter l'infectivité du virus au niveau de la plante [Gaedigk, Adam *et al.*, 1986]. L'étude de la protéine G du virus de la rage, un *Rhabdovirus* infectant des vertébrés, a montré que la protéine G interagit avec un récepteur cellulaire ce qui permet l'attachement des particules virales à la cellule [Lafon, 2005]. Cette protéine initie ensuite la fusion entre la membrane du virus et la membrane de la cellule hôte [Gaudin, Tuffereau *et al.*, 1999]. Il a aussi été montré que la protéine G est un déterminant de la spécificité d'hôte et intervient dans la virulence [Pulmanausahakul, Li *et al.*, 2008].

### ***F - Protéines d'insectes impliquées dans les interactions virus-vecteur***

Récemment, des progrès considérables ont été faits concernant l'identification des protéines agissant comme récepteurs des virus dans le puceron mais ces avancées concernent essentiellement le CaMV transmis de manière non-circulante. Pour les autres virus cependant, ce domaine de recherche reste encore à explorer et nombre de récepteurs de virus dans les vecteurs sont toujours inconnus.

Dans le cas du CaMV [Uzest, Gargani *et al.*, 2007], des observations en microscopie électronique montrent la présence de particules virales seulement au niveau du canal commun

(lieu où se rejoignent les canaux alimentaire et salivaire) des stylets de puceron. Les particules virales sont toujours associées à une zone particulière de densification de la cuticule, dont la fonction n'est pas connue à ce jour chez le puceron. Un test d'interaction *in vitro*, réalisé sur stylets disséqués, a montré que la protéine P2 fusionnée à la GFP s'attache spécifiquement au niveau du canal commun à l'extrémité distale des stylets maxillaires et que cette interaction est strictement corrélée au succès de la transmission (figure 9). En effet, un mutant non fonctionnel de la protéine P2 perd sa capacité à se fixer sur le récepteur d'un puceron vecteur et la protéine P2 fonctionnelle est incapable de s'attacher aux stylets d'un puceron non vecteur. Les stylets ont ensuite été traités avec différents agents chimiques ou enzymatiques avant d'être incubés avec la protéine de fusion P2-GFP, afin de déterminer la nature du récepteur. Ce récepteur serait une protéine enfouie dans une matrice de chitine. Ces résultats apportent les premières données formelles sur l'existence d'un récepteur protéique pour un virus non circulant, à l'extrémité des stylets de son insecte vecteur.

Le *Cereal yellow dwarf virus* (CYDV-RPV), famille des *Luteoviridae*, est transmis spécifiquement par 2 espèces de puceron *Rhopalosiphum padi* et *Schizaphis graminum*. L'étude de la descendance F2 de souches de *S. graminum* vectrices ou non du CYDV-RPV, a mis en évidence que la transmission du virus est régulée par plusieurs gènes, et que les facteurs agissant au niveau de l'intestin et ceux agissant au niveau des GSA ne sont pas génétiquement liés. Une analyse différentielle de gels 2D réalisée à partir du protéome des souches non-vectrices et vectrices et de la descendance F2, a mis en évidence quatre protéines du puceron impliquées dans la transmission du puceron (S4, S8, S29 et S405) [Yang, Thannhauser *et al.*, 2008]). Ces quatre protéines co-immunoprécipitent avec les particules virales du CYDV-RPV, ce qui indique qu'elles interagissent avec le virus. L'analyse par spectrométrie de masse de ces protéines a identifié la protéine S4 comme une luciférase et la protéine S29 comme une cyclophiline, les deux autres protéines n'ayant pas été identifiées à partir des bases de données existantes. Cette approche couplant analyse génétique et analyse protéomique a permis de mettre en évidence des protéines de puceron impliquées dans la transmission du CYDV.

Enfin chez le TuYV, les interactions entre les particules virales du virus et des protéines du puceron ont été étudiées *in vitro* [Seddas, Boissinot *et al.*, 2004]. Ainsi, par des expériences de Far-western blot, il a été mis en évidence que 3 protéines de pucerons intera-

gissaient avec les particules virales : Rack-1 (receptor for activated C kinase 1), GAPDH3 (glycéraldéhyde-3-phosphate déhydrogénase) et l'actine. Rack-1 est une protéine multifonctionnelle qui permet de réguler des récepteurs localisés à la surface des cellules ainsi que des kinases intracellulaires [Choi, Young *et al.*, 2003]. GAPDH3 est une enzyme clé de la glycolyse qui a également d'autres fonctions comme celle de réguler les mécanismes d'endocytose et d'exocytose [Sirover, 1999]. Enfin, l'actine, connue pour son rôle dans le transport intracellulaire, joue un rôle très important dans la formation des vésicules d'endocytose identiques à celle qui vont transporter les virions au travers la cytoplasme des cellules [Gottlieb, Ivanov *et al.*, 1993]. Ces trois protéines pourraient intervenir dans le processus de transcytose des particules virales du TuYV mais ne représentent probablement pas les récepteurs du virus dans le puceron. Une quatrième protéine, d'origine endosymbiotique, la symbionine, est également capable de se lier aux particules virales. Elle permettrait une protection des virions dans l'hémolymphe ou faciliterait l'adressage des particules virales vers les glandes salivaires accessoires du virus [van den Heuvel, Verbeek *et al.*, 1994; Van den Heuvel, Bruyere *et al.*, 1997].

### III - Rôles des modifications post-traductionnelles chez les virus

Les virus sont des parasites intracellulaires et ne peuvent se répliquer seuls. De ce fait, ils sont obligés d'emprunter la machinerie cellulaire de l'hôte pour se répliquer et se propager. De plus, du fait de la quantité limitée de gènes présents dans le génome des virus, les protéines virales exprimées à partir de ces gènes assurent très souvent différentes fonctions au cours du cycle viral. Nous verrons, dans ce chapitre, que les virus détournent la machinerie cellulaire responsable des modifications post-traductionnelles à leur profit. Ils sont en effet susceptibles d'entraîner la modification de certaines protéines de leur hôte leur permettant d'interagir avec ces dernières ou encore de profiter de cette modification post-traductionnelle pour moduler l'activité de leurs propres protéines. En effet, ces modifications affectent largement les caractéristiques des protéines en modulant par exemple leur activité enzymatique, leur durée de vie ou encore les interactions protéines-protéines. Ainsi, nous verrons que les protéines virales sont affectées par la majorité des modifications post-traductionnelles existantes, permettant de contrôler certaines étapes du cycle viral via l'interaction avec les protéines de l'hôte ou du vecteur.

Les modifications post-traductionnelles sont des modifications chimiques ayant lieu sur les protéines au cours ou après la traduction. Généralement, il s'agit de l'une des dernières étapes dans la biosynthèse des protéines. Il existe un très grand nombre de modifications post-traductionnelles parmi lesquelles : l'acétylation, l'alkylation, la méthylation, la biotinylation, la glutamylation, la glycylation, la glycosylation, l'isoprénylation (prénylation, myristoylation, farnésylation, géranyl-geranylation), la lipoylation, la phosphorylation, la sulfation, la sélélation ... Cependant, nous ne verrons en détail, que celles qui ont été les mieux caractérisées chez les virus animaux et végétaux.

#### ***A - La phosphorylation***

La phosphorylation consiste en l'addition d'un groupement phosphate ( $PO_4$ ) à une protéine, réaction catalysée par une protéine kinase. Cette réaction est réversible, la déphosphorylation étant effectuée par une phosphatase. Chez les eucaryotes, la phospho-

rylation des protéines est l'un des mécanismes de régulation le plus important et le plus fréquent. De nombreux récepteurs et enzymes sont mis en position "active" ou "non-active" par une phosphorylation ou une déphosphorylation. Elle est ainsi retrouvée dans la plupart des processus cellulaires tels que le métabolisme, la croissance, la division, la différenciation, le transport membranaire ou bien encore dans le trafic des organelles. Chez l'homme, lors du séquençage de l'ensemble du génome humain, 518 kinases ont été identifiées, ce qui constitue 1,7 % de l'ensemble des gènes [Manning, Whyte *et al.*, 2002].

La phosphorylation a lieu sur les chaînes latérales des acides aminés comportant un groupement hydroxyle tels que la sérine, la thréonine, la tyrosine, l'histidine ou l'acide aspartique.

### 1) Rôle dans la réplication virale

Dans le mécanisme de réplication des virus à ARN, la formation d'un complexe de réplication associé à des structures membranaires est nécessaire. Ces complexes impliquent des interactions fines entre l'ARN viral, les protéines virales et cellulaires, et les lipides. Ces dernières années, les connaissances sur les protéines virales impliquées dans la réplication, ont fortement augmenté et ont en particulier montré que ces protéines étaient très souvent phosphorylées. En effet, la phosphorylation étant un phénomène réversible, elle permet une régulation fine des interactions entre les protéines du complexe et permet ainsi de réguler la réplication virale.

Un premier exemple de régulation de la réplication chez les virus est celui du *virus de la dengue de type 2* (DEN-2), membre de la famille des *Flaviviridae*. Chez ce virus, la protéine NS5, qui comporte un domaine « RNA-dépendant RNA polymérase » (RdRp), peut se trouver sous deux formes : une forme légèrement phosphorylée et une autre hyperphosphorylée. Des expériences de co-immunoprécipitation [Kapoor, Zhang *et al.*, 1995] ont montré que la protéine NS5 dans sa forme légèrement phosphorylée interagit dans le cytoplasme avec une autre protéine virale, la protéine NS3, qui contient notamment un domaine hélicase intervenant dans la séparation des brins d'ARN lors de la réplication virale. Cependant, sous sa forme hyperphosphorylée, la protéine NS5, est retrouvée dans le noyau où sa fonction est encore inconnue et où la protéine NS3 est absente. Ainsi le degré de phosphorylation de la protéine NS5 permet de réguler l'interaction avec la protéine NS3. D'autres expériences de double-hybride dans la levure ont montré que la ré-

gion de la protéine NS5 qui interagit avec la protéine NS3, est également capable de se lier à une importine- $\beta$  (récepteur d'import nucléaire), suggérant une compétition entre ces deux protéines pour l'interaction avec NS5 [Johansson, Brooks *et al.*, 2001].

La phosphorylation intervient également dans la régulation des interactions entre les protéines virales et les protéines de l'hôte au niveau du complexe de réplication comme c'est le cas de la protéine NS5A du *virus de l'hépatite C* (HCV), également membre de la famille des *Flaviviridae*. La protéine NS5A est une sous-unité multifonctionnelle du complexe de réplication, qui joue un rôle clef à la fois dans la réplication virale et dans la modulation de la physiologie de la cellule hôte en agissant sur plusieurs voies de signalisation intracellulaire dont la réponse à l'interféron, l'induction de l'apoptose ou encore la régulation de la croissance cellulaire. Il existe deux formes phosphorylées de cette protéine que l'on peut distinguer par leur profil de migration électrophorétique : la forme à 56 kDa qui correspond à la fois à des protéines NS5A non-phosphorylées et des protéines phosphorylées à un niveau basal, et d'autre part, la forme à 58 kDa qui n'est constituée que de la protéine hyperphosphorylée. Cette hyperphosphorylation est hautement régulée et dépend de l'expression d'autres protéines du HCV. De nombreuses expériences telles que l'apparition de mutations spontanées au niveau des sites de phosphorylation et l'apparition de mutations ponctuelles sur les résidus potentiellement phosphorylés semblent démontrer que l'état de phosphorylation de la protéine NS5A permet de réguler la réplication du virus HCV. Dans tout les cas, les observations montrent qu'une réduction de l'hyperphosphorylation de NS5A conduit à une augmentation de la réplication en culture cellulaire. Une inhibition de la phosphorylation pourrait favoriser l'interaction entre NS5A et hVAP-A (human vesicle-associated membrane protein-A), une protéine servant de point d'ancrage pour l'assemblage du complexe de réplication viral dans la membrane. Il est intéressant de noter que la forme hyperphosphorylée de NS5A n'est cependant pas retrouvée dans le complexe de réplication purifié suggérant que son action sur la réplication pourrait aussi être indirecte. La phosphorylation de NS5A joue un rôle important dans le cycle viral des virus des genres *Hepacivirus* et *Pestivirus* appartenant également à la famille des *Flaviviridae*.

Un deuxième exemple d'intervention de la phosphorylation dans la réplication virale est rencontré chez le *Cucumber mosaic virus* (CMV), un virus de plante de la famille des *Bromoviridae*. L'activité de la réplicase du CMV, la protéine 2a, est régulée par son

état de phosphorylation. Des expériences de co-immunoprécipitation et de double hybride dans la levure, ont montré une interaction entre la protéine 2a et la protéine 1a qui possède un domaine hélicase et dont une fonction supplémentaire est l'ajout d'une coiffe à l'extrémité 5' de l'ARN [Suzuki, Yoshida *et al.*, 2003]. La phosphorylation *in vitro* de la protéine 2a entraîne une inhibition de l'interaction avec la protéine 1a [Kim, Palukaitis *et al.*, 2002]. Etant donné que la protéine 2a n'est phosphorylée qu'à un stade tardif du cycle viral, il a été suggéré que cette phosphorylation inhiberait la formation de nouveaux complexes 1a-2a, ou entraînerait le désassemblage des complexes préexistants, réduisant ainsi la réplication du virus dans la cellule. Kim *et al.* [Kim, Palukaitis *et al.*, 2002] ont cependant proposé que la protéine phosphorylée 2a, via son interaction avec des facteurs de l'hôte, puisse intervenir dans d'autres étapes du cycle viral telles que le mouvement du virus dans la plante, ou dans le court-circuitage de certaines réponses de défense de l'hôte.

La réplicase du *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV), membre de la famille des *Tymoviridae* est phosphorylée en contexte viral mais également lorsqu'elle est exprimée seule [Jakubiec et Jupin, 2007]. Deux sites potentiels de phosphorylation sont localisés dans la partie N-terminale de la protéine dans une séquence PEST, pouvant induire la dégradation de la protéine. Le fait de mimer la phosphorylation de ces deux sites a un effet négatif à la fois sur l'accumulation de la protéine 66K, mais aussi sur la réplication virale. Ainsi la phosphorylation de ces sites permettrait de réguler le niveau d'accumulation de cette protéine en activant les signaux PEST.

Le fait que la phosphorylation des protéines puisse réguler leur interaction avec l'ARN est connu depuis longtemps mais cette hypothèse a seulement été vérifiée plus récemment dans le cas du *Cucumber necrosis virus* (CNV), de la famille des *Tombusviridae*. La protéine p33 phosphorylée, présente dans le complexe de réplication, est impliquée dans la sélection du brin d'ARN matrice et son recrutement dans le complexe de réplication. Les deux sites de phosphorylation de la protéine p33 sont situés près du domaine d'interaction avec l'ARN. Des expériences de phosphorylation *in vitro* de la p33 ou l'introduction de mutations mimant la phosphorylation ont permis de montrer que cette modification diminuait sa fixation à l'ARN viral [Shapka, Stork *et al.*, 2005]. L'état de phosphorylation de la protéine p33 permet donc d'opérer un « switch » pendant le cycle de réplication, conduisant à l'accrochage ou bien au relargage de l'ARN viral.

## 2) Rôle dans le mouvement

Les virus de plantes codent pour des protéines de mouvement (MP), qui interviennent dans le mouvement de cellule à cellule des virus. Les protéines de mouvement peuvent former un complexe ribonucléoprotéique (RNP) avec l'ARN viral mais elles peuvent également interagir avec des protéines de la plante hôte pour augmenter la taille d'exclusion des plasmodesmes et permettre le passage de complexes RNP ou éventuellement des virions. L'implication d'une modification post-traductionnelle dans la régulation du mouvement de cellule à cellule a été mise en évidence pour la première fois sur la protéine de mouvement du *Tobacco mosaic virus* (TMV), qui est phosphorylée dans la plante hôte [Watanabe, Ogawa *et al.*, 1992]. Depuis, la phosphorylation de protéine de mouvement de virus du *Tomato mosaic virus* [Kawakami, Padgett *et al.*, 1999], ou du PLRV [Sokolova, Prüfer *et al.*, 1997] a également été mise en évidence

Les protéines de mouvement virales peuvent donc être phosphorylées par des kinases de plante, suggérant que cette modification post-traductionnelle jouerait un rôle dans la régulation du mouvement des virus [Citovsky, McLean *et al.*, 1993; Waigmann, Ueki *et al.*, 2004]. Pour supporter cette hypothèse, des expériences menées avec des protoplastes et des cellules intactes, ont montré qu'un complexe MP-ARN viral n'était pas infectieux lorsqu'il était introduit dans ces cellules qui ne possèdent pas de plasmodesmes [Karpova, Ivanov *et al.*, 1997]. A l'inverse, l'inoculation de ce complexe dans des cellules localisées au niveau des feuilles, et donc connectées par des plasmodesmes, conduit à une infection virale. De plus, il a également été montré qu'aucun produit de traduction n'était produit quand ce mélange MP-ARN viral était ajouté à un système de traduction *in vitro*. La phosphorylation de la protéine de mouvement du TMV contenu dans le complexe ribonucléoprotéique induit la conversion de la forme non-traductible du complexe en une forme traductible et infectieuse dans les protoplastes et les tissus de plantes [Karpova, Rodionova *et al.*, 1999]. Ces résultats sont consistants avec le fait que la protéine de mouvement du TMV subit une phosphorylation lors de son passage à travers les plasmodesmes, cette modification déstabiliserait le complexe RNP et permettrait au ribosome d'accéder à l'ARN viral.

### 3) Formation de structures spécialisées

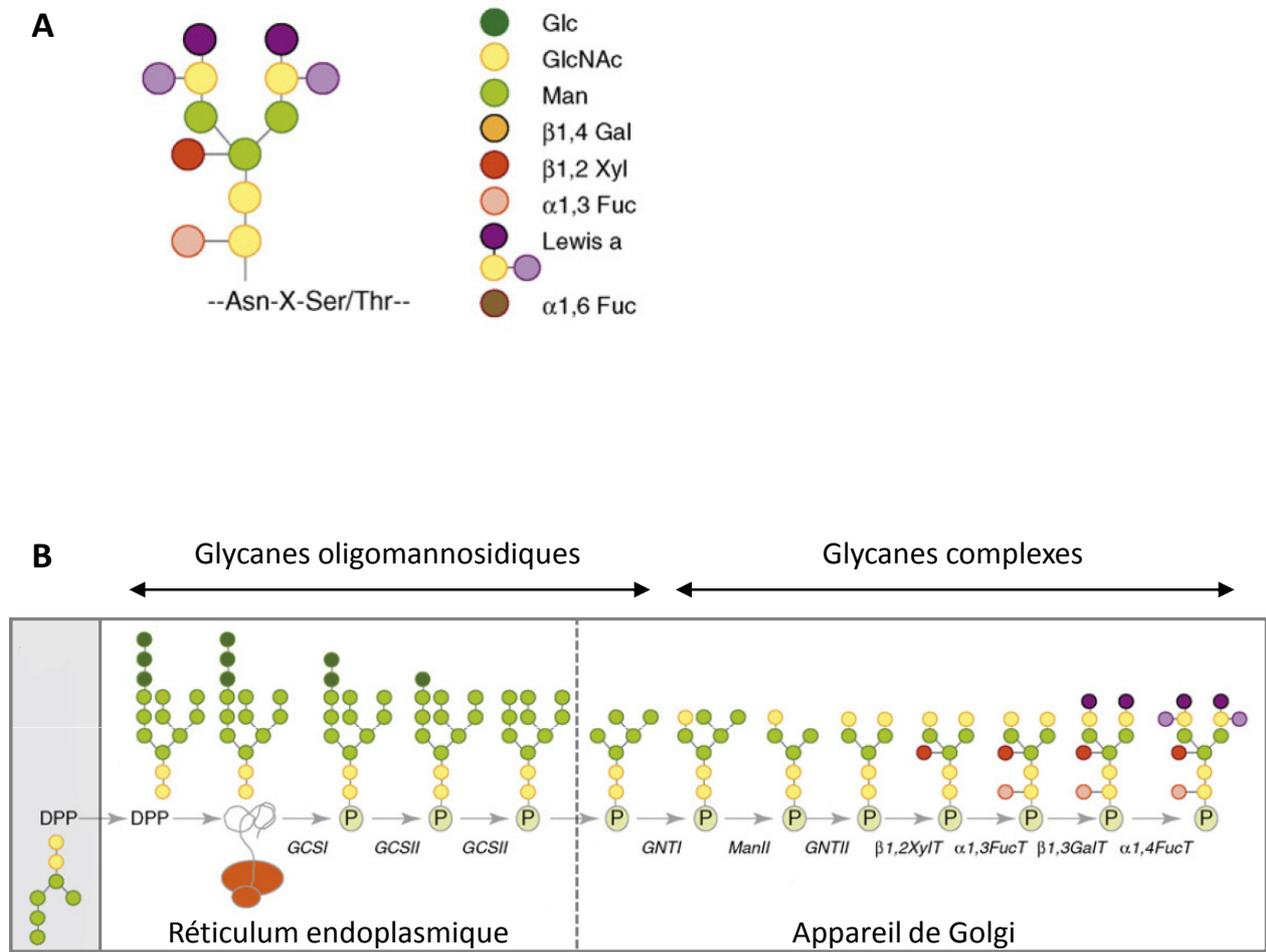
Chez le *Vaccinia virus* (VV), famille des *Poxviridae*, qui sont des virus enveloppés, il a été montré que la protéine A36R était phosphorylée [Frischknecht, Moreau *et al.*, 1999]. L'utilisation de virus mutés au niveau des sites potentiels de phosphorylation sur la séquence de cette protéine a permis de mettre en évidence deux résidus tyrosine phosphorylés. La phosphorylation de ces résidus tyrosine permet une interaction avec la protéine adaptatrice Nck8, qui interagit à son tour avec la protéine N-WASP, qui permet le recrutement du complexe Arp2/3 intervenant dans le processus de nucléation de l'actine. Ce processus entraîne la formation d'une queue d'actine à la surface du virus, qui permet ensuite au virus de se mouvoir dans la cellule hôte.

#### **B - La glycosylation**

Deux types de glycosylation existent dans les cellules eucaryotes, elles se distinguent selon le type de liaison existant entre la protéine et le sucre ajouté. Si le résidu glycosylé est lié à l'azote du groupement amide de l'asparagine, il s'agit de **N-glycosylation**, alors que s'il est lié à l'oxygène du groupement hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine (plus rarement d'une tyrosine, d'une hydroxyproline ou d'une hydroxyllysine), c'est une **O-glycosylation**.

La N-glycosylation a lieu cotraductionnellement au niveau du réticulum endoplasmique. Elle débute par l'ajout d'un oligosaccharide précurseur ( $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ ) sur une asparagine présente au sein d'une séquence consensus : N-X-S/T (ou X peut être n'importe quel acide aminé excepté la proline). Ensuite, lorsque la protéine se déplace du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi, l'oligosaccharide précurseur, accessible aux glycosidases et glycosyltransférases, va subir plusieurs modifications conduisant à la formation de glycanes oligomannosidiques (glycanes constitués de  $\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$  à  $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2$ ) puis de glycanes complexes (avec l'ajout de  $\alpha$ 1-3-fucose,  $\beta$ 1-2xylose, ou bien d'une antenne terminale de type Lewis a (Gal/GlcNAc/Fuc) (figure 12).

La mono-O-glycosylation qui peut se faire dans le cytoplasme ou dans le noyau, doit être distinguée des O-glycosylations complexes qui, ont lieu dans le réticulum endoplasmique et le Golgi. Cette O-glycosylation découverte en 1984 [Torres et Hart, 1984], correspond à l'addition de N-acétyl glucosamine (GlcNAc) sur le résidu hydroxyle d'une



**Figure 12: Voie de maturation des N-glycanes dans le système sécrétoire.** (A) Structure d'un glycan complexe de plante. (B) Maturation de l'oligosaccharide précurseur (DPP) dans le réticulum endoplasmique puis dans l'appareil de Golgi. GCSI et II : Glucosidases I et II ; GNTI et II : N-acetylglucosaminyltransferases I et II; ManI et II: mannosidases I et II ;  $\beta$ 1,2XylT:  $\beta$  1,2 xylosyltransferase;  $\alpha$ 1,3FucT:  $\alpha$  1,3 fucosyltransferase;  $\beta$ 1,3GalT:  $\beta$  1,3 galactosyltransferase;  $\alpha$ 1,4FucT:  $\alpha$ 1,4 fucosyltransferase, sont les enzymes responsables de la maturation des glycanes. D'après Saint-Jore-Dupas *et al.*, 2007.

sérine ou d'une thréonine. Cette modification réversible est catalysée par deux enzymes : la O-GlcNAc transférase qui attache la N-acétyl-glucosamine à la protéine, et la O-GlcNAc transférase qui l'enlève. Il n'existe pas de séquence consensus bien définie pour les O-glycosylations cytoplasmiques, bien que plus de 50 % des sites connus pour contenir cette modification aient un motif Pro-Val-Ser similaire à celui reconnu par certaines kinases du type « proline directed kinase ». A ce jour, l'ensemble des protéines possédant ce type de glycosylation est aussi phosphorylé. Il a été suggéré [Hart, Greis *et al.*, 1995] que cela permettrait une régulation plus fine de l'activité de ces protéines, puisque un même résidu sérine ou thréonine peut être soit O-glycosylé, soit phosphorylé, les deux modifications étant mutuellement exclusives (modèle appelé Yin-Yang).

Les O-glycosylations qui ont lieu dans le réticulum endoplasmique et le Golgi sont plus complexes et modifient de façon stable les protéines membranaires ou sécrétées. Il existe plusieurs familles pour ce type de O-glycosylation, classées selon le premier sucre de la chaîne de glycane attaché à l'acide aminé de la protéine. La O-glycosylation de type mucine, avec une N-acétyl-glucosamine à l'extrémité de la chaîne de glycane, étant la forme la plus fréquente chez les animaux. Comme pour la N-glycosylation, le glycane ajouté peut ensuite être mûré.

La glycosylation de particules virales a principalement été mise en évidence chez les virus enveloppés, comme nous allons le voir. Dans le cas des virus non-enveloppés seuls quelques exemples de glycosylation de particules virales ont été démontrés.

### **1) Glycosylation de protéines virales de virus enveloppés**

Chez le *Virus de l'immunodéficience humaine* (VIH, famille des *Retroviridae*), la protéine d'enveloppe gp120 est fortement N-glycosylée. Les glycanes présents à la surface de la protéine gp120 joueraient un rôle dans l'interaction avec le récepteur CD4. Les premières études suggéraient qu'une perte des glycanes diminuait l'interaction avec le récepteur CD4, mais ne l'abolissait pas complètement. [Montefiori, Robinson *et al.*, 1988; Fenouillet, Gluckman *et al.*, 1990]. Les conséquences de cette interaction réduite avec le récepteur CD4 sont une diminution de l'infectivité cellulaire et de la cytopathicité du virus, mais ne compromettent pas la réplication du virus et sa capacité à infecter l'hôte. Une étude récente sur les différentes séquences de la protéine gp120 disponibles, ont montré que les sites de N-glycosylation présents sur cette protéine varient entre 18 et 33 avec une

moyenne de 25. [Korber, Gaschen *et al.*, 2001]. De plus, il a été montré qu'au cours de l'infection, des sites potentiels de glycosylation sont ajoutés au niveau de la boucle V1-V2 de la protéine d'enveloppe gp120 afin de rendre le virus moins sensible aux anticorps [Sagar, Wu *et al.*, 2006]. L'étude de quinze variants du VIH-1 a également montré que la présence de N-glycanes au niveau de la boucle V1-V2 était indispensable pour l'infectivité virale [Wolk et Schreiber, 2006].

Dans le cas du *West nile virus* (WNV, famille des *Flaviviridae*), la protéine d'enveloppe E est glycosylée. Cette protéine est impliquée dans plusieurs processus biologique tel que l'attachement au récepteur, la fusion membranaire et l'assemblage du virus. L'analyse de plusieurs souches du WNV a montré un lien entre la glycosylation et le caractère neuro-invasif du virus ainsi que l'efficacité de réplication [Beasley, Whiteman *et al.*, 2005]. La glycosylation est aussi importante pour le bon repliement [Lad, Shende *et al.*, 2000] et l'expression de la protéine E.

Chez des virus récemment découverts ou émergents tel que le virus Ebola, Hantaan, Newcastle, Hendra, Nipah, Metapneumovirus ou le Coronavirus du SRAS, la présence de N-glycosylation a aussi été mise en évidence. Cette N-glycosylation jouerait un rôle dans l'infectivité, le repliement des protéines, le tropisme cellulaire ou encore dans le processus d'évasion du système immunitaire. Dans le cas du virus Nipah, la glycosylation permet une résistance accrue aux anticorps, mais réduit le processus de fusion membranaire et l'entrée du virus dans la cellule [Aguilar, Matreyek *et al.*, 2006]. Cet exemple illustre le fait que, chez de nombreux virus, le niveau de glycosylation doit être finement régulé pour pouvoir échapper au système immunitaire de l'hôte sans toutefois compromettre le cycle viral.

## 2) Glycosylation de protéines virales de virus non-enveloppés

Dans le cas des virus non-enveloppés, la présence de glycanes sur les protéines de structure des virus n'est pas très courante. De plus, dans certains cas où la glycosylation avait été observée, des réinvestigations ultérieures ont finalement montré l'absence de ce type de modification post-traductionnelle. C'est le cas du *Cowpea mosaic virus* (CPMV), famille des *Comoviridae*, qui avait été initialement décrit comme étant glycosylé [Partridge, Shannon *et al.*, 1974], avec une estimation de deux molécules de glucosamine et d'une molécule de glucose et de galactosamine par capsid. Cependant, une étude plus récente

[Altmann et Lomonossoff, 2000] mettant en œuvre une technique plus performante d'analyse de la glycosylation (chromatographie liquide par réversion de phase haute performance) a finalement montré l'absence de glycanes sur les protéines de capsidie du CPMV.

Dans le cas du *Virus de l'hépatite E*, famille des *Hepeviridae*, une glycosylation de la protéine de capsidie avait été observée quant cette protéine était exprimée dans des cellules de mammifères. Depuis, des expériences de mutagenèse dirigée n'ont pas démontré la présence de tels résidus sur les virions suggérant que la glycosylation de la protéine de capsidie pouvait être un artefact lié à sa sur-expression [Graff, Zhou *et al.*, 2008].

Les virus du genre *Rotavirus*, famille des *Reoviridae*, semblent donc être le seul exemple de virus non-enveloppés à posséder des glycanes N-liés sur la protéine de structure VP7 [Estes et Cohen, 1989]. Il faut cependant noter que les virions sont entourés transitoirement d'une membrane lipidique où se trouve la protéine VP7, qui est une protéine intégrale de la membrane du réticulum endoplasmique [Kabcenell et Atkinson, 1985]. Cette membrane lipidique est ensuite perdue au cours de la maturation et la protéine VP7, ainsi que la protéine VP4 forment alors la capsidie externe des rotavirus.

Enfin chez le *Plum pox virus* (PPV, *Potyviridae*), une mono-O-glycosylation a été mise en évidence sur la protéine de capsidie [Fernandez-Fernandez, Camafeita *et al.*, 2002]. Cette mono-O-glycosylation a lieu sur deux thréonines présentes dans la partie N-terminale de la protéine [de Jesus Perez, Juarez *et al.*, 2006]. Une mutagenèse dirigée des thréonines en alanines, n'a pas d'effet sur la capacité du PPV à infecter *Prunus persicae* ou *Nicotiana clevelandii*. Cependant, les deux thréonines sont très conservées entre les différentes souches de PPV, ce qui indique que cette mono-O-glycosylation doit être importante pour le virus en conditions naturelles.

### ***C - Autres modifications post-traductionnelles***

En plus de la phosphorylation et de la glycosylation qui sont les modifications post-traductionnelles les plus étudiées et les plus répandues chez les cellules eucaryotes, il existe d'autres modifications post-traductionnelles affectant les protéines virales qui ont été mises en évidence chez différents virus.

### a) Tyrosine-O-sulfation

Cette modification consiste en l'ajout d'un groupement sulfate ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) sur une tyrosine. Cette réaction est catalysée par l'une des enzymes « tyrosyl-protein sulfotransférase » présente au niveau de l'appareil de Golgi (TPST-1 et TPST-2). Cette modification a été observée chez les eucaryotes supérieurs, mais pas chez les procaryotes et les levures. Cette modification est très stable et ne serait pas éliminée par les sulfatases présentes chez les eucaryotes, en faisant donc un processus irréversible *in vivo*. On retrouve cette modification au niveau des protéines membranaires et secrétées. Le rôle fonctionnel de la tyrosine-O-sulfation n'est pas bien défini, cette modification jouerait un rôle au niveau des interactions protéine-protéine.

La tyrosine-O-sulfation n'a été mise en évidence que sur deux protéines virales : la protéine de capsid du polyomavirus [Ludlow et Consigli, 1987] et la glycoprotéine gPI du *Vari-cella-zoster virus* (VZV) [Edson, 1993]. Le rôle de la tyrosine sulfation n'a pas été déterminée pour ces virus, mais elle pourrait jouer un rôle dans la reconnaissance cellulaire, l'attachement et l'entrée de ces virus. D'autre part, une étude bioinformatique [Lin, Tsai *et al.*, 2003] sur les séquences protéiques des virus animaux a montré que cette modification pourrait être bien plus répandue, avec l'identification de sites potentiels de tyrosine-O-sulfation sur 5091 protéines de 1024 virus (sur 1517 étudiés). De plus, un haut degré de conservation a été observé pour les acides aminés entourant la tyrosine potentiellement sulfaté pour l'hémagglutinine du virus de la grippe A, la protéine de capsid VP4 du rotavirus ou encore la protéine US28 du cytomégalovirus.

### b) Myristoylation et Palmitoylation

Il existe plusieurs modifications post-traductionnelles consistant en l'ajout de lipides telles que l'isoprénylation, la glypiation, la myristoylation et la palmitoylation. Nous nous intéresserons plus particulièrement à ces deux dernières qui ont été mises en évidence sur des protéines virales.

#### ***Myristoylation***

La myristoylation consiste à l'attachement sur une glycine en position N-terminale d'un acide myristique (C14:0) par une N-myrosyltransférase. Du fait de la faible hydro-

phobicité de l'acide myristique, la protéine myristoylée peut s'attacher ou se détacher des membranes facilement.

Chez le Poliovirus (famille des *Picornaviridae*), la glycine N-terminale de la protéine de capsid VP4 est myristoylée [Paul, Schultz *et al.*, 1987]. L'étude de mutants où la myristoylation est partiellement ou complètement abolie [Marc, Masson *et al.*, 1990] a montré qu'elle était indispensable pour la formation des capsides du virus, et interviendrait lors des premiers stages de l'infection de la cellule par le Poliovirus. L'importance de la myristoylation de la protéine de capsid a aussi été montrée chez d'autres *Picornaviridae* comme le virus de l'hépatite A [Tesar, JIA *et al.*, 1993] et le virus de la fièvre aphteuse [Krausslich, Holscher *et al.*, 1990].

Chez le HIV, la myristoylation de la protéine de capsid Gag est importante pour l'assemblage du virion [Pal, Reitz JR *et al.*, 1990]. En plus, chez le HIV-1, la protéine de régulation Nef-1 existe sous deux formes : myristoylée ou non. Cette myristoylation permet la formation d'un complexe très stable entre Nef-1 et l'actine [Fackler, Kienzle *et al.*, 1997]. Cette interaction induit une relocalisation de la protéine Nef-1 du cytoplasme vers la membrane cellulaire [Yu et Felsted, 1992].

### **Palmitoylation**

La palmitoylation, consistant en l'ajout d'un acide palmitique (C16:0) sur une cystéine N-terminale, a lieu au niveau du cytoplasme. C'est une modification réversible intervenant dans la régulation du trafic intracellulaire, dans la localisation subcellulaire des protéines, et dans la régulation de leur activité.

Chez le HCV, la protéine NS4B induit la formation d'une structure membranaire spécialisée, qui servirait de « plateforme » pour le complexe de réplication. Il a été montré que cette protéine NS4B peut être palmitoylée [Yu, Lee *et al.*, 2006] au niveau des résidus cystéines (cystéine 257 et 261) présents à son extrémité C-terminale. Cette modification joue un rôle sur les interactions protéine-protéine du complexe de réplication et sa formation.

Une palmitoylation de la cystéine N-terminale a été observée sur plusieurs glycoprotéines de la membrane virale de différents virus dont l'hémagglutinine du virus de la grippe [Jin, Subbarao *et al.*, 1996], la glycoprotéine du virus de la stomatite vésiculaire [Rose, Adams *et*

*al.*, 1984], la protéine gp41 du HIV [Melikyan, Markosyan *et al.*, 2000], ou encore la protéine spike du coronavirus du SRAS [Petit, Chouljenko *et al.*, 2007]. Cette modification intervient au niveau de la fusion du virus à la membrane cellulaire [Petit, Melancon *et al.*, 2005], dans l'assemblage du virus [Lontok, Corse *et al.*, 2004] et dans l'infectivité du virus [Rousso, Mixon *et al.*, 2000].

# Objectifs de la thèse



Des études antérieures réalisées sur le *Turnip yellows virus* (*Polerovirus*) ont montré que la déglycosylation des particules virales, par un traitement à la N-glycosidase ou à l' $\alpha$ -D-galactosidase, inhibait la transmission du virus par puceron, suggérant ainsi que les particules virales du TuYV pouvaient être glycosylées et que la glycosylation jouait un rôle crucial dans la vexion de ce virus [Seddas et Boissinot, 2006]. Le premier objectif de la thèse a été d'analyser l'état de glycosylation des protéines structurales du CABYV, un autre polérovirus, en utilisant différentes approches. Nous avons tout d'abord réalisé une mutagenèse dirigée des quatre sites potentiels de N-glycosylation localisés sur la séquence des deux protéines de structure. Ensuite, la glycosylation des particules du CABYV a été évaluée par l'immunodétection des glycanes via l'utilisation de lectines ou d'anticorps spécifiques, avec la mise en place d'une collaboration avec Anne-Catherine Fitchette de l'équipe de Véronique Gomord du CNRS de Rouen. Enfin, la recherche des résidus glycosylés potentiellement présents sur les protéines de structure du CABYV a également été menée par spectrométrie de masse, en collaboration avec Jean-Marc Strub de l'équipe d'Alain Van Dorsselaer du CNRS de Strasbourg.

D'autre part, des analyses visant à rechercher dans la sève des cucurbitacées les protéines susceptibles de se lier *in vitro* aux particules du CABYV, avaient identifié deux lectines comme partenaires potentiels du virus, renforçant ainsi l'hypothèse d'une glycosylation des particules des polérovirus. Mon travail a consisté à élucider le mode d'action de ces protéines dans le cycle viral et dans la transmission du virus par puceron en analysant plus particulièrement le comportement du CABYV dans des mutants d'*Arabidopsis thaliana* affectés dans l'expression d'une des deux lectines identifiées.

En recherchant les partenaires potentiels du CABYV, une kinase (CK2) avait été identifiée au laboratoire ce qui nous a conduit à rechercher la présence potentielle de résidus phosphorylés sur les protéines de structure du CABYV. Pour mener cette étude, nous avons utilisé l'approche biochimique ainsi que les analyses par spectrométrie de masse. Nous avons aussi analysé le comportement du virus dans des plantes affectées dans l'expression de cette protéine. Les mutants Knock Out d'*Arabidopsis* n'étant pas disponibles, nous avons utilisé la technique du « silencing » induit par un virus (Virus Induced gene Silencing) pour diminuer l'expression de l'ARN messager de cette protéine.



# Résultats

	Sites potentiels de N-glycosylation <sup>a</sup>		Sites potentiels de O-glycosylation <sup>b</sup>
	Dans la CP	Dans la RT	Dans la RT
BChV	2 (162, 181)	3 (267, 388, 514)	0
CABYV	2 (70, 178)	2 (408, 415)	5 (204, 205, 210, 212, 214)
CYDV	2 (11, 79)	2 (337, 349)	5 (213, 217, 225, 227, 493)
MABYV	2 (70, 178)	5 (406, 413, 432, 539, 547)	5 (207, 210, 212, 219, 557)
PEMV-1	4 (47,64, 137, 186)	1 (422)	3 (197, 213, 215)
PLRV	0	3 (273, 410, 603)	5 (217, 219, 223, 225, 317)
TuYV	3 (50, 162, 181)	2 (267, 388)	2 (221, 480)
GFLV	2 (219, 256)	-	0 <sup>c</sup>

**Tableau 1 : Localisation des sites potentiels de N- et O-glycosylation sur les protéines de structures des polérovirus.** <sup>a</sup> Nombres de sites potentiels de N-glycosylation. Entre parenthèses la position de l'asparagine potentiellement N-glycosylée. <sup>b</sup> Nombre de sites potentiels de O-glycosylation. Entre parenthèses la position de la sérine ou de la thréonine potentiellement O-glycosylée. <sup>c</sup> CP du GLFV.

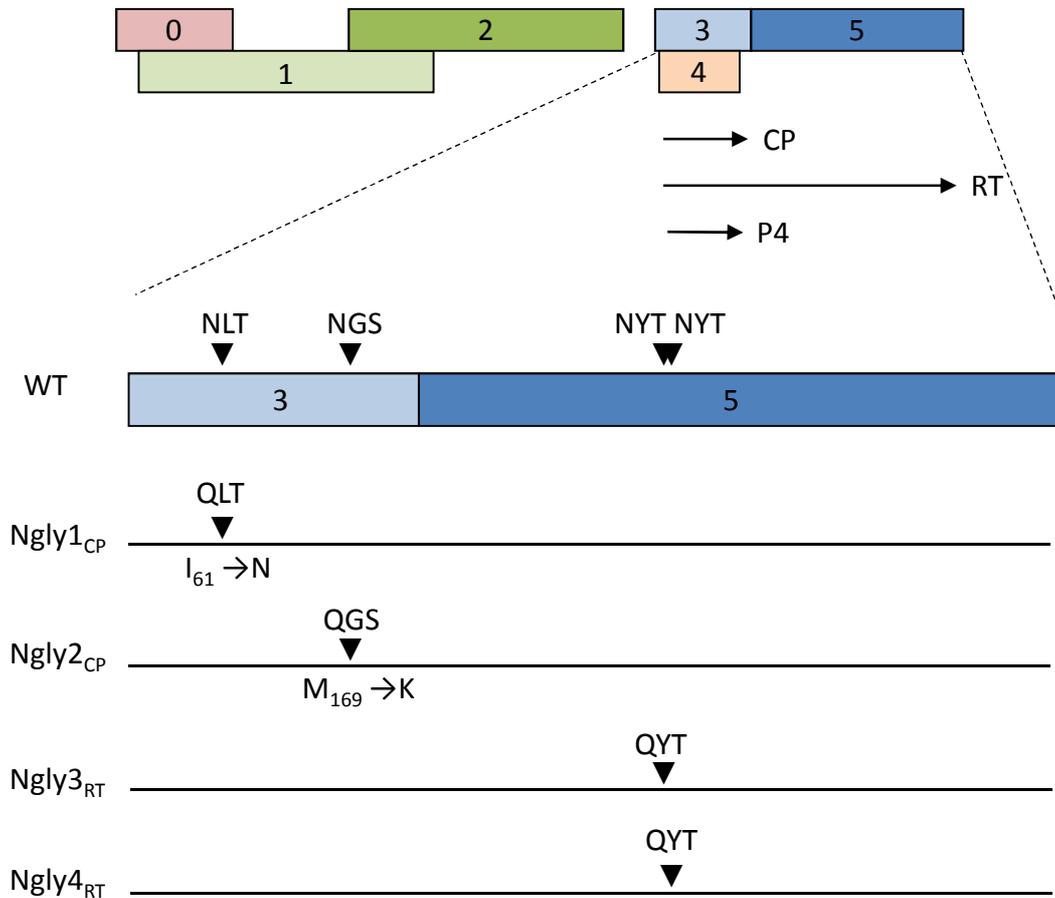
Numéros d'accessions pour le *Beet chlorosis virus* (BChV / NP\_114364.2), *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV / [NC\\_003688.1](#)), *Cereal yellow dwarf virus* (CYDV / NP\_840025.2), *Pea enation mosaic virus* (PEMV-1 / NP\_620027.1) *Potato leafroll virus* (PLRV / [NC\\_001747.1](#)), *Turnip yellow virus* (TuYV / NP\_620487.1), *Melon aphid borne yellows virus* (MABYV / NC\_010809.1) et *Grapevine fanleaf virus* (GFLV / NP\_733996.1).

# I - Analyse de la glycosylation des protéines de structure des polérovirus

## A - Analyse *in silico*

Afin d'analyser le rôle d'une glycosylation potentielle des protéines structurales du CABYV, nous avons tout d'abord réalisé une étude *in silico* avec le logiciel Scanprosite (<http://www.expasy.ch/tools/scanprosite/>) pour identifier les séquences en acides aminés potentiellement glycosylées. La N-glycosylation a lieu au niveau d'une séquence consensus N-X-S/T, où X peut être n'importe quel acide aminé à l'exception d'une proline. Nous avons identifié quatre sites potentiels de N-glycosylation sur la séquence des protéines de structure du CABYV : deux sites (NLT et NGS) sur la séquence de la protéine majeure de capsid (CP) au niveau des acides aminés 70 et 178, et deux autres (NYT et NYT) sur la séquence du domaine de readthrough de la protéine mineure de capsid (RT) au niveau des acides aminés 408 et 415. Concernant la O-glycosylation, cinq sites potentiels ont été mis en évidence par le logiciel Net-o-Glyc, tous situés dans la séquence du domaine de RT (DRT) au niveau de la queue de proline localisée juste en aval du codon stop de la CP.

Nous avons également réalisé une comparaison des sites potentiels de glycosylation entre les séquences des protéines structurales de différents polérovirus. Nous observons une très forte variabilité du nombre et de la position des sites potentiels de glycosylation, que ce soit pour la N-glycosylation ou pour la O-glycosylation (tableau 1). Il faut ajouter que la glycosylation potentielle de la CP n'aura pas le même impact sur la particule virale que celle du DRT puisque les particules des polérovirus sont formées de 180 sous-unités de la CP et de seulement quelques sous-unités de la RT (estimées à 15-20). Les sites potentiels de N-glycosylation sur la séquence comprenant la CP et le DRT varient de 3 chez le PLRV jusqu'à 7 chez le MABYV. Il est assez surprenant de noter que la CP du PLRV ne possède aucun site potentiel de N-glycosylation à l'inverse de tous les autres polérovirus analysés. Cette observation tend à modérer le rôle majeur que pourrait avoir la glycosylation de la CP dans la transmission. A l'inverse, la glycosylation potentielle du DRT est plus probable car cette séquence possède deux à cinq sites de N-



**Figure 1** : Représentation schématique des ORFs 3 et 5 des mutants des sites potentiels de N-glycosylation du CABYV. L'organisation génétique du génome du CABYV codant pour les 6 ORFs est présenté. La protéine majeure de capsid (CP) et mineure (RT) ainsi que le produit de l'ORF4 (P17) sont représentés par des flèches. Les positions et la séquence en acide aminé des sites potentiels de N-glycosylation sont indiqués sur la séquence du sauvage (WT). Pour les différents mutants, la mutation introduite dans les protéines structurales (CP et RT) est indiquée. Pour le mutant Ngly1<sub>CP</sub> et Ngly2<sub>CP</sub>, le changement d'acide aminé introduit dans la protéine P4 par la mutation du site potentiel de N-glycosylation est indiqué sous la séquence de la CP.

glycosylation chez tous les polérovirus analysés. Le nombre et la position des sites potentiels de O-glycosylation sont beaucoup plus conservés car les sites prédits se retrouvent sur une séquence qui est très conservée dans la famille des *Luteoviridae*.

### ***B - Pouvoir infectieux des mutants dans les sites potentiels de N-glycosylation dans les protoplastes et dans les plantes***

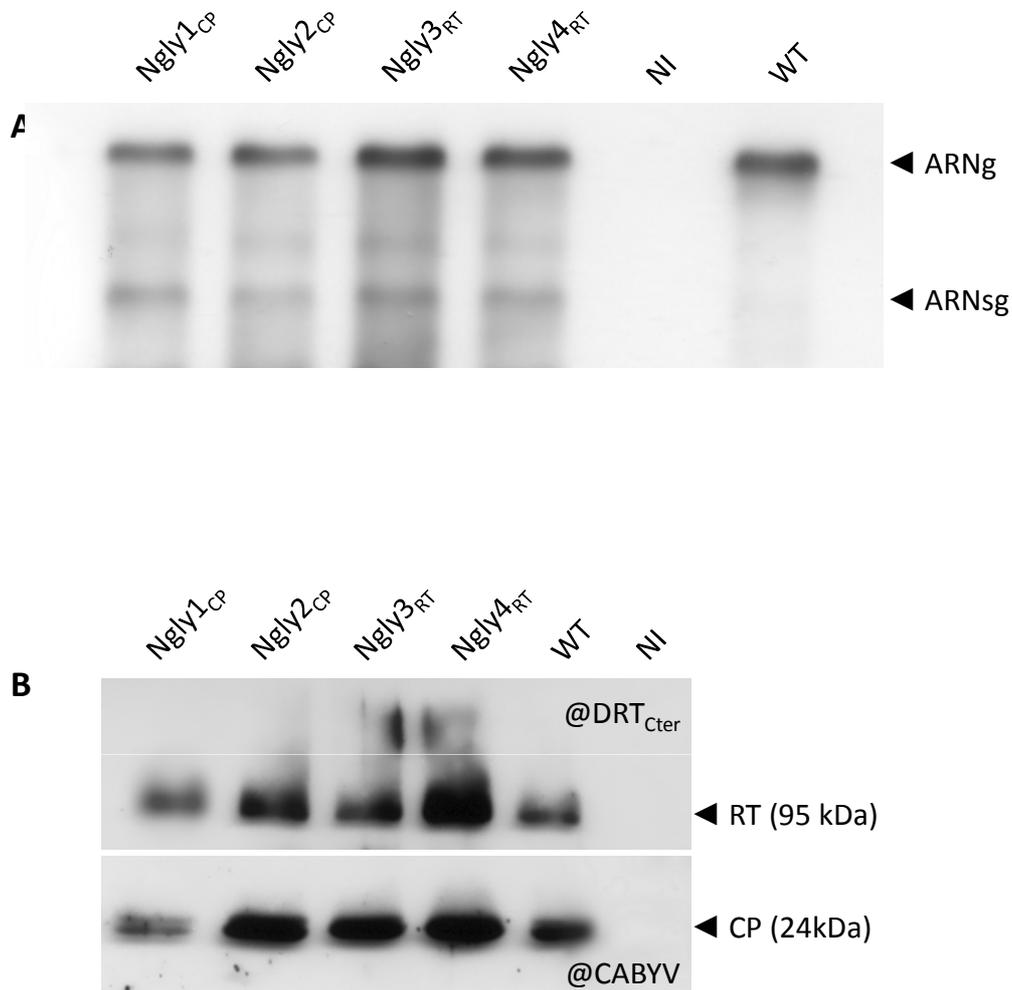
Chez le TuYV, Seddas et Boissinot [Seddas et Boissinot, 2006] ont montré que la N-glycosylation semblait jouer un rôle déterminant dans la transmissibilité du virus par puceron. Nous avons donc choisi de muter, chez le CABYV, les quatre sites potentiels de N-glycosylation situés dans la séquence de la CP et dans celle du DRT afin d'étudier le comportement de ces différents mutants dans des protoplastes et dans des plantes. Les quatre sites potentiels de N-glycosylation ont été mutés individuellement donnant les mutants Ngly1<sub>CP</sub>, Ngly2<sub>CP</sub>, Ngly3<sub>RT</sub> et Ngly4<sub>RT</sub> (figure 1). La mutation introduite vise à remplacer l'asparagine (N) par une glutamine (Q), afin de minimiser les changements dans la structure secondaire de la protéine. Il faut cependant noter que pour les mutants Ngly1<sub>CP</sub> et Ngly2<sub>CP</sub> cette mutation introduit aussi une modification dans la séquence de la protéine de 17 kDa (la P4) dont la séquence codante est comprise dans celle de la CP mais dans une autre phase de lecture (figure 1).

#### **1) Analyse de la réplication des mutants dans les protoplastes**

Nous avons dans un premier temps analysé, dans des protoplastes de *Chenopodium quinoa*, l'impact des différentes mutations sur la réplication du virus. Pour ce faire, des protoplastes de *C. quinoa* ont été infectés avec des transcrits correspondant aux différents mutants. Nous avons analysé le pouvoir infectieux des mutants après extraction des ARN totaux et des protéines des protoplastes transfectés 48 h après l'inoculation.

L'analyse des ARN totaux par Northern blot (figure 2A) montre que l'ARN génomique des différents mutants est détecté dans les protoplastes à un niveau similaire à celui du virus sauvage. Ces résultats suggèrent que les mutations introduites n'ont aucun effet sur la synthèse ou l'accumulation des ARN génomiques.

On observe également sur ces Northern blot des bandes d'ARN de faible poids moléculaire qui peuvent correspondre soit à de l'ARN subgénomique, soit à des produits de dégradation de l'ARN génomique. Chez le CABYV, l'existence de deux ARN subgéo-



**Figure 2 :** Analyse du pouvoir infectieux dans les protoplastes de mutants du CABYV touchés dans les sites potentiels de N-glycosylation. (A) Détection des ARN viraux par Northern-blot dans des protoplastes de *C. quinoa* 48h après inoculation avec les transcrits des mutants Ngly1<sub>CP</sub>, 2<sub>CP</sub>, 3<sub>RT</sub>, 4<sub>RT</sub> et du virus sauvage (WT). La position de l'ARN génomique (ARNg) et subgénomique (ARNsg) est indiquée. (B) Immunodétection de la CP et de la RT du CABYV à partir d'extraits de protoplastes infectés avec les transcrits Ngly1<sub>CP</sub>, 2<sub>CP</sub>, 3<sub>RT</sub>, 4<sub>RT</sub> et du virus sauvage (WT) 48h après l'inoculation. La partie supérieure de la membrane a été incubée avec un anticorps dirigé contre la partie C-terminale de la protéine de RT (@DRT<sub>Cter</sub>) et la partie inférieure avec un anticorps spécifique du CABYV (@CABYV). Les positions de la CP et de la RT sont indiquées avec leur poids moléculaire apparent entre parenthèses. NI : témoin non inoculé.

miques est suspectée, l'un correspondant à la séquence de la protéine de RT et un autre couvrirait la partie C-terminale de la séquence de la protéine de RT [Ashoub, Rohde *et al.*, 1998].

Nous avons aussi voulu nous assurer que la synthèse des protéines virales n'était pas affectée par les mutations introduites. Pour cela, les protéines de structure du CABYV ont été recherchées par western blot dans les extraits de protoplastes infectés en utilisant des sérums polyclonaux dirigés spécifiquement contre la protéine de RT du CABYV (@DRT<sub>Cter</sub>) ou contre les particules virales (@CABYV). Ce dernier sérum obtenu par H. Lecoq (INRA Avignon) détecte plus spécifiquement la protéine CP du CABYV. On constate que la protéine CP du CABYV, d'un PM apparent de 24 kDa, est détectée dans les extraits protéiques des protoplastes inoculés avec les différents transcrits des mutants Ngly1<sub>CP</sub>, Ngly2<sub>CP</sub>, Ngly3<sub>RT</sub> et Ngly4<sub>RT</sub>, et ce à des niveaux similaires au virus sauvage (figure 2B). Dans ces mêmes échantillons, la protéine de RT, d'un PM théorique de 72 kDa, est également mise en évidence mais avec un PM apparent de 95 kDa. Son accumulation dans les protoplastes infectés est identique quelque soit le virus en question (figure 2B). La migration ralentie de la RT du CABYV a déjà été observée pour bon nombre de virus appartenant à la famille des *Luteoviridae* [Brown, Dinesh-Kumar *et al.*, 1996]. L'une des hypothèses avancée pour expliquer ce retard dans la migration de la RT serait la présence de glycanes sur cette protéine. Les résultats du western blot confirment que les mutations introduites n'ont aucun effet sur la réplication de l'ARN viral et ne semblent pas affecter la synthèse des protéines structurales du virus.

## **2) Analyse du pouvoir infectieux et de la stabilité des mutants dans les plantes**

### **a) Accumulation des mutants dans les plantes**

Nous avons poursuivi l'analyse du rôle des mutations introduites en suivant le comportement des mutants dans les plantes. Afin d'inoculer les plantes avec les différents mutants, les constructions ont été introduites dans le vecteur binaire pbin19, sous le contrôle du promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur (*Cauliflower mosaic virus*, CaMV) entre les séquences bordantes de l'ADN-T. Les plasmides recombinants sont introduits dans *A. tumefaciens* et les suspensions d'agrobactéries sont ensuite agroinfiltrées dans des plants de *M. perfoliata* au niveau de blessures. Le transfert dans les cellules de la plante de la séquence virale comprise entre les bordures du T-DNA va

Agroinfection <i>M. perfoliata</i> <sup>a</sup>				
	Feuilles inoculées		Feuilles systémiques	
Ngly1 <sub>CP</sub>	36/39 (92 %) <sup>b</sup>	1.61 ± 0.23 <sup>c</sup>	121/196 (61 %)	0.75 ± 0.26
Ngly2 <sub>CP</sub>	38/47 (81 %)	0.70 ± 0.09	7/66 (10 %)	0.25 ± 0.08
Ngly3 <sub>RT</sub>	8/8 (100 %)	1.91 ± 0.23	38/52 (73 %)	0.38 ± 0.17
Ngly4 <sub>RT</sub>	8/8 (100 %)	2.51 ± 0.31	52/52 (100 %)	1.75 ± 0.27
WT	39/39 (100 %)	2.20 ± 0.48	61/61 (100 %)	1.76 ± 0.31

**Tableau 2 : Détection des mutants de N-glycosylation du CABYV dans les plantes de *M. perfoliata* agroinoculées.** L'accumulation du virus est mesurée par un test DAS-ELISA une semaine après l'agroinoculation sur les feuilles agroinoculées ou 3 semaines plus tard sur les feuilles systémiques. <sup>a</sup> Les résultats de plusieurs expériences sont combinés dans ce tableau. <sup>b</sup> Nombre de plantes infectées/nombre de plantes inoculées. Entre parenthèses le pourcentage de plantes infectées. <sup>c</sup> DO à 405 nm ± écart type après 2 heures d'incubation du substrat. Le bruit de fond observé sur les plantes non inoculées (généralement 0,12) a été soustrait aux valeurs de DO.

Quantité de virus déposée	WT	Ngly1 <sub>CP</sub>	Ngly3 <sub>RT</sub>	Ngly4 <sub>RT</sub>
2 µg	2,16	2,05	1,98	2,33
1 µg	1,65	1,45	1,68	1,53
400 ng	0,84	0,90	0,75	0,79
200 ng	0,45	0,50	0,32	0,48

**Tableau 3 : Réactivité des différents virus purifiés vis-à-vis de l'anticorps anti-CABYV par la technique de DAS-ELISA.** Différentes quantités de virus purifié provenant des mutants Ngly1<sub>CP</sub>, Ngly3<sub>RT</sub>, Ngly4<sub>RT</sub> ou du virus sauvage (*WT*) ont été déposés dans des puits préalablement recouverts d'anticorps dirigés spécifiquement contre le CABYV. Le tableau donne les résultats de DO à 405 nm après 2 heures d'incubation du substrat. *WT* : virus sauvage.

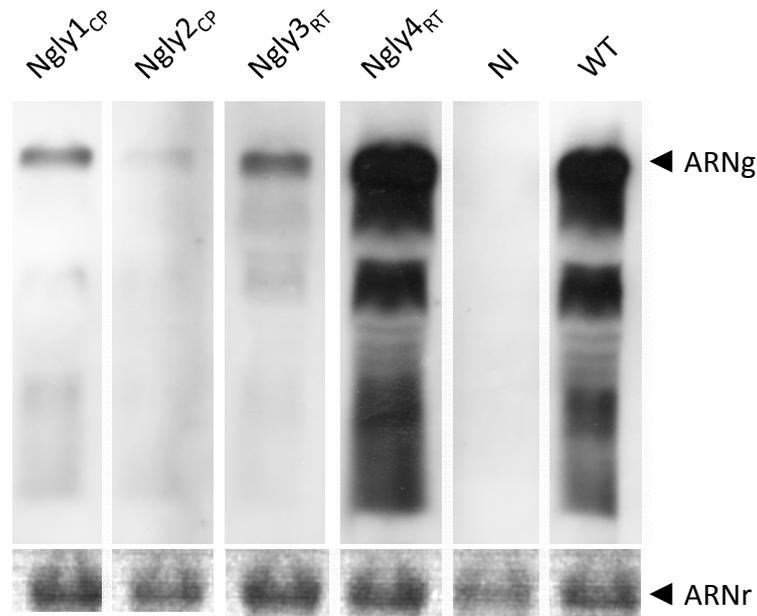
entraîner sa transcription par les polymérase endogènes ce qui va conduire à la synthèse d'un brin d'ARN viral qui peut initier l'infection dans la plante entière.

Le niveau d'accumulation du virus dans les feuilles agroinoculées et dans les feuilles systémiques a tout d'abord été analysé par DAS-ELISA une à trois semaines après l'inoculation. Le sérum polyclonal dirigé contre le CABYV a été utilisé dans ce test. Tous les mutants sont infectieux dans *M. perfoliata* et s'accumulent dans les feuilles agroinoculées à des niveaux similaires à celui du virus sauvage, à l'exception du mutant Ngly2<sub>CP</sub> dont l'accumulation est réduite (tableau 2). Dans les feuilles systémiques, seule l'accumulation du mutant Ngly4<sub>RT</sub> est identique au virus sauvage, tandis que pour les mutants Ngly1<sub>CP</sub> et Ngly3<sub>RT</sub> l'accumulation est plus faible. Enfin, le mutant Ngly2<sub>CP</sub> n'est détecté que dans 10 % des échantillons de feuilles systémiques testés, et ce, à des niveaux très faibles. La différence d'accumulation des mutants Ngly1<sub>CP</sub> et Ngly3<sub>RT</sub> n'est pas liée à une différence de réactivité vis-à-vis du sérum utilisé car des dilutions réalisées à partir de suspensions virales purifiées et testées en DAS-ELISA, donnent des valeurs de DO<sub>405nm</sub> identiques à celle du virus sauvage (tableau 3). Bien que la séquence des protéines de structure ait été modifiée dans ces mutants, aucune modification de la conformation des épitopes n'a été engendrée. Cette expérience n'a malheureusement pas pu être réalisée avec le mutant Ngly2<sub>CP</sub> pour lequel aucune suspension virale purifiée n'a été obtenue.

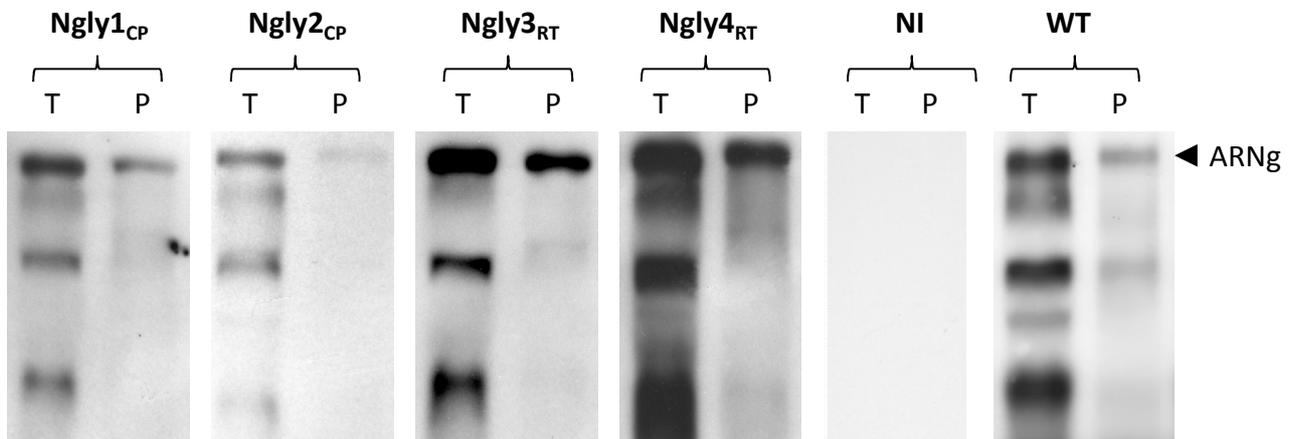
En accord avec les résultats ELISA, une plus faible accumulation des ARN génomiques des mutants Ngly1<sub>CP</sub> et Ngly3<sub>RT</sub>, comparée au virus sauvage, a été observée dans les feuilles systémiques (figure 3) 3 semaines après l'agroinoculation. L'ARN génomique du mutant Ngly2<sub>CP</sub> est à peine détectable alors que l'accumulation du mutant Ngly4<sub>RT</sub> est similaire au virus sauvage.

### **b) Test de stabilité des particules virales**

Pour tenter de déterminer l'origine de la plus faible accumulation de certains mutants dans les plantes, nous avons réalisé des tests de protection aux RNases afin d'analyser la stabilité des particules virales. Deux méthodes d'extractions d'ARN ont été effectuées sur les feuilles agroinoculées 7 jours après l'infection : la première, réalisée dans un tampon de haute force ionique et de pH élevé, inhibe l'action des RNases susceptibles d'être libérées lors du broyage et permet donc l'extraction des ARN totaux (encapsidés et non encapsidés) ; la deuxième extraction, effectuée dans un tampon permet-



**Figure 3 : Pouvoir infectieux des mutants du CABYV dans les sites potentiels de la N-glycosylation dans les plantes.** Accumulation de l'ARN viral des mutants du CABYV dans les feuilles systémiques par Northern blot 3 semaines après l'agroinoculation. La position de l'ARN génomique (*ARNg*) est indiquée. *ARNr* : ARN ribosomique coloré au BET ; *NI* : témoin non inoculé. *WT*: virus sauvage.

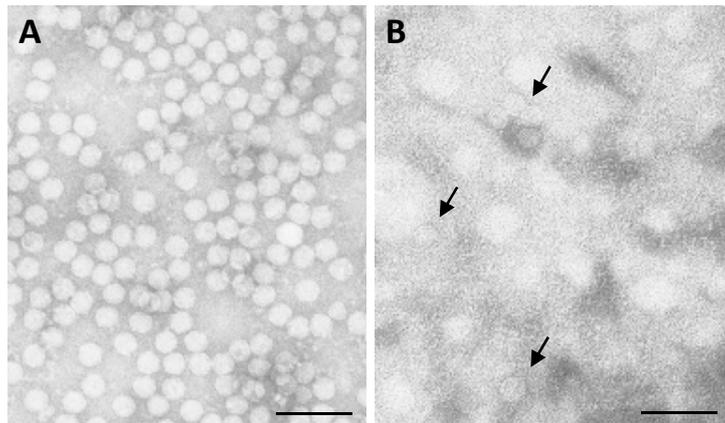


**Figure 4 : Accumulation de l'ARN viral des mutants potentiels de la N-glycosylation ou du virus sauvage après traitement par les RNases endogènes de plante.** Analyse par Northern blot de l'ARN total (**T**) extrait 7 jours après l'inoculation, ou de l'ARN protégé (**P**). Pour l'ARN protégé, l'extraction a été réalisée dans des conditions où seul l'ARN encapsidé dans des particules stables demeure intact. La position de l'ARN génomique (*ARNg*) est indiquée. *WT* : virus sauvage ; *NI* : témoin non inoculé.

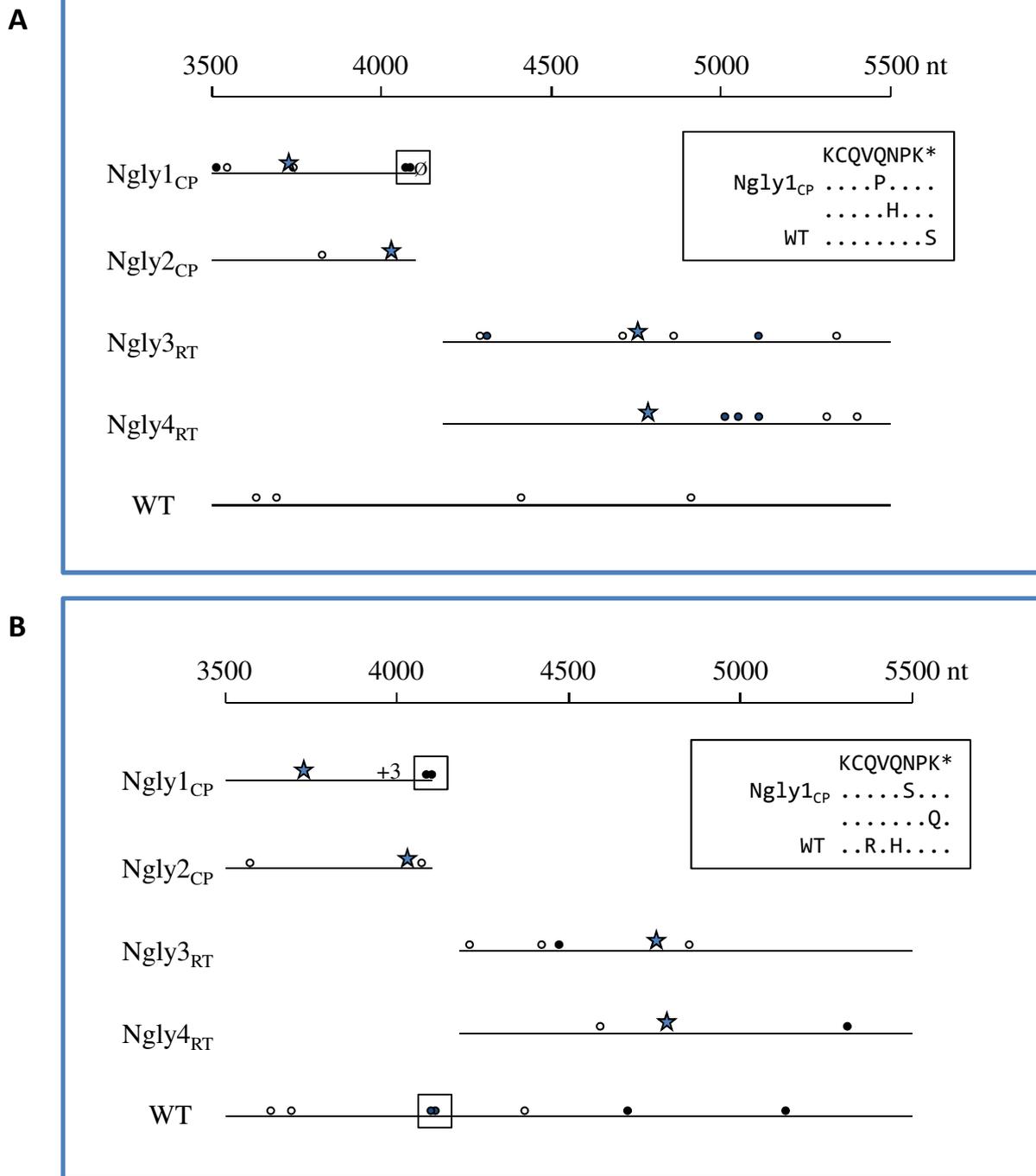
tant l'action des Rnases endogènes, permet seulement de visualiser les ARN protégés par la capsid virale.

Le Northern blot réalisé sur les ARNs extraits dans les deux conditions (figure 4) montre, qu'à l'exception du mutant Ngly2<sub>CP</sub>, les mutants sont résistants à la dégradation par les RNases car les ARN encapsidés sont détectés à un niveau similaire au virus sauvage. A l'inverse, l'accumulation de l'ARN génomique du mutant Ngly2<sub>CP</sub>, en condition non protégée, est extrêmement faible ce qui suggère que la mutation introduite dans la séquence de la CP interfère avec l'encapsidation de l'ARN viral et est probablement responsable de la formation d'une capsid instable.

Une autre technique d'évaluation de la stabilité des virions, est l'obtention de purifications virales des mutants en utilisant la méthode décrite par van den Heuvel [Van den Heuvel, Boerma *et al.*, 1991]. Nous avons purifié les mutants Ngly1<sub>CP</sub>, 3<sub>RT</sub> et 4<sub>RT</sub> à partir des feuilles systémiques infectées et nous avons observé la présence des virions mutés dans les mêmes fractions du gradient de sucrose que celles du virus sauvage. En raison de la faible efficacité du mutant Ngly2<sub>CP</sub> à se mouvoir dans les parties systémiques de la plante, une purification du virus a été réalisée à partir des feuilles agroinfiltrées. Alors qu'une purification du virus sauvage, dans des conditions identiques, conduit à l'obtention de 72,5 µg de virus à partir de 400 g de feuilles, aucun pic révélant la présence de virus n'est observé dans le cas du mutant Ngly2<sub>CP</sub> (3 purifications indépendantes ont été réalisées), ce qui confirme l'instabilité de ce virus qui ne supporte probablement pas les étapes de la purification. Nous avons cependant récupéré les fractions du gradient de saccharose du mutant Ngly2<sub>CP</sub> pouvant potentiellement contenir quelques virions. Après une concentration de ces fractions par ultracentrifugation, quelques particules virales ont pu être observées par microscopie électronique à transmission (figure 5) ce qui montre que la mutation introduite dans le mutant Ngly2<sub>CP</sub> n'abolit pas complètement la formation des virions mais interfère très fortement sur la stabilité des particules virales. Ce défaut d'encapsidation est probablement responsable, du moins en partie, de la faible accumulation de l'ARN viral du mutant Ngly2<sub>CP</sub> dans les plantes.



**Figure 5 : Observation en microscopie électronique des particules virales du mutant Ngly2<sub>CP</sub> après purification à partir de feuilles agroinfectées (A) Particules virales dans une préparation purifiée de CABYV sauvage. (B) Particules virales du mutant Ngly2<sub>CP</sub> dans la préparation virale purifiée. Des fractions aliquotes des gradients de sucrose ont été déposées sur une grille, puis un contraste à l'acétate d'uranyle a été effectué. Les particules virales du mutant Ngly2<sub>CP</sub> sont indiquées par des flèches. La barre correspond à 100 nm.**



**Figure 6 : Distribution des mutations nucléotidiques détectées sur l'ARN viral dans la descendance.** Mutations nucléotidiques détectées sur les séquences codant pour les protéines de structure (CP et RT) 3 semaines après agroinfection des plants de *M. perfoliata* par le CABYV sauvage (WT) ou par les différents mutants (A), ou 3 semaines après inoculation des plantes par puceron. Pour chaque construction, huit clones issus de deux plantes ont été séquencés (B). La ligne horizontale indique la région séquencée. Les séquences encadrées sont agrandies. ★ Mutations introduites ; les cercles représentent les mutations détectées dans la descendance virale : ○ mutation silencieuse, ● mutation induisant un changement d'acide aminé, ∅ suppression du codon stop, +3: ajout de trois nucléotides. 3505: codon initiation de la CP; 4102: codon stop de la CP; 5506: codon stop de la RT.

### **c) Analyse de la conservation des mutations introduites dans la descendance virale**

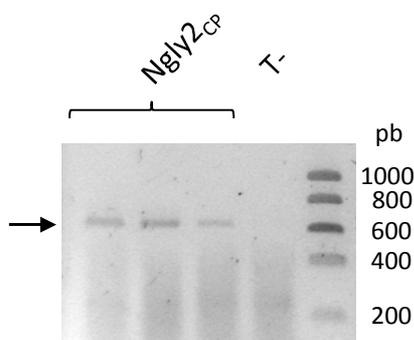
La stabilité des mutations ponctuelles introduites durant la réplication virale a été analysée dans les plantes agroinfectées après extraction de l'ARN total et amplification par RT-PCR d'un fragment couvrant la mutation. Afin de visualiser l'apparition de mutations compensatoires ou de réversions sur un nombre limité de génomes viraux, le fragment amplifié a été cloné et les inserts de huit clones provenant de deux RT-PCR indépendantes ont été séquencés. Toutes les modifications de séquence observées sont listées sur la figure 6. Des changements nucléotidiques sont observés dans la descendance du virus sauvage qui peuvent provenir d'une dérive naturelle de la séquence virale lors de la réplication ou d'erreurs introduites au cours des réactions de transcription inverse et d'amplification. Dans la descendance du mutant Ngly1<sub>CP</sub>, nous avons observé, dans 3 des 8 clones analysés, trois mutations autour du codon stop de la CP qui se situent approximativement à 380 nucléotides de la mutation introduite. Bien que deux de ces mutations induisent un changement d'acide aminé dans la séquence de la CP, aucune d'entre elles ne restaure l'acide aminé muté. La troisième mutation abolit le codon stop de la CP. A part ces modifications, aucune différence majeure n'est observée entre la descendance virale des mutants de N-glycosylation et le virus sauvage ; aucune mutation compensatoire (entraînant la restauration de l'acide aminé muté) ni réversion n'apparaît dans la descendance des mutants. Ainsi, aucune mutation secondaire n'est retrouvée systématiquement dans la descendance virale des différents mutants ce qui indique que les mutations introduites n'exercent pas de pression majeure sur l'évolution du virus. Cette observation peut paraître surprenante puisque certaines de ces mutations ont un effet délétère sur l'infection virale.

### **3) Tests de transmissibilité par pucerons**

L'étape cruciale dans notre étude a été l'analyse de la capacité des virus mutants à être transmis par puceron à partir de plantes de *M. perfoliata* infectées ainsi qu'à partir de suspensions virales purifiées. Dans les deux cas, la période d'acquisition du virus a été fixée à 48h et celle de l'inoculation du virus aux plantes tests à 4 jours. Les plantes tests ont ensuite été analysées par DAS-ELISA 3 à 4 semaines après le dépôt des pucerons.

Transmission			
	<i>M. perfoliata</i> agroinfectée <sup>a</sup>		Virus purifié <sup>b</sup>
	<i>A. gossypii</i>	<i>M. Persicae</i>	<i>M. Persicae</i>
<b>Ngly1<sub>CP</sub></b>	3/24 (13 %) <sup>c</sup>	5/40 (13 %)	14/19 (74 %)
<b>Ngly3<sub>RT</sub></b>	3/17 (18 %)	3/18 (17 %)	4/9 (44 %)
<b>Ngly4<sub>RT</sub></b>	9/18 (50 %)	10/19 (53 %)	16/21 (76 %)
<b>WT</b>	26/26 (100 %)	27/30 (90 %)	14/19 (74 %)

**Tableau 4 : Transmissibilité par puceron des mutants des sites potentiels de N-glycosylation et du virus sauvage à partir de plants de *M. perfoliata* et à partir de virus purifié.** <sup>a</sup> Après 48h d'acquisition sur des plantes infectées par les mutants ou le virus sauvage, 20 pucerons ont été transférés sur les plantes tests pour une période d'inoculation de 4 jours. Les plantes tests ont été analysées par DAS-ELISA 3 semaines plus tard. <sup>b</sup>Après 48h d'acquisition sur du virus purifié (à une concentration finale de 100 µg/ml), 20 pucerons ont été transférés sur les plantes tests pour une période d'inoculation de 4 jours. Les plantes tests ont été analysées par DAS-ELISA 3 semaines plus tard. <sup>c</sup>Nombre de plantes infectées après inoculation par puceron/ nombre de plantes testées. Entre parenthèses, le pourcentage de plantes infectées. Les pourcentages de plantes infectées entre les différents mutants et le sauvage est significativement différent dans les feuilles agroinfectées. Dans le cas du virus purifié nous n'avons aucune différence significative de pourcentage de plantes infectées entre les différents mutants et le sauvage.

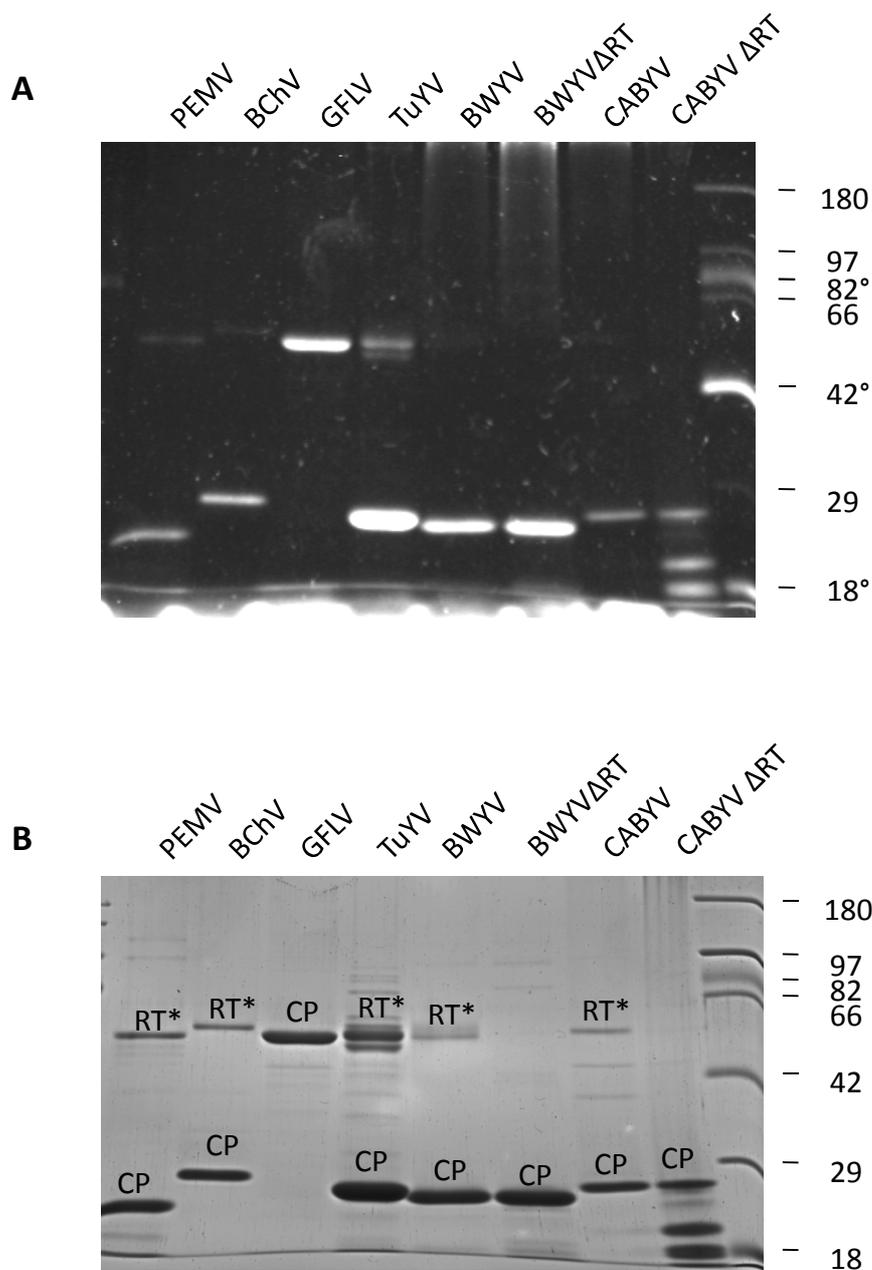


**Figure 7 : Détection du mutant Ngly2<sub>CP</sub> par RT-PCR après transmission par puceron dans les plantes tests.** Après une acquisition du virus de 48 h sur les feuilles agroinoculées, 20 pucerons par plante ont été transférés sur les plantes tests. Les ARN totaux ont été extraits 7 jours plus tard et l'ARN viral a été recherché par RT-PCR. Les fragments PCR sont séparés sur un gel d'agarose puis visualisés après coloration au BET. T- : témoin PCR négatif sans ajout d'ADNc. Le fragment de 601 pb attendu est indiqué par une flèche.

Pour les tests de transmission à partir de plantes infectées, deux espèces de pucerons vecteurs du CABYV ont été utilisées : *M. persicae* et *A. gossypii*. Pour les mutants Ngly1<sub>CP</sub>, 3<sub>RT</sub> et 4<sub>RT</sub>, l'acquisition du virus par les pucerons a été réalisée à partir des feuilles systémiques infectées, trois à quatre semaines après leur agroinoculation. Les résultats, regroupés dans le tableau 4, montrent que la transmissibilité des mutants Ngly1<sub>CP</sub>, 3<sub>RT</sub> et 4<sub>RT</sub> à partir des feuilles infectées est réduite comparée à celle du virus sauvage. Cette différence d'efficacité de transmission peut être attribuée, au moins dans le cas des mutants Ngly1<sub>CP</sub> et Ngly3<sub>RT</sub>, à l'accumulation plus faible de ces deux virus dans les plantes (voir tableau 2). En effet, lorsque des solutions virales purifiées et quantifiées sont délivrées aux pucerons, l'efficacité de transmission de ces deux mutants retrouve un niveau proche de celui du virus sauvage. A l'inverse, la plus faible transmissibilité du mutant Ngly4<sub>RT</sub> à partir des plantes infectées ne peut être liée à son accumulation dans les feuilles systémiques qui est identique à celle du virus sauvage (figure 3 et tableau 2). Cette réduction de la transmission du mutant Ngly4<sub>RT</sub> pourrait provenir d'une répartition spatiale du virus mutant différente de celle du virus sauvage ce qui affecterait l'accessibilité du virus mutant par les pucerons. On pourrait notamment envisager un plus faible déchargement des virions du mutant Ngly4 dans les cellules des tubes criblés. En effet, lorsqu'une solution purifiée de ce mutant est offerte aux pucerons, sa transmissibilité est identique à celle du virus sauvage confirmant que la mutation introduite n'affecte pas directement le mécanisme d'acquisition et d'inoculation du virus.

En raison de l'impossibilité d'obtenir suffisamment de particules purifiées du mutant Ngly2<sub>CP</sub> et de son incapacité à envahir les feuilles systémiques, la transmissibilité de ce virus a été évaluée en utilisant les feuilles agroinfiltrées comme source de virus. Dix jours après l'agroinfection, les pucerons ont été déposés pendant 48 h sur les feuilles infiltrées puis transférés pendant 4 jours sur les plantes test. La recherche du virus dans les plantes tests s'est faite par RT-PCR 7 jours après l'inoculation par puceron. Des trois plantes analysées, toutes montrent la présence de l'ARN viral du mutant Ngly2<sub>CP</sub> (figure 7).

La stabilité des mutations introduites dans la descendance virale des plantes inoculées par puceron a également été analysée par RT-PCR. Toutes les modifications observées dans la descendance ne montrent pas de sélection particulière de variants vi-

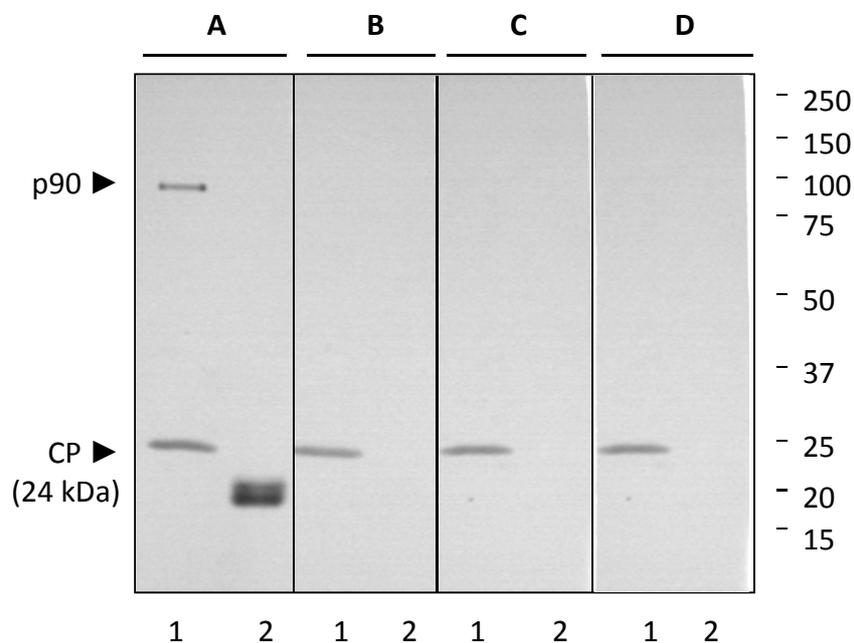


**Figure 8** : Détection des glycanes sur les protéines structurales de différents virus avec le kit Pro-Q Emerald. De 3 à 16  $\mu\text{g}$  de chacun des virus purifiés ont été déposés sur un gel SDS-PAGE à 10 % de polyacrylamide. **(A)** Après un traitement à l'acide périodique, le gel a été incubé avec le réactif Pro-Q Emerald 488 qui permet de mettre en évidence les glycoprotéines. **(B)** Gel réalisé en parallèle et coloré avec le bleu de Coomassie afin de vérifier la charge virale dans chacune des pistes. ° : protéines glycosylées présentes dans le ladder. CP : Protéine majeure de capsid ; RT\* : Protéine de readthrough tronquée. La taille en kDa des protéines du marqueur de poids moléculaire est indiquée.

raux ayant pu s'accumuler dans les plantes sources. En effet aucune mutation compensatoire ou réversion n'est observée sur les séquences analysées (figure 6).

### ***C - Détection des résidus glycosylés sur les protéines de structure des polérovirus par approche biochimique***

La première approche pour analyser la présence de résidus glycosylés sur les particules virales du CABYV a été l'utilisation du kit ProQ Emerald (Invitrogen). Ce kit est basé sur une réaction d'oxydation des glycanes qui sont transformés en aldéhydes par l'acide périodique. Une coloration avec le ProQ Emerald 488 permet de générer un composé fluorescent à partir des aldéhydes. Il faut signaler que ce kit a potentiellement la capacité de détecter aussi bien les résidus N- ou O- glycosylés. Ce réactif a été testé sur les protéines de structure de plusieurs virus de la famille des *Luteoviridae*: le *Pea enation mosaic virus* (PEMV, *Enamovirus*), le *Beet chlorosis virus* (BChV, *Polerovirus*), le *Turnip yellows virus* (TuYV, *Polerovirus*), et le CABYV. Le *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) appartenant au genre *Nepovirus* ainsi que deux mutants viraux du CABYV et du TuYV ne possédant pas le domaine de RT ont également été utilisés dans cette expérience. Le nombre de sites potentiels de N- et de -O glycosylation sur les séquences des protéines de structure des virus est présenté dans le tableau 1. On remarque que toutes les protéines de structure des virus testés peuvent potentiellement être glycosylées. Après séparation des protéines sur un gel SDS-PAGE, le gel a été incubé dans un bain d'acide périodique avant d'être mis en présence du réactif spécifique des sucres. La figure 8A montre qu'un signal fluorescent est observé pour chacune des protéines majeures de la capsid des virus appartenant à la famille des *Luteoviridae* (PM apparent entre 22 et 28 kDa) mais également dans le cas de la protéine de structure du GFLV (56 kDa). Un faible signal est également observé au niveau des protéines mineures des capsides des *Luteoviridae*. La spécificité de la réaction peut être évaluée par comparaison du signal obtenu avec celui des protéines glycosylées présentes dans le marqueur de poids moléculaires. Or, sur la figure 8A, nous pouvons remarquer que la spécificité du réactif n'est pas très stricte car un signal fluorescent est visible pour des protéines non glycosylées comme la phosphorylase b (97 kDa), la BSA (66 kDa) et l'anhydrase carbonique (29 kDa). Ce manque de spécificité, nous empêche de conclure quant à la présence de glycanes sur les protéines structurales des différents virus testés.



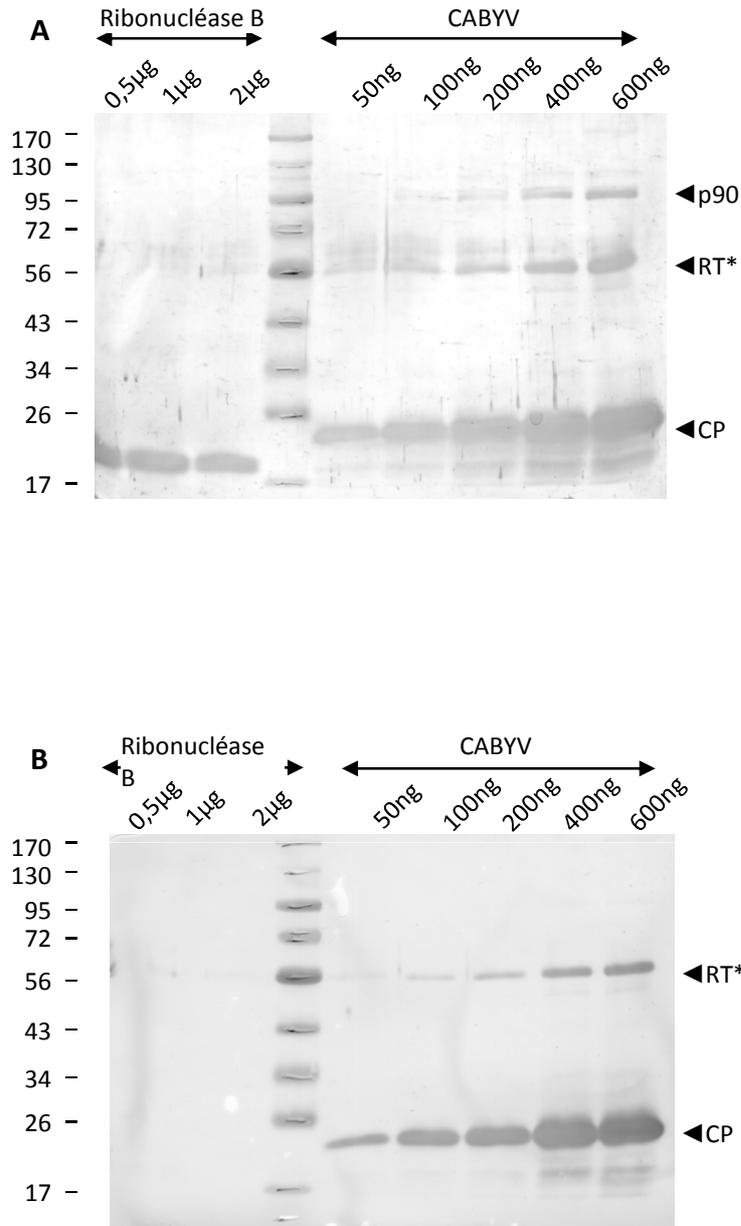
**Figure 9 : Détection des glycanes oligomannosidiques sur les protéines structurales du CABYV avec le système ConA/péroxydase.** 4  $\mu$ g de virus purifié ont été déposés sur les pistes n°1, et 0,5  $\mu$ g de ribonucléase B sur les pistes n°2. Cette protéine d'environ 15 kDa possède des N-glycanes oligomannosidiques et sert de témoin positif dans cette expérience. Les protéines ont été séparées sur un gel SDS-PAGE à 15% d'acrylamide avant d'être transférées sur membrane de nitrocellulose. Une incubation a été réalisée avec la concanavaleine A (ConA)/péroxydase puis avec le substrat de l'enzyme (**panneau A**), et dans des conditions similaires avec ajout du sucre compétiteur de la ConA, l' $\alpha$ -méthylmannose (**panneau B**), ou bien après oxydation des sucres par l'acide périodique (**panneau C**). Dans le **panneau D**, l'incubation a été réalisée avec seulement la péroxydase et le substrat de l'enzyme. La taille en kDa des protéines du marqueur de poids moléculaire est indiquée. CP : Protéine majeure de capsid

## ***D - Détection des glycanes oligomannosidiques et des glycanes complexes sur les protéines de structure des polérovirus***

Les protéines de structure du CABYV peuvent potentiellement, au cours de leur synthèse au niveau du réticulum endoplasmique, être la cible de modifications post-traductionnelles de type N-glycosylation. Cette modification consiste à l'ajout d'un glycanes précurseur au niveau d'une asparagine sur la séquence consensus N-x-S/T. Ce glycanes précurseur peut, par la suite, être mûré en glycanes oligomannosidique au niveau du réticulum endoplasmique puis en glycanes complexes lors de son passage dans l'appareil de Golgi [Lerouge, Cabanes-Macheteau *et al.*, 1998]. Ces modifications sont induites par toute une batterie de glycosidases et glycosyltransférases spécifiques. L'ensemble de ces étapes conduit à une libération d'une protéine portant des glycanes complexes qui peut rejoindre sa destination finale dans le système sécrétoire.

### **1) Détection des glycanes oligomannosidiques**

Pour détecter les résidus oligomannosidiques sur les protéines de structure du CABYV, nous avons utilisé un test de détection via des lectines (Concanavoline A ou ConA). Les protéines de structure du CABYV ont tout d'abord été séparées par électrophorèse sur gel SDS-PAGE avant d'être transférées sur une membrane de nitrocellulose et mise en présence de la ConA. La révélation s'est faite après addition de la peroxydase de raifort qui est une protéine fortement glycosylée. Le fait que la ConA soit une protéine qui s'associe en tétramères, lui confère la possibilité de se lier avec plusieurs protéines glycosylées. L'addition du substrat de l'enzyme permet de détecter deux signaux, un premier de 24 kDa qui correspond à la CP du CABYV et un autre autour de 90 kDa qui correspond à une protéine de plante présente dans les suspensions de virus purifié (figure 9A). La spécificité de ces interactions a été évaluée en ajoutant le sucre compétiteur de la ConA (l' $\alpha$ -méthyl mannose) (figure 9B) ou en soumettant le virus à un traitement periodate (figure 9C) qui clive l'anneau glycol du résidu sucré et inhibe la fixation à la ConA. Seule la réaction observée avec la protéine de 90 kDa est spécifique comme le montre la disparition du signal en présence du sucre compétiteur ou après traitement au périodate. Le signal à 24 kDa est dû à une réaction aspécifique entre la CP du CABYV et la peroxydase (figure 9D). Une réaction aspécifique similaire a été observée entre la peroxydase et la RT\* du CABYV lorsqu'un système de révélation plus sensible que celui présenté sur la figure 9 (système ECL) a été utilisé.



**Figure 10 : Détection des glycanes oligomannosidiques sur les protéines de structure du CABYV avec le système ConA/biotine.** De 50 à 600 ng de CABYV et 500 ng à 2 µg de Ribonucléase B ont été déposés sur un gel SDS-PAGE à 10 % de polyacrylamide. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, les protéines ont été incubées avec la Concanavaline A (ConA) biotinylée puis avec la streptavidine marquée à la phosphatase alcaline. La révélation colorimétrique s'est faite après incubation du substrat NBT/BCIP (**A**). Sur la partie (**B**), le sucre compétiteur de la ConA, l'  $\alpha$ -méthyl-mannose, a été préalablement ajouté pour analyser la spécificité des réactions. CP : Protéine majeure de capsid ; RT\* : Protéine de readthrough tronquée. La taille en kDa des protéines du marqueur de poids moléculaire est indiquée.

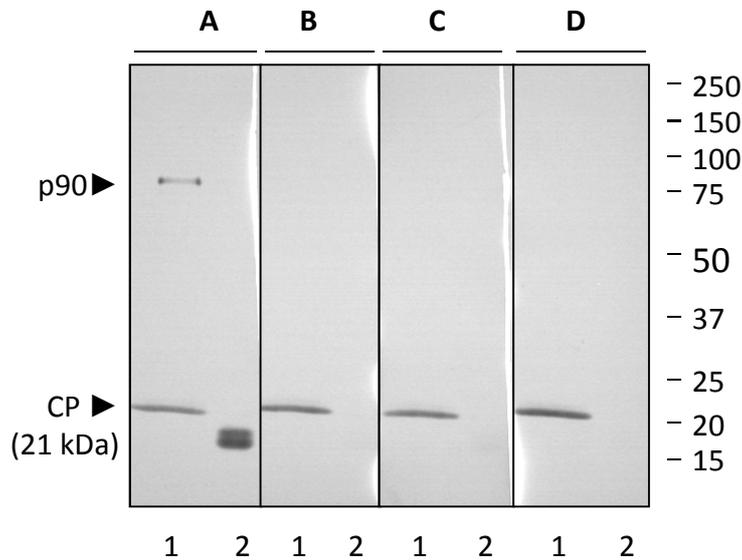
Un autre système de révélation a été employé pour tenter de s'affranchir de cette réaction aspécifique. Il consiste à l'emploi de ConA fixée à la biotine. L'addition de streptavidine couplée à la phosphatase alcaline puis du substrat de l'enzyme permet de mettre en évidence les protéines glycosylées par une réaction colorimétrique. La spécificité de la réaction est évaluée, en parallèle, après addition du sucre compétiteur l' $\alpha$ -méthyl mannose. Une gamme de différentes concentrations de CABYV purifié (50 ng à 600 ng) et de ribonucléase B (500 ng à 2  $\mu$ g), utilisée comme témoin positif, a été déposée sur le gel. La figure 10 montre que les signaux correspondant aux protéines CP et RT\* du CABYV ne disparaissent pas en présence du sucre compétiteur, ce qui montre, une fois de plus, l'aspécificité de la réaction. A l'inverse, nous confirmons la présence de glycanes oligomannosidiques sur la protéine de plante de 90 kDa puisque le signal correspondant à cette protéine disparaît en présence de l' $\alpha$ -méthyl mannose (figure 10).

L'ensemble des résultats présentés dans ce paragraphe ne permet pas de conclure définitivement quant à la présence de résidus oligomannosidiques sur la CP et la RT\* du CABYV. A l'inverse, une protéine de plante de 90 kDa, présente dans les préparations virales purifiées, semble porter des résidus oligomannosidiques.

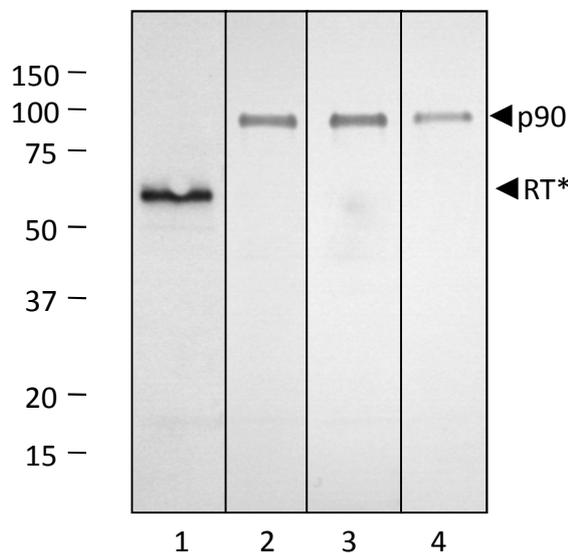
Une partie des expériences présentées ci-dessus a également été reproduite avec les préparations purifiées du TuYV. Nous avons réalisé une recherche des glycanes oligomannosidiques avec le système ConA/péroxydase (figure 11) et comme pour le CABYV, nous avons observé une réaction non-spécifique de la protéine majeure de capsid du TuYV avec la péroxydase ne nous permettant pas de déterminer la présence de ces résidus sur cette protéine. Comme dans les préparations de virus purifié du CABYV, nous détectons la présence de glycanes oligomannosidiques sur la protéine de 90 kDa qui copurifie également avec le TuYV (figure 11).

## 2) Immunodétection des glycanes complexes

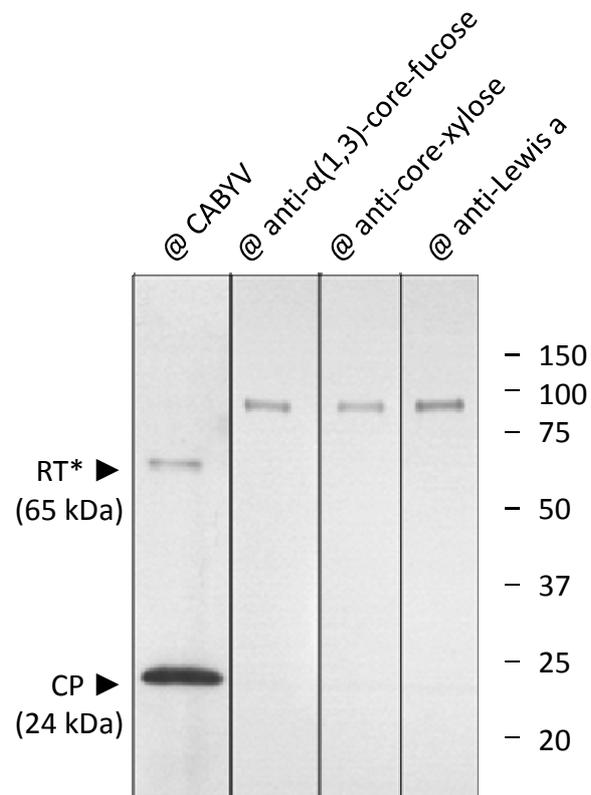
Nous avons poursuivi cette analyse de détection des glycanes sur les protéines de structure du CABYV en réalisant une recherche des glycanes complexes avec des anticorps spécifiques reconnaissant les motifs suivants : core  $\beta$ (1,2)-xylose, core  $\alpha$ (1,3)-fucose [Faye, Gomord *et al.*, 1993] et terminal Lewis a [Fitchette-Laine, Gomord *et al.*, 1997]. Les protéines de structure du CABYV ont été séparées sur gel SDS-PAGE puis transférées sur une membrane de nitrocellulose avant l'incubation avec les anticorps spécifiques des sucres.



**Figure 11 : Détection des glycanes oligomannosidiques sur les protéines de structure du TuYV.** 4  $\mu$ g de TuYV ont été déposés sur les pistes 1 et 500 ng de ribonuléase B sur les pistes 2 d'un gel SDS-PGE à 15 % de polyacrylamide. Après transfert sur membrane de nitrocellulose, les protéines sont incubées en présence Concanavoline A (ConA)/péroxydase puis du substrat de l'enzyme (**A**), dans des conditions similaires avec incubation avec le sucre compétiteur de la ConA, l'  $\alpha$ -méthyl-mannose (**B**), ou après traitement à l'acide périodique (**C**). Sur le panneau **D**, la ConA a été omise et l'incubation a seulement été réalisée avec la peroxydase. La révélation colorimétrique est obtenue après addition de l'enzyme. La taille en kDa des marqueurs moléculaires est indiquée à droite. CP : Protéine majeure de capsid



**Figure 12 : Détection des glycanes complexes du TuYV.** 4  $\mu$ g de virus purifié ont été déposés sur chacune des pistes d'un gel SDS-PAGE à 15 % de polyacrylamide. Après transfert sur une membrane de nitrocellulose, les protéines ont été incubées avec un anticorps dirigé contre (1) la protéine RT du TuYV, (2) l' $\alpha$ (1,3)-core-fucose, (3) le core-xylose ou (4) le Lewis a. La taille en kDa des marqueurs moléculaires est indiquée à gauche. Le motif Lewis a se caractérise par la séquence suivante : Gal $\beta$ 1,3[Fuca $\alpha$ 1,4]GlcNAc. RT\* : Protéine de readthrough tronquée.



**Figure 13 : Détection des glycanes complexes sur les protéines structurales du CABYV.**

4  $\mu\text{g}$  de virus purifié ont été chargés sur chaque piste. Les protéines ont été séparées sur un gel SDS-PAGE à 15 % avant d'être transférées sur membrane de nitrocellulose et incubées avec différents anticorps : anti- $\alpha(1,3)$ -core-fucose, anti-core-xylose ou anti-Lewis a ( $\text{Gal}\beta 1,3[\text{Fuc}\alpha 1,4]\text{GlcNAc}$ ) ainsi qu'avec l'anticorps dirigé contre le CABYV. La taille des protéines (en kDa) du marqueur est indiquée à droite. CP : Protéine majeure de capsid ; RT\* : Protéine de readthrough tronquée.

L'ajout de l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase permet, après addition du substrat de l'enzyme, d'observer un signal à 90 kDa avec les trois anticorps testés (figure 13). Aucun autre signal correspond à la protéine majeure (24 kDa) ou la protéine mineure (65 kDa) de la capsid du CABYV n'est observé sur le blot ce qui suggère l'absence de glycanes complexes sur les protéines virales. Une réaction similaire a été observée à partir d'une solution purifiée de TuYV. La figure 12 montre l'absence de signal correspondant aux protéines CP et RT\* du TuYV alors que la protéine de 90 kDa réagit avec les trois anticorps testés.

La protéine de 90 kDa présente dans les préparations virales purifiées du CABYV et du TuYV possède à la fois des glycanes oligomannosidiques et des glycanes complexes. Cette protéine a été identifiée par spectrométrie de masse comme une  $\alpha$ -glucosidase (O. Lemaire et P. Schellenbaum, communication personnelle).

### ***E - Détection des résidus glycosylés sur les protéines de structure des polérovirus par spectrométrie de masse***

Afin de compléter les approches moléculaire et biochimique pour tenter de mettre en évidence des résidus glycosylés sur les protéines de structure du CABYV, nous avons engagé une étude par spectrométrie de masse. Ce travail a été réalisé en collaboration avec Jean-Marc Strub du Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique du CNRS de Strasbourg. Après séparation des protéines virales sur un gel SDS-PAGE, les bandes correspondant aux protéines de structure du CABYV ont été extraites et soumises à une analyse de masse.

Une analyse par spectrométrie de masse par MALDI-TOF a tout d'abord été conduite avec deux matrices différentes ( $\alpha$ -cyano-4 hydroxy cinnamic acid et 2,5-dihydroxybenzoic acid) permettant d'augmenter la rétention des peptides digérés. Il faut signaler, comme nous l'avons déjà mentionné auparavant, que les particules purifiées du CABYV comportent deux protéines : la protéine majeure de la capsid ou CP d'un PM apparent de 24 kDa et la protéine mineure de la capsid correspondant à une forme tronquée de la protéine de RT qui migre aux environs de 65 kDa et qui est nommée RT\*. Le site précis de clivage de la protéine de RT n'a jamais été identifié avec précision mais est supposé être localisé aux alentours du motif DE (figure 14) très conservé dans la séquence de la RT de nombreux virus appartenant à la famille des *Luteoviridae* [Guilley, Wipf-Scheibel *et al.*, 1994]. Cette analyse de spectrométrie de masse nous a permis de con-

**A**

```

1  MNTVAARNQN AGRRRRRNQR PARRDRVVVV NPIGGPPRGR RQRRNRRRPN
51  RGGRARRGSP GETFVFSKDN LTGSSTGSIT FGPSLSESPA FSSGILKAYH
101 EYKIIMVQLE FISEASSTSS GSISYELDPH CKLSSLQSTI NCFGITKSGL
151 RRWTAKQING MEWHDATEDQ FKILYKGNGS SSVAGSFRIT IKCQVQNPKY
201 VDGSSPPPPS PSPTPPPPPP PQPQPQPCAQ RFWGYEGNPQ NKILTAENSR
251 NIDSRPLNFV QMYKWEDEKW DKVNLQAGYS RNDRRCMETY LTIPADKGF
301 HVYLEADGEF VVKHIGDELD GSWLGNIAYD VSQRGWNVGN YKGCKITNYQ
351 SNTVAVAGHP DATMNGKSFDTARAVEVDWF ASFELECDDE EGSWAIYPPP
401 IQKDSSYNYT VSYGNYTEKY CEWGAISVSI DEDNNGNEPR RIPRRGVMAW
451 STPEPSFSGD DSQRQDFNTP SLEERGS DAL ESEEKKEEDN LLDLEENIP
501 DVDDDDLWKG ISRASEAGTA EDDRASTSSR LRGNLKPKGL PKPQPTRTIT
551 EFNPGPDLIE VWRPDLAPGY SKADVAAATV LAGGSVHEGR DMLERREAKV
601 MDSRKKWGIL SSTSSLTSGA LKKLSAQSEK LATLTTGERV QYQLKNSMG
651 STVAAEYLEK VLADKTS

```

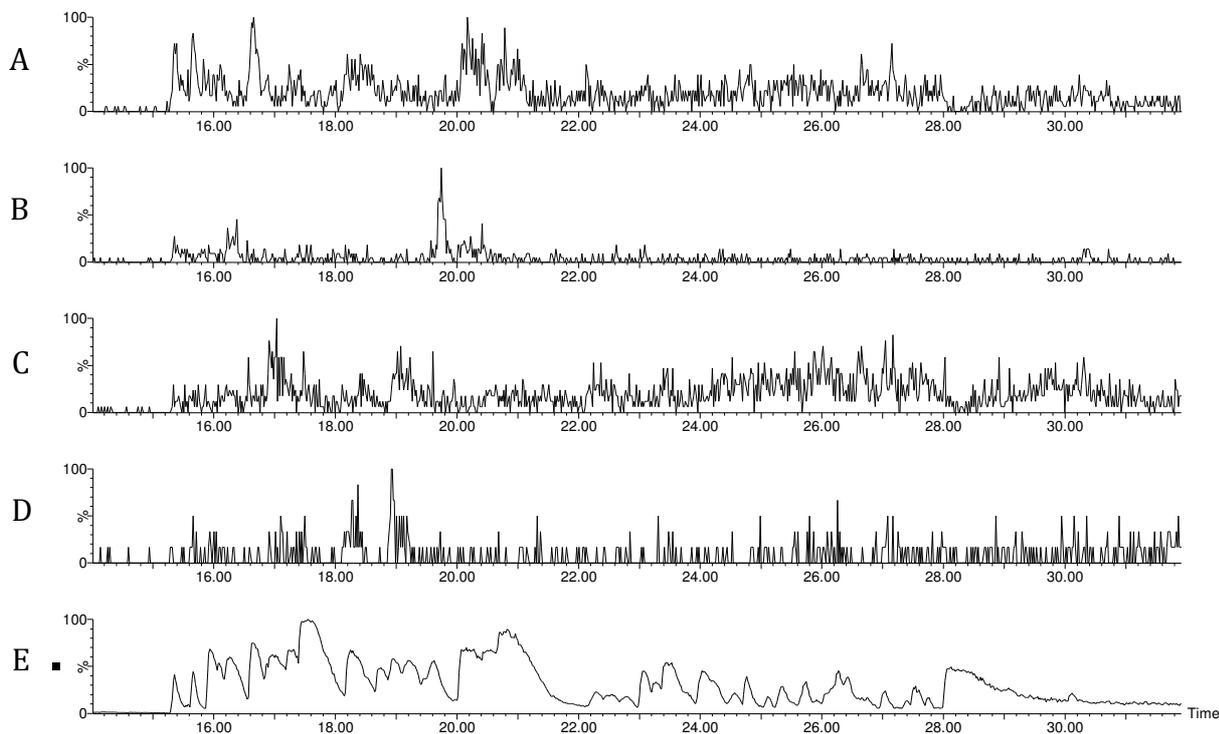
**B**

```

1  MNTVAARNQN AGRRRRRNQR PARRDRVVVV NPIGGPPRGR RQRRNRRRPN
51  RGGRARRGSP GETFVFSKDN LTGSSTGSIT FGPSLSESPA FSSGILKAYH
101 EYKIIMVQLE FISEASSTSS GSISYELDPH CKLSSLQSTI NCFGITKSGL
151 RRWTAKQING MEWHDATEDQ FKILYKGNGS SSVAGSFRIT IKCQVQNPKY
201 VDGSSPPPPS PSPTPPPPPP PQPQPQPCAQ RFWGYEGNPQ NKILTAENSR
251 NIDSRPLNFV QMYKWEDEKW DKVNLQAGYS RNDRRCMETY LTIPADKGF
301 HVYLEADGEF VVKHIGDELD GSWLGNIAYD VSQRGWNVGN YKGCKITNYQ
351 SNTVAVAGHP DATMNGKSFDTARAVEVDWF ASFELECDDE EGSWAIYPPP
401 IQKDSSYNYT VSYGNYTEKY CEWGAISVSI DEDNNGNEPR RIPRRGVMAW
451 STPEPSFSGD DSQRQDFNTP SLEERGS DAL ESEEKKEEDN LLDLEENIP
501 DVDDDDLWKG ISRASEAGTA EDDRASTSSR LRGNLKPKGL PKPQPTRTIT
551 EFNPGPDLIE VWRPDLAPGY SKADVAAATV LAGGSVHEGR DMLERREAKV
601 MDSRKKWGIL SSTSSLTSGA LKKLSAQSEK LATLTTGERV QYQLKNSMG
651 STVAAEYLEK VLADKTS

```

**Figure 14 : Couverture des protéines structurales du CABYV obtenue en spectrométrie de masse.** Les protéines structurales du CABYV ont été extraites à partir d'un gel SDS-PAGE chargé avec une suspension de virus purifié. **(A)** En rouge, peptides tryptiques identifiés par MALDI-TOF. **(B)** En rouge, peptides tryptiques identifiés par nano-LC-MS/MS. Les sites potentiels de glycosylation sont soulignés. La séquence DE, très conservée chez les membres des *Luteoviridae* est entourée. Y grisé: position du codon stop de la CP.



**Figure 15 : Recherche des glycanes sur les protéines de structure du CABYV par spectrométrie nano LC-MS à haute énergie. (A)** Chromatogramme des peptides tryptiques issus de la fragmentation à haute énergie (50V) des protéines de structure du CABYV. **(B)** Chromatogramme des ions de  $m/z$  163.1 ( $M+H^+$ ) correspondant aux hexoses. **(C)** Chromatogramme des ions  $m/z$  204.1 ( $M+H^+$ ) correspondant aux N-acetylhexosamine. **(D)** Chromatogramme des ions  $m/z$  292.1 ( $M+H^+$ ) correspondant à l'acide sialique. **(E)** Chromatogramme des ions  $m/z$  366.14 ( $M+H^+$ ) correspondant aux N-acetylhexosamine et hexoses. Aucun glycanes correspondant à ceux recherchés, n'ont été détecté lors de cette étude.

firmer la nature des protéines virales mais aussi de proposer un site de coupure de la RT localisé 9 acides aminés, ou plus, en aval du motif DE (figure 14). Il est intéressant de signaler que des analyses par spectrométrie de masse réalisées il y a quelques années en collaboration avec Christelle Guillier (plateforme de protéomique de Strasbourg) pour tenter d'identifier le site précis de coupure de la RT du CABYV, avaient également abouti à l'identification de l'Arginine à la position 440 comme étant le dernier acide aminé identifiable sur la séquence de la RT\* (résultat obtenu au cours de deux séquençages sur les 3 réalisés). Si nous considérons l'Arginine comme étant potentiellement le dernier acide aminé de la RT\*, l'analyse par MALDI-TOF nous permet d'obtenir une couverture de 57 % de la séquence de la CP et de 53 % de la séquence totale de la RT\* (figure 14A). Nous remarquons que les peptides tryptiques (69-97, 177-188, 404-419) portant les 4 sites potentiels de N-glycosylation du CABYV sont détectés comme étant non modifiés ce qui suggère qu'aucun de ces sites ne porte de résidus glycosylés.

Cette étude a été complétée par une analyse en nano LC-MS/MS. Une couverture de 47 % pour la CP et de 42 % pour la RT\* respectivement a été obtenue (figure 14B). Une fois encore, les peptides tryptiques couvrant les sites potentiels de N-glycosylation sont détectés comme ne portant aucune modification. Une analyse supplémentaire de nano LC-MS a été réalisée en condition de forte énergie (50 V au lieu de 30 V) afin d'obtenir la fragmentation des chaînes glucidiques. Les ions spécifiques des hexoses, des N-acéthylhexosamines et de l'acide sialique ont été recherchés mais les spectres obtenus (figure 15) montrent qu'aucun ion correspondant à un de ces sucres n'est détecté sur les protéines CP ou RT\* du CABYV. Ces résultats sont en accord avec les analyses par MALDI-TOF et nano LC-MS/MS et suggèrent qu'aucun résidu glycosylé n'est présent sur les protéines de structure du CABYV.

Une étude similaire de spectrométrie de masse par MALDI-TOF a été réalisée sur les protéines de structure du TuYV. Les résultats obtenus, combinés sur la figure 16, montrent que 4 des 5 sites potentiels de N-glycosylation sur la séquence des protéines de structure du TuYV sont couverts par les peptides tryptiques lors de l'analyse par MALDI-TOF ou par nano LC-MS/MS. Seul un site (NRT) localisé dans la séquence de la CP (49-51) n'a pas pu être couvert par ces analyses de spectrométrie de masse ce qui laisse une incertitude quand à la présence d'un glycane à cette position. On remarque également que ces analyses de spectrométrie de masse suggèrent un site de coupure de

**A**

1	MNTVVGRRII	NGRRRPRRQT	RRAQRQPQVV	VVQTSRATQR	RPRRRRRGNN
51	<u>RT</u> GRTVPTRG	AGSSETFVFS	KDNLAGSSSG	AITFGPSLSD	CPAFSNGMLK
101	AYHEYKISMV	ILEFVSEASS	QNSGSIAYEL	DPHCKLNSLS	STINKFGITK
151	PGKRAFTASY	<u>INGTE</u> WHDVA	EDQFRILYKG	<u>NGSS</u> SIAGSF	RITIKCQFHN
201	PKYVDEEPPG	SPGPSPSPQP	TPQKKYRFIV	YTGVPVTRIM	AQSTDDAISL
251	YDMP SQRFY	<u>IEDENMN</u> WTN	LDSRWYSQNS	LKAIPMIIVP	VPQGEWTV EI
301	SMEGYQPTSS	TTDPNKDKQD	GLIAYNDDL S	EGWNVGIYNN	VEITNNKADN
351	TLKYGHPDME	LNGCHFNQGG	CLERDGD LTC	HIKTTGD <u>NAS</u>	FFVVGPAVQK
401	QSKYNYAVSY	GAWTDRMMEI	GMI AIAI <u>DE</u> Q	GSSGSVKTER	PKRVGHSM AV
451	STWETIKLPE	KGNSEGYETS	QRQDSKTPPT	ASGGSDTL DV	EEGGLPLPVE
501	EEIPDFVGDN	PWSDLSTKNS	QEE EAMSS ES	GLRPQLKPPG	LPKPQPIRTI
551	RNFDPTPDLV	EAWRPDVNPG	YSKADVAAT	IIAGGSIKDG	RSMIDKR NKA
601	VLDGRKSWG S	SLASSLTGGT	LKASAKSEKL	AKLTTSERAR	YERIKRQQGS
651	TRASEFLES L	LAGEDPDSRF			

**B**

1	MNTVVGRRII	NGRRRPRRQT	RRAQRQPQVV	VVQTSRATQR	RPRRRRRGNN
51	<u>RT</u> GRTVPTRG	AGSSETFVFS	KDNLAGSSSG	AITFGPSLSD	CPAFSNGMLK
101	AYHEYKISMV	ILEFVSEASS	QNSGSIAYEL	DPHCKLNSLS	STINKFGITK
151	PGKRAFTASY	<u>INGTE</u> WHDVA	EDQFRILYKG	<u>NGSS</u> SIAGSF	RITIKCQFHN
201	PKYVDEEPPG	SPGPSPSPQP	TPQKKYRFIV	YTGVPVTRIM	AQSTDDAISL
251	YDMP SQRFY	<u>IEDENMN</u> WTN	LDSRWYSQNS	LKAIPMIIVP	VPQGEWTV EI
301	SMEGYQPTSS	TTDPNKDKQD	GLIAYNDDL S	EGWNVGIYNN	VEITNNKADN
351	TLKYGHPDME	LNGCHFNQGG	CLERDGD LTC	HIKTTGD <u>NAS</u>	FFVVGPAVQK
401	QSKYNYAVSY	GAWTDRMMEI	GMI AIAI <u>DE</u> Q	GSSGSVKTER	PKRVGHSM AV
451	STWETIKLPE	KGNSEGYETS	QRQDSKTPPT	ASGGSDTL DV	EEGGLPLPVE
501	EEIPDFVGDN	PWSDLSTKNS	QEE EAMSS ES	GLRPQLKPPG	LPKPQPIRTI
551	RNFDPTPDLV	EAWRPDVNPG	YSKADVAAT	IIAGGSIKDG	RSMIDKR NKA
601	VLDGRKSWG S	SLASSLTGGT	LKASAKSEKL	AKLTTSERAR	YERIKRQQGS
651	TRASEFLES L	LAGEDPDSRF			

**Figure 16** : Couverture obtenue en spectrométrie de masse sur les protéines structurales du TuYV. Les protéines structurales du TuYV ont été extraites à partir d'un gel SDS-PAGE chargé avec une suspension de virus purifié. (A) En rouge, peptides tryptiques identifiés par MALDI-TOF. (B) En rouge, peptides tryptiques identifiés par nano-LC-MS/MS. Les sites potentiels de glycosylation sont soulignés. La séquence DE, très conservée chez les membres des *Luteoviridae* est entourée. Y grisé: position du codon stop de la CP.

la RT localisé en aval du motif « DE ». Dans le cas du TuYV, le dernier acide détectable sur la séquence de la RT\* est la Lysine en position 437 (résultat obtenu au cours de 3 séquençages sur les 3 réalisés).

## II - Analyse de la phosphorylation des protéines de structure des polérovirus

### A - Analyse *in silico*

Des études réalisées au laboratoire par Sylvaine Boissinot ont montré une interaction dans la levure, grâce au système du double hybride, entre la sous-unité régulatrice de la caséine kinase II (CK2) et les protéines de structure du CABYV (CP et RT\*). Cette interaction a également été observée avec les protéines correspondantes chez le TuYV. La CK2 est constituée d'un tétramère formé de deux sous-unités  $\alpha$  portant le domaine catalytique de la kinase, et de deux sous-unités  $\beta$  correspondant à l'activité régulatrice de cette enzyme. Contrairement à la majorité des autres kinases, les deux sous-unités  $\alpha$  sont actives même en absence des sous-unités régulatrices. L'association en tétramère peut avoir, en fonction du substrat, soit un effet positif, soit un effet négatif sur la phosphorylation [Filhol et Cochet, 2009].

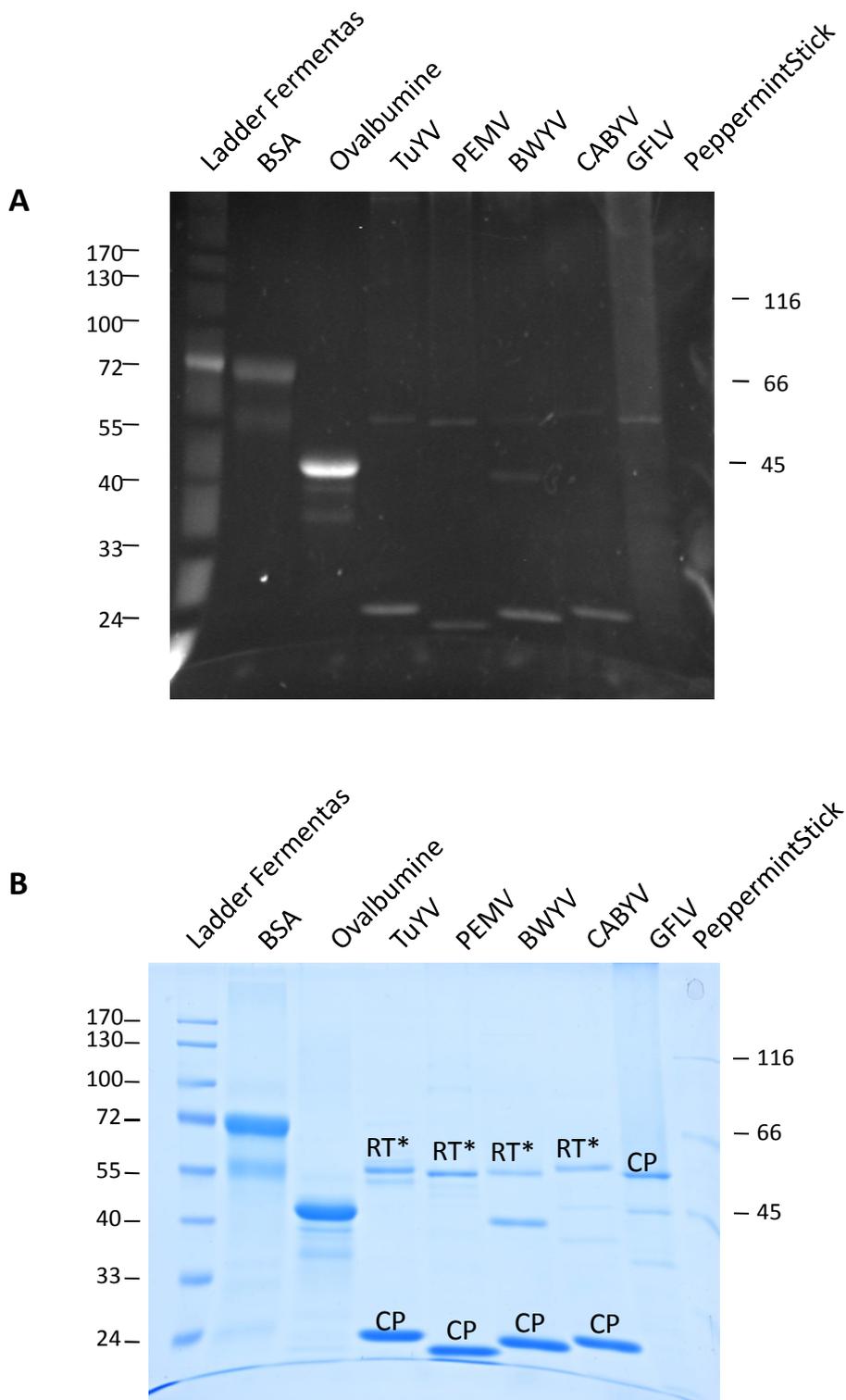
La CK2 est une protéine ubiquitaire pour laquelle plusieurs centaines de substrats sont décrits [Meggio et Pinna, 2003]. Ces substrats sont principalement impliqués dans la transduction du signal, dans le contrôle de la transcription, dans la prolifération cellulaire et dans différentes étapes du développement. Certains pathogènes tels que les virus animaux et certains phytovirus possèdent des protéines phosphorylées par cette kinase. C'est notamment le cas du *Potato virus A* (PVA, *Potyvirus*) dont la CP est phosphorylée par la CK2. Cette modification jouerait un rôle dans le mouvement du virus de cellule à cellule et aussi à longue distance [Ivanov, Puustinen *et al.*, 2003]. Un autre exemple de phosphorylation par la CK2 concerne la protéine de mouvement du *Tomato mosaic virus* (ToMV) [Matsushita, Ohshima *et al.*, 2003]. Dans ce dernier cas cependant, le rôle de la phosphorylation de la protéine de mouvement ne serait pas directement lié au mouvement du virus de cellule à cellule car la région phosphorylée peut être délétée sans affecter la dispersion du virus dans la plante [Watanabe, Ogawa *et al.*, 1992].

Sites potentiels de phosphorylation		
	Dans la CP	Dans la RT
BChV	1 (87)	10 (243, 249, 269, 310, 384, 451, 572, 586, 592, 634)
CABYV	2 (59, 84)	10 (280, 429, 451, 458, 471, 519, 548, 571, 585, 635)
CYDV	3 (64, 89, 171)	12 (253, 320, 394, 423, 435, 459, 472, 493, 495, 497, 499, 525)
MABYV	1 (84)	9 (278, 427, 451, 472, 480, 486, 545, 587, 631)
PEMV-1	1 (155)	2 (417, 490)
PLRV	2 (92, 174)	14 (212, 316, 332, 414, 419, 458, 487, 517, 548, 554, 572, 586, 592, 663)
TuYV	1 (87)	243, 249, 269, 310, 384, 451, 520, 572, 586, 592, 634)
GFLV	5 (123, 258, 299, 342, 380)	-

**Tableau 5 : Nombre et localisation des sites potentiels de phosphorylation par la caséine kinase 2 sur les protéines structurales des différents virus.** Entre parenthèses la position de la sérine ou thréonine potentiellement phosphorylée.

		Bleu de Coomassie	ProQ Diamond	Rapport
Témoin	négatif: BSA	32357	222	6,9
	positif: ovalbumine	33738	803	23,8
CP	GFLV	22299	94	4,2
	TuYV	44176	244	5,5
	PEMV	43672	98	2,2
	BWYV	40838	191	4,7
	CABYV	36044	161	4,5
RT*	TuYV	22375	68	3,0
	PEMV	23868	83	3,5
	BWYV	9800	20	2,0
	CABYV	13001	13	1,0

**Tableau 6 : Analyse de la phosphorylation des protéines de structure des différents virus avec le kit Pro-Q Diamond.** Quantification de l'intensité par mm<sup>2</sup> des bandes avec le logiciel Quantity One et détermination du rapport (intensité de la coloration au ProQ Diamond\*100/ intensité de la coloration au bleu de Coomassie).



**Figure 17 : Détection des résidus phosphorylés sur les protéines structurales de différents virus avec le kit Pro-Q Diamond.** De 3 à 16 µg de chacun des virus purifiés ont été déposés sur un gel SDS-PAGE à 10 % de polyacrylamide. **(A)** Le gel a été incubé avec le réactif Pro-Q Diamond qui permet de mettre en évidence les phosphoprotéines. **(B)** Coloration avec le bleu de Coomassie afin de vérifier la charge virale dans chacune des pistes. *CP* : Protéine majeure de capsid ; *RT \**: Protéine de readthrough. La taille en kDa des protéines du marqueur de poids moléculaire est indiquée.

L'existence d'une interaction entre la sous unité régulatrice de la kinase et les protéines virales pourrait potentiellement conduire à la phosphorylation des protéines de structure du CABYV et du TuYV dans le cas où la sous-unité catalytique de la kinase serait ultérieurement ajoutée au complexe. Afin d'évaluer cette possibilité, nous avons recherché la présence de résidus phosphorylés sur les protéines de structure du CABYV. Un certain nombre d'expériences a également été réalisé avec le TuYV.

La séquence consensus de phosphorylation par la CK2 est la suivante : S/T-X-X-D/E où « X » représente n'importe quel acide aminé excepté la proline. La phosphorylation par la CK2 consiste en l'ajout d'un groupement phosphate au niveau du groupement hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine. Les sites potentiels de phosphorylation ont été recherchés grâce au logiciel ScanProsite sur les séquences des protéines de structure de différents polérovirus (tableau 5). Alors que les sites de phosphorylation sont au nombre de un à trois sur la séquence de la CP, ils sont beaucoup plus nombreux sur la séquence du DRT puisqu'on en dénombre de neuf à quatorze.

### ***B - Détection des résidus phosphorylés sur les protéines de structure des polérovirus par approche biochimique***

La première approche pour détecter la présence de résidus phosphorylés sur les particules virales du CABYV a été l'utilisation du kit ProQ Diamond (Invitrogen). Ce kit, permet une détection spécifique des résidus phosphorylés grâce à un réactif fluorescent. Il a été testé sur les préparations virales purifiées de plusieurs virus appartenant à la famille des *Luteoviridae* : le *Pea enation mosaic virus* (PEMV, *Enamovirus*), le *Turnip yellows virus* (TuYV, *Polerovirus*), et le CABYV. Le *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) appartenant au genre *Nepovirus* dans la famille des *Comoviridae* a également été utilisé dans cette expérience.

Après séparation des protéines de structure de chacun des virus sur un gel SDS-PAGE, le gel a été incubé dans un bain contenant le colorant spécifique des phosphoprotéines. La figure 17A montre qu'un signal fluorescent est observé pour chacune des protéines structurales analysées. Afin d'évaluer la spécificité du signal obtenu avec les protéines virales, celui-ci a été comparé aux signaux émis par un témoin négatif (protéine BSA qui est non phosphorylée) et un témoin positif (ovalbumine qui est fortement phosphorylée). Le ratio entre la quantité de protéines déposées sur le gel (après coloration au bleu de Coomassie) et le signal obtenu après coloration au ProQ Diamond (tableau 6),

1 MNTVAARNQN AGRRRRRNQR PARRDRVVVV NPIGGPPRGR RQRRNRRRPN  
 51 RGGRRRRGSP GETFVFSKDN LTGSSTGSIT FGPSLSESPA FSSGILKAYH  
 101 EYKIIMVQLE FISEASSTSS GSISYELDPH CKLSSLQSTI NKFGITKSGL  
 151 RRWTAKQING MEWHDATEDQ FKILYKNGS SSVAGSFRIT IKCQVQNPKY  
 201 VDGSSPPPPS PSPTPPPPPP PQQPQPQCAQ RFWGYEGNPQ NKILTAENSR  
 251 NIDSRPLNFV QMYKWEDEKW DKVNLQAGYS RNDRRCMETY LTIPADKGGF  
 301 HVYLEADGEF VVKHIGDELD GSWLGNIAVD VSQRGWNVGN YKGCKITNYQ  
 351 SNTVAVAGHP DATMNGKSFDTARAVEVDWF ASFELECDDE EGSWAIYPPP  
 401 IQKDSSYNYT VSYGNYTEKY CEWGAISVSI DEDNNGNEPR RIPRRGVMW  
 451 STPEPSFSGD DSQRQDFNTP SLEERGSDAL ESEEKKEEDN LLDLEENIP  
 501 DVDDDDLWKG ISRASEAGTA EDDRASTSSR LRGNLKPKGL PKPQPTRIT  
 551 EFNPGPDLIE VWRPDLAPGY SKADVAAATV LAGGSVHEGR DMLERREAKV  
 601 MDSRKKWGIL SSTSSLTSGA LKKLSAQSEK LATLTTGERV QYQRLKNSMG  
 651 STVAAEYLEK VLADKTS

**Figure 18 : Couverture peptidique obtenue par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) sur les protéines structurales du CABYV.** Les protéines structurales du CABYV ont été extraites à partir d'un gel SDS-PAGE chargé avec une suspension de virus purifié. Les sites potentiels de phosphorylation sont soulignés. En rouge les peptides tryptiques détectés en spectrométrie de masse. Y grisé: position du codon stop de la CP.

1 MNTVVGRRII NGRRRPRRQT RRAQRQPQVV VVQTSRATQR RPRRRRRGNN  
 51 RTGRTVPTRG AGSSETFVFS KDNLAGSSSG AITFGPSLSD CPAFSNGMLK  
 101 AYHEYKISMV ILEFVSEASS QNSGSIAYEL DPHCKLNSLS STINKFGITK  
 151 PGKRAFTASY INGTEWHDVA EDQFRILYKG NGSSSIAGSF RITIKCQFHN  
 201 PKYVDEEPPG SPGPSPSPQP TPQKKYRFIV YTGVPVTRIM AQSTDDAISL  
 251 YDMPSQRFRY IEDENMNWTN LDSRWYSQNS LKAIPMIIV VPQGEWVEI  
 301 SMEGYQPTSS TTDPNKDKQD GLIAYNDDLSEGWNVGIYNN VEITNNKADN  
 351 TLKYGHDPME LNGCHFNQGG CLERDGD LTC HIKTTGDNAS FFVVGPAVQK  
 401 QSKYNYAVSY GAWTDRMMEI GMIAIALDEQ GSSGSVKTER PKRVGHSMVA  
 451 STWETIKLPE KGNSEGYETS QRQDSKTPPT ASGGSDTLDV EEGGLPLPVE  
 501 EEIPDFVGDN PWSDLSTKNS QEEEAMSSSES GLRPQLKPPG LPKPQPIRTI  
 551 RNFDPTPDV EAWRPDVNPG YSKADVAAAT IIAGGSIKDG RSMIDKRNKA  
 601 VLDGRKSWGSLASSLTGGT LKASAKSEKL AKLTTSERAR YERIKRQQGS  
 651 TRASEFLES LAGEDPDSRF

**Figure 19 : Couverture peptidique obtenue par spectrométrie de masse (MALDI-TOF) sur les protéines structurales du TuYV.** Les protéines structurales du TuYV ont été extraites à partir d'un gel SDS-PAGE chargé avec une suspension de virus purifié. Les sites potentiels de phosphorylation sont soulignés. En rouge les peptides tryptiques détectés en spectrométrie de masse. Y grisé: position du codon stop de la CP.

montre que les protéines structurales des virus analysés (PEMV, CABYV, TuYV, TuYV et GFLV), ne semblent pas porter de résidus phosphorylés puisque le ratio obtenu pour ces protéines virales est inférieur à celui du témoin négatif.

### ***C - Détection des résidus phosphorylés sur les protéines de structure des polérovirus par spectrométrie de masse***

Afin de compléter cette recherche des résidus phosphorylés sur les protéines de structure des polérovirus, une analyse par spectrométrie de masse a été réalisée en collaboration avec Jean-Marc Strub du Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique du CNRS de Strasbourg. Cette étude a été réalisée au départ pour rechercher les résidus glycosylés sur les protéines de structure des virus mais les résultats obtenus ont été analysés afin d'identifier la présence de potentiels résidus phosphorylés. Cette analyse a porté à la fois sur les protéines de structure du CABYV et du TuYV.

La figure 18 montre la couverture peptidique par spectrométrie de masse de la séquence des protéines de structure du CABYV. Nous remarquons que les peptides tryptiques portant les sites potentiels de phosphorylation du CABYV sont détectés comme étant non modifiés ce qui suggère qu'aucun de ces sites ne porte de résidus phosphorylés. Il faut cependant ajouter que les 8 sites potentiels de phosphorylation localisés dans la partie C-terminale du DRT, qui n'est pas présente dans les préparations de virus purifié, n'ont pu être analysés par cette approche.

Des résultats similaires (figure 19) ont été obtenus avec le TuYV puisque l'analyse par spectrométrie de masse permet de couvrir la totalité des sites potentiellement phosphorylés sur les protéines structurales de ce virus. Les six sites potentiels de phosphorylation localisés dans la partie C-terminale du DRT ne sont cependant pas couverts dans cette analyse.

Les résultats obtenus par spectrométrie de masse nous permettent de montrer que les virions du CABYV ou du TuYV ne portent aucun résidu phosphorylé. Par contre, il ne nous est pas possible de conclure quant-à la phosphorylation de la RT complète dans les plantes. Il semblerait donc que l'interaction observée dans la levure entre la sous-unité régulatrice de la CK2 et les protéines structurales des virus n'ait pas pour objet, dans la plante, de phosphoryler ces protéines. Nous pouvons envisager que cette interaction permettrait de détourner la sous unité régulatrice de la CK2 de sa voie fonc-

CKB1 1 -----GAACA AGATTGACA AAAGCTAAAA -ATAAAAT-- -----AAAA  
CKB2 1 CCCTGTTCTT TTATCTTTT CTATCTACA AAAAAAACC TCGAGCAAGAA CAAAAAATAA AAACTGTCCA TGTACCACAC CATGAGATTA GTTGTGAGAT  
CKB3 1 -----ATTTTTTA A-----AAAAT  
CKB4 1 -----ACAGGGAA AAGCAGAGCA CTCTTTATCT CTTCTTCTCT CTTTCTCTCA CTTCTGATGC

CKB1 37 GAA-GAAGCA AAACCCTAGA -GCTCAAGGT AATCGCCGTC GATTTCCTCA TCTCTCACCG GCGA--TTAC ATGCCGATGA AAGTTGTACA ATAGC-----  
CKB2 101 AGA-TATTCTG CGAGAGGAGA AGCTCCAATT AAAAAACCTA GAGCTCATC TCTCTCTCCA GGTG--CGGC CTTTTCTGTTT TTGCTTTTCA CCGCGTGGG  
CKB3 18 AAA--ATTAA AAAGAAGA-A AACCTAGAT T-TCTCCGTC TCTCTAATTT CTTTCTCTCT TCAAGCTTCT CAGAAAGTCT GACACTTTCG AGAATCTAAT  
CKB4 59 AAATATCGA AGAAAAACA AACCTAGAT T-TATCCGCC CCTCT----- TCTTCTCTG ATGA-----T AAGAAAGTGC AAGACTTT-G AGAATCTAAA

CKB1 127 --TGCTGTA GAGAGAGATT TA-----TCA GGTATTTTTA GAATCATGTA TAGAGACAGA GGAACGGTGA ATTCGAGACC TGAAGTTGTG GATCGTAAAC  
CKB2 197 TCTCCGGTGA CGGGAGAGATT CGGAATTTCC GAGAGATTTT AGATCATGTA TAGGGAGAGA GGTATGGTTG GATCGAAGTC GGAGGTGGTC GATCGGAAAC  
CKB3 114 CTCCAATTT CTTGTCTTTT T-----GG AGAAGGAATC GAATATGTA CAAGAACCTG AG--TGGAGG AGG----- TGGTGGTG GGTCTCGA-  
CKB4 147 GCTGAAAAAT TTTGTTTTTT TCAATTGAGG AAGTCAACTG CAAGGATCGG AG--TGGAGG AGGAATAATG GGTGGTGGTG GATCATCGA-

CKB1 221 GGATCAACGA CGCTCTTGA- -AC-GTCCTT CTCCTTCAAC CTCTCGTCAA GTTAAACGGG AAGGCCAAAG AACCGTTACG GCGGCGACGA CGACGGCGAA  
CKB2 297 GAATAAACGA GATTACAGAT AACAGGCCCTT CGCATTCGAT GTCTCAGCCT GTCAATGGAA AAGGCCAA-- -GGTAACAT CGACCTCCGT  
CKB3 194 -GATCAGAGA TCCTCGGTGG AGCTATTGAT CGGAAACGAA TCAACGATGC ACTCAATAAG AAAGTAGAGA A----- --ATCTTCAA CTTCCACCAC  
CKB4 243 -GATCGGAGA TCCTGGTGG AGCTATTGAT CGGAAACGAA TCAATGATGC TTTAGACAAA CATCTTAAGA A----- --ATCTTCAAC CTTCTAC---

CKB1 318 CTTGATTGGG AAGCAGCAGT CGAATAACAT CAACCATAGA GATTCTCGTT CTGCTTCTCT CTCGAAGAAC AATA----- -CGGTTTC TGATGATGAA  
CKB2 382 TTTGATGGGG AAGCAGCAAT TGCATGATA- -AGGAA TCTTCAAGTT CTGGTCTAT CTCTAAGACT AACATTT--- -CCGACGC TGTGGATGAA  
CKB3 283 ACATCTAAG GTTTTCTCTT CTAAGGACA- -AAGT CCTTTCCTT TCACATC--- TACTAAAAC CAGCTC--- -GGTGTGAA  
CKB4 328 ---ATCTAGG GTTTTCACTT CTAAGGACA- -AAGT TCTGTCCCTT CTACTTCAAC TGCTAAATC CAGCTTCATT CTCGTTCCCC CGATGTTGAA

CKB1 409 TCAGACACAG ATAGTGAAGA ATCAGATGTG AGTGGTCTG ATGGAGAGGA CACTTCATGG ATATCTTGGT TTTGTAATCT AAGAGGAAAC GAGTTCCTTT  
CKB2 470 TCAGACACAG ACAGCGAAGA ATCAGAGGTC AGTGGTCTG ATGGAGAGGA CACTTCGTTG ATATCTTGGT TCTGCAACCT TCGTGGGAAAC GAGTTCCTTT  
CKB3 362 TCGGAAACTG ATAGTGAAGG GTCTGATGTG AGTGGATCGG AGGGTATGTA TAGCTCTGGG ATCTCTTGGT TTTGTAATTT GAGAGGGAAT GATTTCCTTT  
CKB4 420 TCTGACACGG ATAGTGAAGG ATCAGATGTG AGTGGTCTG AAGGTATGTA TACTCTTGG ATCTCATGTT TTTGTAATTT GAGAGGGAAT GAGTTTTTCT

CKB1 509 GTGAAGTTGA TGATGATTAC ATTCAAGATG ACTTCAACTT GTGTGGACTC AGCAGTCTAG TTCCTACTA CGAGTACGCT CTTGATTGTA TTTTGGATGT  
CKB2 570 GTGAAGTTGA TGATGATTAC ATCCAGGATG ACTTTAACTT GTGTGGACTC AGCCATCAAG TTCCTACTA CGACTATGCC CTTGATTGTA TTTTGGATGT  
CKB3 462 GTGAAGTTGA TGAAGATTAT ATTCAAGATG ATTTCAATCT TTTGGTTTGA AGTGGTCAAG TCCCTACTA TGATTATGCA CTTGATCTCA TTTTAGATGT  
CKB4 520 GTGAAGTTGA TGAAGATTAT ATCAAGATG ATTTCAATCT CTGTGGTTTG AGTGGTCAAG TTCCTACTA TGATTATGCA CTTGATCTCA TTTTAGATGT

CKB1 609 TGAATCTTCT CAAGGAGAGA TGTTTACAGA GGAACAGAAT GAATTGATCG AGTCAGCAGC TGAGATGTTG TATGGACTGA TTCATGCTCG TTACATATTG  
CKB2 670 GGAGTCTTTC CATGGTGAAGA TGTTTACAGA GGAACAGAAT GAATTGATCG AGTCAGCAGC AGAGATGCTA TATGGAATGA TTCATGCTCG TTACATATTG  
CKB3 562 TGATGCTTCC AACAGTGAAGA TGTTTACTGA TGAACAGCAT GAAATGGTGG AATCAGCTGC TGAGATGCTA TATGGTCTTA TTCATGTTG TTACATTTG  
CKB4 620 TGAATCATCA AATGGTGATA TGTTTACTGA AGAACAGCAT GAGATGGTGG AATCAGCTGC TGAGATGTTA TATGGTCTTA TTCATGTTG TTATATTCTC

CKB1 709 ACTAGCAAAG GATTGGCAGC AATGTTAGAC AAATACAAAA ACTATGACTT TGGAAGATGT CCAAGAGTTT ATTGCTGTGG CCAACCTTGT CTTCCGGTTG  
CKB2 770 ACTAGCAAAG GGCTGGCTTC TATGTTAGAC AAATACAAAA ACTATGACTT TGGAAGATGT CCAAGAGTTT ATTGTTGGGG CCAACCTTGT TTACAGTTG  
CKB3 662 ACTACTAAAG GAATGCTCTG AATGACTGAG AAGTACAAGA ACTGTGATTT CCGGAGATGC CCGAGAGTTT TCTGTGGCGG TCAGTCTTGT TCTCCAGTTG  
CKB4 720 ACTACTAAAG GAATGCTCTG TATGATGGAG AAGTATAAGA ATTTATGATTT CCGGAGATGC CCCAGAGTTT TCTGTGGCGG ACAGTCTTGT CTTCCGGTTG

CKB1 809 GTCAATCAGA CTTACCGGA TCTAGCACTG TGAAGATATA TTGCCCGAAA TGCGAAGACA TTTATTACCC ACGATCAAAG TATCAAGGCA ACATTGATGG  
CKB2 870 GTCAATCAGA TATCCCTAGA GCAAGCACCG TAAAGATATA CTGCCCGAAA TGTGAAGATG TCTATTACCC ACGATCAAAG TATCAAGGCA ACATTGATGG  
CKB3 762 GACAATCCGA TATCCCGAGA TCGAGTACTG TGAAGATATA CTGCCCGAAA TGCGAAGACA TATCTTACCC GCGATCTAAA TTCAAGGCA ATATTGATGG  
CKB4 820 GCCAATCTGA TATCCCGAGG TCGAGCACTG TGAAGATATA CTGCCCGAAA TGCGAAGACA TTTACTACCC GCGATCTAAA TATCAAGGCA ---TTGATGG

CKB1 909 AGCTTACTTT GGGACAACGT TTCCACATCT GTTCTGATG ACTTATGGGC ATCTCAAGCC AGCGAAGGCA ACACAAAAC ATGTTCAAAG AGTGTGGGG  
CKB2 970 AGCTTACTTT GGGACAACGT TTCCACATCT GTTCTGATG ACGTACGGGC ATCTCAAGCC ACAAAAGGCA TCACAAAGCT ACCTCAAAG AGTGTGGGG  
CKB3 862 AGCGTACTTT GGAACCACAT TCCCTCACTT GTTCTGATG ACTTACGGGA ACTTAAAGCC GCAGAAGCCT ACTCAAAGCT ATGTCCCAA AATCTTTGGC  
CKB4 917 AGCTTACTTT GGAACCACAT TCCCTCACTT GTTCTCATG GCCTATGGGA ACATGAAACC GCAGAAGCC GCTCAAACCT ACGTCTCTAA GATCTTTGGC

CKB1 1009 TTCAAATTAC ACAACCGTG AAGGAAGT-T TGACGACAAA ACCCAAGGAT CAAGATCATG CCGTTG-GAA TGGAACTGAG AAAAGAA--- -GAGACG  
CKB2 1070 TTCAAAGTAC ACAAGCGGTG AAGGAAA--- -CAAGGAA GAAGAAATGC ACCCT----- TGGGTTTGA GAAACAA--- -GAAATG  
CKB3 962 TTCAAAGTAC ACAACCATG ATACTAGTGC TCTGCATTCT CAATGGTATG ACATTTAGTG GCTCTGTAAT TGATCCGGG TGACAACTG AAACGATAGC  
CKB4 1017 TTTAAGGTAC ACA--CA-A ACAATGATAC TCTCTCTCT CAACAGTCTT GTGGTTGAAT ACAATCTCGG TGG--CTAAA CCACCA-TTC TTCTGATGGT

CKB1 1100 TGTGTGAACA GAAACGGAAA ATAAAC--- GCACTGTAAT CACAC---G AATGGTGAAG AGAG-CATT ATGTCTCTAT TTGCTTCTAG GTACATACAC  
CKB2 1142 TGTGTGAACA AAACAAGAAA AAAAAGA--- CCATTTGAT CACAG---A A--GGTGAAG CTAG-T-TCC ATCTCTCTCT CTCTCTCTCT CTTTTCTTT  
CKB3 1062 TGGCGTACTG GAGCATACA TCAACCA--T TGGGTTAGAG GATGA--GA GCTGAAGTTG AAAGATGGAA TCTTGAAAGA ATCTCATGAA GTTCCAAGAA  
CKB4 1111 CACGG-GTTT GAAATGGATG ATACTAAACT GCGTTTGGAG GATGAGAAGA GCTAATGAAG AAAGTGCAG ACTTAAAGT TTTTACTAT GT-----A

CKB1 1192 ATTAGAAGAA AGC---AAA AGCATGGTTA GA---AAGAA AAAAAACAGC AAAAACTTTT AATGAGTTTG TTA---CTTGAACATG TATTTTTCTA  
CKB2 1231 GTTTTTGGTA T----- --TGTGTTTA GG---TTTAG ATAAAAATT AGCAGCATGG ACTG-GTAA CTGAA----- ATCCCATAT- TATTGTAATA  
CKB3 1157 AACTTAGAAG TGCAACAGCG TGGCTCATTG GGGGAAAAGA ACGACACT --TGGGCTT GTTGTGTCT CCGAAAAGAT TTTCCCGAGT TAGTTGGATT  
CKB4 1203 ATCTCAAAG TTC--TAAGT AGAATCTTCA AC---ATAGA ACCGTTCTT GATGGGCTT GGGAAATCT TTAC-----C TGTGAGTAAT CAATTAATC

CKB1 1280 CTTCTGTAA ACTTTTTTAT TTTGTTTCTT -TTCTCAGTG TCTGATTTAG TCATTTATCA TTTAAAAAAG TATCCATTAA AATTTATCAA AGATTTCAAT  
CKB2 1310 CTTTACTTTA TTGTTCTTTT TTGCTTTCTT CTCTCCACTA CCAAA--TAG TTATC-ACAA TTTCCCA--  
CKB3 1255 TTGTTTTGAA CTGTGGGATT ATTATTCTTT -TTTCTAATT TCATG--TAA AACTCATAAA TTTCAACTGA AGTATAACTT AGATCAATCA ATTTATCAA  
CKB4 1293 ATTTACCAGA TGGATGGATT TTGCTTTGCT -TAACTGTTG TC-TA--TAA TTGCTGAAAA TTTAGGTTG ATCTACTTA TCTTAAGTTT CTTGTTGTTG

CKB1 1379 TTTGGAAG  
CKB2 1374 -----  
CKB3 1352 AGATCAT  
CKB4 1389 ACGG----

**Figure 20** : Zones ciblées par le VIGS dans les séquences des sous-unités  $\beta$  de la CK2. Alignement des séquences nucléotidiques des gènes *CKB1*, *CKB2*, *CKB3* et *CKB4* d'*A. thaliana*. En rouge, la séquence introduite dans le TRV<sub>400</sub> et en bleu celle introduite dans le TRV<sub>172</sub>.

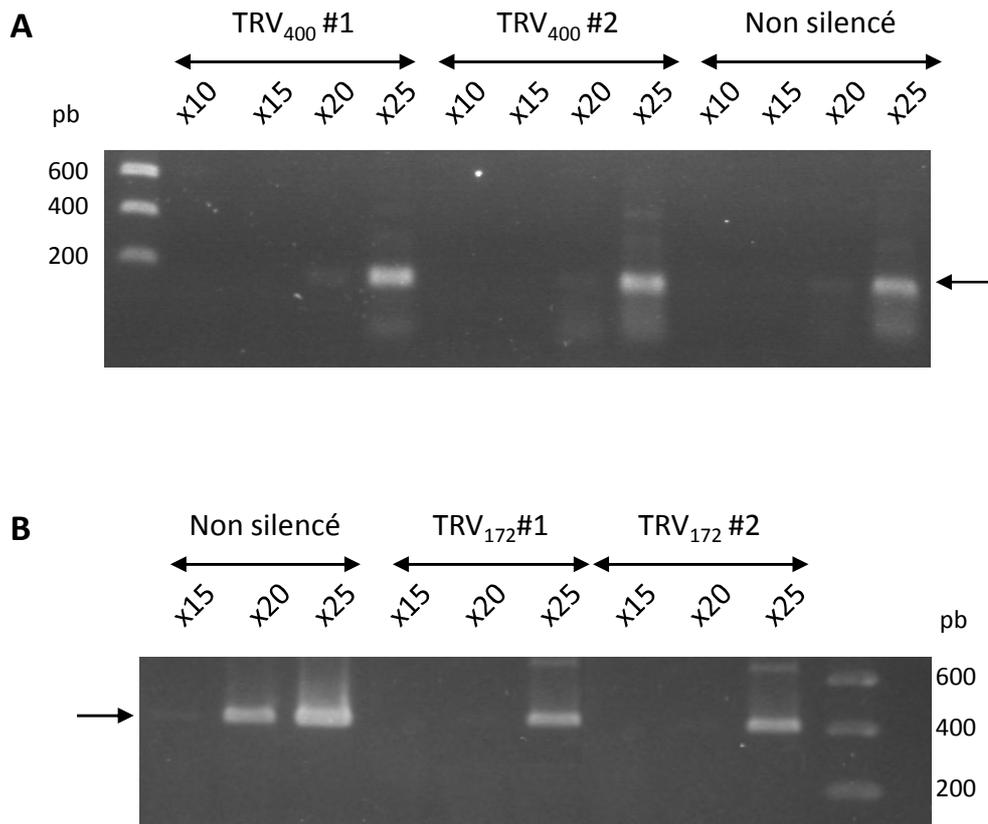
## 1) Evaluation de l'efficacité du VIGS

Afin d'évaluer l'efficacité de la technique du VIGS pour diminuer l'expression du gène codant pour la CKB2, nous avons procédé à une RT-PCR semi-quantitative sur les plantes inoculées avec les TRV recombinants 3 semaines après l'agroinoculation. La séquence de la CKB2 amplifiée par RT-PCR est localisée à l'extérieure de la séquence introduite dans le virus recombinant pour discriminer la séquence virale de l'ARNm de la CKB2.

Comme nous pouvons le voir sur la figure 21A, aucune différence d'accumulation de l'ARNm de la CKB2 n'est observée entre les plantes silencées avec le TRV<sub>400</sub> et les plantes non silencées. A l'inverse, nous observons une baisse de l'expression du gène CKB2 dans les plantes inoculées avec le TRV<sub>172</sub> (figure 21B). Alors qu'un signal correspondant à l'ARNm de la CKB2 est visible après 20 cycles d'amplification sur les ARN extraits des plantes silencées, le même signal est observé seulement après 10 cycles chez 4 des 5 plantes non silencées.

## 2) Accumulation virale dans les plantes silencées

Afin d'analyser l'effet du « silencing » du gène CKB2 sur l'accumulation du virus dans les plantes, nous avons inoculé les plantes, 10 jours après induction du « silencing », avec le CABYV ou le TuYV en utilisant des pucerons virulifères. Trois semaines après l'inoculation, l'accumulation des virus a été analysée par ELISA. Le tableau 7 ne montre aucune différence d'efficacité de transmission par puceron du TuYV ou du CABYV sur les plantes silencées (« silencing » induit avec le TRV<sub>172</sub>) ou non silencées (inoculées avec le TRV seul ou le TRV<sub>400</sub>). Ainsi, la réduction d'accumulation de l'ARNm de la CKB2 dans les plantes silencées ne semble pas avoir d'effet sur le taux d'inoculation du virus par les pucerons. De plus, aucune différence significative d'accumulation des virus dans les plantes silencées par rapport aux plantes non silencées n'est également visible pour chacun des virus testés. Ceci montre que la plus faible synthèse de l'ARNm de l'un des quatre gènes codant pour les sous-unités régulatrices de la CK2 dans les plantes silencées avec la construction TRV<sub>172</sub> n'influe pas sur l'accumulation des polérovirus dans les plantes. Ce résultat est facilement explicable par la redondance des gènes codant pour les deux sous-unités régulatrices de cette enzyme qui assurent probablement des fonctions similaires.



**Figure 21 : Inhibition de l'expression de l'ARNm de la CKB2 après induction du VIGS avec les constructions TRV<sub>400</sub> (A) et TRV<sub>172</sub> (B).** Une RT-PCR semi-quantitative a été réalisée à partir des ARN totaux extraits 3 semaines après l'agroinfection des plantes d'*A. thaliana* avec les différentes constructions. 10, 15, 20 et 25 cycles de PCR ont été réalisés à partir des ADNc. Un fragment de 172 pb de l'ARNm du gène *CKB2* a été amplifié dans les plantes silencées par la construction TRV<sub>400</sub> alors qu'un fragment de 400 pb du même ARNm a été amplifié après le silencing avec la construction TRV<sub>172</sub>. Les fragments PCR ont été analysés sur un gel d'agarose après coloration au BET.

	CABYV		TuYV	
	Taux d'infection	DO $\pm$ Ecart-type	Taux d'infection	DO $\pm$ Ecart-type
WT	10/10	1,63 $\pm$ 0,27	10/10	2,39 $\pm$ 0,49
WT + TRV	9/10	1,61 $\pm$ 0,65	10/10	2,48 $\pm$ 0,47
WT + TRV <sub>400</sub>	10/10	1,40 $\pm$ 0,35	9/10	2,09 $\pm$ 0,42
WT + TRV <sub>172</sub>	10/10	1,68 $\pm$ 0,35	9/10	2,48 $\pm$ 0,43

**Tableau 7 : Comportement du CABYV et du TuYV dans les plantes silencées avec la construction TRV<sub>172</sub>.** Dix jours après l'inoculation des plantes avec les constructions TRV<sub>172</sub>, TRV<sub>400</sub>, ou TRV non recombinant, 20 pucerons virulifères (porteurs du CABYV ou du TuYV) ont été déposés sur ces plantes qui ont été analysées par DAS-ELISA 3 semaines après. Le taux d'infection (nombre de plantes infectées / nombre de plantes inoculées avec des pucerons virulifères) ainsi que l'accumulation du virus sont présentés. *DO* : densité optique à 405 nm.

	CABYV		TuYV	
	Taux de transmission	DO $\pm$ Ecart-type	Taux de transmission	DO $\pm$ Ecart-type
WT	10/10	0,53 $\pm$ 0,10	10/10	0,76 $\pm$ 0,13
WT + TRV	9/10	0,47 $\pm$ 0,07	7/7	0,73 $\pm$ 0,13
WT + CKB <sub>400</sub>	10/11	0,52 $\pm$ 0,04	9/10	0,66 $\pm$ 0,15
WT + CKB <sub>172</sub>	9/9	0,52 $\pm$ 0,08	10/10	0,70 $\pm$ 0,17

**Tableau 8 : Transmission du CABYV et du TuYV à partir de plantes silencées avec la construction TRV<sub>172</sub>.** Les plantes inoculées avec les constructions TRV<sub>172</sub>, TRV<sub>400</sub>, ou TRV non recombinant et infectées avec le CABYV ou le TuYV ont servi de source virale pour l'acquisition du virus par les pucerons (AAP de 48h pour le CABYV et de 24h pour le TuYV). Les pucerons ont ensuite été transférés sur des plantes tests (*A. thaliana*) à raison de 10 pucerons/plante test pour le TuYV et 20 pucerons/plante test pour le CABYV. Les plantes tests ont été analysées par DAS-ELISA 3 semaines après. Le taux de transmission (nombre de plantes infectées / nombre de plantes inoculées avec des pucerons virulifères) ainsi que l'accumulation du virus dans les plantes tests sont présentés. *DO* : densité optique à 405 nm.

### 3) Analyse de la transmissibilité

Les plantes silencées ou non et infectées avec le TuYV ou le CABYV ont ensuite servi de source virale dans des expériences de transmission par puceron afin d'évaluer le rôle de la sous unité régulatrice de la CKB2 dans l'acquisition du virus par le vecteur. Après une période d'acquisition du virus de 24 h pour le TuYV ou de 48 h pour le CABYV, les pucerons ont été déposés sur des plantes tests qui ont été analysées 3 semaines plus tard par ELISA. Aucune différence dans l'efficacité de transmission des virus (taux de transmission variant entre 90 % et 100 %) ni dans l'accumulation des virus dans les plantes tests n'a été observée dans les différentes conditions (Tableau 8).

## III - Rôle de la P90 dans la transmission du CABYV par puceron

Dans les paragraphes I - D - 1) et I - D - 2) , nous avons montré qu'une protéine de plante, qui se retrouve de manière reproductible dans les suspensions virales purifiées du CABYV ainsi que du TuYV, porte des N-glycanes de type oligomannosidique ainsi que des glycanes complexes. L'effet de la déglycosylation sur la transmission du TuYV par puceron, que nous attribuons à un effet direct sur les virions, pourrait être dû à un effet indirect sur cette protéine glycosylée co-purifiant avec les particules virales. Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé des expériences préliminaires pour analyser la capacité de cette protéine de se lier aux virions et d'influencer leur transmissibilité par puceron.

Le séquençage partiel sur 77 acides aminés de la protéine de 90 kDa extraite de *Montia perfoliata* a révélé de fortes similarités avec une  $\alpha$ -glucosidase de *Solanum tuberosum* (77 %) et une  $\alpha$ -xylosidase d'*A. thaliana* (68 %) [Munsch, 2004], deux enzymes appartenant à la famille des glycosyl-hydrolases. Il a été montré que l'activité  $\alpha$ -glucosidase était deux à trois fois plus stimulée chez *M. perfoliata* infectée par le TuYV ou le CABYV alors que chez *A. thaliana*, c'est l'activité  $\beta$ -xylosidase qui est perturbée après infection par le TuYV [Munsch, 2004], bien que cet effet soit variable selon l'accession d'*A. thaliana* (stimulation ou répression de l'activité). Par similitude avec les protéines appartenant à la famille des glycosyl-hydrolases, cette enzyme aurait une localisation pariétale, bien que les résultats de localisation cellulaire de l' $\alpha$ -glucosidase suggèrent également une localisation cytoplasmique dans les cellules phloémiques de *M. perfoliata* [Munsch, 2004],

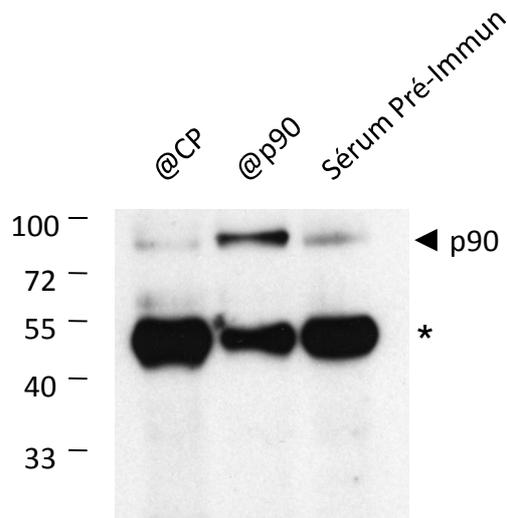
Les enzymes appartenant à la famille des glycosyl-hydrolases interviennent principalement dans le métabolisme des polysaccharides de la paroi cellulaire, mais aussi dans la maturation des N-glycanes [Minic, Jamet *et al.*, 2007]. L'application d'inhibiteurs de l' $\alpha$ -glucosidase sur des plants de *M. perfoliata* ne semble pas avoir d'effet sur l'accumulation du virus dans les plantes ainsi que sur la transmissibilité des virions par puceron. Seules les plantes tests inoculées à partir de virus acquis sur les plantes traitées développent des symptômes plus tardifs comparées aux plantes tests inoculées à partir des plantes témoins non traitées [Munsch, 2004].

Afin de compléter ces études, nous avons tenté d'analyser la capacité de la protéine P90 de se lier aux particules virales par différentes approches telles que l'immunoprécipitation et l'IC-RT-PCR. Nous avons également réalisé des expériences d'inhibition de la transmission en présence d'anticorps spécifiques de la P90 et enfin, nous avons étudié le comportement du CABYV dans un mutants d'insertion d'*A. thaliana* portant une mutation dans le gène codant pour une  $\beta$ -xylosidase.

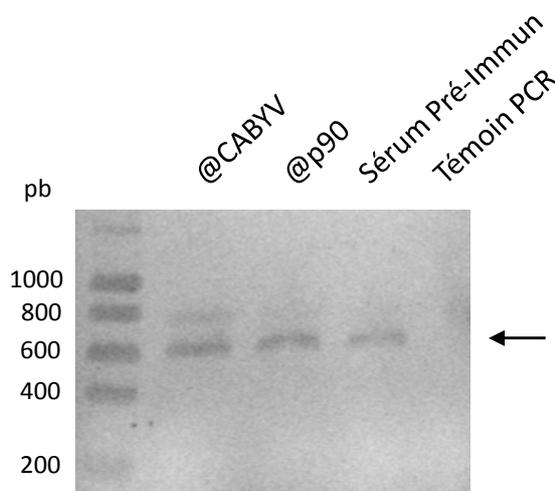
### ***A - Immunocapture des particules virales avec des anticorps dirigés contre la P90***

Afin de mettre en évidence une interaction potentielle entre la P90 et les particules virales du CABYV ou du TuYV, nous avons réalisé des expériences d'immunocapture des virions en utilisant des anticorps dirigés contre la P90. Les anticorps dirigés contre la P90 nous ont été fournis par O. Lemaire. Ils ont été obtenus après immunisation de lapin à partir de P90 extraite de gel SDS-PAGE. Pour tenter de mettre en évidence la présence de complexes entre la P90 et le TuYV, le mélange a été incubé en présence de protéine A sépharose et les particules virales potentiellement présentes dans les complexes ont été recherchées par western blot. Les expériences ont été répétées en incubant les virions avec des anticorps dirigés contre la CP du TuYV (témoin positif) ou des anticorps pré-immuns (témoin négatif). Comme le montre la figure 22, une réaction aspécifique en présence du sérum pré-immun ne nous permet pas de conclure quant à une interaction entre la P90 et les particules du TuYV. Malgré de nombreuses tentatives, nous n'avons pas réussi à éliminer cette réaction aspécifique.

Pour analyser l'interaction entre la P90 et les particules du CABYV, nous avons donc utilisé la technique de l'IC-RT-PCR qui a consisté à déposer dans des tubes les virions du CABYV après avoir réalisé un « coating » avec les anticorps anti-P90. La pré-



**Figure 22 : Recherche d'une interaction p90-TuYV par immunocapture des virions en présence d'anticorps dirigés contre la p90 suivi d'un Western-blot.** Les particules virales du TuYV ont été mises en présence d'anticorps anti-CP, anti-p90, ou en présence de sérum pré-immun avant d'être incubées avec la protéine A sépharose. Les complexes formés ont ensuite été dissociés sur un gel SDS-PAGE et les protéines transférées sur une membrane de nitrocellulose ont été incubées avec des anticorps anti-p90. \*: réaction due à l'interaction entre la chaîne lourde des IgG et l'anticorps secondaire. La taille en kDa des protéines du marqueur de poids moléculaire est indiquée.



**Figure 23 : Recherche d'une interaction p90-CABYV par immunocapture des virions en présence d'anticorps dirigés contre la p90 suivie d'une RT-PCR.** Des anticorps anti-CABYV, anti-p90 et du sérum pré-immun ont été mis en présence d'une suspension de CABYV purifié. Après plusieurs lavages, le génome du CABYV a ensuite été recherché par RT-PCR. Le fragment attendu de 601 pb (flèche) a été visualisé sur un gel d'agarose après coloration au BET.

sence du virus a ensuite été recherchée par RT-PCR. Les tubes ont parallèlement été recouverts avec un antisérum dirigé contre le virus (@CAVYV) ou un sérum pré-immun. Malheureusement, la présence d'une réaction aspécifique en présence du sérum pré-immun (figure 23) ne nous permet pas, encore une fois, de conclure quant à une interaction entre les particules du CABYV et la protéine P90.

Aucune de ces deux techniques en nous permet de conclure quant-à une interaction entre la P90 et les deux virus étudiés.

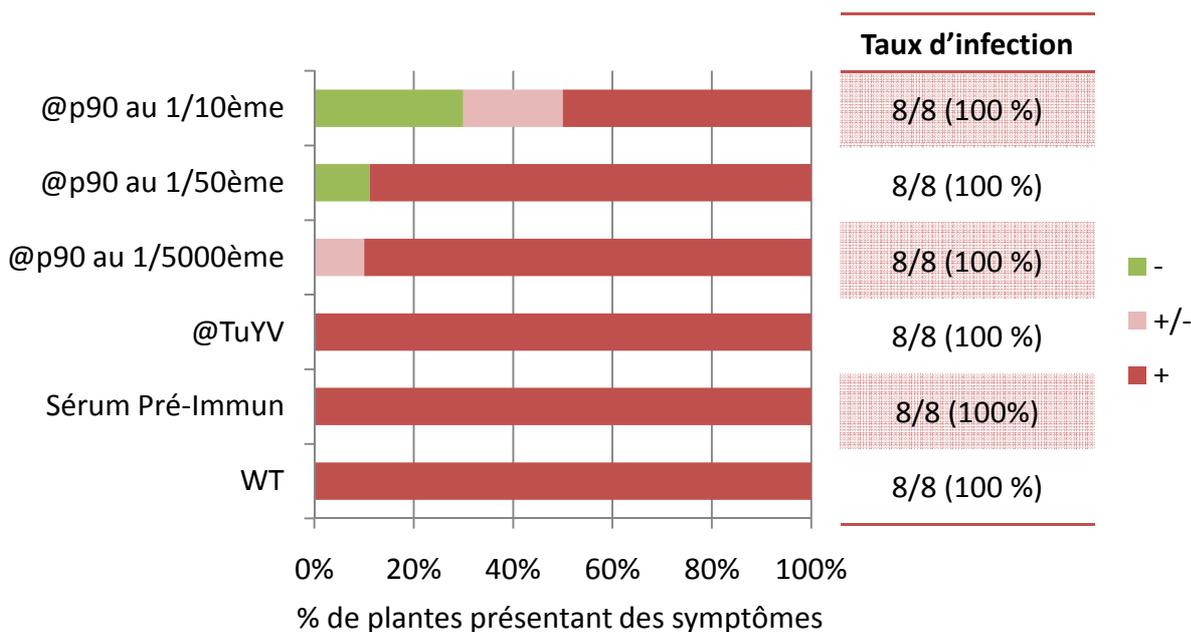
### ***B - Effet de l'incubation des virus avec les anticorps anti-P90 sur la transmission du virus par puceron***

Afin d'appréhender le rôle de la P90 dans la transmission des virus par puceron, nous avons réalisé des expériences de transmission du CABYV ou du TuYV mis en présence d'anticorps anti-P90 en utilisant *A. thaliana* comme plante test. Ces mélanges ont été soumis aux pucerons pendant 24 h (TuYV) à 48 h (CABYV) puis les pucerons ont été transférés sur des plantes tests qui ont été analysées trois semaines plus tard par ELISA. Les résultats de transmission obtenus au cours de deux expériences et rassemblés dans le tableau 9 pour le CABYV et la figure 24 pour le TuYV ne permettent pas de conclure quant à l'implication de la P90 dans le processus de vection puisqu'aucune diminution significative dans l'efficacité de transmission des virus n'est obtenue après incubation des virus avec les anticorps dirigés contre la P90. La seule différence est observée au niveau des symptômes des plantes tests inoculées avec le TuYV (figure 24) : alors que toutes les plantes inoculées avec des pucerons ayant acquis le virus seul développent des symptômes de rougissement trois semaines après inoculation, seules 50 % au maximum des plantes inoculées avec le virus préalablement incubé avec les anticorps anti-P90 au 1/10<sup>ème</sup> extériorisent des symptômes à cette date.

Cette absence de symptôme n'est pas corrélée avec une plus faible accumulation du virus dans les plantes puisque toutes les plantes, avec ou sans symptôme, se sont révélées positives en ELISA (figure 25). Il faut rappeler que les plantes infectées avec le CABYV n'extériorisent pas de symptômes, ou seulement des symptômes très tardifs sur les plantes infectées. Une telle observation n'a donc pas pu être réalisée sur les plantes tests infectées par ce virus. Le retard d'apparition des symptômes sur les plantes infectées avec le TuYV pourrait provenir d'une charge plus faible de virus délivrée au moment de l'inoculation par le puceron après incubation du virus avec les anticorps dirigés

	Taux d'infection
@p90 au 1/50 <sup>ème</sup>	3/8 (37 %)
@p90 au 1/100 <sup>ème</sup>	7/16 (44 %)
@p90 au 1/200 <sup>ème</sup>	3/8 (37 %)
@p90 au 1/500 <sup>ème</sup>	6/16 (38 %)
@p90 au 1/1000 <sup>ème</sup>	4/8 (50 %)
@CABYV	0/8 (0 %)
Sérum Pré-Immun	4/8 (50 %)
Virus seul	7/14 (66 %)

**Tableau 9 : Effet de l'ajout d'anticorps anti-p90 au CABYV purifié sur la transmission par puceron.** Les pucerons ont été nourris pendant 48h sur une suspension de CABYV purifié (80 ng/μl) mélangée à différentes dilutions des anticorps anti-p90 ou mis en présence du sérum anti-CABYV ou du sérum pré-immun. 20 pucerons ont ensuite été transférés par plant test (*M. perfoliata*) qui ont été analysées 3 semaines plus tard par DAS-ELISA. Le taux d'infection représente le nombre de plantes tests infectées / nombre de plantes inoculées par puceron. Entre parenthèses, le pourcentage de plantes infectées.



**Figure 24 : Effet de l'ajout d'anticorps anti-p90 au TuYV purifié sur la transmission par puceron et l'expression des symptômes sur les plantes tests.** Les pucerons ont été nourris pendant 24h sur une suspension de TuYV purifié (50 ng/μl) mélangée à différentes dilutions des anticorps anti-p90 ou mis en présence du sérum TuYV ou du sérum pré-immun. *WT* : sans anticorps. 10 pucerons ont ensuite été transférés par plant test (*M. perfoliata*) qui ont été analysées 3 semaines plus tard par DAS-ELISA. Le taux d'infection représente le nombre de plantes tests infectées / nombre de plantes inoculées par puceron. Entre parenthèses, le pourcentage de plantes infectées.

Le graphe représente l'expression des symptômes sur les plantes tests 3 semaines après inoculation du virus. - : aucun symptôme; +/- : symptômes sur une à deux feuilles; + : symptômes très prononcés sur pratiquement toutes les feuilles.

contre la P90. Cette hypothèse nécessiterait cependant une interaction spécifique entre les virions et la protéine, interaction que nous n'avons pour l'instant pas pu confirmer. Il est intéressant de noter qu'un tel phénomène de retard d'apparition des symptômes avait également été observé sur les plantes tests lors d'expériences de transmission par puceron lorsque les plantes sources avaient été traitées avec un inhibiteur de l' $\alpha$ -glucosidase [Munsch, 2004].

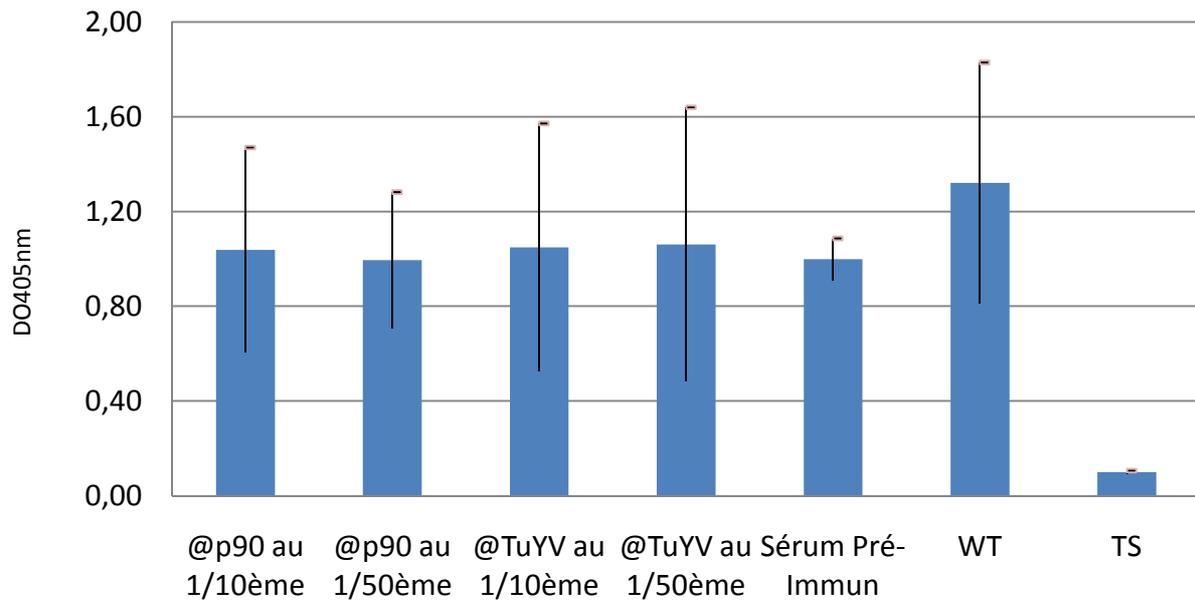
### ***C - Analyse du comportement du CABYV et du TuYV dans le mutant d'insertion de la $\beta$ -xylosidase 1 (mutant Bxl1)***

#### **1) Caractérisation du mutant Bxl1**

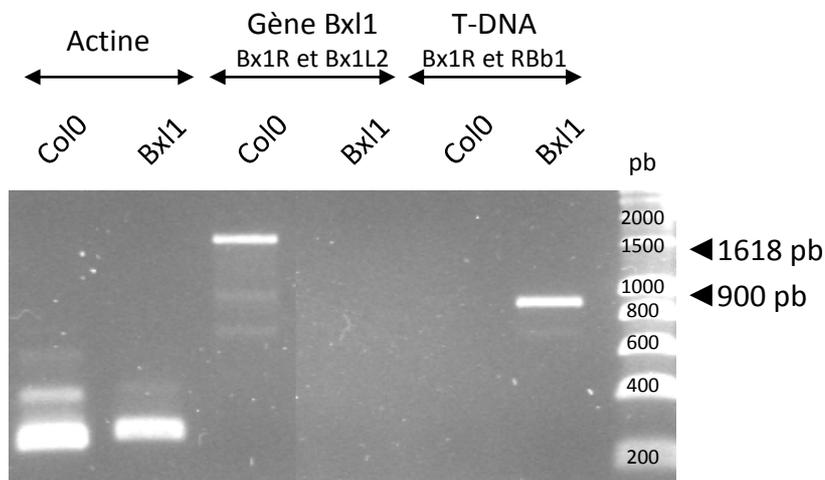
Le rôle potentiel de la  $\beta$ -xylosidase dans le cycle viral a été appréhendé en utilisant un mutant d'insertion disponible dans les banques d'Arabidopsis et qui vise la  $\beta$ -xylosidase 1 parmi les sept que l'on recense chez Arabidopsis. Le mutant sur lequel nous avons travaillé est issu d'une autofécondation d'un mutant SALK du gène Bxl1. Après avoir extrait l'ADN génomique sur des plants d'Arabidopsis du mutant Bxl1, différents couples d'amorces ont été utilisés pour mettre en évidence l'insertion du T-DNA qui se situe principalement dans un exon mais qui chevauche également le premier intron. Comme on peut le voir sur la figure 26, en utilisant des amorces s'hybridant de part et d'autre du T-DNA, nous obtenons une amplification d'une partie du gène de la  $\beta$ -xylosidase 1 chez Col0 alors qu'aucune bande n'est observée chez le mutant. A l'inverse, en utilisant des amorces qui s'hybrident d'une part sur le gène et d'autre part sur le T-DNA, seul un fragment est amplifié chez le mutant Bxl1 ce qui nous montre que ce mutant homozygote possède bien une insertion du T-DNA dans le gène attendu.

#### **2) Accumulation du CABYV et du TuYV dans le mutant Bxl1 et transmissibilité par puceron à partir des plantes infectées**

Nous avons ensuite suivi l'accumulation du TuYV et du CABYV par ELISA dans les mutants Bxl1 après inoculation par des pucerons virulifères. Nous n'avons constaté aucune différence significative dans le taux d'infection des plantes par les deux virus, ni dans l'accumulation virale dans les plantes (tableau 10). Lorsque ces plantes infectées (Col0 ou Bxl1) ont été utilisées comme source virale dans les expériences de transmission par puceron, nous n'avons pas observé de différence d'efficacité de transmission du TuYV, celui-ci étant transmis à 100 % à partir des Col0 ou des Bxl1 (tableau 11). Le CA-



**Figure 25 :** Accumulation du TuYV dans les plantes tests de *M. perfoliata* inoculées avec les pucerons ayant acquis le virus en présence d'anticorps anti-p90. Les pucerons ont été nourris pendant 24h sur une suspension de TuYV purifié (50 ng/ $\mu$ l) mélangée à différentes dilutions des anticorps anti-p90 ou différentes dilutions du sérum TuYV ou encore en présence du sérum pré-immun. *WT* : sans anticorps. 10 pucerons ont ensuite été transférés par plante test (*M. perfoliata*) qui ont été analysées 3 semaines plus tard par DAS-ELISA. DO des plantes tests à 405nm. *TS* : plante non inoculée.



**Figure 26 :** Caractérisation génomique du mutant d'*A. thaliana* Bxl1. L'extraction d'ADN des plantes Col0 d'*A. thaliana* ou du mutant Bxl1 a été réalisée selon la méthode d'extraction de l'ADN au CTAB. Afin de caractériser l'insertion de l'ADN de transfert (T-DNA) au niveau du gène Bxl1, nous avons conçu des oligonucléotides qui s'hybrident, dans le gène Bxl1, de part et d'autre du site potentiel d'insertion du T-DNA: Bx1R et Bx1L2. Nous avons aussi utilisé des oligonucléotides s'hybridant d'une part sur la séquence du T-DNA (RBb1) et sur le gène Bxl1 (Bx1R). Les fragments PCR attendus de 1618 pb (couple Bx1R et Bx1L2) et d'environ 900 pb (couple Bx1R et RBb1) PCR ont été séparés sur un gel d'agarose coloré au BET.

BYV semble avoir un comportement différent puisque nous avons constaté une plus faible efficacité de transmission du CABYV à partir des plantes mutantes Bxl1 (50 % de transmission) comparé aux plantes Col0 infectées (100 % de transmission) (tableau 11). De plus, l'accumulation du virus dans les plantes tests est plus faible lorsque les pucerons ont acquis le CABYV à partir des mutants Bxl1 qu'à partir des plantes Col0 infectées (tableau 11).

Cet effet potentiel de la protéine P90 sur la transmissibilité du CABYV par puceron a ensuite été évalué en nourrissant les pucerons sur une suspension virale purifiée enrichie en protéine P90. Pour ce faire, les fractions hautes d'un gradient de saccharose chargé avec une purification du TuYV à partir de plants de *M. perfoliata* infectés et supposées contenir la protéine P90 ont été récoltées. La protéine présente dans les fractions a ensuite été concentrée à l'aide de centricones, visualisée par western blot (figure 27) et quantifiée par un dosage par Bradford. Les différentes fractions contenant la protéine ont ensuite été mélangées au virus dans le milieu nutritionnel pour les pucerons. Les expériences de transmission ont été réalisées avec *A. gossypii* qui n'est pas vecteur du TuYV et permet donc de s'affranchir d'une contamination potentielle des préparations de P90 par des particules virales du TuYV. Nous nous sommes volontairement placés dans des conditions limitantes pour la transmission du CABYV en utilisant une solution virale à 50 ng/ $\mu$ l. Pour information, une efficacité de transmission du CABYV de 80 à 100% est obtenue en utilisant une concentration virale de 100 ng/ $\mu$ l.

Les résultats du test de transmission (figure 28) ne montrent qu'une augmentation très légère du taux de transmissibilité du CABYV en présence de certaines fractions contenant la P90. Cette différence est cependant trop faible pour conclure définitivement à un rôle de la P90 dans la transmission du CABYV par puceron. Ces résultats méritaient d'être reproduits mais afin de travailler avec des suspensions plus homogènes de P90, il faudrait envisager l'expression de la protéine dans un système hétérologue.

	CABYV		TuYV	
	Taux d'infection <sup>a</sup>	DO ± Ecart-type <sup>b</sup>	Taux d'infection	DO ± Ecart-type
Col0	12/12 (100 %)	1,21 ± 0,33	12/12 (100 %)	1,98 ± 0,21
Bxl1	14/14 (100 %)	1,83 ± 0,74	12/12 (100 %)	2,05 ± 0,35

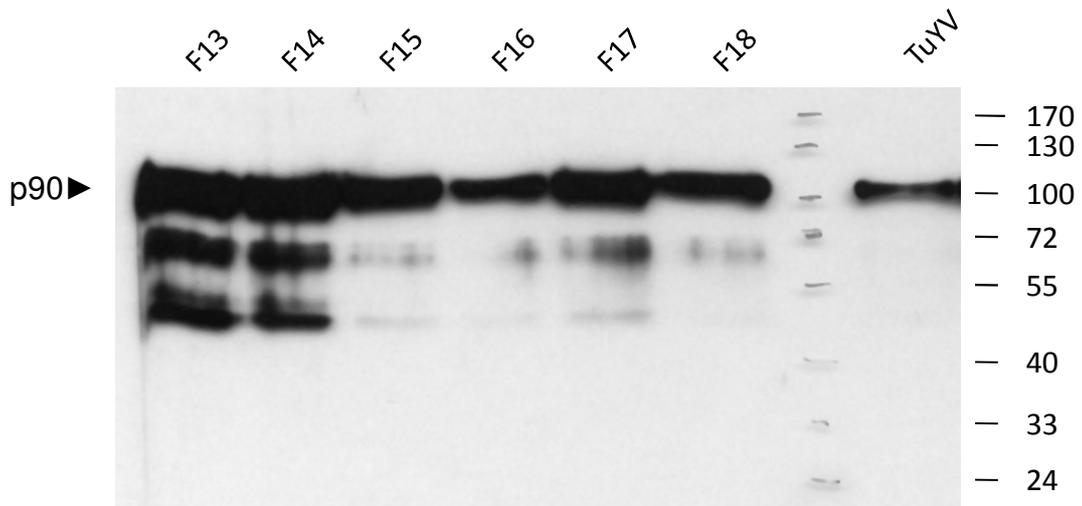
**Tableau 10 : Comportement du CABYV et du TuYV dans les mutants d'*A. thaliana* Bxl1.**

Les mutants d'*A. thaliana* Bxl1 ainsi que les témoins Col0 ont été inoculés à raison de 10 à 15 par pucerons virulifères/plante. Les plantes inoculées par puceron ont été analysées 3 semaines plus tard par DAS-ELISA. <sup>a</sup>Le taux d'infection représente le nombre de plantes infectées/nombre de plantes inoculées par puceron. Entre parenthèses, le pourcentage de plantes infectées. <sup>b</sup>Accumulation du virus dans les plantes. *DO* : densité optique à 405 nm.

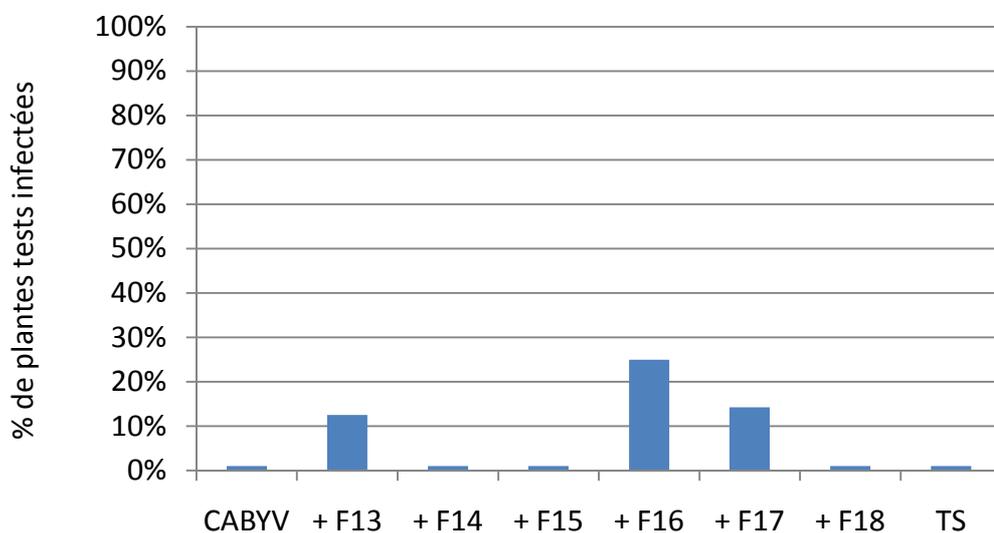
	CABYV		TuYV	
	Taux de transmission <sup>a</sup>	DO ± Ecart-type <sup>b</sup>	Taux de transmission	DO ± Ecart-type
Col0	10/10 (100 %)	1,02 ± 0,42	10/10 (100 %)	1,68 ± 0,15
Bxl1	5/10 (50 %)	0,5 ± 0,12	10/10 (100 %)	1,59 ± 0,26

**Tableau 11 : Transmission du CABYV et du TuYV à partir des mutants d'*A. thaliana***

**Bxl1 infectés.** Après une acquisition de 48 h sur les plantes infectées par le CABYV ou de 24h sur les plantes infectées par le TuYV, 10 (pour le TuYV) ou 20 (pour le CABYV) pucerons ont été déposés sur les plantes tests (*A. thaliana*). Ces plantes tests ont été analysées 3 semaines plus tard par DAS-ELISA. <sup>a</sup> Le taux de transmission représente le nombre de plantes tests infectées/nombre de plantes inoculées par puceron. Entre parenthèses, le pourcentage de plantes infectées. <sup>b</sup>Accumulation du virus dans les plantes tests. *DO* : densité optique à 405 nm.



**Figure 27 : Obtention de protéines p90 à partir d'un gradient de saccharose.** Les fractions récupérées à partir du gradient de saccharose (dernière étape de la purification du TuYV) ont été déposées sur des colonnes centricon (Millipore) afin d'obtenir des suspensions de la protéine p90 concentrée. 15  $\mu$ l de chacune des fractions concentrées ont ensuite été séparés sur un gel SDS-PAGE puis la protéine p90 a été recherchée par Western blot en utilisant les anticorps spécifiques. La position de la p90 est indiquée à gauche. La taille en kDa des protéines du marqueur de poids moléculaire est indiquée. Un extrait d'une précédente purification de TuYV a été déposée pour servir de témoin.



**Figure 28 : Effet sur la transmission par puceron de l'ajout de la protéine p90 à des purifications virales de CABYV.** Environ 20  $\mu$ g de protéines p90 contenus dans les fractions F13 à F18 ont été ajoutés au virus purifié (50 ng/ $\mu$ l). Les pucerons (*A. gossypii*) ont acquis ce mélange pendant 48h avant d'être déposés sur les plantes tests (20 pucerons/plante) qui ont été analysées 3 semaines plus tard par DAS-ELISA. Le graphe représente le nombre de plantes tests positives en ELISA/nombre de plantes inoculées par puceron.



## **IV - Recherche de partenaires phloémiens du CABYV : rôle des lectines dans le cycle viral et la transmission par puceron**

Les polérovirus, tel que le CABYV, sont strictement confinés aux cellules du phloème et sont acquis par le puceron à partir du pool de particules virales s'accumulant dans les tubes criblés. Ainsi, il a été avancé l'hypothèse que toute protéine de l'hôte capable de se lier dans les tubes criblés aux particules virales des polérovirus serait acquise en même temps que les virions et pourrait donc jouer un rôle dans la transmission du virus par puceron. De la même manière, étant donné que les virions sont supposés être les entités virales se déplaçant à longue distance dans les tubes criblés, ces protéines de l'hôte pourraient également assister le virus pour son passage des tubes criblés vers les cellules compagnes ou vers les cellules du parenchyme phloémien. Des expériences antérieures réalisées au laboratoire pour rechercher les protéines présentes dans la sève des cucurbitacées capables de fixer les particules du CABYV *in vitro* (technique du far-western blot) ont montré la capacité de plus d'une vingtaine de protéines de se lier aux particules du CABYV parmi lesquelles seules huit ont pu être identifiées par spectrométrie de masse. Ces protéines sont principalement des protéines de défense de la plante. On trouve notamment les deux lectines majoritaires dans la sève des cucurbitacées, la CsLec17 et la CsLec26 appartenant à la famille des Phloem Protein 2 (PP2). Les travaux de l'équipe se sont principalement focalisés sur ces deux protéines car elles sont connues pour être mobiles dans les tubes criblés [Golecki, Schulz *et al.*, 1999], particularité qui peut être intéressante pour le mouvement du virus dans la plante mais aussi pour la transmission par puceron. On peut en effet supposer que le puceron ingère plutôt des particules libres dans les tubes criblés (donc potentiellement liées à des protéines qui elles aussi sont libres dans la sève) plutôt que des virions adsorbés le long de la membrane de ces cellules. De plus, il a été montré que ces lectines phloémiennes sont capables de se lier à différents ARN viraux et viroïdaux [Gómez et Pallás, 2001; Owens, Blackburn *et al.*, 2001] permettant potentiellement d'assurer leur déplacement dans les tubes criblés. Une fois encore, cette faculté pourrait intervenir dans le mouvement du virus, sous une forme ribonucléoprotéique, dans la plante. Nous nous sommes également intéressés à ces protéines car l'hypothèse primaire de ce travail de thèse était que les virions des

		Taux d'infection	DO ± EC
Col0		16/16 (100 %)	0,84 ± 0,05
F11-1-2	5 puc/pl	10/10 (100 %)	0,92 ± 0,07
	10 puc/pl	10/10 (100 %)	0,92 ± 0,04
F11-7-4	5 puc/pl	10/10 (100 %)	0,87 ± 0,07
	10 puc/pl	10/10 (100 %)	0,84 ± 0,08

**Tableau 12 : Comportement du TuYV dans les mutants d'*A. thaliana* affectés dans l'expression de la At-PP2-A1.** Après une acquisition du TuYV à partir de virus purifié pendant 24 h, 5 à 10 pucerons ont été transférés sur les mutants d'*A. thaliana* (F11-1-2 et F11-7-4) qui ont été analysés 3 semaines plus tard par DAS-ELISA. Le taux d'infection représente le nombre de plantes infectées/nombre de plantes inoculées par puceron. Entre parenthèses, le pourcentage de plantes infectées. *DO* : densité optique à 405 nm. *EC*: Ecart type.

		Taux de transmission	DO ± EC
Col0		6/6 (100 %)	1,28 ± 0,14
F11-1-2	5 puc/pl	6/6 (100 %)	1,63 ± 0,09
	10 puc/pl	6/6 (100 %)	1,56 ± 0,46
F11-7-4	5 puc/pl	8/8 (100 %)	1,52 ± 0,36
	10 puc/pl	4/4 (100 %)	1,28 ± 0,37

**Tableau 13 : Taux de transmission du TuYV à partir des mutants d'*A. thaliana* affectés dans l'expression de la At-PP2-A1 et infectés par le virus.** Les pucerons ont acquis le TuYV pendant 24h sur les plantes mutantes infectées (F11-1-2 ou F11-7-4). 5 à 10 pucerons ont ensuite été transférés sur les plantes tests (*A. thaliana*) qui ont été analysées 3 semaines plus tard par DAS-ELISA. Le taux de transmission représente le nombre de plantes tests infectées/nombre de plantes inoculées par puceron. Entre parenthèses, le pourcentage de plantes infectées. *DO* : densité optique à 405 nm ; *EC* : écart-type

polérovirus étaient glycosylés ce qui aurait pu expliquer leur capacité de se lier à ces lectines.

Les travaux de la validation fonctionnelle de cette interaction entre particules du CABYV et lectines phloémiennes observée *in vitro* n'ont pas été conduits chez le concombre mais chez *A. thaliana* en utilisant les protéines orthologues à savoir l'At-PP2-A1 pour la CsLec26 et l'At-PP2-A2 pour la CsLec17. Des expériences de transmission par puceron en présence de ces deux protéines purifiées ont montré la capacité de ces protéines à stimuler la transmission du CABYV et du TuYV par puceron [Bencharki, 2010].

Mon travail a donc consisté à poursuivre l'analyse fonctionnelle de ces lectines en étudiant le comportement des polérovirus dans des mutants d'*A. thaliana* mutés dans l'expression du gène de l'At-PP2-A1. J'ai également mené plusieurs expériences destinées à comprendre le mécanisme permettant à ces protéines de stimuler la transmission des polérovirus par puceron.

### ***A - Etude du comportement des polérovirus dans des mutants d'*A. thaliana* affectés dans l'expression du gène de l'At-PP2-A1***

Afin d'analyser l'effet que pourrait avoir une réduction de la synthèse de l'At-PP2-A1 sur le cycle viral des polérovirus, nous avons suivi l'accumulation du TuYV et du CABYV dans des lignées mutantes obtenues par ARN interférence d'*A. thaliana* où l'accumulation des transcrits codant pour la protéine At-PP2-A1 est réduite de 50 à 80 % par rapport à la lignée sauvage Col0 d'*A. thaliana* [Beneteau ], 2009]. Ces lignées ont été obtenues dans l'équipe de Sylvie Dinant (INRA Versailles) après introduction dans *A. thaliana* d'une structure en tige boucle correspondant au gène de l'At-PP2-A1. Ces lignées présentent des phénotypes altérés avec un plus faible pourcentage de germination, des cotylédons sur- ou sous-numéraires, un motif vasculaire des cotylédons anormal et une altération au niveau des feuilles.

#### **1) Accumulation des virus dans les mutants d'*A. thaliana***

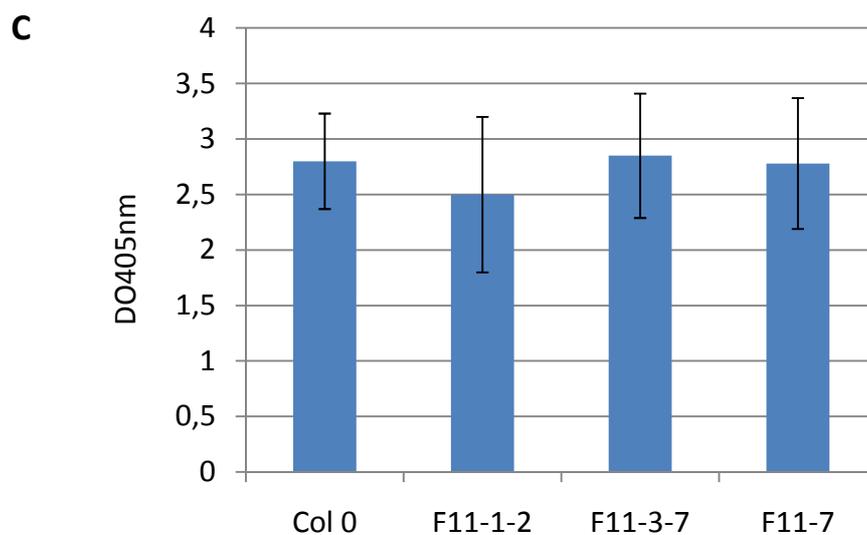
Plusieurs lignées de plantes, présentant toutes une plus faible expression de la protéine At-PP2-A1, ont été inoculées par puceron avec les virus. Alors que les deux lignées testées vis-à-vis du TuYV sont infectées avec un taux identique à celui des plantes Col0 (tableau 12), nous avons observé, pour le CABYV (figure 29A) des taux d'infection différents entre les lignées mutantes. En effet, alors que le taux d'infection des mutants

**A**

	Taux d'infection <sup>a</sup>	DO ± EC <sup>b</sup>
Col0	38/72 (53 %)	0,93 ± 0,31
F11-1-2	11/38 (29 %)	0,51 ± 0,11
F11-7	17/36 (47 %)	0,96 ± 0,35
F11-7-4	12/36 (33 %)	-
F11-3-7	19/34 (55 %)	0,77 ± 0,27

**B**

Taux de transmission	
Col 0	17/17 (100 %)
F11-1-2	10/15 (66 %)
F11-3-7	3/6 (50 %)
F11-7	9/18 (50 %)



**Figure 29 : Comportement du CABYV dans les mutants d'*A. thaliana* affectés dans l'expression de l'At-PP2-A1 et taux de transmission du CABYV à partir des mutants affectés dans l'expression de l'At-PP2-A1 et infectés (A)** Après une acquisition du CABYV à partir de plantes infectées pendant 48 h, 10 pucerons ont été transférés sur les mutants d'*A. thaliana* (F11-1-2, F11-7, F11-7-4 et F11-3-7) qui ont été analysés 3 semaines plus tard par DAS-ELISA. <sup>a</sup>Résultats combinés de plusieurs expériences. Le taux d'infection représente le nombre de plantes infectées/nombre de plantes inoculées par puceron. Entre parenthèses, le pourcentage de plantes infectées. <sup>b</sup>A titre d'exemple, accumulation du CABYV au cours d'une expérience. DO : densité optique à 405 nm. EC: Ecart type. **(B)** Les pucerons ont acquis le virus pendant 48h sur les plantes infectées puis 20 pucerons ont été transférés sur les plantes tests (*A. thaliana*) qui ont été analysées 3 semaines plus tard par DAS-ELISA. Le taux de transmission représente le nombre de plantes infectées/nombre de plantes inoculées par puceron. **(C)** Accumulation du CABYV dans les plantes tests 3 semaines après l'inoculation par puceron. Moyenne de 3 à 17 plantes infectées (voir B).

F11-7 et F11-3-7 (de 47 % à 55 %) est similaire aux plantes Col0 (53 %), le taux d'infection des mutants F11-1-2 et F11-7-4 par le CABYV est réduit (29 % et 33 % respectivement). Dans les plantes infectées par le TuYV, aucune différence significative de l'accumulation n'est observée (tableau 12) alors qu'une très grande variation dans les valeurs de DO entre plantes d'une même lignée et entre les expériences a été observée chez les plantes mutantes infectées par le CABYV. En raison de ces fortes variations de DO, aucune différence significative d'accumulation du CABYV n'a été observée entre les mutants F11-7, F11-7-4 et F11-3-7 et les plantes Col0. Seule la lignée F11-1-2 se comporte différemment des autres puisqu' une diminution de l'accumulation du CABYV semble se produire de manière reproductible dans ces plantes (figure 29A).

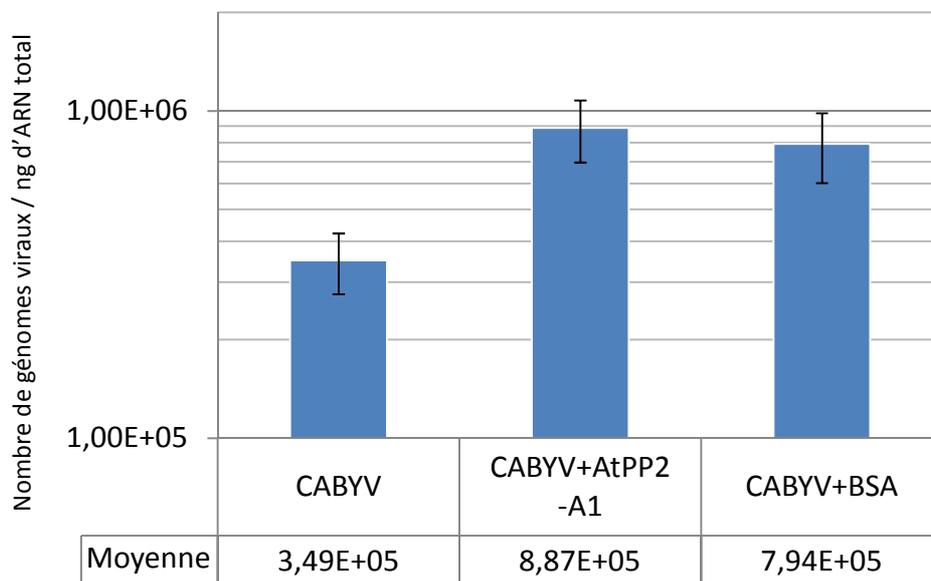
## **2) Transmissibilité des virus par puceron à partir des mutants d'*A. thaliana***

A partir des plantes mutantes d'*A. thaliana* infectées, nous avons réalisé des tests de transmission par puceron afin d'analyser l'effet de la réduction de la synthèse de l'At-PP2-A1 sur la transmission du virus. Lorsque les plantes mutantes ont servi de source pour la transmission du TuYV, aucune différence d'efficacité de transmission n'a été observée par comparaison avec une acquisition du virus sur les plantes Col0 infectées (tableau 13).

Lorsque les mutants affectés dans l'expression de l'At-PP2-A1 infectés par le CABYV ont servi de source virale dans les expériences de transmission, nous avons observé une plus faible transmissibilité du virus (100 % de transmission à partir de Col0 et 50 à 66 % de transmission à partir des mutants de l'At-PP2-A1) (figure 29B). Aucune différence dans l'accumulation du virus dans les plantes tests n'a cependant été observée (figure 29C). Les tests de transmission n'ont malheureusement pas pu être réalisés avec le mutant F11-7-4, celui ayant un phénotype trop altéré qui entraîne une mort rapide des plantes. Cette diminution de la transmissibilité du CABYV à partir des mutants d'expression de l'At-PP2-A1 pourrait être attribuée à une accumulation plus faible des virus dans les plantes puisque nous n'avons pas pu, par DAS-ELISA, quantifier avec précision le niveau d'accumulation du virus dans les plantes.

	Taux de transmission	DO ± EC
CABYV (50ng/μl)	0/10 (100 %)	-
+ At-PP2-A1 (330ng/μl)	9/10 (90 %)	2,51 ± 0,50
+At-PP2-A1 (660ng/μl)	8/10 (80 %)	2,49 ± 0,34
+BSA	10/10 (100 %)	2,51 ± 0,31
+At-PP2-A1+BSA	8/10 (80 %)	2,84 ± 0,40
+Lysozyme	9/10 (90 %)	2,48 ± 0,49
+At-PP2-A2 (330ng/μl)	10/10 (100 %)	2,65 ± 0,37
+At-PP2-A2 (660ng/μl)	7/10 (70 %)	1,98 ± 0,76

**Tableau 14 : Effet de l'addition de protéines purifiées au CABYV sur la transmission du virus par puceron.** Après une AAP de 24h sur un milieu artificiel de nutrition contenant du virus purifié à 50 ng/μl, 10 pucerons ont été déposés sur chaque plante test qui ont été analysées par DAS-ELISA 3 semaines plus tard. Le taux de transmission représente le nombre de plantes tests infectées/nombre de plantes inoculées par puceron. Entre parenthèses, le pourcentage de plantes infectées. *DO* : densité optique à 405 nm ; *EC* : écart-type.



**Figure 30 : Détermination du nombre de génomes du CABYV dans les pucerons par qRT-PCR après acquisition du virus supplémenté d'At-PP2-A1 ou de BSA.** Après une AAP de 24h sur un milieu artificiel de nutrition contenant du virus purifié à 50 ng/μl, des lots de 10 pucerons ont été transférés sur des plantes saines pendant 4 jours pour éliminer les virions libres du tube digestif. Les ARN totaux ont ensuite été extraits à partir des groupes de 10 pucerons avant d'être soumis à une RT-PCR quantitative.

## ***B - Analyse de l'effet de protéines purifiées (autres que les lectines) sur la transmission du CABYV par puceron***

Comme nous l'avons précisé précédemment, Bencharki et al [Bencharki, 2010], ont montré que l'ajout des lectines purifiées (At-PP2-A1 et -A2) au virus avait un rôle stimulateur sur la transmission du virus par le puceron. Afin d'analyser plus en détail la spécificité de cet effet, nous avons conduit des expériences de transmission du CABYV en présence d'autres protéines purifiées telles que la BSA et le lysozyme.

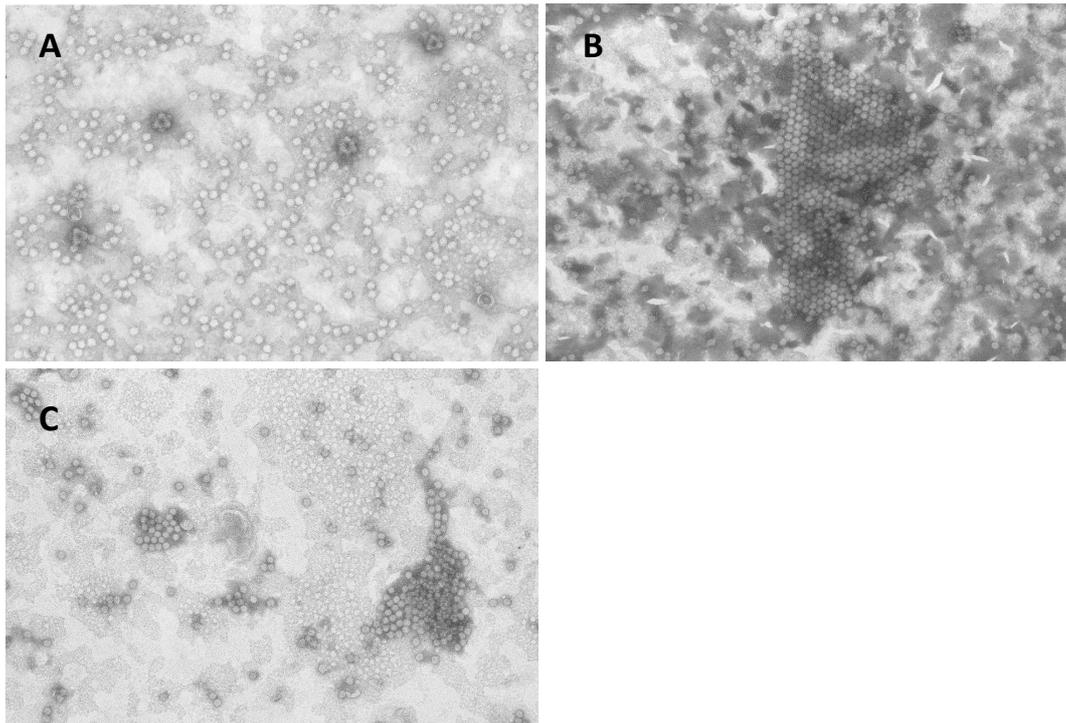
Les résultats obtenus, regroupés dans le tableau 14, montrent que toutes les protéines purifiées testées (At-PP2-A1 et -A2, BSA, lysozyme,) sont capables de stimuler la transmission du CABYV. Ce résultat assez inattendu montre donc que l'effet observé sur la transmission n'est pas spécifique des lectines phloémiennes mais qu'il pourrait à priori s'appliquer à toute protéine présente dans la sève au moment de l'acquisition par le puceron. Nous remarquons également que l'augmentation de la quantité de protéines présentes dans le milieu nutritionnel pour le puceron aurait plutôt tendance à légèrement diminuer le taux de transmission du virus. Ces expériences devront être reproduites avec des quantités encore plus importantes de protéines afin d'analyser l'effet sur la transmissibilité du virus.

## ***C - Devenir des particules virales en présence de l'At-PP2-A1***

### **1) Effet de l'addition d'At-PP2-A1 sur l'internalisation des virions dans le puceron**

Nous avons poursuivi l'étude afin de voir si l'augmentation de la transmissibilité observée était due à une augmentation de la quantité de virus internalisée dans les pucerons. Pour cela, nous avons évalué par qRT-PCR l'accumulation du virus dans des pucerons nourris avec des préparations de virus purifié supplémentées ou non avec l'At-PP2-A1. Avant d'extraire les ARN totaux des pucerons virulifères pour quantification, les pucerons ont été transférés 4 jours sur des plantes saines afin de vider la lumière du tube digestif de virions libres. Ainsi, le nombre de génomes viraux estimés par qRT-PCR représente le nombre de virions internalisés dans les cellules du puceron.

Les résultats présentés sur la figure 30, montrent une augmentation significative du nombre de génome viraux en présence d'At-PP2-A1 (2,5 fois) ou de BSA (2,3 fois) :  $3,49 \times 10^5$  de génomes viraux/ng d'ARN total présents dans les pucerons après acqui-



**Figure 31 : Observation en microscopie électronique à transmission des purifications virales de CABYV après ajout de protéine At-PP2-A1 purifiée. (A)** Purification virale de CABYV à 90 ng/μl. **(B)** Purification virale de CABYV à la même concentration en présence de At-PP2-A1 à 1,2 μg/μl. **(C)** Conditions identiques à (B) avec, en plus, la présence de salive de puceron.

	Concentration	Particules isolées	Total des particules	% de particules isolées	Significativement différent du contrôle (CABYV seul)
CABYV	100 ng/μl	400	701	57,1	-
CABYV+At-PP2-A1	50 ng/μl	249	536	46,5	<b>oui</b>
	180 ng/μl	276	633	43,6	<b>oui</b>
	950 ng/μl	359	616	58,3	non
CABYV+At-PP2-A2	180 ng/μl	273	552	49,5	<b>oui</b>
	950 ng/μl	291	474	61,4	non

**Tableau 15 : Evaluation de l'agrégation des particules du CABYV mises en présence des protéines At-PP2-A1 ou -A2.** Une suspension de virus purifiée à 100 ng/μl a été mise en présence de différentes concentrations de protéine At-PP2-A1 ou -A2 avant d'être déposée sur un grille de MET. Différents clichés ont été pris à partir de chacune des conditions et le nombre total de particules virales ainsi que le nombre de particules isolées ont été comptés manuellement.

tion du CABYV seul contre  $8,79 \times 10^5$  de génomes viraux après addition d'At-PP2-A1 ou  $7,82 \times 10^5$  de génomes viraux après addition de BSA. Ainsi, l'augmentation de l'efficacité de transmission observée lorsque ces protéines sont ajoutées au virus purifié pourrait être en partie expliquée par le plus grand nombre de particules virales présent dans le puceron. Cette expérience montre de plus que l'accumulation accrue du nombre de génomes viraux dans les cellules du puceron n'est pas spécifique à la lectine (At-PP2-A1) puisqu'elle se produit également avec la BSA.

## 2) Effet de l'addition d'At-PP2-A1 sur l'agrégation des virions

Pour tenter de caractériser l'effet que pourrait avoir la protéine At-PP2-A1 sur le virus, nous avons procédé à des observations en microscopie électronique à transmission (MET) de purifications virales mises en présence ou non d'At-PP2-A1 purifiée. Ces expériences ont été effectuées avec l'aide de Catherine Reinbold (INRA, Colmar). Nous avons également réalisé des observations similaires sur le mélange At-PP2-A1/virus purifié préalablement soumis aux pucerons afin d'analyser l'effet de la salive.

Les observations en MET nous montrent un tapis homogène de particules virales (figure 31A) lorsque le virus se trouve seul en solution. Lorsque le CABYV est incubé en présence d'At-PP2-A1, on observe la formation d'agrégats des particules virales qui peuvent même apparaître sous la forme de structures paracrystallines (figure 31B). La présence de salive de puceron au mélange précédent ne modifie pas les observations où les virions sont principalement sous une forme agrégée (Figure 31C).

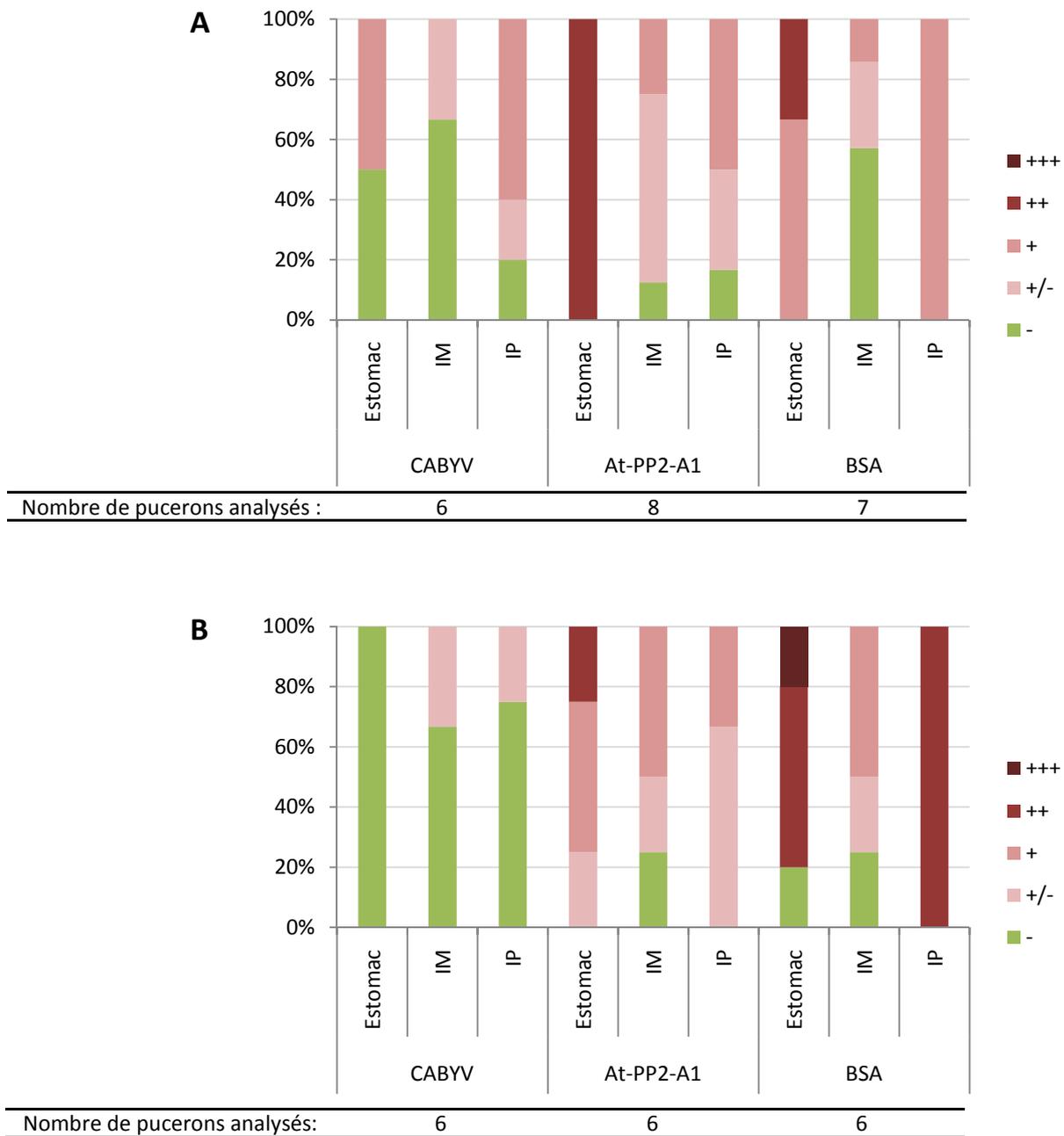
Afin de quantifier cette capacité des virions à s'agréger en présence d'At-PP2-A1, nous avons dénombré le nombre de particules isolées par rapport au nombre total de virions observables sur la lame. Cette expérience a également été réalisée après ajout d'At-PP2-A2 à la solution de CABYV purifié. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 15. Nous constatons que le pourcentage de particules isolées diminue significativement lorsque les protéines At-PP2-A1 ou -A2 sont ajoutées au virus aux concentrations finales de 50 et 180 ng/ $\mu$ l. Pour les concentrations plus fortes d'At-PP2-A1 et d'At-PP2-A2 (950 ng/ $\mu$ l), un tel effet n'est pas observé. Ces résultats tendraient à montrer qu'à certaines concentrations de protéines, les particules virales peuvent s'associer en complexes.

Nous avons ensuite cherché à observer la présence des virions dans le corps des pucerons par MET, après incubation des virus avec la protéine At-PP2-A1. Cette expérience a également été réalisée lorsque les virions ont été mis en présence de BSA avant leur acquisition par les pucerons. Les résultats des observations en MET sont regroupés sur la figure 32. Les observations se sont principalement focalisées sur l'estomac, lieu de passage des particules virales puis sur l'intestin moyen et postérieur qui sont les lieux d'internalisation des virions dans les cellules de l'insecte. Nous remarquons qu'en présence d'At-PP2-A1 ou de BSA, le nombre de particules virales présentes dans la lumière de l'estomac du puceron est plus important lorsque les pucerons ont acquis le virus seul (figure 32A). Cet effet pourrait être attribué à une plus grande stabilité des virions dans la lumière de l'estomac lorsqu'ils sont mis en présence des protéines At-PP2-A1 ou BSA. Cet effet protecteur des protéines sur la dégradation des virions avait déjà été observé *in vitro* [Bencharki, 2010] et pourrait donc aussi avoir lieu *in vivo*. Les observations réalisées ont également montré une augmentation de la présence des virions dans les cellules de l'intestin moyen et postérieur en présence des deux protéines (figure 32B) qui peut provenir soit du plus grand nombre de virions cheminant dans le tube digestif de l'insecte soit d'une internalisation plus importante des virions dans les cellules de l'intestin.

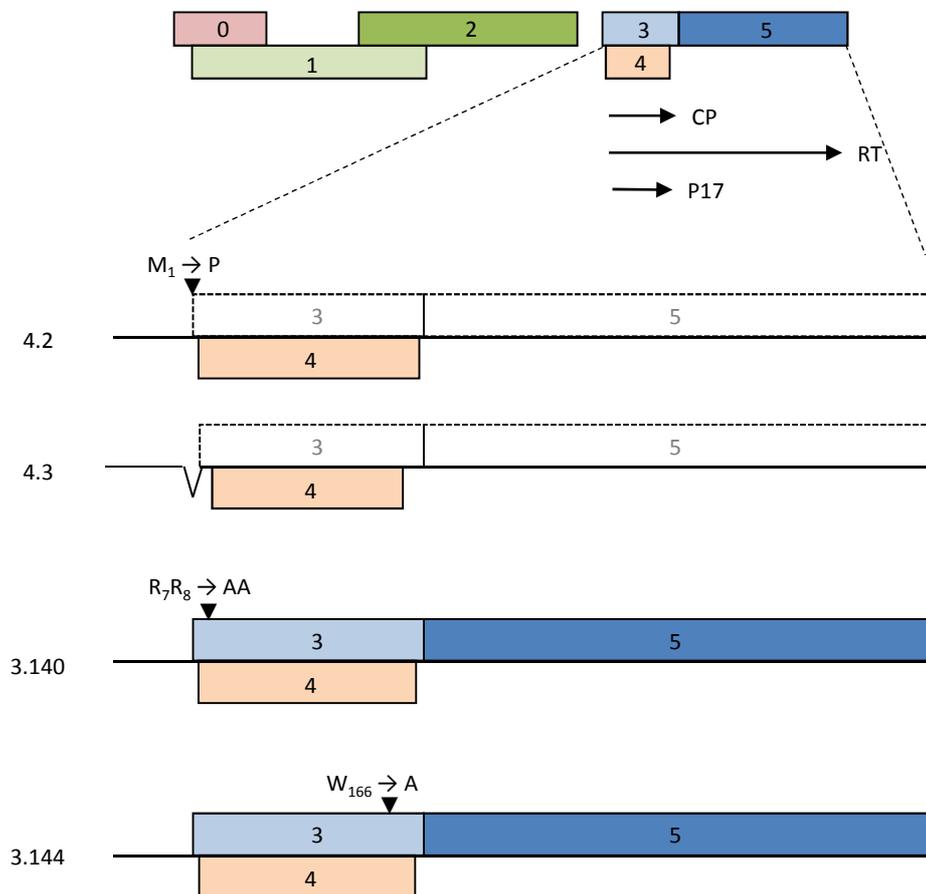
## V - Résultats complémentaires

### ***A - Mouvement à longue distance des polérovirus dans les plantes : quelle(s) forme(s) virale(s) chemine(nt) dans les tubes criblés ?***

L'une des questions que nous avons souhaité adresser suite aux résultats obtenus au cours de la première partie de la thèse a été de tenter d'identifier la(les) forme(s) virale(s) qui chemine(nt) dans les tubes criblés et qui est (sont) responsable(s) du mouvement à longue distance du CABYV. En effet, même si des particules virales ont été observées dans les plasmodesmes connectant les cellules compagnes des tubes criblés, nous ne pouvons pas éliminer l'hypothèse qu'une autre forme virale pourrait être responsable du mouvement à longue distance du virus. Nous avons donc amorcé cette étude en utilisant des mutants viraux ne formant pas de particules virales ou présentant des défauts d'encapsidation.



**Figure 32 : Observation par microscopie électronique de la présence de particules virales du CABYV après acquisition du virus supplémenté d'At-PP2-A1 ou de BSA.** Après une acquisition de 48h sur une solution de CABYV à 100 ng/μl, les pucerons ont été inclus dans une résine d'époxy avant d'être observés en MET. **(A)** Fréquence des particules virales dans la lumière du tube digestif au niveau de l'estomac, de l'intestin moyen (IM) ou de l'intestin postérieur (IP). **(B)** Fréquence des particules virales dans les cellules de ces différents tissus. (-) : absence de particules virales ; (+/-) : présence de particules virales douteuses car souvent isolées ; (+) à (+++): présence faible à élevée des particules virales.



**Figure 33 : Représentation schématique des mutants du TuYV présentant des défauts d'encapsidation.** L'organisation génétique du génome du TuYV codant pour les 6 ORFs est présentée. La protéine majeure de capsid (CP) et mineure (RT) ainsi que le produit de l'ORF4 (P17) sont représentés par des flèches. Pour les différents mutants, les changements induits par les mutations introduites sont mentionnés ainsi que la délétion (V) introduite dans le mutant 4.3. Les ORFs en pointillé indique que leur codon d'initiation a été modifié ou supprimé empêchant leur expression.

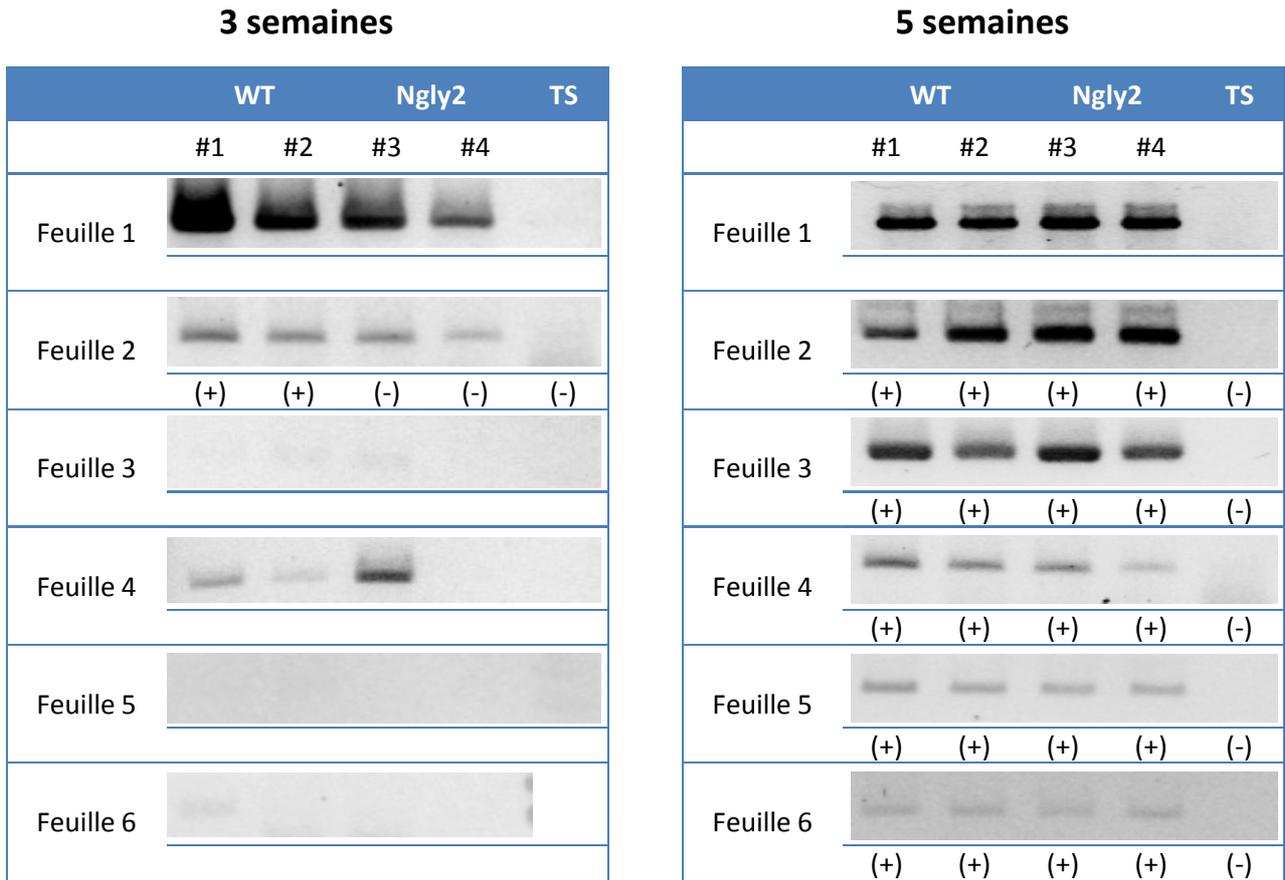
## 1) Suivi de l'accumulation de mutants viraux présentant un défaut d'encapsidation

Nous avons utilisé pour cette étude le mutant du CABYV Ngly2<sub>CP</sub> qui présente un défaut d'encapsidation et pour lequel le mouvement systémique dans la plante est ralenti. Nous avons également étendu cette étude à plusieurs mutants du TuYV qui présentent tous des défauts d'encapsidation (figure 33) :

- Le mutant 4.2 : chez ce mutant, le codon d'initiation de la CP a été remplacé par un codon sens, empêchant la synthèse de la CP.
- Le mutant 4.3 : ce mutant comporte une délétion de 37 nucléotides couvrant le codon d'initiation de la CP, boquant ainsi son expression et limitant l'apparition de révertants.
- Le mutant 3.140 : les arginines en position 7 et 8 de la séquence protéique de la CP ont été remplacées par des alanines. Cette mutation n'a pas d'effet au niveau de la réplication du virus dans des protoplastes de plante, mais une forme plus courte de l'ARN viral est encapsidé suggérant un défaut d'encapsidation du mutant. Ce défaut d'encapsidation serait en effet responsable de l'accessibilité d'une partie de l'ARN viral par les RNases endogènes libérées lors des tests d'analyse de la stabilité des virions (voir paragraphe B-2-b).
- Le mutant 3.144 : le tryptophane en position 166 a été remplacé par une arginine. Ce mutant est affecté au niveau de la réplication dans des protoplastes de plante et ne forme pas de particules stables.

L'ensemble de ces mutants du TuYV ne sont pas détectés par DAS-ELISA après agroinoculation de *M. perfoliata* [Reutenauer, Ziegler-Graff *et al.*, 1993; Brault, Bergdoll *et al.*, 2003].

Nous avons agroinoculé soit des concombres avec le mutant Ngly2<sub>CP</sub>, soit des plants de *M. perfoliata* avec les mutants du TuYV et avons suivi l'accumulation des virus dans les feuilles systémiques par DAS-ELISA et par RT-PCR 3 à 5 semaines après l'inoculation. Comme le montre la figure 34, qui regroupe les résultats obtenus pour le mutant Ngly2<sub>CP</sub>, on remarque que, lorsque le prélèvement des échantillons est effectué 3 semaines après l'inoculation, le mutant Ngly2<sub>CP</sub> n'est pas détecté par ELISA dans la feuille 2 alors qu'on le détecte par RT-PCR. Par contre, lorsque le prélèvement des échantillons a lieu 5 semaines après l'inoculation, les résultats par DAS-ELISA sont concordants avec ceux de la RT-PCR (figure 34).



**Figure 34 : Détection du virus sauvage (WT) et du mutant Ngly2<sub>CP</sub> par RT-PCR et par ELISA dans des feuilles de concombres 3 et 5 semaines après l'agroinoculation.** Les prélèvements d'échantillons pour les tests de DAS-ELISA et de RT-PCR ont été effectués sur deux plantes inoculées avec le virus WT (#1 et 2) et deux plantes inoculées avec le mutant Ngly2<sub>CP</sub> (#3 et 4) au niveau de différentes feuilles. La feuille 1 est la première feuille au dessus de la feuille inoculée et les feuilles 2 à 6 sont les feuilles supérieures. Les fragments PCR ont été séparés sur un gel d'agarose coloré au BET. Entre parenthèses les résultats du DAS-ELISA: (+): présence de protéines virales dans l'échantillon; (-): pas de détection de protéines virales dans l'échantillon.

	Taux d'infection	DO ± Ecart-type
WT	7/7 (100 %)	3,21 ± 0,05
4.2	0/5 (0 %)	0,10 ± 0
4.3	0/7 (0 %)	0,12 ± 0,01
3.140	6/7 (86 %)	0,89 ± 0,53
3.144	0/7 (0 %)	0,13 ± 0,04

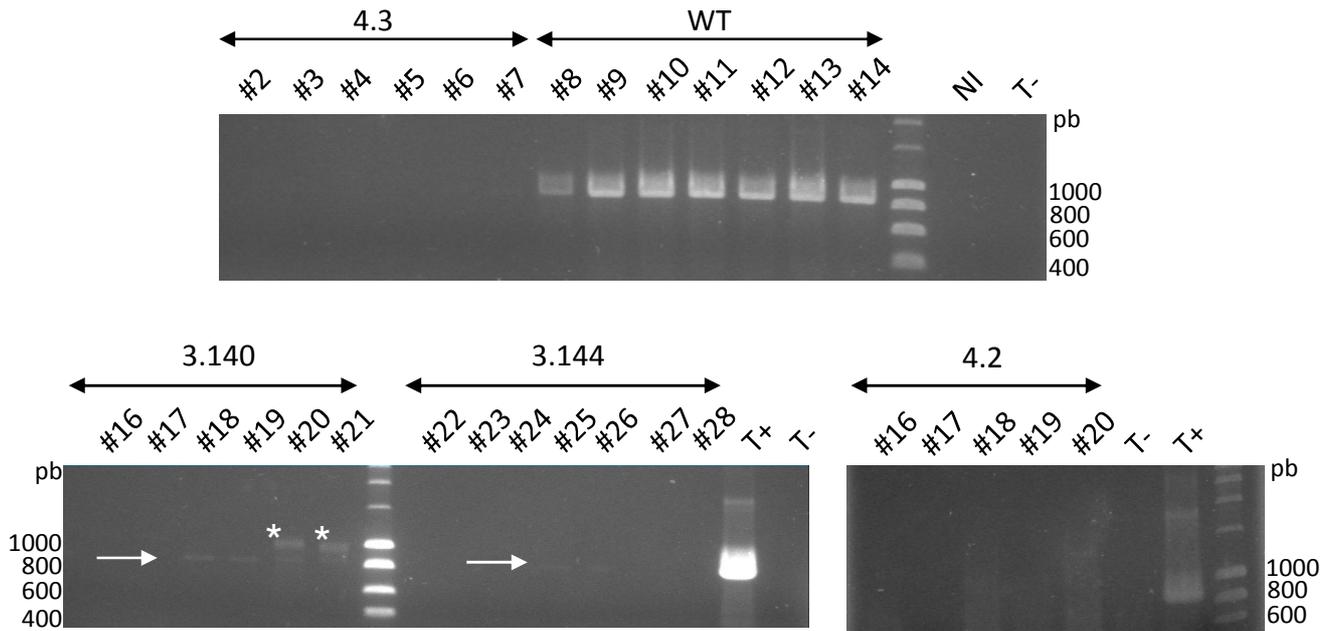
**Tableau 16: Détection des mutants du TuYV deux semaines après l'inoculation de plantes de *M. perfoliata*.** La détection du virus par DAS-ELISA a été réalisée sur les feuilles systémiques. Le taux d'infection correspond aux nombres de plantes infectées/nombre de plantes agroinfectées. DO : densité optique à 405 nm. La moyenne des DO pour les plantes non inoculées est de 0.10.

Ces expériences complémentaires suggèrent que seule la vitesse d'envahissement des feuilles de la plante est affectée dans le cas du mutant Ngly2<sub>CP</sub> mais pas sa capacité à envahir les tissus systémiques, malgré sa capsid instable.

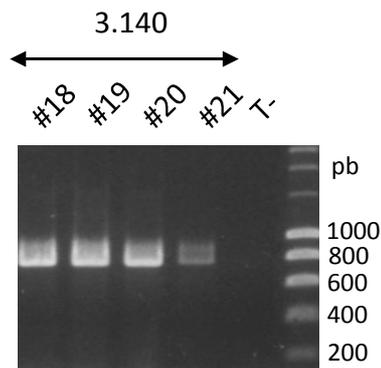
Le suivi de l'accumulation des mutants du TuYV dans les plants de *M. perfoliata* a été réalisé 2 semaines après inoculation. Le même broyat de feuilles systémiques a été utilisé pour détecter la présence des protéines de structure du virus par DAS-ELISA, et la présence d'ARN viral par RT-PCR. Les résultats sont synthétisés dans le tableau 16 et la figure 35. Pour les mutants 4.2, 4.3, et 3.144 on ne détecte la présence d'aucune protéine de structure du TuYV ou de l'ARN viral dans les feuilles systémiques des plantes testées. Pour le mutant 3.140, à l'inverse, la présence de protéines de structure est observée par DAS-ELISA dans la quasi-totalité des plantes (6 sur les 7 inoculées, tableau 16) et celle de l'ARN viral dans 4 plantes sur les 6 positives en ELISA (figure 35). Afin de voir si la détection de l'ARN viral en RT-PCR reflétait la présence de virions dans les plantes, des expériences d'immunocapture des particules suivies d'une RT-PCR ont été réalisées sur les plantes 18 à 21 inoculées avec le mutant 3.140. Dans ces conditions, un signal est toujours présent dans toutes les plantes (figure 36) ce qui suggère que, si l'immunocapture ne permet de capturer que les virions, la mutation introduite dans le mutant BW 3.140 n'altère pas complètement sa capacité à former des particules virales. Les résultats obtenus avec ce mutant ne sont pas en accord avec des expériences réalisées précédemment qui avaient montré qu'aucune plante ne pouvait être infectée par ce mutant.

La figure 34 suggère également la présence d'un signal dans 2 des 7 plantes inoculées avec le mutant 3.144 alors qu'aucune détection du virus par ELISA n'est observée (tableau 16). Il sera donc intéressant de poursuivre l'étude sur ce mutant afin de voir si le faible signal détecté par RT-PCR est du à la présence de complexes ribonucléoprotéiques.

Malheureusement, des expériences complémentaires visant à analyser si des réversions étaient responsables de la capacité de ces virus de se mouvoir dans la plante n'ont pu être réalisées au cours de ma thèse. Des travaux complémentaires sont donc en cours au laboratoire pour analyser à nouveau le comportement de ces mutants dans les plantes.



**Figure 35 : Détection par RT-PCR des mutants TuYV dans les feuilles systémiques 2 semaines après l'inoculation.** Les ARN totaux ont été extraits des plantes 2 semaines après leur inoculation avec les différents virus mutants. L'ARN viral a été recherché par RT-PCR et les fragments PCR ont été séparés sur un gel d'agarose coloré au BET. \*: réaction aspécifique. ⇐ Faible signal. NI : RT-PCR réalisée sur une plante non-inoculée ; T- : témoin PCR négatif sans ajout d'ADNc ; T+ : témoin PCR positif réalisé à partir d'ADNc d'une plante infectée par le TuYV.



**Figure 36 : Détection par IC-RT-PCR du mutant 3.140 du TuYV dans les feuilles systémiques 2 semaines après l'inoculation.** Des extraits de plantes inoculées avec le mutant 3.140 ont été déposés dans des puits préalablement recouverts d'anticorps dirigés contre le virus. Après une lyse des virions, une réaction de RT-PCR a été effectuée pour détecter l'ARN viral. Les fragments PCR ont été séparés sur un gel d'agarose coloré au BET. NI : IC-RT-PCR réalisée sur une plante non-inoculée ; T- : témoin PCR négatif sans ajout d'ADNc.

# **Discussion, Conclusion Générale et Perspectives**

# **I - Recherche de modifications post-traductionnelles sur les protéines de structure du CABYV : résultats directs et indirects de l'étude**

Le premier objectif de ma thèse était de mettre en évidence la présence de modifications post-traductionnelles sur les particules virales du CABYV afin d'analyser leur impact sur la transmission par puceron. Malgré les études antérieures sur le TuYV ayant suggéré une glycosylation des protéines structurales de ce virus, ainsi qu'un rôle crucial de cette modification dans la vection du virus par le puceron, nous n'avons pas confirmé la présence de tels résidus sur les protéines de structure du TuYV ainsi que du CABYV. Plusieurs approches ont été menées de front pour aboutir à ce résultat dont la première a été la mutagenèse dirigée des sites potentiels de N-glycosylation sur les protéines structurales du CABYV. Cette approche nous a permis de montrer qu'aucun des 4 mutants obtenu, touché chacun dans un site de N-glycosylation, ne perdait la capacité à être transmis par puceron. Ce résultat ne permet cependant pas d'éliminer l'hypothèse de la présence simultanée de plusieurs sites glycosylés sur les protéines de structure du CABYV. Si tel était le cas, la mutation d'un site affectant la charge globale en résidus glycosylés des virions pourrait être compensée par la glycosylation d'un ou des autres sites. On comprend bien que cette question aurait pu être résolue par l'obtention de doubles, triples ou quadruples mutants. Néanmoins, en raison du faible pouvoir infectieux du mutant Ngly2<sub>CP</sub> dans les plantes, il était difficile d'envisager l'introduction d'une ou de plusieurs mutations supplémentaires dans cet environnement, sans risquer de perdre complètement le caractère infectieux de ce virus.

Cette première approche, même si elle n'a pas abouti à un résultat définitif sur la présence de résidus N-glycosylés sur les protéines de structure du CABYV, a cependant permis l'obtention de 4 mutants du CABYV qui représentent des outils intéressants pour compléter les études sur le mouvement du CABYV dans les plantes et sur sa transmission par puceron. En effet, la disposition d'une collection de mutants du CABYV ayant des comportements particuliers dans la plante (réplication ou mouvement affectés) ou vis-à-vis du vecteur (peu ou pas transmis par puceron) est encore très limitée au laboratoire. Nous ne disposons à l'heure actuelle que de mutants du CABYV dépourvus de la

partie C-terminale de la protéine de RT qui s'accumulent très faiblement dans les plantes et ne sont pas transmis par puceron. Cette collection pourra donc être enrichie par un mutant qui s'accumule bien dans les plantes mais qui est transmis faiblement à partir de plantes infectés (cas du mutant Ngly4<sub>RT</sub>). Ce mutant est probablement affecté dans sa répartition dans la plante car la transmission à partir de virus purifié est aussi efficace qu'à partir du virus sauvage. Il serait donc intéressant de réaliser des expériences d'hybridation *in situ* couplées à des observations en MET pour analyser plus en détail la localisation tissulaire et cellulaire de ce virus. Une deuxième hypothèse pour expliquer la plus faible transmissibilité du virus à partir des plantes infectées, serait l'intervention d'une protéine de plante dans la transmission. Le virus mutant ne serait plus en mesure d'interagir avec cette protéine ce qui entraînerait la diminution de sa transmissibilité. Cette hypothèse rejoint celle sur laquelle travaille actuellement l'équipe et qui est que toute protéine végétale susceptible de s'associer au virus dans les tubes criblés, pourrait avoir un rôle dans la transmission par puceron. Des études basées sur le criblage par le système du double hybride dans la levure de banques d'ADNc de cellules du phloème avec les protéines de structure du CABYV comme appât sont développées au laboratoire. Il sera donc intéressant, une fois les candidats identifiés, d'analyser leur interaction avec la protéine de RT du mutant Ngly4<sub>RT</sub>. Deux autres virus mutants (Ngly1<sub>CP</sub> et Ngly3<sub>RT</sub>) sont affectés dans leur capacité à envahir efficacement les tissus systémiques des plantes ce qui en fait de bons outils pour étudier le mouvement systémique du virus dans la plante. Cette déficience dans le mouvement à longue distance n'est pas due à l'instabilité des virions, comme nous l'avons montré, mais pourrait être attribuée, une fois de plus, à une incapacité des particules virales à interagir avec des composants cellulaires impliqués dans le mouvement du virus à savoir : des protéines impliquées dans l'adressage des virions vers les plasmodesmes et le passage au travers des plasmodesmes ou des protéines participant à la formation des complexes ribonucléoprotéiques (s'ils existent) responsables du passage du virus de cellule à cellule. De la même façon, il sera intéressant d'analyser la capacité de ces virus mutants à interagir avec les protéines cellulaires intervenant dans le mouvement à longue distance, lorsque celles-ci auront été identifiées (programme en cours). Enfin, le dernier mutant que nous avons obtenu (Ngly2<sub>CP</sub>) s'est révélé peu infectieux dans les plantes, particularité que l'on peut probablement attribuer à sa capsid très instable. Néanmoins, nous avons déjà mis à profit la caractéristique de ce virus pour rechercher l'existence d'une forme ribonucléoprotéique

qui serait responsable, en totalité ou en partie, du mouvement du virus dans la plante. Les résultats que nous avons présentés dans la partie « résultats complémentaires », ne nous permettent pas pour l'instant de conclure définitivement quant à la présence de tels complexes mais ont permis d'amorcer des études complémentaires qui sont actuellement développées au laboratoire pour rechercher la présence de complexes ribonucléoprotéiques dans les tubes criblés et analyser la capacité des génomes viraux à interagir *in vitro* avec des protéines phloémiennes.

Afin de poursuivre l'identification potentielle des résidus glycosylés sur les protéines de structure du CABYV, nous avons dû développer d'autres approches et nous avons alors décidé de mener parallèlement ces études sur le TuYV pour lequel la glycosylation avait été suspectée. Ces méthodes, basées sur la reconnaissance des virions par des lectines ou des anticorps spécifiques des sucres complexes et utilisant également la spectrométrie de masse, nous ont finalement permis de montrer, avec une quasi certitude, l'absence de résidus glycosylés sur les protéines de structure des deux virus étudiés. Seule la présence d'un résidu O-glycosylé non conventionnel et localisé au niveau d'une séquence non consensus pourrait encore éventuellement être envisagé. Cette hypothèse nous paraît cependant très peu probable car les exemples actuels de glycosylation des virus suggèrent que l'absence de glycosylation des virus non-enveloppés est plutôt une règle plutôt qu'une exception.

Un résultat annexe à ces études a également été la mise en évidence d'une protéine glycosylée dans *M. perfoliata* (une  $\alpha$ -glucosidase) se retrouvant systématiquement dans les préparations virales purifiées des poliovirus. Les diverses expériences menées n'ont pas permis de mettre en évidence une interaction directe entre les virions et cette protéine de plante. L'expression de cette protéine étant très fortement augmentée dans *M. perfoliata* après l'infection par le TuYV (O. Lemaire et P. Schellenbaum, communication personnelle), il se pourrait donc que cette protéine soit présente dans les préparations virales, non pas parce qu'elle interagit avec les virions, mais parce qu'elle est très abondante dans les plantes infectées. Nous avons quand même tenté d'évaluer le rôle potentiel de cette protéine dans le cycle viral et la transmission des virus par puceron. Les résultats encore préliminaires, portant sur l'orthologue d'*Arabidopsis*, une  $\beta$ -xylosidase, ne suggèrent pas d'implication de cette protéine dans la capacité des deux virus (CABYV et TuYV) à infecter les plantes, ni dans la capacité du TuYV à être transmis par puceron.

La situation semble un peu différente pour le CABYV puisque ce virus est moins bien transmis à partir des mutants d'*A. thaliana* ne produisant pas cette  $\beta$ -xylosidase. Il faut cependant rappeler que, dans cette étude, nous avons travaillé avec l'orthologue de l' $\alpha$ -glucosidase de *M. perfoliata* qui est une  $\beta$ -xylosidase, et que nous n'avons aucune évidence que la fonction de  $\alpha$ -glucosidase de *M. perfoliata* soit assurée chez *Arabidopsis* par la  $\beta$ -xylosidase. Il faut juste signaler que l'activité des deux protéines est très fortement augmentée dans les plantes infectées par le TuYV. Les données actuelles ne nous permettent donc pas de préciser le rôle que pourrait jouer cette protéine dans le mécanisme de transmission du CABYV. Mais, si l'on s'en réfère aux résultats qui montrent que la transmissibilité du virus peut être stimulée après ajout de protéines dans le milieu nutritionnel pour les pucerons, on pourrait envisager que la déplétion de cette protéine très fortement exprimée dans les plantes infectées puisse diminuer de manière significative le contenu global protéique dans les tubes criblés réduisant ainsi le taux de transmission du virus. On comprend bien que des études supplémentaires sont bien sûr nécessaires afin de confirmer cette hypothèse et de proposer un rôle potentiel de cette  $\beta$ -xylosidase dans la transmission du CABYV par puceron.

La deuxième modification potentielle des protéines de structure du CABYV à laquelle nous nous sommes également intéressés est la phosphorylation, car une interaction entre les protéines de capsid du CABYV et la sous-unité régulatrice de la caséine kinase 2 (CK2) avait été mise en évidence précédemment au laboratoire. Etant donné le grand nombre de sites potentiels de phosphorylation par la CK2 sur les protéines de structures du CABYV et du TuYV, il ne nous a pas été possible de développer une approche par mutagenèse dirigée pour étudier le rôle potentiel des résidus phosphorylés dans le cycle viral. Nous avons, par une approche biochimique et par l'analyse des résultats de spectrométrie de masse, déduit que les séquences des protéines de structure incorporées dans les particules du CABYV et du TuYV ne possédaient pas de résidus phosphorylés. Cette étude ayant été conduite sur les protéines incorporées dans les virions, il reste cependant une incertitude quand à la phosphorylation de la partie C-terminale de la protéine de RT. Nous pouvons donc supposer que l'interaction entre la sous-unité régulatrice de la CK2 n'a pas pour but de conduire à la phosphorylation des protéines structurales du CABYV et du TuYV. Le rôle cette interaction pourrait être de détourner la protéine CK2 de sa fonction primaire et ainsi permettre au virus de contourner les mécanismes de défense de la plante. Une autre hypothèse serait que cette interaction favo-

riserait la phosphorylation d'autres protéines virales qui seraient susceptibles de se lier aux protéines de structure du virus. Cet effet a notamment été observé dans le cas du HIV-1 où l'interaction entre la protéine Rev et la sous-unité  $\beta$  de la CK2 a pour effet de stimuler la phosphorylation d'autres protéines codées par le virus [Ohtsuki, Maekawa *et al.*, 1998]. Comme nous l'avons vu dans les résultats, il n'existe pas de mutants d'Arabidopsis affectés dans l'expression des sous unités régulatrices ou catalytiques de la CK2, probablement en raison de la fonction essentielle de cette protéine dans les plantes. Le mécanisme d'ARN interférence s'est avéré peu adapté, dans nos mains, à la réduction de l'expression d'un gène codant pour une sous-unité régulatrice. Vu la redondance des gènes qui codent pour cette protéine et la très faible homologie de séquences entre ces gènes, le suivi de l'accumulation du virus dans des plantes n'exprimant pas cette protéine ne nous semble pas réalisable. Il faudra donc développer d'autres approches pour appréhender le rôle de cette protéine dans le cycle viral telle que la surexpression de la protéine dans des plantes et son effet sur le cycle viral.

Nous pouvons conclure de cette première partie que toutes les expériences mises en œuvre au cours de la thèse n'ont pas permis d'identifier de résidus glycosylés ou phosphorylés sur les protéines de structure du CABYV et du TuYV. Ce résultat a une implication directe sur la recherche des récepteurs des virus dans le puceron. En effet, il est très probable que les virions non modifiés interagissent directement avec les récepteurs dans le puceron. Cela permet donc l'utilisation de protéines virales exprimées dans un système procaryote ou *in vitro* pour étudier les interactions entre les protéines virales et les récepteurs. Finalement, la seule modification post-traductionnelle qui, pour l'instant, semble affecter la protéine mineure de la capsid de ces virus est le clivage post-traductionnel de la partie C-terminale de la protéine qui conduit à la production d'une protéine de RT tronquée (RT\*). Cette protéine RT\* est détectée dans les virions purifiés ainsi que dans la sève des concombres infectés. Le site exact de coupure de la protéine de RT n'est pas connu mais nos études de spectrométrie de masse nous ont permis de définir un peu plus précisément sa position (environ 9 acides aminés en aval d'un motif DE très conservé chez les *Luteoviridae*). L'introduction de mutations au niveau de cette région dans la séquence du CABYV est actuellement en cours afin d'analyser l'effet que pourrait avoir, sur le cycle viral et la transmission par puceron, l'inhibition du clivage de la protéine de RT.

## II - Rôle des protéines de plantes dans la transmission

La deuxième partie de la thèse a consisté à élucider le rôle que pourrait jouer les protéines de plante dans la transmission des polérovirus par puceron. Cette étude a été initiée par un travail antérieur à la thèse, qui a porté sur l'identification des protéines présentes dans la sève capables de se lier aux virions. L'identification de deux lectines comme partenaires potentiels du virus nous a bien évidemment conduits à poursuivre une étude plus approfondie sur ces candidats étant donné que nous nous intéressions à la glycosylation des virions.

La première approche a été d'analyser le comportement des virus dans les mutants affectés dans l'expression de l'ARNm codant pour la PP2-A1 (orthologue de la CsLec26 de concombre). Les résultats obtenus suggèrent une accumulation plus faible du CABYV dans certains des mutants ainsi qu'un taux de transmission par puceron réduit. Un tel comportement n'a cependant pas été observé pour le TuYV. La plus faible accumulation du CABYV dans les plantes peut être directement responsable de la plus faible transmissibilité du virus et il est difficile de déduire de ces expériences un rôle définitif de la protéine dans la transmission. Dans les plantes, cette protéine pourrait intervenir dans le mouvement du virus dans la plante puisqu'il a été montré sa capacité à augmenter la taille d'exclusion limite des plasmodesmes [Balachandran, Xiang *et al.*, 1997]. Il faut également signaler que l'interprétation des résultats obtenus avec le TuYV et le CABYV est rendue plus délicate du fait que ces mutants d'*Arabidopsis* sont des mutants obtenus par la technique d'ARN interférence dans lesquels l'inhibition de la synthèse de la protéine At-PP2-A1 n'est pas totale. Enfin, rappelons que cette famille multigénique compte plus d'une trentaine de gènes chez *Arabidopsis* et que bien qu'une partie seulement d'entre eux semble spécifiquement exprimée dans les cellules du phloème, des phénomènes de complémentation pourraient se produire dans ces plantes silencées rendant difficile l'exploitation des résultats. On comprend bien, avec ces expériences, la difficulté de mener une étude fonctionnelle sur une protéine codée par un gène faisant partie d'une famille multigénique.

Nous avons également tenté d'élucider le mécanisme responsable de l'effet stimulateur sur la transmission du virus obtenu après ajout de protéines At-PP2-A1 purifiées. Nous avons ainsi montré que l'acquisition du virus en présence d'At-PP2-A1 augmentait

de 2,5 fois la quantité de virions internalisés dans les cellules du puceron, cet effet pouvant, en lui-même, être responsable de l'augmentation du taux de transmission du virus en présence de la protéine. L'augmentation de l'internalisation des virus dans les cellules pourrait être due à une augmentation de la stabilité des virions dans le tube digestif de l'insecte puisqu'il a été montré que l'incubation du virus avec la protéine At-PP2-A1 augmentait la résistance des virions à un traitement RNase *in vitro* [Bencharki, 2010]. Ces résultats ont, de plus, été confirmés par une observation en MET plus fréquente des virions dans la lumière du tube digestif ainsi que dans les cellules de l'insecte après ajout de la protéine At-PP2-A1. Des résultats similaires ont été obtenus avec la BSA montrant donc que l'effet de protection sur les virions ne serait pas spécifique de la lectine phloémienne. Les virions pourraient être protégés dans la lumière intestinale des enzymes digestives ou du changement de pH qui s'opère tout au long du tube digestif et qui varie de 5,5 à 8,5 [Cristofolletti, Ribeiro *et al.*, 2003] par la présence des protéines de plante. Des observations *in vitro* en MET ont également permis de noter un phénomène d'agrégation des particules virales mises en présence d'At-PP2-A1. Cette agrégation pourrait également favoriser la résistance accrue des virions aux dégradations enzymatiques ainsi qu'aux variations de pH. Il sera intéressant d'analyser, dans le futur, si la capacité des lectines At-PP2-A1 et -A2 à entraîner l'agrégation des virions est liée à leur capacité de s'associer sous la forme de multimères dans certaines conditions.

Nous avons également observé que d'autres protéines d'origine non végétale avaient un effet stimulateur sur la transmission quand elles étaient ajoutées au virus dans le mélange nutritionnel pour les pucerons. Cette absence de spécificité était plutôt inattendue car il a été montré que des fractions de sève, dont le contenu protéique diffère, n'avaient pas toutes la même capacité à stimuler la transmission du virus par puceron [Bencharki, 2010]. Dans ces différentes fractions, les protéines se trouvent principalement sous forme de complexes ce qui diminue la quantité de protéines libres. Il semblerait donc qu'il faille une quantité suffisante de protéines libres et solubles (quantité probablement atteinte dans les expériences contrôles avec les protéines purifiées) pour que l'effet stimulateur sur la transmission du virus par puceron puisse se mettre en place. L'effet stimulateur sur la transmission du CABYV observé après addition de sève de concombre pourrait être dû, non pas à l'action d'une seule protéine, mais à l'action combinée de plusieurs protéines libres dans la sève. Ces protéines pourraient former une « couverture » de protection autour des virions leur permettant de cheminer plus faci-

lement dans le tube digestif du puceron. Même si on peut envisager que n'importe quelle protéine présente dans la sève peut avoir une action bénéfique sur la transmissibilité du virus, nous pensons que les protéines capables de se lier aux virions seront les plus aptes à assurer cette fonction.

L'identification de protéines de plante intervenant dans la transmission des virus par puceron peut constituer une fabuleuse avancée dans la recherche de nouvelles méthodes de lutte contre ces virus qui passeraient par le blocage ou l'inhibition de la transmission du virus à partir des plantes ne produisant plus ces protéines. De telles protéines restent encore inconnues et cette stratégie ne peut pour l'instant être envisagée en raison de l'aspécificité de la stimulation de la transmission observée *in vitro* avec les protéines phloémiennes et non phloémiennes. Les travaux devront donc être poursuivis afin de voir si *in vivo* cette augmentation de la transmission du virus peut être attribuée à certaines protéines en particulier. L'analyse de la composition des complexes viraux cheminant dans la sève se révélera nécessaire afin d'identifier les protéines de plantes qui se trouvent réellement associées aux virus au moment de l'acquisition par le puceron.



# Matériel et méthodes



# I - Matériel

## A - Milieux de culture

### 1) Milieu complet Luria Bertani (LB)

Milieu utilisé pour cultiver *E. coli*. Il contient 1 % de bactotryptone, 0,5 % d'extraits de levures et 1 % de NaCl. Le pH est ajusté à 7,5. Le milieu est ensuite autoclavé.

### 2) Milieu de culture Yeast Extract Broth (YEB)

Milieu utilisé plus particulièrement pour la culture d'*A. tumefaciens*. Il contient 0,5 % d'extraits de viande de bœuf, 0,1 % d'extraits de levure, 0,5 % de bacto-peptone, 0,5 % de saccharose, le pH est ajusté à 7,2, puis on ajoute 2 mM de MgSO<sub>4</sub> après autoclavage.

## B - Bactéries

### 1) *Escherichia coli*, souche DH5 $\alpha$

La souche a été utilisée pour le clonage et pour l'amplification des différents plasmides durant les différents clonages. Dans son génome, on retrouve (1) la mutation endA1 qui inactive une endonucléase intracellulaire permettant d'éviter la dégradation de l'ADN plasmidique durant les minipréparations, (2) l'allèle  $\Delta(lacZ)M15$  qui permet d'utiliser le système de criblage blanc/bleu, et enfin (3) la mutation recA1 qui supprime la recombinaison homologue, réduisant ainsi les événements de multimérisation et de délétion des plasmides. Les bactéries *E. coli* sont cultivées à 37°C dans le milieu LB contenant les antibiotiques appropriés.

### 2) *Agrobacterium tumefaciens*, souche C58C1

Cette souche est utilisée pour l'agroinfiltration de *Montia perfoliata*, de *Cucumis sativus* et d'*Arabidopsis thaliana*. La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* C58C1 utilisée contient un plasmide Ti « désarmé » dépourvu des gènes tumoraux de l'ADN-T et portant le gène de résistance à la gentamycine. Le plasmide Ti apporte en *trans* les gènes *vir* nécessaires au transfert dans les cellules de plante d'un brin d'ADN compris entre les séquences bordantes de l'ADN-T présent sur le plasmide binaire. Le chromosome bactérien possède le gène de résistance à la rifampicine. Cette bactérie est cultivée à 28°C dans le milieu YEB contenant les antibiotiques appropriés.

## C - Plasmides

### 1) Plasmide Bluescript KS

C'est un phagemide dérivé du plasmide pUC19, qui compte 2961 paires de bases. Ce plasmide est utilisé pour les étapes de clonage des fragments PCR dans le cadre de l'analyse de la descendance virale dans les plantes agroinfectées ou infectées par puce-ron. Ce plasmide porte le gène de résistance à l'ampicilline. Le clone ADNc complet du CABYV a également été introduit en aval du promoteur du bactériophage T3 dans un plasmide dérivé du pUC19 [Prüfer, Wipf-Scheibel *et al.*, 1995]. Ce plasmide, contenant le clone complet du CABYV, est utilisé dans les étapes de mutagenèse dirigée avant le transfert dans un plasmide binaire ainsi que lors de la production des transcrits infectieux servant à l'inoculation des protoplastes.

### 2) Plasmide binaire

Le clone complet du CABYV a également été introduit dans un plasmide binaire pbin19 entre les bordures droite et gauche du T-DNA (provenant du plasmide Ti), en aval du promoteur 35S du CaMV et en amont du terminateur du 35S du CaMV. Le pbin19, d'environ 10 kb, possède une origine de répllication peu spécifique fonctionnant à la fois dans *E. coli* et dans *A. tumefaciens*. Il confère à la bactérie qui l'héberge la résistance à la kanamycine.

La concentration finale des antibiotiques utilisés pour les cultures, est résumée dans le tableau suivant.

	Milieu solide (µg/ml)	Milieu Liquide (µg/ml)
Ampicilline	50	70
Rifampicine	100	100
Kanamycine	100 ( <i>A. tumefaciens</i> )	250 ( <i>A. tumefaciens</i> )
	35 ( <i>E. coli</i> )	50 ( <i>E. coli</i> )
Gentamycine	20	

## D - Virus

### 1) Cucurbit aphid borne yellows virus (CABYV)

La souche virale utilisée au laboratoire est celle isolée en 1989 à Nérac par Lecoq [Lecoq, Bourdin *et al.*, 1992] à partir d'un plant de melon infecté. Ce génome de ce virus a été entièrement séquencé par Guilley [Guilley, Wipf-Scheibel *et al.*, 1994] et a servi à l'obtention du clone complet infectieux [Prüfer, Wipf-Scheibel *et al.*, 1995] qui a été utilisé pendant notre étude.

## **2) *Beet western yellows virus (BWYV)***

La souche FL1 du BWYV, est la souche qui a servi à l'obtention du clone complet infectieux qui a été utilisé dans notre étude [Veidt, Lot *et al.*, 1988]. Cette souche a depuis été renommée TuYV [Mayo, 2002], nomination que nous utiliserons dans ce manuscrit. Le TuYV a été isolé à partir de plants de laitue qui proviennent de l'INRA de Montfavet [Veidt, Lot *et al.*, 1988].

## ***E - Matériel végétal et inoculation des plantes par agroinfection***

### **1) *Arabidopsis thaliana***

L'écotype Col0 d'*Arabidopsis thaliana*, famille des *Brassicaceae*, a été utilisé lors de ces travaux comme plantes tests lors des expériences de transmission ou pour suivre l'accumulation du virus dans les plantes. *A. thaliana* est une petite plante à fleur qui est utilisée comme organisme modèle en biologie végétale. Son génome de 125 Mb a été complètement séquencé en 2000 [Arabidopsis, 2000].

Le mutant SALK\_012090 n'exprimant plus le gène codant pour la  $\beta$ -xylosidase 1 (AT5G49360), résultant de l'insertion d'un fragment de T-DNA, ainsi que plusieurs lignées silencées pour l'expression du gène de l'At-PP2-A1 (AT4G19840) ont été utilisés dans nos travaux. Les gènes AtPP2-A2 (AT4G19850) et CKB2 (AT4G17640) ont également été étudiés.

### **2) *Montia perfoliata***

*Montia perfoliata* couramment nommé claytonia appartient à la famille *Portulacaceae*. C'est une plante de choix pour les expériences d'agroinfection et de transmission par puceron. En raison de sa bonne capacité à être infectée par agroinfiltration et en raison de la masse foliaire relativement importante qu'elle peut produire, cette plante est également utilisée pour la multiplication du virus en vue de sa purification.

### **3) *Cucumis sativus***

Le concombre (*Cucumis sativus*) de la famille des *Cucurbitaceae*, est l'un des hôtes naturels du CABYV. Au cours de ces travaux, le cultivar « Marketer » a été utilisé pour les expériences d'agroinfection.

## **4) Inoculation des plantes par la technique d'agroinfection**

Une préculture d'agrobactéries portant le plasmide d'intérêt est réalisée dans 2 ml de LB en contenant les antibiotiques adéquats pendant une nuit à 28°C. La préculture est utilisée pour ensemercer le milieu de culture LB, additionné de MES 10 mM, d'acétosyringone 20  $\mu$ M et des antibiotiques. La culture est incubée sous agitation pendant la nuit. Les bactéries sont ensuite sédimentées par une centrifugation de 10 min à 5 krpm avant d'être lavées dans un même volume d'eau. Après une nouvelle sédimentation, les bactéries sont remises en suspension dans une solution correspond à la moitié du volume initial et contenant MgCl<sub>2</sub> 10mM, MES 10 mM, Acétosyringone 150  $\mu$ M. La culture est ajustée à une DO de 600 nm comprise entre 0,5 et 1. La solution est ensuite

incubée à température ambiante pendant 1 h minimum avant d'être infiltrée à l'aide d'une seringue au niveau d'une blessure réalisée avec une lame de scalpel.

## ***F - Pucerons et expériences de transmission***

### **1) *Myzus persicae***

Les colonies du puceron vert du pêcher, *Myzus persicae* (Sulzer) sont maintenues sur des piments (*Capsicum annuum*) dans une pièce climatisée à 20 °C avec une photopériode de 16 h et une hygrométrie de 80 %. Cette espèce de puceron transmet aussi bien le TuYV que le CABYV.

### **2) *Aphis gossypii***

Pour le puceron du cotonnier, *Aphis gossypii* (Glover) les élevages sont réalisés sur des plants de concombre (*Cucumis sativus*) dans les mêmes conditions que précédemment.

## **3) Expériences de transmission par puceron**

### **a) À partir de plantes agroinfectées**

Les tests de transmission des virus à partir de plantes agroinfectées, sont réalisés après prélèvement de feuilles systémiques infectées qui sont mises en survie dans des boîtes « bonne maison ». Les pucerons provenant des élevages sont déposés sur les feuilles pendant 24 h (pour l'acquisition du TuYV) ou 48 h (pour l'acquisition du CABYV). À la fin de la période d'acquisition du virus, les pucerons sont transférés sur des plantes -tests pour la période d'inoculation du virus qui durera 4 jours. Les pucerons sont finalement éliminés par un traitement insecticide (Mévinphos, insecticide de surface ou Confidor, insecticide de surface et systémique). Les plantes sont recouvertes d'un sachet plastique de type « bread bags » afin d'éviter la dissémination de pucerons ayant survécu au traitement insecticide.

### **b) À partir de virus purifié**

Les tests de transmission des virus sont également réalisés à partir des solutions virales purifiées. Les pucerons sont déposés dans des boîtes cylindriques en plastique noir fermées qui sont ensuite recouvertes d'un Parafilm étiré. Le virus purifié, contenu dans une solution de saccharose à 30 % environ ou dilué dans le milieu nutritionnel MP148 [Harrewijn, 1983], est déposé à la surface de la membrane de Parafilm puis recouvert d'une seconde membrane étirée. Après une période d'acquisition de 24 h (pour le TuYV) ou 48 h (pour le CABYV), les pucerons sont transférés sur des plantes tests et le protocole se poursuit comme décrit dans le paragraphe précédent.

## II - Méthodes

### A - Biologie Moléculaire

L'ensemble des techniques de biologie moléculaire évoquées ci-dessous sont des techniques courantes, décrites en détail dans les manuels de laboratoires tels que le Maniatis [Maniatis, Fritsch *et al.*, 1982].

#### 1) Mutagenèse dirigée sur des fragments d'ADN par la technique de PCR et clonage du fragment mutagénisé dans un vecteur

##### a) PCR

Les réactions de PCR sont réalisées dans un volume réactionnel de 50 µl dans un thermocycleur (Mastercycler gradient, Eppendorf). L'amplification des fragments d'ADN est réalisée selon les paramètres suivants : une étape de dénaturation de 2 min à 94°C suivie d'un cycle de 15 sec à 94°C, 30 sec au T<sub>m</sub> des amorces -2°C pour l'hybridation, 45 sec à 72°C pour l'élongation. Ce cycle est répété 25 fois et se termine par 7 min d'élongation à 72°C. La réaction s'effectue avec une concentration de 0,4 µM de chacune des amorces, 200 µM de dNTPs, 1x tampon PCR et 0,4 unités de Taq polymérase. L'introduction des mutations dans le clone complet du CABYV a été réalisée par PCR en utilisant des amorces portant les mutations. Les fragments d'ADN amplifiés sont ensuite purifiés en utilisant le kit Quiagen « PCR Purification » avant d'être digérés par les enzymes adaptées au clonage.

##### b) Analyse des fragments d'ADN sur gel d'agarose

Afin d'estimer la taille ainsi que la quantité des fragments d'ADN obtenus, une migration électrophorétique sur gel d'agarose est réalisée à partir d'une fraction aliquote de la réaction. Le gel d'agarose (1 à 1,5 % en général) est préparé dans du tampon TBE 0,5X (45 mM tris-borate, 1 mM EDTA). Les échantillons d'ADN sont mélangés au tampon de charge (20 % glycérol, 1mM EDTA, 50 mM Tris ph 7,5 et 0,4 % de bleu de bromophénol), avant d'être déposés sur le gel. La migration s'effectue dans du tampon TBE 0,5X à 100V. Le gel est ensuite incubé pendant 10 min dans un bain contenant du bromure d'éthidium BET à 0,5 µg/ml, puis la visualisation des fragments d'ADN s'effectue avec un transilluminateur (GelDoc, Biorad) sous lumière ultra-violet (UV).

##### c) Digestion par des enzymes de restriction

Pour réaliser le clonage des fragments d'ADN dans un vecteur, les deux molécules sont digérées par des enzymes de restriction. Les réactions de digestion sont généralement réalisées dans un volume final de 100 µl contenant 0,1 mg/ml de BSA, le tampon approprié pour l'enzyme de restriction, et 5U d'enzyme (la moitié ajoutée à t=0, et l'autre moitié à t=1h30). La réaction a lieu pendant 3h à 37°C. Lorsque plusieurs enzymes doivent être utilisées pour le clonage et que leur tampon de digestion est différent, une déprotéinisation au phénol/chloroforme-alcool isoamylique (vol/vol) puis au chloroforme-alcool isoamylique (vol/vol) est réalisée avant de précipiter l'ADN avec un mélange d'acétate de sodium 0,3M pH 5,2 et de 2,5 vol d'éthanol à 100 %. Dix µg de glycogène peuvent éventuellement être ajoutés à l'ADN pour faciliter la sédimentation.

Après une incubation à -20°C, l'ADN est sédimenté après 45 min de centrifugation à 14 krpm, 4°C. Un lavage avec de l'éthanol à 70 % est ensuite réalisé et l'ADN est finalement repris dans de l'eau avant de procéder à la deuxième digestion enzymatique.

#### **d) Purification des fragments d'ADN**

Les fragments d'ADN digérés par les enzymes de restriction sont ensuite purifiés après migration sur un gel d'agarose. Après une incubation du gel dans un bain de BET à 50 µg/µl, les fragments d'intérêt sont excisés sous lumière UV avant d'être purifiés en utilisant le kit « Gel extraction » de Qiagen. La concentration d'ADN obtenue après purification est estimée par absorbance à une DO de 260 nm ou après migration sur gel d'agarose d'une fraction aliquote. Si nécessaire, l'ADN est concentré par précipitation en présence de 10 µg de glycogène, de 0,3M d'AcNa pH 5,2 et de 2,5 vol d'éthanol à 100 %. Après sédimentation pendant 45 min à 14 krpm, 4°C puis lavage du culot avec de l'éthanol à 70 %, celui-ci est resuspendu dans 10 µl d'eau.

#### **e) Ligation**

La ligation du plasmide linéarisé (vecteur) avec le fragment d'ADN d'intérêt (insert) a lieu lors d'une incubation la nuit à 14°C dans un volume réactionnel de 25 µl contenant :

- Vecteur : 400ng
- Insert : rapport molaire insert/vecteur comprise entre 2 et 3
- Tampon de ligation x1
- ADN ligase T4 : 1 unité

Le produit de ligation est ensuite purifié avant l'électroporation en réalisant deux extractions successives au phénol/chloroforme-alcool isoamylique et chloroforme-alcool isoamylique puis une précipitation de l'ADN dans les conditions décrites précédemment (paragraphe II-A-1-d). Le culot est repris dans 5 µl d'eau.

#### **f) Transformation de bactéries**

Deux µl du mélange de ligation sont ajoutés à 40 µl de bactéries compétentes *E. coli* DH5α et le tout est soumis à un choc électrique dans un électroporateur (BioRad) selon les conditions suivantes : 50 µF de capacité, 1,8 kV/cm de champ électrique et 200 Ω de résistance. 800 µl de milieu LB sont ensuite ajoutés aux bactéries qui sont incubées 30 min à 37 °C avant d'être étalées sur un milieu gélosé sélectif. Les boîtes sont incubées une nuit à 37°C.

Cette technique a été également appliquée pour la transformation des agrobactéries, *A. tumefaciens*, avec les plasmides binaires mais dans ce dernier cas, les conditions de culture ont été fixées à 28°C.

#### **g) Extraction des plasmides des bactéries recombinantes**

1,5 ml de milieu de culture LB contenant les antibiotiques appropriés sont ensemencés avec une colonie ayant poussé sur milieu sélectif. Après une incubation d'une nuit à 37°C. L'ADN plasmidique est soit extrait avec le kit Qiagen lorsque l'ADN doit être séquencé, soit extrait selon la méthode de « lyse alcaline » [Sambrook, Fritsch *et al.*, 1989] lorsqu'un profil électrophorétique doit être fait. Pour cette dernière méthode, les cellules

sont sédimentées par une centrifugation de 1 min à 14 krpm, 4°C et le culot est repris dans 100 µl de la solution I (50mM de glucose, 25mM de Tris-HCL pH 8,0, 10mM EDTA). 200 µl de la solution II (0,2N de NaOH, 1 % de SDS) puis 150 µl de la solution III (5M d'acétate de potassium, 11,5 % d'acide acétique) sont ajoutés au mélange. L'ADN chromosomique bactérien est sédimenté par une centrifugation de 15 min à 14 krpm, 4°C puis le surnageant est déprotéinisé par une extraction avec le mélange phénol/chloroforme-alcool isoamylique (vol/vol). La phase aqueuse est mise en présence de 2 vol d'éthanol 100 % pour entraîner la précipitation de l'ADN plasmidique qui est récupéré après une centrifugation de 15 min à 14 krpm, 4°C. Après un lavage à l'éthanol 70 %, le culot est finalement remis en suspension dans 50 µl d'eau.

## h) Construction des mutants du CABYV

Tous les mutants ponctuels ont été créés par mutagenèse dirigée par PCR en utilisant l'ADN du plasmide pCA<sub>0</sub>WT comme matrice. Les amorces mutagènes ont été conçues pour remplacer les résidus asparagine par une glutamine à la position 70 (5'AAGGACCAACTCACGGGCAGTTCC3' et 5'CCGTGAGTTGGTCCTTTGAAAATACAAATG3' pour le mutant Ngly1<sub>CP</sub>) et 178 (5'AAAGGGCAAGGATCTTCCTCGGTTG3' et 5'GAAGATCCTTGCCCTTTATAGAGGATCTT3' pour le mutant Ngly2<sub>CP</sub>) dans la séquence de la CP du CABYV et aux positions 408 (5'CTTCGTATCAATACACCGTCTCATACGG3' and 5'CGGTGTATTGATACGAAGAATCCTTCTG3' pour le mutant Ngly3<sub>RT</sub>) et 415 (5'TACGGGCAATACACGGAGAAATATTGC3' et 5'CCGTGTATTGCCCGTATGAGACGGTG3' pour le mutant Ngly4<sub>RT</sub>) au niveau de la séquence de la RT du CABYV. Les oligonucléotides CA<sub>11</sub> (nucléotides 3071 à 3088 de l'ARN du CABYV) et CA<sub>12</sub> (complémentaire aux nucléotides 40059 à 4076) ont été utilisés comme amorces externes pour réaliser les mutants dans la CP, et les oligonucléotides CA<sub>EagI</sub> (nucléotide 4261 à 4278 de l'ARN du CABYV) et CA<sub>20</sub> (complémentaire aux nucléotides 5656 à 5670) pour les mutants dans la RT. Les fragments amplifiés ont ensuite été digérés par les enzymes de restriction *EcoRI* et *EagI* pour les mutants Ngly1<sub>CP</sub> et Ngly2<sub>CP</sub>, ou par *EagI* et *SalI* pour les mutants Ngly3<sub>RT</sub> et Ngly4<sub>RT</sub>, et ensuite introduits dans le plasmide pCA<sub>0</sub>WT soumis aux mêmes enzymes de restriction. Les constructions pour l'agroinfection ont été réalisées en introduisant la séquence ADNc du CABYV dans le vecteur binaire pBin35SCA-WT [Prüfer, Wipf-Scheibel *et al.*, 1995]. Le plasmide obtenu a ensuite été introduit dans *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 [Holsters, Silva *et al.*, 1980] pour l'agroinoculation [Prüfer, Wipf-Scheibel *et al.*, 1995].

## B - Protéines

### 1) Détection des virus par la technique ELISA

La technique du DAS-ELISA est une technique immuno-enzymatique où l'antigène (dans notre cas le virus) est pris en sandwich entre 2 anticorps. Le premier anticorps dirigé contre le virus est fixé sur la plaque ELISA, tandis que le 2<sup>ème</sup> anticorps, spécifique du virus, est couplé à la phosphatase alcaline. L'hydrolyse du substrat incolore (paranitrophénol phosphate) en un produit coloré permet le dosage de l'antigène par spectrophotométrie (DO 405 nm).

200 mg de fragments de feuilles prélevés sur l'ensemble de la plante sont broyés dans 1 ml de tampon de broyage (1x PBS, 0,05 % Tween 20, 2 % PVP). Le broyat obtenu est sédimenté 5 min à 4000 rpm puis 200 µl de surnageant sont ensuite déposés dans les puits de la plaque ELISA préalablement recouverts d'anticorps dirigés contre le virus

dilués dans le tampon de coating (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub> pH 9,6) et incubés 4 h à 32°C. Après une incubation la nuit à 4°C, l'anticorps secondaire est dilué dans le tampon conjugué (1x PBS, 0,05 % Tween 20, 2 % PVP, 0,2 % ovalbumine) puis 200 µl sont déposés dans chacun des puits. L'incubation est poursuivie pendant 4h à 32°C. Après chacune des étapes décrites précédemment, trois lavages de 3 min sont réalisés dans du PBS-Tween (0,5 %). Après addition du paranitrophénol phosphate préparé à 1 mg/ml dans le tampon substrat (0,1 M Diéthanolamine pH 9,8), l'incubation est poursuivie à température ambiante et les lectures au spectrophotomètre (DO 405 nm) sont réalisées 30 min, 1 h puis 2 h après addition du substrat.

Les anticorps primaires et secondaires utilisés pour détecter le TuYV (LOEWE) et le CABYV (SEDIAG) sont dilués selon les recommandations des fournisseurs.

## 2) Purification de virus à partir de plantes agroinfectées

Les plantes infectées sont conservées à -80°C pour préserver le virus et pour faciliter le broyage des tissus lors de la purification. Comme les lutéovirus restent confinés dans les tissus conducteurs du phloème, la technique d'extraction nécessite l'utilisation d'enzymes de type cellulase et macérozyme (Onozuka R-10). Le rendement d'extraction reste cependant faible puisqu'il est de l'ordre de quelques centaines de µg de virus par kg de feuilles infectées pour le virus sauvage.

Toutes les centrifugations sont réalisées à 17°C et le stockage des suspensions se fait à température ambiante pour éviter toute précipitation du virus pendant la purification.

300 g de feuilles infectées et congelées sont broyées dans 600 ml de tampon citrate de sodium 0,1 M pH 6,0 (tampon citrate x1) contenant 0,5 % de macérozyme, 0,5 % de cellulase, 0,5 % d'éthanol et 0,1 % d'acide thioglycolique. Le broyat est incubé sous agitation pendant 4h à 25°C. 450 ml d'un mélange (vol/vol) de chloroforme et de n-butanol est ensuite ajouté et le tout est homogénéisé vigoureusement pendant 15 min. Cette émulsion est centrifugée à 10 krpm pendant 15 min. On rajoute à la phase aqueuse 4 ml de Triton X-100 (0,5 % final). Après 30 min d'agitation, du PEG 600 (8 % final) et du NaCl (0,4 M final) sont additionnés et cette préparation est mise sous agitation pendant 1 h, puis laissée au repos à température ambiante pendant une nuit. Une centrifugation de 20 min à 12 krpm est réalisée, puis les culots sont remis en suspension dans 80 ml de tampon citrate x1 contenant 5 % d'éthanol, puis laissés sous agitation pendant 1h. Après une centrifugation de 17 min à 9 krpm, le surnageant, qui contient la suspension virale, est réparti sur plusieurs coussins de saccharose à 30 % préparés dans du tampon citrate x1 contenant 0,5 % d'éthanol. Après 2h30 de centrifugation à 35 krpm, chaque culot est repris dans 200 µl de tampon citrate x1. La suspension de virus est ensuite déposée sur un gradient de saccharose (20 % à 60 %) puis centrifugée 2h30 à 35 krpm. Des fractions de 500 µl sont ensuite récupérées puis une lecture de la DO entre 230 et 300 nm est réalisée. Les fractions présentant un rapport de DO 260/280 compris entre 1,5 et 1,7 sont celles qui contiennent le virus. La concentration du virus est déterminée en appliquant la formule suivante :  $DO\ 260 / \text{coefficient d'extinction du virus} = \text{nombre de } \mu\text{g}/\mu\text{l de virus}$  ( $\epsilon = 8,6$  pour le TuYV et 8,5 pour le CABYV). Des fractions aliquotes du virus sont finalement stockées à -80°C

### **3) Préparation des échantillons de protéines**

#### **a) À partir de protoplastes**

Après 48h de culture, les protoplastes sont sédimentés et le culot est repris dans 50 µl de tampon Laemmli 2x (4 % de SDS, 20 % de glycérol, 10 % de β-mercaptoéthanol, 0,1 % de bleu de bromophénol et 125 mM de Tris-HCl pH de 6,8). Après une dénaturation de 10 min à 95°C, une fraction aliquote du mélange est déposée sur un gel de polyacrylamide.

#### **b) À partir de plantes**

200 mg de feuilles prélevés sur l'ensemble de la plante sont broyés dans 200 µl de tampon Laemmli 2x (4 % de SDS, 20 % de glycérol, 10 % de β-mercaptoéthanol, 0,1 % de bleu de bromophénol et 125 mM de Tris-HCl pH de 6,8). Le broyat est ensuite placé à 95°C pendant 10 min, puis centrifugé 5 min à 10 krpm afin de sédimenter les débris cellulaires. Environ 20 µl de surnageant sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide dénaturant comme décrit ci-dessous.

### **4) Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes (SDS-PAGE)**

Les gels sont composés d'un gel de concentration (120 mM Tris-HCl pH 6,8) contenant 5 % d'acrylamide, qui permet de concentrer les échantillons en une bande très fine et d'un gel de séparation (37 mM Tris-HCl pH 8,8) contenant 10 % d'acrylamide, qui permet de séparer les protéines selon leur poids moléculaire. L'électrophorèse est réalisée à 100V dans le tampon 25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM Glycine, 0,1 % SDS.

### **5) Coloration au bleu de Coomassie**

Les protéines séparées par SDS-PAGE sont incubées dans un bain contenant 25 % d'isopropanol, 10 % d'acide acétique et 0,5 % de bleu de Coomassie R-250. Le gel est ensuite décoloré dans de l'eau ultrapure en présence d'une éponge pour absorber le surplus de bleu de Coomassie.

### **6) Western blot**

Après séparation des protéines par électrophorèse, celles-ci sont transférées sur une membrane de nitrocellulose préalablement hydratée dans le tampon de transfert (25 mM Tris-HCl pH 8,3, 192 mM Glycine 20 % éthanol) pendant 2 h à 60 V. La membrane est ensuite saturée dans une solution de blocage (PBS 1x, 0,5 % Tween-20, 2,5 % lait) pendant au moins 1h. Ensuite, elle est incubée pendant la nuit à 4°C dans le même tampon additionné de l'anticorps primaire (voir tableau pour les facteurs de dilution des différents anticorps) dirigé contre la protéine d'intérêt. Après 3 lavages dans du PBS-Tween-20 0,5 %, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire dilué dans la solution de blocage et couplé à la peroxydase. L'incubation a lieu pendant 4 h à 4°C. Après 3 lavages dans du PBS-Tween-20 0,5 %, les protéines d'intérêt sont révélées par chimio-luminescence grâce au kit Lumi-Light PLUS (Roche) puis autoradiographié.

Les concentrations des différents anticorps utilisés sont résumées dans le tableau suivant.

Anticorps utilisé	Détection	Facteur de dilution
IgG1	Particules du CABYV	2000 <sup>ème</sup>
Clavier	Partie C-terminale de la RT du CABYV	25000 <sup>ème</sup>
Clopinette	CP du CABYV	2000 <sup>ème</sup>

Tampon PBS 10x (pH 7,4) : 20mM de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 100mM de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 27mM de KCl et 1,37M de NaCl.

## C - Analyse des acides nucléiques

### 1) Extraction d'ARN à partir de protoplastes ou de plants de *M. perfoliata*

Après sédimentation des protoplastes, le culot est remis en suspension dans la solution RLT du kit Rneasy (Qiagen) et soumis pendant 1 min à un broyage à l'aide d'un pilon motorisé. L'extraction des ARN totaux se poursuit ensuite comme décrit par le fournisseur. L'extraction d'ARN total de plantes infectées est réalisée à partir de 100 mg de feuilles réduits en poudre dans de l'azote liquide. Après addition de la solution RLT du kit Rneasy (Qiagen), le protocole se déroule selon les recommandations du fournisseur.

### 2) Extraction d'ARN à partir de concombre

200 mg de feuilles de *Cucumis sativus* sont prélevés sur l'ensemble de la plante. Le broyage des échantillons est effectué dans un mortier avec 400 µl de tampon de broyage (1 M glycine, 1 M NaCl, 0,1M EDTA et 1 % SDS) et 200 µl de Tris-phénol pH 8,0. Après une centrifugation à 14 krpm, 5 min, 4°C, le surnageant est prélevé et additionné à 1 volume de chloroforme-alcool isoamylique. Une nouvelle centrifugation à 14 krpm, 5 min, 4°C est réalisée et la phase aqueuse est additionnée à 1 volume d'éthanol à 100 %. Après une incubation d'au moins 30 min à -20°C, le culot d'ARN est récupéré après une centrifugation à 14 krpm, 45 min, 4°C. Le culot est finalement remis en suspension dans 30 µl d' $\text{H}_2\text{O}$  RNase free après un dernier lavage avec de l'éthanol à 70 %.

### 3) Préparation de sondes à ARN marquées à la digoxigénine

La synthèse d'une sonde ARN spécifique du CABYV marquée à la digoxigénine et complémentaire de l'extrémité 3' de l'ARN viral a été obtenue à partir d'un plasmide contenant l'extrémité 3' du génome du CABYV. Après linéarisation de ce plasmide par l'enzyme *Sall*, 1 µg est placé dans le tampon de transcription du kit DIG RNA labeling mix (Roche) en présence de digoxigénine-11-UTP et d'ARN polymérase du bactériophage T3 (Promega) selon les recommandations du fournisseur. La sonde ainsi obtenue est conservée à -20°C.

#### 4) Northern blot

Dix µg d'ARN totaux ou la totalité des ARN extraits de 500 000 protoplastes sont dénaturés 10 min à 65°C dans 2 volumes de tampon de dénaturation (MOPS 1x, 40 % formamide désionisée, 6 % formaldéhyde, 50 ng BET, bleu de bromophénol). Les échantillons sont déposés sur un gel d'agarose à 1 % préparé dans des conditions dénaturantes (formaldéhyde 6,5 %, MOPS 1x). La migration s'effectue à 50 V dans du tampon MOPS 1x.

L'excès de formaldéhyde est éliminé par un lavage du gel de 20 min dans du SSC 20x. Les ARN sont ensuite transférés par capillarité sur une membrane de nylon chargée positivement (Roche) pendant une nuit dans du tampon SSC 20x. Après transfert, les ARNs sont fixés à la membrane par une irradiation aux UV.

La membrane est ensuite pré-hybridée à 68°C pendant 1 h dans 10 ml de tampon DIG Easy (Boehringer) puis hybridée la nuit à 68°C dans 5 ml du même tampon contenant 2 µl de sonde marquée à la digoxygénine, dénaturée au préalable 5 min à 99°C. La membrane est ensuite lavée deux fois 5 min à température ambiante dans du tampon SSC 2x, SDS 0,1 % puis deux fois 15 min à 68°C dans du tampon SSC 0,1x, SDS 0,1 %. Après un équilibrage de la membrane dans un tampon maléique (0,1 M Acide maléique, 0,15 M NaCl pH 7,5), Tween-20 0,3 %, la membrane est saturée 1 h à température ambiante dans un tampon de blocage (Tampon maléique, 1 % Réactif Block de Boehringer). L'incubation avec des anticorps anti-digoxygénine couplés à la phosphatase alcaline est réalisée pendant 1 h sous agitation douce. Après 2 lavages de 15 min dans le tampon maléique, 0,3 % tween-20, la membrane est équilibrée 2 min dans le tampon de détection (0,1 M Tris-HCl pH 9,5, 0,1 M NaCl) puis incubée 5 min à l'obscurité en présence du substrat chimioluminescent, le CDP-Star (Boehringer). Les ARNs viraux sont ensuite visualisés par autoradiographie.

Composition du tampon 20x SSC : 3 M NaCl, 300 mM citrate trisodique.

#### 5) Test de sensibilité aux RNases

Afin d'analyser la stabilité des particules virales des différents mutants obtenus, un test de sensibilité aux RNases endogènes a été réalisé. Il consiste à extraire sur le même échantillon, les ARN totaux et les ARN encapsidés. Un northern blot est ensuite réalisé afin de comparer l'accumulation de ces ARNs.

##### a) Extraction des ARN totaux

200 mg de feuilles sont prélevés sur l'ensemble de la plante puis broyés en présence de 400 µl de tampon de broyage (200 mM Tris-HCl pH 9,0, 400 mM KCl, 200 mM saccharose, 35 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM EDTA). Ce tampon de force ionique et de pH élevé inhibe l'action des RNases susceptibles d'être libérées lors du broyage. Après une déprotéinisation de l'échantillon avec des extractions successives avec les mélanges phénol, phénol/chloroforme-alcool isoamylique puis chloroforme-alcool isoamylique (cette dernière extraction étant répétée deux fois), les acides nucléiques recueillis dans la phase aqueuse après une centrifugation de 10 min à 14 krpm 4°C sont ensuite précipités dans 2 vol d'éthanol 100 %. Après centrifugation de 45 min à 14 krpm 4°C, le culot est repris dans de l'acétate de sodium 3M pour solubiliser l'ADN et les petits ARN (ARNt, ARN 5S). Les ARN ribosomiques (ARNr), messagers (ARNm) et viraux, insolubles sont

récupérés par centrifugation de 30 min à 14 krpm 4°C, remis en suspension dans 100 µl d'eau RNase free et précipités à nouveau avec 2,5 vol d'éthanol à 100 %. Après une incubation à -20°C suivie d'une centrifugation de 45 min à 14 krpm 4°C, un lavage dans 800 µl d'éthanol 70 % est réalisé avant de reprendre le culot dans 20 µl d'eau Rnase free. Une estimation de la quantité et de la qualité des ARNs obtenus est ensuite réalisée par lecture de la DO à 260 nm et calcul du rapport de la DO à 260 nm/DO à 280nm (Nanodrop).

### **b) Extraction des ARN encapsidés**

L'extraction des ARN encapsidés est réalisée d'une manière identique à celle décrite dans le paragraphe précédent à l'exception de la composition du tampon de broyage (50 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) qui est compatible avec l'action des RNases qui est réalisée au cours d'une incubation de 30 min à 37°C.

## **6) Analyse de la descendance virale par RT-PCR**

Pour étudier la stabilité des mutations dans la descendance des virus dans les plantes agroinfectées ou infectées par puceron, l'ARN total est extrait à partir de ces plantes avant d'être utilisé dans l'étape de transcription réverse [Brault, Van den Heuvel *et al.*, 1995]. Cinq à 10 µg d'ARN totaux sont dénaturés en présence de 20 µmoles d'un oligonucléotide approprié par chauffage à 80°C pendant 2 min. Une solution d'hybridation (50 mM Tris-HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM dNTPs, 10 unités de Rnasine et 1 unité de transcriptase reverse) est ensuite additionnée au mélange et l'incubation est poursuivie 1 h à 42°C. Pour les mutants Ngly1<sub>CP</sub> et Ngly2<sub>CP</sub>, la RT a été réalisée avec l'oligonucléotide CA<sub>08</sub> (complémentaire des nucléotides 4088 à 4105), et le produit PCR a été synthétisé avec l'ajout de l'oligonucléotide CA<sub>07</sub> (nt 3505 à 3520). Pour les mutants Ngly1<sub>CP</sub> et Ngly2<sub>CP</sub>, la RT a été réalisée avec l'oligonucléotide CA<sub>20</sub> (complémentaire des nucléotides 5656 à 5670), et le produit PCR a été synthétisé après l'ajout de l'oligonucléotide CA<sub>EagI</sub> (nt 4261 à 4278). Le produit PCR a ensuite été digéré avec les enzymes de restriction appropriées (le nombre entre parenthèses indique la position de chaque site de restriction): *Bam*HI(4006)/*Eco*RI(4544), *Eag*I (4268)/*Sal*I(5669) selon le mutant à analyser. Les fragments ont ensuite été introduits dans le plasmide pBluescript KS+ (Stratagene, Heidelberg, Allemagne) digéré au préalable avec les enzymes appropriées, et les séquences insérées ont ensuite été séquencées.

## **7) qRT-PCR**

Pour les analyses par RT-PCR quantitative (qRT-PCR), les pucerons ont été mis en acquisition sur une solution de CABYV purifié (50µg/ml) pendant 24 h avant d'être transférés vers des plants de *M. perfoliata* sains pendant 4 jours afin de vider le tube digestif des virions libres. Une acquisition similaire a été réalisée après ajout de 30 µg de PP2-A1 purifiée d'*A. thaliana* ou de 30 µg de BSA à la solution de CABYV purifié. L'ARN total a ensuite été extrait à partir de lots de 10 pucerons (RNeasy Plant Mini kit, Qiagen). La quantité d'ARN dans les échantillons a été déterminée par lecture de la DO<sub>260nm</sub> (Nanodrop, ThermoScientific). Des oligonucléotides spécifiques ont été utilisés pour amplifier une séquence de 180 pb dans le gène de la CP du CABYV (nucléotides 3149 à 3328).

12,5 ng d'ARN total dans un milieu de réaction de 25 µl ont été soumis à une RT-PCR en une étape en utilisant le kit Quantitect SYBR Green RT-PCR (Qiagen), contenant 2 transcriptases inverses (Omniscript et Sensiscript) et une ADN polymérase (HotStart-

Taq) aux concentrations recommandées par les fabricants et en présence des oligonucléotides (concentration finale 0,5 µM). La RT-PCR a été réalisée avec le system iCycler IQ (BioRad). Les cycles PCR réalisés ont été les suivants : 1 cycle de 30 min à 50°C et 15 min à 95°C, suivi de 40 cycles de 15 s à 94°C, 30 s à 55°C et 30 s à 72°C. La quantification absolue a été réalisée en utilisant une série de dilutions contenant de 10<sup>3</sup> à 10<sup>8</sup> copies d'ARN viral préparé à partir de virions purifiés de CABYV.

## **D - Analyse de la glycosylation**

### **1) Par l'utilisation du kit ProQ Emerald**

Les protéines virales sont tout d'abord séparées sur un gel SDS-PAGE à 10 % d'acrylamide. Les gels sont incubés dans un premier temps dans 100 ml d'une solution de fixation contenant 50 % de méthanol et 5 % d'acide acétique pendant 1h, puis dans une solution de fixation fraîche pendant la nuit. Les gels sont ensuite lavés deux fois dans 50 % de méthanol pendant 30 min puis trois fois dans 3 % d'acide acétique pendant 5-10 min. Les glycanes sont ensuite oxydés par une incubation dans 1 % d'acide périodique pendant 20 min. Après 4 lavages des gels dans 3 % d'acide acétique pendant 5-10 min une incubation dans une solution contenant le colorant ProQ Emerald 488 est réalisée pendant 30-120 min. La solution contenant le ProQ Emerald est préparée extemporanément avec une dilution au 1/50<sup>ème</sup>. Le gel est finalement incubé dans 3 % d'acide acétique pendant 5-10 min puis rincé brièvement à l'eau.

## **E - Divers**

### **1) Analyse *in silico* des protéines**

SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) a été utilisé pour identifier les séquences signales d'adressage vers les membranes sur les protéines structurales des polérovirus. ScanProsite (<http://www.expasy.ch/tools/scanprosite/>) a été utilisé pour identifier les sites potentiels de N-glycosylation, et NetOGlyc 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) a été utilisé pour prédire les sites potentiels de O-glycosylation par une N-acétylgalactosamine sur les séquences des protéines structurales des polérovirus.

### **8) Immunoprécipitation**

Dans un tube Eppendorf de 2 ml, on ajoute 5 µl d'anticorps à la solution de virus purifié. On procède ensuite à une incubation sur la nuit à 4°C sur roue rotative. Après avoir ajoutés 20 µl de billes de sépharose/protéine A, l'incubation est poursuivie pendant 4 h à 4°C sur la roue. On réalise ensuite une centrifugation de 3 min, 1000 rpm à 4°C pour sédimenter les billes qui sont finalement resuspendues dans 200 µl de tampon de lavage (20mM TrisHCl ph 8, 125mM NaCl, 10 % NP-40, 1 % NP-40, 2mM EDTA). Cette étape est réalisée trois fois avant d'ajouter 30 µl de tampon Laemmli 2X. Le mélange est ensuite dénaturé par une incubation pendant 10 min à 100°C. Les protéines sont ensuite séparées sur un gel SDS-PAGE avant d'être analysées par western blot.

## 9) IC-RT-PCR

200 mg de fragments de feuilles prélevés sur l'ensemble de la plante sont broyés dans 1 ml de tampon de broyage (1x PBS, 0,05 % Tween 20, 2 % PVP). Le broyat obtenu est sédimenté 5 min à 4000 rpm puis 200 µl de surnageant sont ensuite déposés dans les puits de la plaque ELISA préalablement recouverts d'anticorps dirigés contre le virus dans le tampon de coating (15 mM Na<sub>2</sub> CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub> pH 9,6) et incubés 4 h à 32°C. Après une incubation la nuit à 4°C, on réalise trois lavage dans du PBS-Tween (0,5 %), puis on ajoute 10 µl d'une solution de Triton X-100 à 1 % dans chacun des puits. La plaque est incubée pendant 210 secondes à 80°C. Dix µl d'un mélange réactionnel pour la transcription réverse sont ensuite ajoutés dans chacun des puits et l'incubation est poursuivie pendant 1h à 42°C. La réaction de PCR est ensuite réalisée dans des tubes comme décrit précédemment.



# Références

- Abou-Jawdah, Y., H. Sobh and A. Fayyad** (1997). "First Report of Cucurbit Aphid-borne Yellow's Luteovirus in Lebanon." *Plant Disease* **81**(11): 1331-1331.
- Aguilar, H., K. Matreyek, C. Filone, et al.** (2006). "N-glycans on Nipah virus fusion protein protect against neutralization but reduce membrane fusion and viral entry." *Journal of virology* **80**(10): 4878.
- Ahlquist, P., A. O. Noueir, W. M. Lee, et al.** (2003). "Host factors in positive-strand RNA virus genome replication." *J Virol* **77**(15): 8181-6.
- Allen, E., S. Wang and W. A. Miller** (1999). "Barley yellow dwarf virus RNA requires a cap-independent translation sequence because it lacks a 5' cap." *Virology* **253**(2): 139-44.
- Allison, R., W. Dougherty, T. Parks, et al.** (1985). "Biochemical analysis of the capsid protein gene and capsid protein of tobacco etch virus: N-terminal amino acids are located on the virion's surface." *Virology* **147**(2): 309.
- Altmann, F. and G. Lomonosoff** (2000). "Glycosylation of the capsid proteins of cowpea mosaic virus: a reinvestigation shows the absence of sugar residues." *Journal of general Virology* **81**(4): 1111.
- Anandalakshmi, R., G. Pruss, X. Ge, et al.** (1998). "A viral suppressor of gene silencing in plants." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**(22): 13079.
- Arabidopsis, G.** (2000). "Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*." *Nature* **408**(6814): 796.
- Ashoub, A., W. Rohde and D. Pruffer** (1998). "In planta transcription of a second subgenomic RNA increases the complexity of the subgroup 2 luteovirus genome." *Nucleic acids research* **26**(2): 420.
- Bahner, I., J. Lamb, M. Mayo, et al.** (1990). "Expression of the genome of potato leafroll virus: readthrough of the coat protein termination codon in vivo." *Journal of General Virology* **71**(10): 2251.
- Balachandran, S., Y. Xiang, C. Schobert, et al.** (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**(25): 14150-5.
- Bar-Joseph, M., R. Marcus and R. Lee** (1989). "The continuous challenge of citrus tristeza virus control." *Annual Review of Phytopathology* **27**(1): 291-316.
- Baulcombe, D.** (2004). "RNA silencing in plants." *Nature* **431**(7006): 356-363.
- Baumann, P., L. Baumann, C. Lai, et al.** (1995). "Genetics, physiology, and evolutionary relationships of the genus *Buchnera*: intracellular symbionts of aphids." *Annual Reviews in Microbiology* **49**(1): 55-94.
- Baumberger, N., C. Tsai, M. Lie, et al.** (2007). "The Polerovirus silencing suppressor P0 targets ARGONAUTE proteins for degradation." *Current Biology* **17**(18): 1609-1614.
- Beasley, D., M. Whiteman, S. Zhang, et al.** (2005). "Envelope protein glycosylation status influences mouse neuroinvasion phenotype of genetic lineage 1 West Nile virus strains." *Journal of virology* **79**(13): 8339.
- Bencharki, B.** (2010). "Phloem protein partners of Curcubit aphid borne yellows virus: possible involvement of phloem PP2 lectins in virus transmission by aphids " *MPMI sous-presse*.
- Beneteau J, L. T., Renard D, Vilaine F, Batailler B, Dinant S** (2009). "Functionnal characterisation of the Arabidopsis Phloem Protein 2 (PP2-A1) lectin reveals a role in plant architecture and development." *Soumis*.

- Blanc, S., E. Ammar, S. Garcia-Lampasona, et al.** (1998). "Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets." Journal of General Virology **79**(12): 3119.
- Bortolamiol, D., M. Pazhouhandeh, K. Marrocco, et al.** (2007). "The polerovirus F box protein P0 targets ARGONAUTE1 to suppress RNA silencing." Current Biology **17**(18): 1615-1621.
- Boubourakas, I., A. Avgelis, P. Kyriakopoulou, et al.** (2006). "Occurrence of yellowing viruses (Beet pseudo-yellows virus, Cucurbit yellow stunting disorder virus and Cucurbit aphid-borne yellows virus) affecting cucurbits in Greece." Plant Pathology **55**(2): 276-283.
- Brault, V., M. Bergdoll, J. Mutterer, 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." Journal of virology **77**(5): 3247-3256.
- Brault, V., É. Herrbach and C. Reinbold** (2007). "Electron microscopy studies on luteovirid transmission by aphids." Micron **38**(3): 302-312.
- Brault, V., J. Mutterer, D. Scheidecker, 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." Journal of virology **74**(3): 1140.
- Brault, V., J. Mutterer, D. Scheidecker, 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." Journal of virology **74**(3): 1140-1148.
- Brault, V., S. Perigon, C. Reinbold, et al.** (2005). "The polerovirus minor capsid protein determines vector specificity and intestinal tropism in the aphid." The Journal of Virology **79**(15): 9685.
- Brault, V., S. Tanguy, C. Reinbold, et al.** (2010). "Transcriptomic analysis of intestinal genes following acquisition of pea enation mosaic virus by the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*." J Gen Virol **91**(Pt 3): 802-8.
- Brault, V., J. Van den Heuvel, M. Verbeek, et al.** (1995). "Aphid transmission of beet western yellows luteovirus requires the minor capsid read-through protein P74." The EMBO Journal **14**(4): 650.
- Brigneti, G., O. Voinnet, W. Li, et al.** (1998). "Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*." The EMBO Journal **17**(22): 6739.
- Brown, C., S. Dinesh-Kumar and W. Miller** (1996). "Local and distant sequences are required for efficient readthrough of the barley yellow dwarf virus PAV coat protein gene stop codon." The Journal of Virology **70**(9): 5884.
- Bruyere, A., V. Brault, V. Ziegler-Graff, 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**(2): 323-334.
- Bruyère, A., V. Brault, V. Ziegler-Graff, 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**(2): 323-334.
- Canto, T. and P. Palukaitis** (1999). "Are Tubules Generated by the 3a Protein Necessary for Cucumber Mosaic Virus Movement?" Molecular Plant-Microbe Interactions **12**(11): 985-993.

- Carrington, J., K. Kasschau, S. Mahajan, et al.** (1996). "Cell-to-cell and long-distance transport of viruses in plants." *The plant cell* **8**(10): 1669.
- Chay, C., U. Gunasinge, S. Dinesh-Kumar, et al.** (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**(1): 57-65.
- Chen, B. and R. Francki** (1990). "Cucumovirus transmission by the aphid *Myzus persicae* is determined solely by the viral coat protein." *Journal of general Virology* **71**(4): 939.
- Choi, D. S., H. Young, T. McMahon, et al.** (2003). "The mouse RACK1 gene is regulated by nuclear factor-kappa B and contributes to cell survival." *Mol Pharmacol* **64**(6): 1541-8.
- Citovsky, V., B. McLean, J. Zupan, et al.** (1993). "Phosphorylation of tobacco mosaic virus cell-to-cell movement protein by a developmentally regulated plant cell wall-associated protein kinase." *Genes & development* **7**(5): 904.
- Citovsky, V. and P. Zambryski** (1991). "How do plant virus nucleic acids move through intercellular connections?" *Bioessays* **13**(8): 373-379.
- Cristofolletti, P. T., A. F. Ribeiro, C. Deraison, et al.** (2003). "Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*." *J Insect Physiol* **49**(1): 11-24.
- Cronin, S., J. Verchot, R. Haldeman-Cahill, et al.** (1995). "Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase." *The Plant Cell Online* **7**(5): 549.
- de Jesus Perez, J., S. Juarez, D. Chen, et al.** (2006). "Mapping of two O-GlcNAc modification sites in the capsid protein of the potyvirus Plum pox virus." *FEBS Lett* **580**(25): 5822-8.
- Dogimont, C., A. Bussemakers, J. Martin, et al.** (1997). "Two complementary recessive genes conferring resistance to Cucurbit Aphid Borne Yellows Luteovirus in an Indian melon line (*Cucumis melo* L.)." *Euphytica* **96**(3): 391-395.
- Drucker, M., R. Froissart, E. Hébrard, et al.** (2002). "Intracellular distribution of viral gene products regulates a complex mechanism of cauliflower mosaic virus acquisition by its aphid vector." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**(4): 2422.
- Edson, C.** (1993). "Tyrosine sulfation of varicella-zoster virus envelope glycoprotein gpl." *Virology*(New York, NY) **197**(1): 159-165.
- Estes, M. and J. Cohen** (1989). "Rotavirus gene structure and function." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **53**(4): 410.
- Fackler, O., N. Kienzle, E. Kremmer, et al.** (1997). "Association of human immunodeficiency virus Nef protein with actin is myristoylation dependent and influences its subcellular localization." *European Journal of Biochemistry* **247**(3): 843-851.
- Faye, L., V. Gomord, A. Fitchettelaine, et al.** (1993). "Affinity purification of antibodies specific for Asn-linked glycans containing 1 3 fucose or 1 2 xylose." *Analytical biochemistry* **209**(1): 104-108.
- Fenouillet, E., J. Gluckman and E. Bahraoui** (1990). "Role of N-linked glycans of envelope glycoproteins in infectivity of human immunodeficiency virus type 1." *Journal of virology* **64**(6): 2841.
- Fernandez-Fernandez, M. R., E. Camafeita, P. Bonay, et al.** (2002). "The capsid protein of a plant single-stranded RNA virus is modified by O-linked N-acetylglucosamine." *J Biol Chem* **277**(1): 135-40.

- Filhol, O. and C. Cochet** (2009). "Protein kinase CK2 in health and disease: Cellular functions of protein kinase CK2: a dynamic affair." Cell Mol Life Sci **66**(11-12): 1830-9.
- Fitchette-Laine, A., V. Gomord, M. Cabanes, et al.** (1997). "N-glycans harboring the Lewis a epitope are expressed at the surface of plant cells." The Plant Journal **12**(6): 1411-1417.
- Franz, A., F. van der Wilk, M. Verbeek, et al.** (1999). "Faba bean necrotic yellows virus (genus Nanovirus) requires a helper factor for its aphid transmission." Virology **262**(1): 210-219.
- Frischknecht, F., V. Moreau, S. Rottger, et al.** (1999). "Actin-based motility of vaccinia virus mimics receptor tyrosine kinase signalling." Nature **401**(6756): 926-928.
- Gaedigk, K., G. Adam and K. Mundry** (1986). "The spike protein of potato yellow dwarf virus and its functional role in the infection of insect vector cells." Journal of general Virology **67**(12): 2763.
- Gaudin, Y., C. Tuffereau, P. Durrer, et al.** (1999). "Rabies virus-induced membrane fusion." Molecular membrane biology **16**(1): 21-31.
- Gera, A., G. Loebenstein and B. Raccah** (1979). "Protein coats of two strains of cucumber mosaic virus affect transmission by *Aphis gossypii*." Phytopathology **69**: 396-399.
- Gildow, F.** (1999). "Luteovirus transmission and mechanisms regulating vector specificity." The Luteoviridae: 88-113.
- Gildow, F., V. Damsteegt, A. Stone, et al.** (2000). "Virus-vector cell interactions regulating transmission specificity of soybean dwarf luteoviruses." Journal of Phytopathology **148**(6): 333-342.
- Gildow, F. and S. Gray** (1993). "The aphid salivary gland basal lamina as a selective barrier associated with vector-specific transmission of barley yellow dwarf luteoviruses." Phytopathology (USA).
- Gildow, F., B. Reavy, M. Mayo, et al.** (2000). "Aphid acquisition and cellular transport of potato leafroll virus-like particles lacking P5 readthrough protein." Phytopathology **90**(10): 1153-1161.
- Golecki, B., A. Schulz and G. Thompson** (1999). "Translocation of structural P proteins in the phloem." The Plant Cell Online **11**(1): 127.
- Gómez, G. and V. Pallás** (2001). "Identification of an in vitro ribonucleoprotein complex between a viroid RNA and a phloem protein from cucumber plants." Molecular Plant-Microbe Interactions **14**(7): 910-913.
- Gottlieb, T. A., I. E. Ivanov, M. Adesnik, et al.** (1993). "Actin microfilaments play a critical role in endocytosis at the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells." J Cell Biol **120**(3): 695-710.
- Govier, D., B. Kassanis and T. Pirone** (1977). "Partial purification and characterization of the potato virus Y helper component." Virology **78**(1): 306.
- Graff, J., Y. Zhou, U. Torian, et al.** (2008). "Mutations within potential glycosylation sites in the capsid protein of hepatitis E virus prevent the formation of infectious virus particles." The Journal of Virology **82**(3): 1185.
- Graichen, K. and F. Rabenstein** (1996). "European isolates of beet western yellows virus(BWYV) from oilseed rape(*Brassica napus* L. ssp. *napus*) are non-pathogenic on sugar beet(*Beta vulgaris* L. var. *Altissima*) but represent isolates of turnip yellows virus(TuYV)." Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz(1970) **103**(3): 233-245.

- Gray, S. and F. Gildow** (2003). "Luteovirus-aphid interactions." Annual Review of Phytopathology **41**: 539-566.
- Guilley, H., C. Wipf-Scheibel, K. Richards, et al.** (1994). "Nucleotide sequence of cucurbit aphid-borne yellows luteovirus." Virology **202**(2): 1012.
- Habili, N. and R. Symons** (1989). "Evolutionary relationship between luteoviruses and other RNA plant viruses based on sequence motifs in their putative RNA polymerases and nucleic acid helicases." Nucleic acids research **17**(23): 9543.
- Harrewijn, P.** (1983). "The effect of cultural measures on behaviour and population development of potato aphids and transmission of viruses." Mededelingen van de Faculteit Landbouwwetenschappen Rijksuniversiteit Gent **48**: 791-799.
- Harris, K.** (1977). "An ingestion-egestion hypothesis of noncirculative virus transmission." Aphids as virus vectors In Aphid as Virus Vectors: 165.
- Harrison, B., D. Robinson and D. Tyrrell** (1988). "Molecular Variation in Vector-Borne Plant Viruses: Epidemiological [and Discussion] Significance." Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences: 447-462.
- Hart, G., K. Greis, L. Dong, et al.** (1995). "O-linked N-acetylglucosamine: the "yin-yang" of Ser/Thr phosphorylation? Nuclear and cytoplasmic glycosylation." Advances in experimental medicine and biology **376**: 115.
- Haupt, S., T. Stroganova, E. Ryabov, et al.** (2005). "Nucleolar localization of potato leafroll virus capsid proteins." Journal of General Virology **86**(10): 2891.
- Hebrard, E., Y. Bessin, T. Michon, et al.** (2009). "Intrinsic disorder in Viral Proteins Genome-Linked: experimental and predictive analyses." Virol J **6**: 23.
- Hofius, D., K. Herbers, M. Melzer, 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." The Plant Journal **28**(5): 529-543.
- Hogenhout, S. A., D. Ammar el, A. E. Whitfield, et al.** (2008). "Insect vector interactions with persistently transmitted viruses." Annual Review of Phytopathology **46**: 327-59.
- Holsters, M., B. Silva, F. Van Vliet, et al.** (1980). "The functional organization of the nopaline Agrobacterium tumefaciens plasmid pTiC58." Plasmid (USA).
- Huang, L. F., M. Naylor, D. W. Pallett, et al.** (2005). "The complete genome sequence, organization and affinities of carrot red leaf virus." Arch Virol **150**(9): 1845-55.
- Ivanov, K., P. Puustinen, R. Gabrenaite, et al.** (2003). "Phosphorylation of the potyvirus capsid protein by protein kinase CK2 and its relevance for virus infection." The Plant Cell Online **15**(9): 2124.
- Jaag, H., L. Kawchuk, W. Rohde, et al.** (2003). "An unusual internal ribosomal entry site of inverted symmetry directs expression of a potato leafroll polerovirus replication-associated protein." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(15): 8939.
- Jakubiec, A. and I. Jupin** (2007). "Regulation of positive-strand RNA virus replication: the emerging role of phosphorylation." Virus Research **129**(2): 73-79.
- Jansen, K., C. Wolfs, H. Lohuis, et al.** (1998). "Characterization of the Brome Mosaic Virus Movement Protein Expressed in E. coli." Virology **242**(2): 387-394.
- Jin, H., K. Subbarao, S. Bagai, et al.** (1996). "Palmitoylation of the influenza virus hemagglutinin (H3) is not essential for virus assembly or infectivity." The Journal of Virology **70**(3): 1406.

- Johansson, M., A. Brooks, D. Jans, et al.** (2001). "A small region of the dengue virus-encoded RNA-dependent RNA polymerase, NS5, confers interaction with both the nuclear transport receptor importin- $\beta$  and the viral helicase, NS3." Journal of general Virology **82**(4): 735.
- Jolly, C. and M. Mayo** (1994). "Changes in the amino acid sequence of the coat protein readthrough domain of potato leafroll luteovirus affect the formation of an epitope and aphid transmission." Virology(New York, NY) **201**(1): 182-185.
- Juarez, M., V. Truniger and M. Aranda** (2004). "First Report of Cucurbit aphid-borne yellows virus in Spain." Plant Disease **88**(8): 907-907.
- Kabcenell, A. and P. Atkinson** (1985). "Processing of the rough endoplasmic reticulum membrane glycoproteins of rotavirus SA11." Journal of cell Biology **101**(4): 1270.
- Kapoor, M., L. Zhang, M. Ramachandra, et al.** (1995). "Association between NS3 and NS5 proteins of dengue virus type 2 in the putative RNA replicase is linked to differential phosphorylation of NS5." J Biol Chem **270**(32): 19100-6.
- Karpova, O., K. Ivanov, N. Rodionova, et al.** (1997). "Nontranslatability and Dissimilar Behavior in Plants and Protoplasts of Viral RNA and Movement Protein Complexes Formed in Vitro." Virology **230**(1): 11-21.
- Karpova, O., N. Rodionova, K. Ivanov, et al.** (1999). "Phosphorylation of tobacco mosaic virus movement protein abolishes its translation repressing ability." Virology **261**(1): 20-24.
- Kassanis, B. and D. Govier** (1971). "New evidence on the mechanism of aphid transmission of potato C and potato aucuba mosaic viruses." Journal of general Virology **10**(1): 99.
- Kasschau, K. and J. Carrington** (1998). "A Counterdefensive Strategy of Plant Viruses:: Suppression of Posttranscriptional Gene Silencing." Cell **95**(4): 461-470.
- Kasschau, K., S. Cronin and J. Carrington** (1997). "Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase." Virology **228**(2): 251-262.
- Kassem, M., R. Sempere, M. Juárez, et al.** (2007). "Cucurbit aphid-borne yellows virus is prevalent in field-grown cucurbit crops of southeastern Spain." Plant Disease **91**(3): 232-238.
- Kawakami, S., H. Padgett, D. Hosokawa, et al.** (1999). "Phosphorylation and/or presence of serine 37 in the movement protein of tomato mosaic tobamovirus is essential for intracellular localization and stability in vivo." Journal of virology **73**(8): 6831.
- Kennedy, J., M. Day and V. Eastop** (1962). A conspectus of aphids as vectors of plant viruses, CAB-Commonwealth Institute of Entomology. London. GB.
- Kim, S., S. MacFarlane, N. Kalinina, et al.** (2007). "Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(26): 11115.
- Kim, S., P. Palukaitis and Y. Park** (2002). "Phosphorylation of cucumber mosaic virus RNA polymerase 2a protein inhibits formation of replicase complex." The EMBO Journal **21**(9): 2292.
- Kneller, E. L., A. M. Rakotondrafara and W. A. Miller** (2006). "Cap-independent translation of plant viral RNAs." Virus Res **119**(1): 63-75.
- Korber, B., B. Gaschen, K. Yusim, et al.** (2001). "Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation." British medical bulletin **58**(1): 19.

- Krausslich, H., C. Holscher, Q. Reuer, et al.** (1990). "Myristoylation of the poliovirus polyprotein is required for proteolytic processing of the capsid and for viral infectivity." *Journal of virology* **64**(5): 2433.
- Lad, V., V. Shende, A. Gupta, et al.** (2000). "Effect of tunicamycin on expression of epitopes on Japanese encephalitis virus glycoprotein E in porcine kidney cells." *Acta virologica* **44**(6): 359-364.
- Lafon, M.** (2005). "Rabies virus receptors." *Journal of neurovirology* **11**(1): 82-87.
- Lecoq, H., D. Bourdin, C. Wipf-Scheibel, et al.** (1992). "A new yellowing disease of cucurbits caused by a luteovirus, cucurbit aphid-borne yellows virus." *Plant Pathology* **41**(6): 749-761.
- Lecoq, H., S. Cohen, M. Pitrat, et al.** (1979). "Resistance to cucumber mosaic virus transmission by aphids [*Myzus persicae* and *Aphis gossypii*] in *Cucumis melo* [Muskmelon]." *Phytopathology (USA)*.
- Lee, L., P. Palukaitis and S. Gray** (2002). "Host-dependent requirement for the Potato leafroll virus 17-kDa protein in virus movement." *Molecular Plant-Microbe Interactions* **15**(10): 1086-1094.
- Leh, V., E. Jacquot, A. Geldreich, et al.** (2001). "Interaction between the open reading frame III product and the coat protein is required for transmission of cauliflower mosaic virus by aphids." *Journal of virology* **75**(1): 100.
- Lemaire, O., W. Gubler, J. Valencia, et al.** (1993). "First Report of Cucurbit Aphid-borne Yellows Luteovirus in the United States." *PLANT DISEASE-STPAUL-* **77**: 1169-1169.
- Lerouge, P., M. Cabanes-Macheteau, C. Rayon, et al.** (1998). "N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends." *Plant molecular biology* **38**(1): 31-48.
- Lin, H. C., K. Tsai, B. L. Chang, et al.** (2003). "Prediction of tyrosine sulfation sites in animal viruses." *Biochem Biophys Res Commun* **312**(4): 1154-8.
- Lontok, E., E. Corse and C. Machamer** (2004). "Intracellular targeting signals contribute to localization of coronavirus spike proteins near the virus assembly site." *The Journal of Virology* **78**(11): 5913.
- Ludlow, J. and R. Consigli** (1987). "Polyomavirus major capsid protein VP1 is modified by tyrosine sulfuration." *Journal of virology* **61**(5): 1708.
- Maia, I., A. Haenni and F. Bernardi** (1996). "Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein." *Journal of general Virology* **77**(7): 1335.
- Maniatis, T., E. Fritsch and J. Sambrook** (1982). *Molecular cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Cold Spring Harbor, NY.
- Manning, G., D. Whyte, R. Martinez, et al.** (2002). "The protein kinase complement of the human genome." *Science* **298**(5600): 1912.
- Marc, D., G. Masson, M. Girard, et al.** (1990). "Lack of myristoylation of poliovirus capsid polypeptide VP0 prevents the formation of virions or results in the assembly of noninfectious virus particles." *Journal of virology* **64**(9): 4099.
- Matsushita, Y., M. Ohshima, K. Yoshioka, et al.** (2003). "The catalytic subunit of protein kinase CK2 phosphorylates in vitro the movement protein of Tomato mosaic virus." *Journal of general Virology* **84**(2): 497.
- Mayo, M.** (2002). "virology division news: ICTV at the Paris ICV: Results of the Plenary Session and the Binomial Ballot." *Archives of virology* **147**(11): 2254-2260.
- Meggio, F. and L. Pinna** (2003). "One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2?" *The FASEB Journal* **17**(3): 349.

- Melikyan, G., R. Markosyan, H. Hemmati, et al.** (2000). "Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion." Journal of cell Biology **151**(2): 413.
- Minic, Z., E. Jamet, L. Négroni, et al.** (2007). "A sub-proteome of Arabidopsis thaliana mature stems trapped on Concanavalin A is enriched in cell wall glycoside hydrolases." Journal of Experimental Botany.
- Mnari Hattab, M., J. Kummert, S. Roussel, et al.** (2005). "First Report of Cucurbit aphid-borne yellows virus in Tunisia Causing Yellows on Five Cucurbitaceous Species." Plant Disease **89**(7): 776-776.
- Montefiori, D., W. Robinson and W. Mitchell** (1988). "Role of protein N-glycosylation in pathogenesis of human immunodeficiency virus type 1." Proceedings of the National Academy of Sciences **85**(23): 9248.
- Moreno, A., E. Hebrard, M. Uzest, et al.** (2005). "A single amino acid position in the helper component of cauliflower mosaic virus can change the spectrum of transmitting vector species." The Journal of Virology **79**(21): 13587.
- Mossop, D. and R. Francki** (1977). "Association of RNA 3 with aphid transmission of cucumber mosaic virus." Virology **81**(1): 177.
- Munsch, M.** (2004). "Contribution à l'étude de la dérégulation des glycosyl-hydrolases dans les interactions Polerovirus/plantes." Rapport de DEA.
- Mutterer, J., C. Stussi-Garaud, P. Michler, et al.** (1999). "Role of the beet western yellows virus readthrough protein in virus movement in Nicotiana clevelandii." Journal of general Virology **80**(10): 2771.
- Nault, L.** (1997). "Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis." Annals of the Entomological Society of America **90**(5): 521-541.
- Ng, J. C. and B. W. Falk** (2006). "Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses." Annu Rev Phytopathol **44**: 183-212.
- Ohtsuki, K., T. Maekawa, S. Harada, et al.** (1998). "Biochemical characterization of HIV-1 Rev as a potent activator of casein kinase II in vitro." FEBS letters **428**(3): 235-240.
- Owens, R., M. Blackburn and B. Ding** (2001). "Possible involvement of the phloem lectin in long-distance viroid movement." Molecular Plant-Microbe Interactions **14**(7): 905-909.
- Pal, R., M. Reitz JR, E. Tschachler, et al.** (1990). "Myristoylation of gag proteins of HIV-1 plays an important role in virus assembly." AIDS Research and Human Retroviruses **6**(6): 721-730.
- Papayiannis, L., N. Ioannou, I. Boubourakas, et al.** (2005). "Incidence of Viruses Infecting Cucurbits in Cyprus." Journal of Phytopathology **153**(9): 530-535.
- Papura, D., E. Jacquot, C. Dedryver, et al.** (2002). "Two-dimensional electrophoresis of proteins discriminates aphid clones of Sitobion avenae differing in BYDV-PAV transmission." Archives of virology **147**(10): 1881-1898.
- Partridge, J., L. Shannon, D. Gumpf, et al.** (1974). "Glycoprotein in the capsid of plant viruses as a possible determinant of seed transmissibility." Nature **247**.
- Paul, A., A. Schultz, S. Pincus, et al.** (1987). "Capsid protein VP4 of poliovirus is N-myristoylated." Proceedings of the National Academy of Sciences **84**(22): 7827.
- Pazhouhandeh, M., M. Dieterle, K. Marrocco, et al.** (2006). "F-box-like domain in the polerovirus protein P0 is required for silencing suppressor function." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(6): 1994.

- Peng, Y., D. Kadoury, A. Gal-On, et al.** (1998). "Mutations in the HC-Pro gene of zucchini yellow mosaic potyvirus: effects on aphid transmission and binding to purified virions." *Journal of General Virology* **79**(4): 897.
- Perry, K., L. Zhang and P. Palukaitis** (1998). "Amino acid changes in the coat protein of cucumber mosaic virus differentially affect transmission by the aphids *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*." *Virology* **242**(1): 204-210.
- Perry, K., L. Zhang, M. Shintaku, et al.** (1994). "Mapping determinants in cucumber mosaic virus for transmission by *Aphis gossypii*." *Virology* **205**(2): 591-595.
- Peter, K., D. Liang, P. Palukaitis, et al.** (2008). "Small deletions in the potato leafroll virus readthrough protein affect particle morphology, aphid transmission, virus movement and accumulation." *Journal of general Virology* **89**(8): 2037.
- Peter, K. A., F. Gildow, P. Palukaitis, et al.** (2009). "The C terminus of the polerovirus p5 readthrough domain limits virus infection to the phloem." *J Virol* **83**(11): 5419-29.
- Petit, C., V. Chouljenko, A. Iyer, et al.** (2007). "Palmitoylation of the cysteine-rich endodomain of the SARS-coronavirus spike glycoprotein is important for spike-mediated cell fusion." *Virology* **360**(2): 264-274.
- Petit, C., J. Melancon, V. Chouljenko, et al.** (2005). "Genetic analysis of the SARS-coronavirus spike glycoprotein functional domains involved in cell-surface expression and cell-to-cell fusion." *Virology* **341**(2): 215-230.
- Pfeffer, S., P. Dunoyer, F. Heim, et al.** (2002). "P0 of Beet western yellows virus is a suppressor of posttranscriptional gene silencing." *Journal of virology* **76**(13): 6815.
- Pirone, T.** (1964). "Aphid transmission of a purified stylet-borne virus acquired through a membrane." *Virology* **23**: 107-108.
- Plisson, C., M. Uzest, M. Drucker, et al.** (2005). "Structure of the mature P3-virus particle complex of cauliflower mosaic virus revealed by cryo-electron microscopy." *Journal of molecular biology* **346**(1): 267-277.
- Prüfer, D., C. Wipf-Scheibel, K. Richards, et al.** (1995). "Synthesis of a full-length infectious cDNA clone of cucurbit aphid-borne yellows virus and its use in gene exchange experiments with structural proteins from other luteoviruses." *Virology* **214**(1): 150-158.
- Pulmanusahakul, R., J. Li, M. Schnell, et al.** (2008). "The glycoprotein and the matrix protein of rabies virus affect pathogenicity by regulating viral replication and facilitating cell-to-cell spread." *Journal of virology* **82**(5): 2330.
- Randles, J. W.** (1983). *Current Topics in Vector Research* **1**: 169.
- Reinbold, C., F. Gildow, E. Herrbach, et al.** (2001). "Studies on the role of the minor capsid protein in transport of Beet western yellows virus through *Myzus persicae*." *Journal of General Virology* **82**(8): 1995.
- Reinbold, C., E. Herrbach and V. Brault** (2003). "Posterior midgut and hindgut are both sites of acquisition of Cucurbit aphid-borne yellows virus in *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*." *Journal of General Virology* **84**(12): 3473.
- Reutenauer, A., V. Ziegler-Graff, H. Lot, et al.** (1993). "Identification of beet western yellows luteovirus genes implicated in viral replication and particle morphogenesis." *Virology* **195**(2): 692-699.
- Rose, J., G. Adams and C. Gallione** (1984). "The presence of cysteine in the cytoplasmic domain of the vesicular stomatitis virus glycoprotein is required for palmitate addition." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **81**(7): 2050.

- Rouso, I., M. Mixon, B. Chen, et al.** (2000). "Palmitoylation of the HIV-1 envelope glycoprotein is critical for viral infectivity." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(25): 13523.
- Ryabov, E., D. Robinson and M. Taliansky** (1999). "A plant virus-encoded protein facilitates long-distance movement of heterologous viral RNA." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(4): 1212.
- Sagar, M., X. Wu, S. Lee, et al.** (2006). "Human immunodeficiency virus type 1 V1-V2 envelope loop sequences expand and add glycosylation sites over the course of infection, and these modifications affect antibody neutralization sensitivity." Journal of virology **80**(19): 9586.
- Saint-Jore-Dupas, C., L. Faye and V. Gomord** (2007). "From planta to pharma with glycosylation in the toolbox." Trends in Biotechnology **25**(7): 317-323.
- Sambrook, J., E. Fritsch and T. Maniatis** (1989). Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press Cold Spring Harbor, NY.
- Schmitz, J., C. Stussi-Garaud, E. Tacke, et al.** (1997). "In Situ Localization of the Putative Movement Protein (pr17) from Potato Leafroll Luteovirus (PLRV) in Infected and Transgenic Potato Plants." Virology **235**(2): 311-322.
- Scholthof, H., K. Scholthof, M. Kikkert, et al.** (1995). "Tomato bushy stunt virus spread is regulated by two nested genes that function in cell-to-cell movement and host-dependent systemic invasion." Virology **213**(2): 425-438.
- Seddas, P. and S. Boissinot** (2006). "Glycosylation of beet western yellows virus proteins is implicated in the aphid transmission of the virus." Archives of virology **151**(5): 967-984.
- Seddas, P., S. Boissinot, J. Strub, et al.** (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**(2): 399-412.
- Shapka, N., J. Stork and P. Nagy** (2005). "Phosphorylation of the p33 replication protein of Cucumber necrosis tobravirus adjacent to the RNA binding site affects viral RNA replication." Virology **343**(1): 65-78.
- Shukla, D., P. Strike, S. Tracy, et al.** (1988). "The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the N terminus contains the major virus-specific epitopes." Journal of general Virology **69**(7): 1497.
- Sirover, M. A.** (1999). "New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase." Biochim Biophys Acta **1432**(2): 159-84.
- Sokolova, M., D. Prüfer, E. Tacke, et al.** (1997). "The potato leafroll virus 17K movement protein is phosphorylated by a membrane-associated protein kinase from potato with biochemical features of protein kinase C." FEBS letters **400**(2): 201-205.
- Suzuki, M., M. Yoshida, T. Yoshinuma, et al.** (2003). "Interaction of replicase components between Cucumber mosaic virus and Peanut stunt virus." Journal of general Virology **84**(7): 1931.
- Tacke, E., J. Schmitz, D. Pruffer, et al.** (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**(1): 274-82.
- Taliansky, M., I. M. Roberts, N. Kalinina, et al.** (2003). "An umbraviral protein, involved in long-distance RNA movement, binds viral RNA and forms unique, protective ribonucleoprotein complexes." J Virol **77**(5): 3031-40.

- Taliansky, M. and D. Robinson** (2003). "Molecular biology of umbraviruses: phantom warriors." *Journal of general Virology* **84**(8): 1951.
- Tamborindeguy, C., Monsion, B., Brault, V., Hunnicutt, L., Ju, H.J., Nakabachi A. and Van Fleet, E.** (2010). "A genomic analysis of virus transcytosis in the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*." *Insect Molecular Biology*.
- Terauchi, H., K. Honda, N. Yamagishi, et al.** (2003). "The N-terminal region of the readthrough domain is closely related to aphid vector specificity of Soybean dwarf virus." *Phytopathology* **93**(12): 1560-1564.
- Terradot, L., M. Souchet, V. Tran, et al.** (2001). "Analysis of a three-dimensional structure of Potato leafroll virus coat protein obtained by homology modeling." *Virology* **286**(1): 72-82.
- Tesar, M., X. JIA, D. Summers, et al.** (1993). "Analysis of a potential myristoylation site in hepatitis A virus capsid protein VP 4." *Virology(New York, NY)* **194**(2): 616-626.
- The International Aphid Genomics, C.** (2010). "Genome Sequence of the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum*." *PLoS Biol* **8**(2): e1000313.
- Thornbury, D., G. Hellmann, R. Rhoads, et al.** (1985). "Purification and characterization of potyvirus helper component." *Virology* **144**(1): 260.
- Tomassoli, L. and M. Meneghini** (2007). "First report of Cucurbit aphid-borne yellows virus in Italy." *Plant Pathology* **56**(4): 720.
- Torres, C. and G. Hart** (1984). "Topography and polypeptide distribution of terminal N-acetylglucosamine residues on the surfaces of intact lymphocytes." *J. Biol. Chem* **259**(5): 3308-3317.
- Uzest, M., D. Gargani, M. Drucker, et al.** (2007). "A protein key to plant virus transmission at the tip of the insect vector stylet." *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**(46): 17959.
- Van den Heuvel, J., T. Boerma and D. Peters** (1991). "Transmission of potato leafroll virus from plants and artificial diets by *Myzus persicae*." *Phytopathology* **81**(2): 150-154.
- Van den Heuvel, J., A. Bruyere, S. Hogenhout, 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." *Journal of virology* **71**(10): 7258.
- van den Heuvel, J., M. Verbeek and F. van der Wilk** (1994). "Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*." *Journal of General Virology* **75**(10): 2559.
- van Lent, J., M. Storms, F. van der Meer, et al.** (1991). "Tubular structures involved in movement of cowpea mosaic virus are also formed in infected cowpea protoplasts." *Journal of General Virology* **72**(11): 2615.
- Veidt, I., H. Lot, M. Leiser, et al.** (1988). "Nucleotide sequence of beet western yellows virus RNA." *Nucleic acids research* **16**(21): 9917.
- Vogel, F., D. Hofius and U. Sonnewald** (2007). "Intracellular trafficking of Potato leafroll virus movement protein in transgenic Arabidopsis." *Traffic* **8**(9): 1205-14.
- Wagmann, E., S. Ueki, K. Trutnyeva, et al.** (2004). "The ins and outs of nondestructive cell-to-cell and systemic movement of plant viruses." *Critical Reviews in Plant Sciences* **23**(3): 195-250.
- Watanabe, Y., T. Ogawa and Y. Okada** (1992). "In vivo phosphorylation of the 30-kDa protein of tobacco mosaic virus." *FEBS letters* **313**(2): 181.

- Watson, M. and F. Roberts** (1939). "A comparative study of the transmission of Hyoscyamus virus 3, potato virus Y and cucumber virus 1 by the vectors *Myzus persicae* (Sulz), *M. circumflexus* (Buckton), and *Macrosiphum gei* (Koch)." Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences **127**(849): 543-576.
- Wolf, S., C. Deom, R. Beachy, et al.** (1989). "Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit." Science **246**(4928): 377-379.
- Wolk, T. and M. Schreiber** (2006). "N-Glycans in the gp120 V1/V2 domain of the HIV-1 strain NL4-3 are indispensable for viral infectivity and resistance against antibody neutralization." Medical microbiology and immunology **195**(3): 165-172.
- Xiang, H., Q. Shang, C. Han, et al.** (2008). "First report on the occurrence of Cucurbit aphid-borne yellows virus on nine cucurbitaceous species in China." Plant Pathology **57**(2): 390.
- Yang, X., T. Thannhauser, M. Burrows, et al.** (2008). "Coupling genetics and proteomics to identify aphid proteins associated with vector-specific transmission of Polerovirus (Luteoviridae)." Journal of virology **82**(1): 291.
- Yardimci, N. and H. Ozgonen** (2007). "First report of Cucurbit aphid-borne yellows virus in Turkey." Australasian Plant Disease Notes **2**(59).
- Yu, G. and R. Felsted** (1992). "Effect of myristoylation on p27 nef subcellular distribution and suppression of HIV-LTR transcription." Virology **187**(1): 46.
- Yu, G. Y., K. J. Lee, L. Gao, et al.** (2006). "Palmitoylation and polymerization of hepatitis C virus NS4B protein." J Virol **80**(12): 6013-23.
- Ziegler-Graff, V., V. Brault, J. Mutterer, 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." Molecular Plant Microbe Interactions **9**: 501-510.



# Annexes



**Phloem protein partners of *Curcurbit aphid borne yellows virus*: possible involvement of phloem proteins in virus transmission by aphids**

<sup>1</sup>\*B. Bencharki, <sup>1</sup>S. Boissinot, <sup>1</sup>S. Revollon, <sup>4</sup>V. Ziegler-Graff, <sup>1</sup>M. Erdinger, <sup>1</sup>L. Wiss, <sup>2</sup>S. Dinant, <sup>3</sup>D. Renard, <sup>1</sup>M. Beuve, <sup>5</sup>†C. Lemaitre-Guillier, and <sup>1</sup>‡V. Brault

<sup>1</sup>INRA Université de Strasbourg UMR SVQV, 28 rue de Herrlisheim BP 20507, 68021 Colmar, France

<sup>2</sup>INRA UR501 Laboratoire de Biologie Cellulaire, Institut Jean Pierre Bourgin route de Saint-Cyr, 78026 Versailles, France

<sup>3</sup>INRA UR1268 Biopolymères, Interactions Assemblages, rue de la Géraudière BP 71627, 44316 Nantes, France

<sup>4</sup>CNRS-IBMP Département de Virologie, 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg, France

<sup>5</sup>Plateforme Protéomique de l'Esplanade, 15 rue Descartes, 67084 Strasbourg, France

Present address : \*Université Hassan 1<sup>er</sup>, Faculté des Sciences et Techniques Département de Biologie Appliquée et Agro-alimentaire BP 577, Settat 26000, Maroc ; †UMR PME INRA-CNRS-Université de Bourgogne, 17 rue Sully BP 86510, 21065 Dijon, France

‡corresponding author

[veronique.brault@colmar.inra.fr](mailto:veronique.brault@colmar.inra.fr)

**Abstract :**

Poleroviruses are phytoviruses strictly transmitted by phloem-feeding aphids in a circulative and non-propagative mode. During ingestion, aphids sample virions in sieve tubes along with sap. Therefore, any sap protein bound to virions will be acquired by the insects and could potentially be involved in the transmission process. By developing *in vitro* virus-overlay assays on sap proteins collected from cucumber, we observed that about twenty proteins were able to bind to purified particles of *Cucurbit aphid borne yellows virus* (CABYV). Among them, eight proteins were identified by mass spectrometry. The role of two candidates belonging to the PP2-like family (predominant lectins found in cucurbit sap) in aphid transmission was further pursued by using purified orthologous PP2 proteins from *Arabidopsis*. Addition of these proteins to the virus suspension in the aphid artificial diet greatly increased virus transmission rate. This shift was correlated with an increase in the number of viral genomes in insect cells and to an increase of virion stability *in vitro*. Surprisingly, increase of the virus transmission rate was also monitored after addition of unrelated proteins in the aphid diet, suggesting that any soluble protein at sufficient high concentration in the diet and acquired together with virions could stimulate virus transmission.

**Introduction**

The plant vascular tissue is a crucial compartment that poleroviruses (*Luteoviridae*, *Polerovirus*) exploit both to multiply and to invade distant part of the plant. Virus replication takes place in the nucleus-containing phloem parenchyma and companion

cells which surround the enucleate sieve elements (SE). Long-distance movement of virions occurs via the sieve tubes, formed by connecting SE (Talianky and Barker, 1999). Virus particles have been observed in the branched plasmodesmata connecting companion cells and SE (Esau and Hoefert, 1972; D'Arcy and De Zoeten, 1979; Shepardson et al., 1980; Mutterer et al., 1999), suggesting that virions are the infectious entity moving over long distances. For their transmission from plant to plant, virus particles are taken up exclusively from SE by the phloem-feeding aphids during sap ingestion. Members of the *Luteoviridae* family (called hereafter luteovirids) are transmitted in a persistent and circulative mode by aphids and successively cross the intestinal and accessory salivary gland cell epithelia by transcytosis before being released into a healthy plant together with saliva (Gildow, 1999; Brault et al., 2007) during a subsequent feed. Luteovirids have icosahedral particles which enclose a single-stranded RNA genome of about 6 kb. The virions are composed of two structural proteins, multiple copies of the major coat protein (or CP) and a few copies of a minor component (readthrough protein or RT protein). The RT protein is a fusion protein containing the CP at its N-terminus and a RT domain at its C-terminus. Both proteins are required for aphid transmission and are also involved in virus movement in plant (Brault et al., 1995; Chay et al., 1996; Brault et al., 2003; Peter et al., 2008). The RT protein has also been implicated in limitation of the virions to the vascular tissue (Peter et al., 2009).

Research in recent years has identified in phloem sap a plethora of small molecules including sugars, amino acids and phytohormones as well macromolecules such as RNAs and proteins (for reviews see Lough and Lucas, 2006; Kehr and Buhtz, 2008; Turgeon and Wolf, 2009). The non-cell autonomous nature of these macromolecules has been the subject of particular recent attention since it has been demonstrated that some of them are able to move over long distances in sieve tubes (Golecki et al., 1999; Aoki et al., 2005), potentially acting as regulators in distant cells or as shuttles for any interacting molecules. Several hundred proteins have been identified in the sap of different plant species (Fisher et al., 1992; Nakamura et al., 1993; Walz et al., 2002; Barnes et al., 2004; Walz et al., 2004; Giavalisco et al., 2006; Lin et al., 2009). Because mature SE are deprived of functional translation machinery, the most likely synthesis sites of phloem sap proteins are either immature SE or adjacent companion cells. Specialized branched plasmodesmata connecting SE and companion cells display the ability to mediate trafficking of proteins of up to 67 kDa (Stadler et al., 2005), a size exclusion limit which largely exceeds the size exclusion limit (approximately 1 kDa) of plasmodesmata interconnecting mesophyll cells (Wolf et al., 1989). Thus, most proteins synthesized in the companion cells could diffuse through these widened plasmodesmata into the SE. Moreover, microinjection experiments have revealed that some phloem sap proteins can significantly increase the size exclusion limit of mesophyll plasmodesmata (Balachandran et al., 1997; Ishiwatari et al., 1998). If this property can be extrapolated to plasmodesmata connecting phloem cells, phloem proteins contained in sap could further facilitate protein exchanges between SE and companion cells.

Roles have already been assigned to some phloem sap proteins. For example, an antioxidant defense mechanism has been observed in *Cucumis sativus* and *Cucurbita maxima* sieve tubes (Walz et al., 2002). There is evidence that two abundant phloem proteins (PP1 and PP2) associate following wounding to plug the SE (Read and Northcote, 1983; Schulz, 1986). Phloem proteins are also thought to play an important role in transporting RNA molecules to their destination sites (Xoconostle-Cazares et al., 1999; Xoconostle-Cazares et al., 2000; Yoo et al., 2004; Gomez et al., 2005). Finally, some

proteins, such as the protein encoded by the *FLOWERING LOCUS T*, act as signals for developmental switches transmitted from the leaves to the meristems (Corbesier et al., 2007). The functions of most of the other phloem proteins are still unknown but there is speculation that many are implicated in long distance signaling, development, stress and defense reactions (Ruiz-Medrano et al., 2001; Van Bel, 2003; Lough and Lucas, 2006).

A few studies reported that phloem proteins can bind to pathogens like phytoviruses or viroids: The phloem protein 1-homolog from *Cucumis melo* was shown to bind *Cucumber mosaic virus* particles *in vivo* and to increase virus stability (Requena et al., 2006). Two predominant lectins in cucumber sap, belonging to the phloem-protein 2 family (PP2), were also shown to bind to viroids and virus RNA *in vitro* and *in vivo* (Gomez and Pallas, 2001; Owens et al., 2001; Gomez and Pallas, 2004), a property that was proposed to facilitate long distance movement of these entities. As the SE is not only used by luteovirids to move over long distances but also contains the virus stock for phloem-feeding insects, we reasoned that phloem proteins might not only have an effect on virus movement *in planta*, but could play a role in aphid transmission of these viruses as well. Implication of plant proteins in the aphid transmission process is so far limited to the non-persistently transmitted *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). Recent work by Martinière et al. (2009) showed that specific interactions between host proteins involved in microtubule genesis together with viral determinants are implicated in the formation of specialized structures required for vector transmission (Drucker et al., 2002; Khelifa et al., 2007).

In the present study, we have shown that several proteins from cucumber SE can interact with *Cucurbit aphid borne yellows virus* (CABYV, Lecoq et al., 1992). We have further observed that phloem lectins can stimulate virus transmission by aphid when mixed with virus in an artificial diet and have a protective activity of the virions against *in vitro* degradation. However, this effect on virus transmission rate was not restricted to plant lectins and could be extended to various non plant proteins suggesting that any protein present in phloem sap in sufficient high concentration could stimulate virus transmission by aphids.

## Results

### Identification of phloem sap protein partners of CABYV

Our knowledge concerning luteovirids transmission by aphids is at present limited to the identification of viral proteins essential for virus acquisition, retention and transport through the aphid and to the identification of several aphid proteins which could be involved in the transmission process (Brault et al., 1995; Brault et al., 2000; Gildow et al., 2000; Reinbold et al., 2001; Peter et al., 2008; Yang et al., 2008). This study was designed to identify cucumber sap proteins that can bind purified polerovirus particles with the idea that such proteins could be putatively involved in aphid transmission. Interaction of CABYV virions with phloem sap proteins was evaluated using a virus-overlay assay on crude sap protein extract collected by exudation from cucumber. This plant species is particularly well adapted to sap collection as highlighted by the abundant literature reporting identification of cucurbit sap proteins (for a review, see Kehr, 2006). Moreover, CABYV particles can be detected in sap extract collected from infected plants (data not shown), in agreement with previous observations of virus-like particles in SEs of other plant species (Esau and Hoefert, 1972; D'Arcy and De Zoeten, 1979; Shepardson et al., 1980; Mutterer et al., 1999). Three hundred micrograms of phloem sap proteins were separated by 2D-gel electrophoresis prior to electro-blotting and incubation with

purified virions in the conditions described in Material & Methods. The blot was then incubated with CABYV-specific antiserum and the proteins exhibiting the ability to bind purified CABYV were excised from a duplicate gel loaded in parallel with the same extract. A unique profile of spots corresponding to CABYV-interacting proteins was not observed among the five independent experiments performed with phloem sap collected over a 4 month-period. However, in four of the five experiments, a very strong signal was observed that corresponded to one or several proteins migrating between 18-22 kDa (see arrowhead in Figure 1A for the most typical result). The absence of such a signal in the fifth experiment was likely due to the range of molecular weights (MW) covered by the separation in the gel (Figure 1C). Note that the labelled spots marked with asterisks in Figure 1A and 1C are due to nonspecific reactions with CABYV specific antibodies as they are also observed when the virus-overlay was omitted from the experimental protocol (Figure S1A). The virus binding proteins migrating at around 18-22 kDa were extracted from a replicate 2D-gel loaded in parallel and stained with Colloidal blue. As shown in Figure 1B, the proteins corresponding to the 18-22 kDa strong signal exhibited a closely spaced tetrad-like arrangement that facilitated their localization and excision. After trypsin digestion, the resulting peptides were analysed by mass spectrometry (MALDI-MS or nano LC-MS/MS) and referenced to databases (Table 1, Table S1). Although not all the proteins of the tetrad could be identified with confidence, one spot could be assigned by nano LC-MS/MS to the 17 kDa phloem lectin from *C. sativus* (Table S1). The sequencing also revealed the presence of an additional non-identified protein. Therefore, identification of the 17 kDa protein is still hypothetical and indicated as nonidentified in Table 1. However, as the four proteins in the tetrad are in close proximity, the observed signal could be due to an interaction between CABYV virions and one or more unidentified proteins from the tetrad. Other signals (for instance those corresponding to the 32-34 kDa or the 24-27 kDa proteins respectively in Figure 1A and 1C) were less reproducibly observed (in two experiments out of the 5 performed, Table 1). The three spots corresponding to 32-34 kDa proteins (one example in Figure 1A; the spot is labeled by an open arrow) did not give any mass spectrometry identification, probably because of a lack of sequence homology to proteins in the available databases, whereas among the five signals that appeared between 24 and 27 kDa (open arrows on Figure 1C), the cucumber phloem lectin of 26 kDa was identified twice with a sequence coverage of 37 to 68% (Table 1). The signal corresponding to the 26 kDa phloem lectin appeared on two blots as a succession of 3 to 4 spots that all gave similar protein identification (an example is shown in Figure 1C). Identification of CABYV partners was further pursued using fractions of sap proteins obtained after size fractionation by exclusion chromatography (Figure 2). Phloem sap proteins were collected by exudation as above before being deposited on the exclusion chromatography column. The proteins collected in each fraction were first concentrated before being separated by 1D-gel electrophoresis (20 µg per lane). It is interesting to note that mixtures of proteins of different sizes were present in most of the fractions (Figure 2B) suggesting the existence of protein complexes in sap exudates. Nine independent sap protein fractionation experiments were performed over a five-month period and these protein extracts were then used in the virus-overlay assays. Similarly to the previous experiments in which the sap proteins were separated on a 2D-gel electrophoresis prior to virus-overlay assay, the nine experiments performed with proteins separated on a 1D-gel did not produce a unique CABYV-binding proteins profile. Figure 2A shows one example of reactions obtained after incubation of the phloem sap proteins with purified virions. Whereas the CABYV antiserum reacted

nonspecifically with phloem sap proteins of about 35 kDa (Figure S1B), a total of about fourteen proteins, ranging from 16 kDa to about 100 kDa, displayed a capacity to bind specifically to CABYV particles in the nine experiments performed (Table 2). The most reproducible interactions with the CABYV virions (signals observed in 8 out of 9 experiments) were mainly observed in two fractions ranging from 12 to 14 with proteins exhibiting a MW between 22 and 29 kDa (plain arrows in Figure 2A). The corresponding bands were extracted from a replicate gel and further processed for mass spectrometry identification. Among the candidates, we found the lectin CsLec26 from *C. sativus* previously identified by 2D-gel overlay assay (see above), an ascorbate peroxidase and a protein with homology to a protein of unknown function from *Oryza sativa* (Figure 2B). Additional proteins with MWs between 22 and 29 kDa that interacted with CABYV could not be identified by mass spectrometry due to absence of sequence homology in the databases. Others reproducible signals (observed in 3 out of 9 experiments) occurred at a MW range of 16 to 19 kDa in fractions 16 or 17 and of 53 to 57 kDa in fractions 11 or 12 (open arrows in Figure 2B). The spots corresponded to the lectin CsLec17, the Csf-2 protein, a translationally controlled tumor related-protein, and a hypothetical protein from *C. melo* similar to a hydroxymethyltransferase from *A. thaliana*. This last protein exhibited a higher MW than the homologous protein in *C. melo* (35 kDa). An additional less reproducible band was observed at about 100 kDa in fraction 12 (in 2 experiments out of 9) and could be assigned by mass spectrometry to a lipoxygenase (Table 2).

### **Effect of phloem sap proteins on CABYV transmission**

To analyze the effect of phloem sap components on virus transmission by aphids, purified CABYV preparations were supplemented with phloem exudates collected from healthy cucumbers. The mixture was deposited between two stretched Parafilm® membranes that aphids can puncture to feed and acquire the virus. Virus transmission parameters (virus concentration, acquisition access period (AAP) and number of aphids transferred per plant) were adjusted so as to obtain a basal transmission efficiency ranging from 0 to 13% when no additional substance was added (Table 3). Cucumber crude sap extract was collected from several plants combined and mixed with the virus preparation. In five independent experiments (Exp. 1-5, Table 3), virus transmission rates of the purified CABYV alone varied from 0 to 12% (average 6%) whereas the transmission rates shifted to 28 to 93% (average 60%) after addition of sap content. When sap was collected from individual plants and mixed with purified virus, the stimulatory effect of phloem exudates varied considerably between plants (Table 3, Exp. 6-9). These variations could be due to the position on the plant where sap was collected because depending on the rate of exudation flow, sap was collected at different sites along the cucumber stem in the different plants. We have found that protein concentration in SE varies considerably depending on the leaf position where sap was collected (Figure S2) although no obvious difference in protein composition was observed (data not shown). This variation in protein concentration could explain the difference in the transmission rates among the different plants although we cannot exclude an additional effect of the protein content, the protein aggregation state or the presence of other sap compounds.

To further evaluate the role of sap protein composition on CABYV transmission, phloem sap proteins were fractionated by size exclusion column chromatography and

concentrated. Three separate fractionation experiments were conducted and 30 to 40 µg of proteins of each fraction were added to the purified virus before being delivered to aphids. Note that the protein concentration in the aphid diet in these experiments was much lower than that used in the previous transmission experiments with whole sap extracts in which about 150 to 200 µg of sap proteins were added in the diet.

As shown in Figure 3, half of the protein fractions of experiment 1 (Exp. 1, 8 fractions out of 18 tested) had a mild to strong stimulatory effect on virus transmission compared with “NP” sample containing only purified virus, while the remaining protein fractions did not alter the transmission rate. This effect may be attributed to the presence of specific sap proteins in certain fractions. This is particularly striking with proteins contained in fraction 17 of two independent experiments, which shifted the aphid transmission rate from 0 to 29% (Exp. 2) or 71% (Exp. 1). In experiment 3, on the other hand, the stimulatory effect was mainly elicited by proteins contained in fractions 12, 16 and 20 (Figure 3). Analysis by SDS-PAGE of the protein composition of the three sap fractions that predominantly increased transmission efficiency, revealed the presence of low MW proteins (less than 17 kDa to 33 kDa) in fractions 16 and 17 and additional proteins of higher MW, including a major band at about 100 kDa, in fraction 12 (Figure S3). It is interesting to note that the experimental MW of more than half of the proteins identified by virus-overlay assay that exhibited the ability to bind CABYV ranged between 17 to 24 kDa and that a lipoxygenase of about 100 kDa was also identified by virus-overlay assay (see Tables 1 & 2).

### **Role of phloem proteins in CABYV transmission by aphids**

To confirm a stimulatory effect of some phloem proteins on viral transmission, we selected the two phloem lectins CsLec17 and CsLec26 identified as CABYV potential partners by virus overlay assays (see before) for additional experimentation. These two proteins belong to the Phloem Protein 2 (PP2) family (Dinant et al., 2003). Their close orthologs in *A. thaliana*, AtPP2-A1 and -A2, display the same domain organization and share over 38% similarity. The transcription pattern of *AtPP2-A1* and *AtPP2-A2* genes is restricted to the companion cell-SE complexes, as shown for CsLec26 and CsLec17 (Dinant et al., 2003), and *AtPP2-A1* exhibits identical lectin activity to its orthologous protein in cucumber (Beneteau et al., 2009). Together these data provide strong evidence that both cucumber and Arabidopsis PP2 proteins share identical functions in the phloem.

To test the effect of the *A. thaliana* PP2 lectins on CABYV transmission, we purified AtPP2-A1 et -A2 proteins from recombinant *E. coli* (Beneteau et al., 2009). The recombinant AtPP2-A1 and -A2 proteins contained a 6 histidine C-terminal extension and were purified on a nickel affinity column. As previously, the transmission parameters were fixed to obtain a basal virus transmission rate (2.7%) in the absence of any compound added to the virus solution (virus concentration 50 µg/ml, 24h AAP and 10 aphids transferred per plant). When these parameters were modified to 100 µg/ml for the virus concentration, 48h for the AAP and 20 aphids per test plant, the transmission efficiency raised to 80% (Table 4). In the low transmission conditions, addition of 30 µg of either AtPP2-A1 or -A2 to the virus in the aphid diet increased the transmission rate to 70.5 and 90%, respectively (Table 4). This enhancement in the virus transmission rate was similarly observed when AtPP2-A1 was added to a purified suspension of TuYV, another polerovirus transmitted by aphids and also able to infect *A. thaliana* (Table 4). Finally, to establish if this effect on virus transmission was specific to

phloem proteins, different purified proteins from various origins were added to the aphid diet. As shown in Table 4, virus transmission rate also increased when BSA, casein, lyzosome, cytochrome c or carbonic anhydrase were mixed to the virus. In contrast, addition of two other lectins from *Lens culinaris* (LcH) or from *Maclura pomifera* (MPA) did not induce a stimulation of virus transmission by aphids. This experiment suggests that the enhancement of transmission by added proteins may be more complex than originally thought.

Despite the apparent aspecific enhancement of transmission provided by different proteins, we performed additional experiments with AtPP2-A1. First, we evaluated the effect of this protein on the stability of the virions. Viral particles mixed with AtPP2-A1 were submitted to an RNase treatment using increasing concentrations of RNase A (Figure 4). This treatment should induce a partial degradation of any viral RNA which is poorly protected by the capsid. The protected RNA was extracted and amplified by RT-PCR. We observed that the PCR-amplified virus fragment was more abundant when AtPP2-A1 was mixed to the virus prior to RNase addition. Incubation of purified CABYV particles with AtPP2-A1 therefore seems to diminish the accessibility of the encapsidated RNA to RNase A *in vitro*, suggesting that interaction with this protein masks accessible sites on the virus particles.

We further investigated whether the enhancement in transmission efficiency was due to an increase in the amount of virus retained in the aphids. To this aim, we evaluated by Q-RT-PCR virus accumulation in aphids fed on purified preparations of CABYV supplemented with AtPP2-A1 by comparing it to a reference scale of quantified CABYV RNA genomes. Before extracting RNA from the viruliferous aphids for quantification, aphids were transferred for 4 days on healthy plants to empty the digestive tract lumen of free virions. The number of virus genomes estimated by Q-RT-PCR therefore represents the number of internalized virions.

The results presented in Figure 5 reveal a significant increase (2.5 fold) of the number of viral genomes internalized when AtPP2-A1 was present in the aphid diet:  $3.5 \cdot 10^5$  virus genomes/ng of total RNA in aphids after acquisition of CABYV alone (Ct value of  $24.63 \pm 0.17$ ) versus  $8.8 \cdot 10^5$  virus genomes after addition of AtPP2-A1 (Ct value of  $23.04 \pm 0.15$ ). The increase in transmission efficiency observed when purified AtPP2-A1 was added to the virus in the aphid diet may be at least in part explained by the higher number of viral particles present within the aphid.

## Discussion

### **CABYV protein partners in sieve elements: a role in plant defense and/or a function in virus long distance movement?**

As noted in the introduction, poleroviruses such as CABYV are strictly confined to the phloem compartment. Therefore, it is reasonable to hypothesize that interactions between virions and phloem-specific host proteins could play a role in the viral infection cycle. In this paper, we have used virus-overlay assays of sap extracts to detect a number of host phloem proteins which can bind *in vitro* to CABYV. Concerning the possible significance of these interactions, at least three types of situation can be envisaged; (1) the interaction could be involved in a host anti-virus defense mechanism; (2) alternatively, the interaction could represent a situation in which the virus hijacks that machinery for its own ends; and finally, (3) we can by no means rule out the possibility that, at least some of the interactions, have no effect one way or the other.

Some of the virus-host phloem protein interactions reported here were reproducibly observed although protein identification did not lead to unique candidates. Other interactions were found less frequently and the protein identification remained hypothetical (Tables 1 & 2). Overall, the experiments performed clearly showed that CABYV virions could bind sap proteins, but the interacting proteins could not be identified with confidence. Several reasons could explain the low reproducibility of some interactions, like a weak affinity between virus particles and these particular phloem proteins, experimental variations in protein composition of cucumber sap or more basic technical problems related to proper identification and excision of spots.

Among the proteins extracted from the gel that could bind CABYV virions were two lectins, CsLec 17 (Dinant et al., 2003; Walz et al., 2004; Gomez et al., 2005) and CsLec26 (Dinant et al., 2003; Walz et al., 2004). These proteins, known to be the most abundant species in the sap of cucurbits, are poly-GlcNAc-binding lectins belonging to the PP2 family and are widespread among the angiosperms (Dinant et al., 2003). They have been suggested to function in plant defense responses by recognizing invading pathogens (Read and Northcote, 1983). Recently, it was shown that Arabidopsis PP2-A1 phloem lectin binds to different classes of glycans, including N-glycans (Beneteau et al., 2009). They could potentially recognize glycosylated virus particles although a recent reinvestigation did not provide any evidence for the presence of sugar residues on structural proteins of poleroviruses (Revollon et al., 2009) as was previously proposed (Seddas and Boissinot, 2006).

Most of the other identified putative CABYV partners can also be linked directly or indirectly to stress and defense response pathway. This probably reflects, at least to some extent, the abundance of stress-related proteins in the phloem sap (Kehr, 2006; Dafoe et al., 2009). Thus, among the interacting proteins, we found a protein of the antioxidant defense pathway (ascorbate peroxidase) and a lipoxygenase involved in the jasmonic acid biosynthesis pathway dedicated in the peroxidation of membrane lipids and synthesis of signaling molecules (Siedow, 1991). Lipoxygenase expression has been reported to be induced after injury of plants by feeding aphids (Fidantsef et al., 1999; Voelckel et al., 2004). A hydroxymethyltransferase was also found among the candidates. This enzyme is involved in the photorespiratory chain pathway. In Arabidopsis, one isoform was shown to minimize the oxidative damage caused by biotic and abiotic stresses (Moreno et al., 2005). A similar isoform was highly abundant in pumpkin. Conversely, implication of the other two candidates in plant defense mechanisms is not established: Csf-2, is a plant factor whose expression was previously shown to be induced by ripening in cucumber (Suyama et al., 1999) and the translationally controlled tumor-related protein was characterized in human as IgE-dependent histamine releasing factor (MacDonald et al., 1995). Note that all the candidates identified have already been found in phloem exudates of different plant species (Aoki et al., 2005; Kehr, 2006; Dafoe et al., 2009) except the protein similar to an *O. sativa* protein of unknown function (Table 2).

The potential of a number of phloem proteins to move over long distances has been demonstrated. For instance, in addition to trafficking in both directions between companion cells and SE, PP2 proteins can also move into SE by following assimilate transport from source to sink (Golecki et al., 1999). It is conceivable that CABYV and other poleroviruses could take advantage of the ability of these phloem proteins to traffic to distant locations by forming complexes mobile with them. The rootward movement of *C. maxima* PP16-1 was shown to depend on its interaction with other specific phloem proteins, including a translationally controlled tumor related-protein

(Aoki et al., 2005), identified in this study as a putative CABYV partner. Similarly, Csf-2, another potential CABYV partner, has recently been shown to be part of a multiprotein complex with RBP50 (Ham et al., 2009), which is able to move over long distances. Moreover, such a complex is likely to play an essential role in long distance transport of several messenger RNAs in phloem sap. Interaction of Csf-2 with CABYV virions raises the possibility that this protein could bridge viral particles to the aforesaid complexes and thus be involved in addressing viruses to specific distant tissues.

Virus binding to phloem proteins could also be an important step in virus exit from SE. Virus interaction with parietal proteins could, for instance, favor capture of virions from sap flow, therefore promoting their transport into companion cells through plasmodesmata. This mechanism would share similarities with virus uptake in aphid intestinal cells, which is thought to rely on the presence of receptors on the apical plasmamembrane that would capture virions from the food bolus (Reinbold et al., 2001; Seddas et al., 2004; Yang et al., 2008). Trafficking through plasmodesmata could also be facilitated by certain phloem sap proteins, which have been reported to modify the size exclusion limit of the plasmodesmata connecting adjacent cells (Balachandran et al., 1997; Ishiwatari et al., 1998). By sequentially interacting with these protein types (parietal and plasmodesmatal), the virus could thus usurp cellular trafficking mechanisms to enter uninfected companion cells.

On the other hand, virus interaction with parietal proteins could function as a defense mechanism against viruses, by sequestering the virions, therefore limiting their systemic movement. Conversely, the virus could make use of the interaction with phloem proteins, independently of their mobility, to phenotypically mask particles and protect them from plant defense mechanisms. It is noteworthy that CABYV and TuYV virus particles can bind a bacterial endosymbiotic protein (symbionin) in the aphid hemolymph, with consequent protection of virions from recognition by the insect immune system (van den Heuvel et al., 1997). As the identification of phloem CABYV-partners remains hypothetical, further studies are required to validate the interactions observed and to understand their role in the virus cycle.

### **Purified proteins can stimulate CABYV transmission by aphids**

When a crude sap extract was added to purified virus, a stimulatory effect on virus transmission by aphids was observed in our experiments. Implication of proteins present in SE in the aphid transmission process is further suggested by the results obtained when using purified phloem lectins from *A. thaliana* (AtPP2-A1 and -A2) and expressed in *E. coli*. Moreover, enhancement of virus transmission, after addition of these proteins to the virus in the aphid diet, was directly correlated with an increase of virus accumulation in the aphid's body. Unfortunately, the ability of these specific *A. thaliana* proteins to bind CABYV could not be assessed in a virus-overlay assay because of a nonspecific reaction between the purified proteins and the serum directed against CABYV (data not shown). Therefore, we couldn't determine if the increase in virus transmission efficiency was directly related to the capacity of the lectins to bind CABYV virions.

Surprisingly, a stimulatory effect on virus transmission was also recorded when several purified proteins of non-plant origin were added in the aphid diet, although the two lectins from *Lens culinaris* or from *Maclura pomifera*, which are probably toxic for the aphids, (Murdock and Shade, 2002) did not have a stimulatory effect. This finding suggests that virtually any protein that has no harmful effect on aphids could stimulate virus transmission. However, we did not observe such an increase in the virus

transmission rate with all the proteins present in the different enriched sap fractions obtained after size exclusion chromatography of sap exudate. As most proteins present in the purified sap fractions appear to be associated in complexes as shown in Figure 2B, it is possible that only partially uncomplexed proteins have the ability to increase virus transmission rate. It is likely that the concentration of uncomplexed proteins in all the enriched sap fractions is not like that used in the artificial aphid diet in the control experiments, which could explain why not all the sap protein fractions have the capacity to increase virus transmission rate. If virtually any protein can have significant effect on the virus transmission rate at sufficient high concentration, then the increase of virus transmission observed when using total phloem sap exudate could be the effect of the sum of small “nonspecific” contributions from many proteins in relatively low concentration.

### **Purified phloem proteins can protect CABYV particles from degradation**

As shown in Figure 4, addition of *A. thaliana* lectin AtPP2-A1 to virions can stabilize CABYV particles in an *in vitro* assay. In the aphid digestive tube, the presence of a membranous Cathepsin-L-like cysteine proteinase in *A. pisum* and *A. gossypii* midgut has been reported (Cristofolletti et al., 2003; Deraison et al., 2004) and virions complexed with sap proteins could potentially be protected from *in vivo* degradation. Such protection could also occur in the phloem compartment although no proteases have been identified so far in SE of different plant species (Kehr, 2006). Protection of virus particles by a phloem sap protein was also reported for *Cucumber mosaic virus* (CMV), where resistance to ribonuclease treatment was monitored *in vitro* following interaction with a 48 kDa protein from cucumber (homologous to the pumpkin PP1 protein) (Requena et al., 2006). Effect of addition of the phloem protein to CMV on the aphid transmission rate was, however, not evaluated. Finally, the action of plant proteins could also operate at the hemocoel level as it was reported that after oral uptake, some lectins could be recovered from the insect’s hemolymph (Powell et al., 1998). By masking viral antigens, the presence of phloem proteins could prevent an insect immune response. Thus, the site of the putative protective effects of proteins may not be strictly limited to the aphid gut.

The work presented here represents an extensive analysis of phloem sap proteins that can bind to a phloem-limited virus, although many of the virus partners could not be identified with confidence. It represents the first report of plant proteins that may enhance the circulative transmission of virus by aphids. Additional studies will, however, be required to validate one possible implication of this work, namely, that the positive effect at least of some proteins on aphid transmission of CABYV is mediated by their ability to bind virus particles.

## Material and methods

### Cucumber sap collection and virus strains

Seedlings of *Cucumis sativus* cv Genereux and Marketer were grown in the greenhouse. Aliquots of phloem exudates were collected from 4-week-old cucumber plants after sectioning petioles. After the first droplet was discarded, the remaining exuded phloem sap was immediately diluted in a buffer appropriate to the type of experiment (see below). Depending on the exudate flow and on the volume of sap required, sap was collected from two to eight sectioned petioles from the same plant or from different plants.

*Cucurbit aphid borne yellows virus* (CABYV) and *Turnip yellows virus* (TuYV) (formerly referred to as *Beet western yellows virus*) were purified from agroinfected *M. perfoliata* (Leiser et al., 1992; Prufer et al., 1995) according to the method of Van den Heuvel et al. (1991).

### Size exclusion chromatography and preparation of protein extracts for electrophoresis

Sap proteins were fractionated by gel exclusion chromatography. Aliquots of 500 µl of cucumber sap were mixed with 3 volumes of ice-cold citrate buffer (0.5 M sodium citrate, pH 6.5, 0.3 M NaCl, 5 mM DTT, and 1 mM 4-(2-Aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (antiprotease, Pefablock C, Roche). Gel exclusion chromatography was performed on an AKTA purifier system (GE Healthcare). The sample was filtered through a 0.2 µm Millipore membrane before being loaded onto a HiPrep™ 16/60 Sephacryl™ S-200 high resolution column (Amersham Biosciences, Europe GmbH, Freiburg, Germany) pre-equilibrated with citrate buffer (also used as elution buffer). Absorption of elutes was monitored at 280 nm, and fractions of 5 ml were collected. After addition of antiprotease (Pefablock C, Roche) to 10 µM final concentration, each sample was concentrated 100 fold using centricon-3 microconcentrators (Millipore corp., Amicon, Belford MA).

For 1D-gel electrophoresis, sap protein fractions were diluted in an equal volume of Laemmli x2 buffer (Laemmli, 1970) before denaturation at 90°C for 10 min. For 2D-gel electrophoresis, the protein extraction method was as described by Giavalisco et al. (2006) with modifications. Crude sap protein extract was successively sedimented into cold acetone and a mixture of methanol/ammonium acetate 0.1 M (v:v). The pellet was finally suspended in 2 M thiourea, 7 M urea, 4% CHAPS and 10 mM DTT. Protein concentrations were determined using the Bradford protein assay kit (Bio-Rad, Germany) with bovine serum albumin (BSA) as a standard.

### Aphid transmission experiments using diets supplemented with crude cucumber sap or purified proteins

Virus-free colonies of *Myzus persicae* were reared on caged pepper (*Capsicum annuum*) seedlings, at 20°C with a 16 h photoperiod. Purified CABYV suspensions were mixed with sap extracts prepared as follows: one volume of crude sap (150 to 200 µg of proteins) was diluted in 3 volumes of aphid artificial diet MP148 (Bruyère et al., 1997) containing 2.5 mM DTT. Purified virus was also added to sap protein fractions collected after gel exclusion chromatography. Sucrose was added to each fraction to a final concentration of 20%. Finally, purified virus was also mixed with *A. thaliana* recombinant proteins (30 µg of AtPP2-A1 or -A2) presenting a C-terminal 6 histidine-tag extension. Recombinant AtPP2-A1 was produced in *E. coli*, purified on a nickel affinity column (Beneteau et al., 2009) and then lyophilized. The purification of the recombinant

AtPP2-A2 followed a similar procedure except that solubilization of the protein before nickel affinity column was done in 50 mM Tris HCl, 0.2% SDS, 10 mM imidazole, pH 8.0 (Douville et al., unpublished data). AtPP2-A1 and -A2 purity was estimated by gel electrophoresis to be over 90% and 80%, respectively. Purified AtPP2-A1 and -A2 were directly suspended in aphid artificial diet before being sonicated 5 min in a ultrasound water bath to dissolve the protein. Aphid artificial diet was also supplemented with 30 µg of additional purified proteins like bovine serum albumin acetylated (BSA, Promega), casein (Sigma), cytochrome c from equine heart (Sigma), carbonic anhydrase from bovine erythrocytes (Sigma), LcH and MPA lectins from (Sigma) and lyzosome (Sigma). Third- and fourth-instar nymphs or adults were given a 24 h acquisition access period (AAP) on the different virus sources, supplemented or not with recombinant proteins, before being transferred to *M. perfoliata* test plants for a 4-day inoculation access period (IAP) (Bruyère et al., 1997). Test plants were assayed by double-antibody sandwich ELISA 3 to 4 weeks later (Herrbach et al., 1991) using a CABYV-specific antiserum (SEDIAG, France) or TuYV-specific antibodies (LOEWE, Germany).

### **Protein separation by gel electrophoresis**

For 1D-SDS-PAGE, 20 µg of crude phloem protein extract or size fractionated proteins were diluted in one volume of 2x Laemmli buffer. Protein samples were incubated at 90°C for 10 min before being loaded on a 12% SDS-PAGE gel (Laemmli, 1970).

For 2D-gel electrophoresis, the first dimension was performed in 17-cm-long non-immobilized pH 3-10 NL gradient (IPG) Drystrips (Bio-Rad). Three hundreds µg of proteins were mixed with isoelectric focusing (IEF) buffer and applied on Drystrip for active rehydration overnight at 50 V at room temperature before being focused on an Protean IEF cell (Bio-Rad) for 60, 000 Vh, with amperage limited to 50 mA. After IEF, the strips were equilibrated for 15 min in 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% (v/v) glycerol, 1% (w/v) SDS supplemented with 65 mM DTT, followed by a second 15 min equilibration in the same buffer containing 240 mM iodoacetamide instead of DTT, and 0.05% bromophenol blue. Strips were then sealed onto 12% 2D-SDS-PAGE gels (24.3 x 24 cm). Electrophoresis was carried out with running buffer in a PROTEAN II XL cell tank (Bio-Rad, USA) at room temperature at 30 V for 1h followed by 100 V overnight (limited to a maximum of 24 mA per gel).

### **Virus-overlay assay and western blotting**

For virus-overlay assay, proteins present in cucumber sap were separated by electrophoresis either on a 1D-SDS-PAGE or 2D-gel before being transferred onto a nitrocellulose membrane (Millipore, Bedford, MA) by liquid transfer (Brault et al., 1995) or by electroblotting in a Milliblot™ apparatus (W.E.P. Company, Washington, USA) for 45 min at 80 V and 2.5 mA.cm<sup>-2</sup> of membrane. The membranes were first saturated with TPBS (PBS, 1% Tween 20) containing 5% skimmed milk powder before being incubated overnight with 20 µg of purified CABYV for 24 h at 4°C in TPBS buffer. The membranes were successively incubated with primary (CABYV-specific) antibodies and secondary antibodies (goat anti-rabbit antibody coupled either to peroxidase (Invitrogen, The Netherlands) or to alkaline phosphatase (Sigma Aldrich GmbH, Germany) prepared in TPBS containing 5% skimmed milk powder. Depending on the enzyme coupled to the secondary antibody, the complexes were revealed using the Lumi-light western blotting substrate (Roche Diagnostics GmbH, Germany) or the Immun-Star™ Chemiluminescent protein detection systems (Bio-Rad, France). In control experiments, western blotting

was performed following a similar procedure except that incubation with purified virus was omitted.

### **Protein identification by mass spectrometry and database analysis**

Mass spectrometry was conducted at the Proteomic Platform hosted at the Institute of Molecular and Cellular Biology of Strasbourg (France).

#### *In-gel digestion :*

For protein identification, stained protein bands were excised from a duplicate gel loaded in parallel as the one used in the virus-overlay experiment and stained with colloidal blue 0.1% (Serva Blue G) prepared in 17% of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.5% acetic acid and 34% methanol. After an incubation over-night at room temperature, the gel was destained by successive washes in  $\text{H}_2\text{O}$ . The spots in the gel were located with regard to their position relative to the MW markers on the virus-overlay autoradiography. The nitrocellulose membrane was also stained with 0.1% Ponceau S Red solution (SIGMA) to visualize the abundant proteins transferred onto the membrane to provide additional reference points to collect protein spots. The gel digestion procedure was carried out as described by Rabilloud et al. (2001). Selected bands were washed twice with 100  $\mu\text{l}$  of 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  / 100  $\mu\text{l}$  of acetonitrile (ACN) / dehydration cycles. Between the two wash cycles, reduction was achieved by 45 min treatment with 10 mM DTT in  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  buffer (100  $\mu\text{l}$ ) at 56 °C and the alkylation reaction was performed by addition of 100  $\mu\text{l}$  of 25 mM iodoacetamide in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  buffer for 45 min at room temperature. All treatments were performed under continuous agitation. The final dried spots were rehydrated with three volumes of trypsin (Promega, V5111) at 12.5 ng/ $\mu\text{l}$ , in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  buffer (freshly diluted) and the digestion was performed at room temperature overnight. Finally, 5  $\mu\text{l}$  of 35%  $\text{H}_2\text{O}$ /60% ACN/ 5%  $\text{HCOOH}$  were added and the mixture was vigorously shaken for 15 min to extract tryptic peptides.

#### *MALDI mass spectrometry:*

MALDI mass measurements were carried out with a Biflex III (Bruker-Daltonik GmbH, Bremen, Germany) matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometer (MALDI-TOF) used in reflector positive mode. A saturated solution of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% water/50% acetonitrile was used as a matrix. Mass spectra were internally calibrated with trypsin autolysis peaks ( $m/z = 842.510$  and  $m/z = 2211.105$ ). Monoisotopic peptide masses were assigned and the peak list transferred through MS BioTools™ program (Bruker Daltonics, Bremen, Germany) as input to search against preferentially NCBI cucurbits or *Arabidopsis thaliana* taxonomic sub-databases of non-redundant protein sequences. Variable modifications (methionine oxidation, cysteine carbamidomethylation) were taken into account and the peptide mass error was limited to 50 ppm.

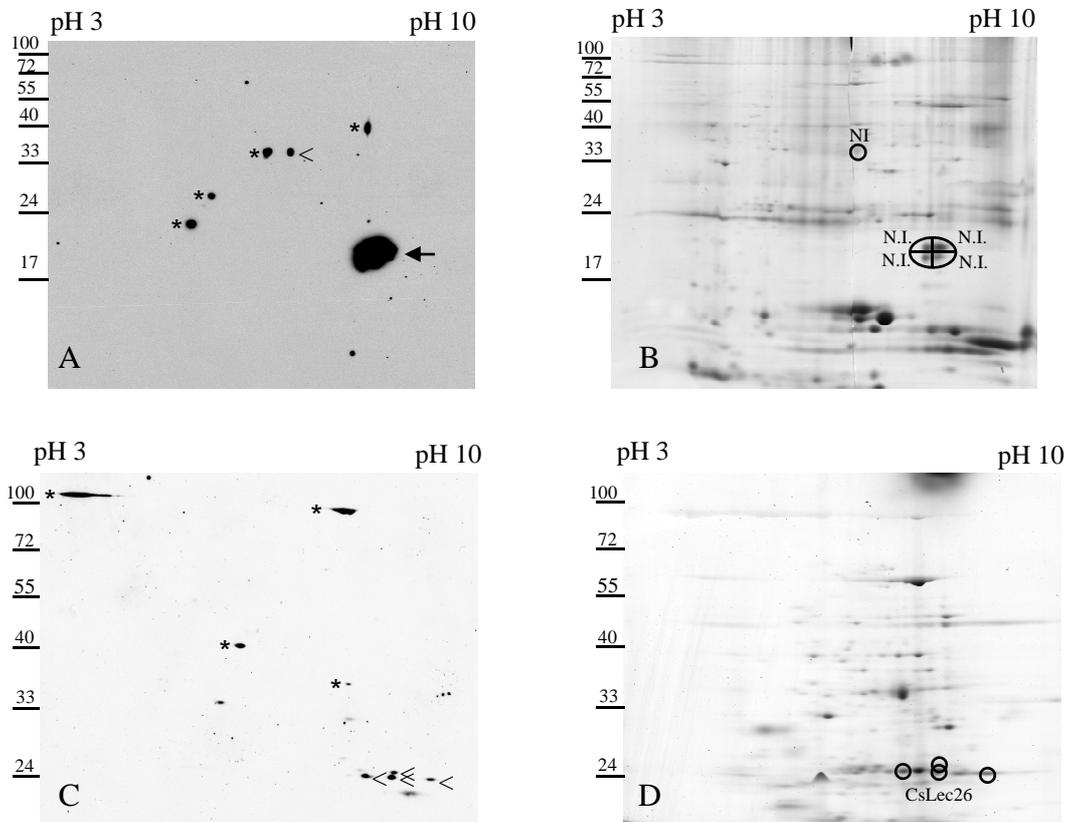
#### **Nano LC-MS-MS :**

Analysis of the digested proteins was performed using a CapLC capillary LC system (Waters, Altrincham, UK) coupled to a hybrid quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight tandem mass spectrometer (Q-TOF Micro, Waters). Diluted sample (5  $\mu\text{L}$ ) was first loaded, concentrated and cleaned up on a C18 PepMap precolumn cartridge (LC Packings, Dionex, France) and then separated on-line by an analytical reversed-phase capillary column (NanoEase C18, 75  $\mu\text{m}$  i.d., 15 cm length; Waters) using a linear gradient of 200  $\mu\text{l min}^{-1}$  flow rate. Internal calibration was provided by the Lockspray

module (Waters) during the acquisition run and the spray system (liquid junction) was used at 3.6 kV. Mass data acquisitions were piloted by MassLynx 4.0 software (Waters). Nano-LC-MS/MS data were collected by data-dependent scanning, that is, automated MS to MS/MS switching. Four ion precursors were allowed to be fragmented at a time. Mass data collected during a NanoLC-MS/MS analysis were processed automatically with the ProteinLynx Process (Waters) module. Data analysis was performed with MASCOT (Matrix Science Ltd., London, UK) against all non-redundant sequences databases with 0.25 Da mass error, one miss cleavage and taking into account modifications such as carbamidomethylation (Cys) and oxidation (Met).

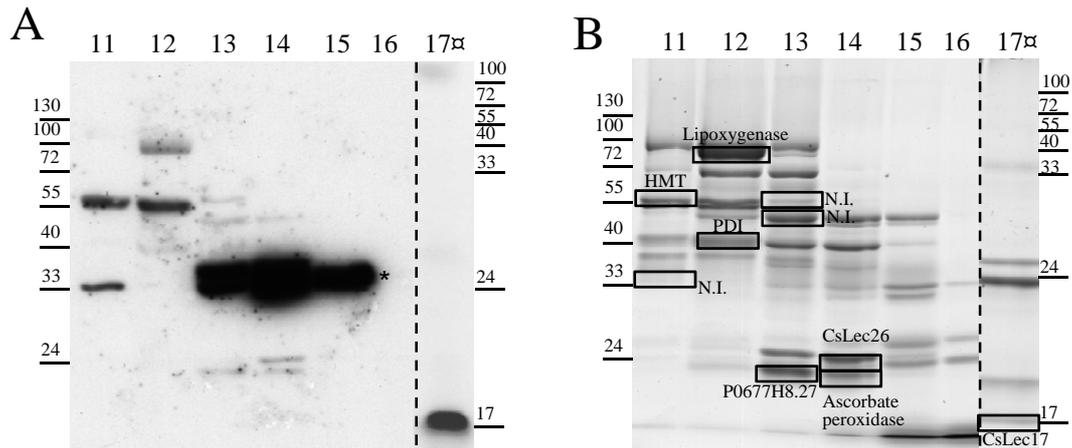
### **Quantitative RT-PCR**

For quantitative RT-PCR (Q-RT-PCR) analysis, aphids were allowed to acquire purified CABYV (50 µg/ml) for 24 hr before being transferred to healthy *M. perfoliata* for 4 days to empty the digestive tract. A similar virus acquisition was performed after incubating CABYV virions with 30 µg of *A. thaliana* PP2-A1. Lots of 10 aphids were then subjected to total RNA extraction on microcolumns (RNeasy Plant Mini kit, Qiagen, France), followed by elution with 50 µl of RNase free water. RNA was quantified with the Nanodrop ND-100 instrument (Nanodrop Technologies, USA) and stored at -20°C for subsequent Q-RT-PCR assays. Primers listed below were designed manually to amplify a specific 180 pb CABYV sequence of the CP gene (from nt 3149 to 3328). The forward CABYV primer: 5'-ATACATGGCTATGAACCGGAAT-3' and the reverse CABYV primer: 5'-GGATAGTGTTCTTTATACTCC-3' were analyzed for the absence of possible hairpins and secondary structure with the Beacon Designer 2.0 software (Biosoft International, USA). 12,5 ng of total RNA in a 25 µl reaction were subjected to one-step RT-PCR using the Quantitect SYBR Green RT-PCR kit (Qiagen, France) containing two reverse transcriptases (Omniscript and Sensiscript) and a HotStartTaq DNA polymerase according to the manufacturer's recommendations with final primer concentrations of 0.5 µM. Real-time RT-PCR was performed with the iCycler IQ system (BioRad, France). PCR cycles were as follows: 1 cycle of 30 min at 50°C and 15 min at 95°C, followed by 40 cycles each of 15 s at 94°C, 30 s at 55°C and 30 s at 72°C. A dissociation curve was produced at the end of the cycling phase to ensure that a single PCR product was produced with no primer dimers. Absolute quantification was realized by using a dilution series of 10<sup>3</sup> to 10<sup>8</sup> viral RNA copies obtained from RNA extracted from purified CABYV virions. The cycle thresholds (Ct) were plotted proportionally to the logarithm of the input RNA copy numbers to generate the standard quantification curve. The correlation value was 0,998 and amplification efficiency was 0.953 calculated by the formula  $E = [10^{-1/\text{slope}}] - 1$  with a slope of -3.440. No fluorescent signal was obtained with nonviruliferous aphids and each analysis was carried out in duplicate.



**Figure 1: Virus-overlay assays on cucumber sap proteins separated by 2D-gel electrophoresis**

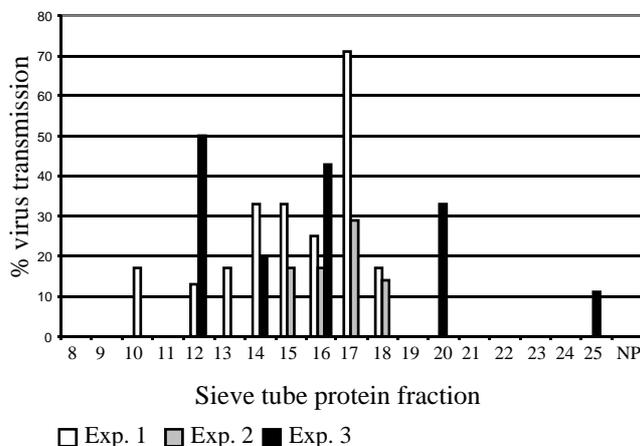
A and C) Two independent experiments of virus-overlay assays in which 300  $\mu\text{g}$  of total sap proteins were separated by 2D-gel electrophoresis, transferred onto nitrocellulose and incubated with 20  $\mu\text{g}$  of purified CABYV. Complexes between SE proteins and CABYV were revealed using CABYV-specific antibodies. B and D) Similar gels loaded with the same sap extracts and stained with Colloidal blue. Positions of the proteins sequenced by mass spectrometry are indicated on the stained gel. \*: background reactions due to antibodies directed against CABYV. The plain arrow indicates the more reproducible signal observed in 4 experiments out of 5 performed whereas open arrows indicate less reproducible signals. The size of the molecular markers are indicated in kDa. N.I.: non-identified by mass spectrometry



**Figure 2: Virus-overlay assay on cucumber sap proteins separated by 1D-gel electrophoresis**

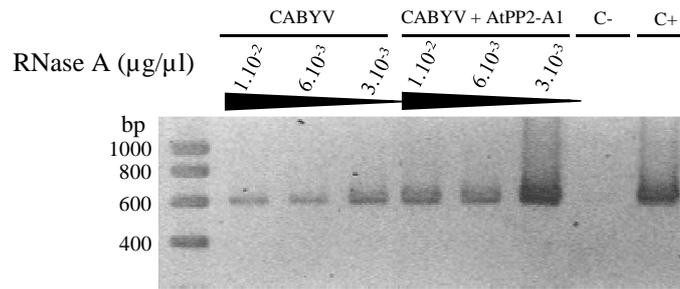
A) An example of virus-overlay assay in which 20  $\mu\text{g}$  of proteins from column fractions 11 to 17 were loaded on a 12% gel SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose before being incubated with 10  $\mu\text{g}$  of purified CABYV. Complexes between phloem proteins and CABYV were revealed using CABYV-specific antibodies. B) A similar gel loaded with the same protein extract and stained with Colloidal blue. Positions of the proteins sequenced by mass spectrometry are indicated on the stained gel.

□ Lane from a separate gel in which proteins were separated on a 13,5% gel SDS-PAGE. \*: background reaction due to antibodies directed against CABYV. Plain arrows represent the more reproducible signals observed in 8 experiments out of 9 performed whereas open arrows indicate less reproducible signals. The size of the molecular markers are indicated in kDa. HMT: Hydroxymethyltransferase; CsLec17: 17 kDa phloem lectin from *C. sativus*; CsLec26: 26 kDa phloem lectin from *C. sativus*.



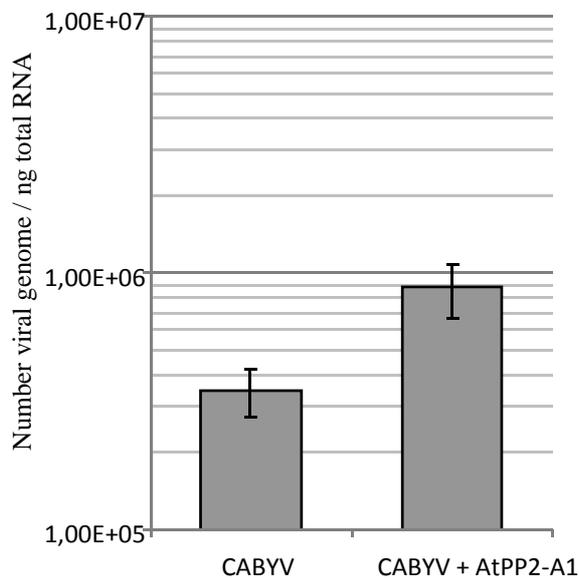
**Figure 3: Aphid transmission of purified CABYV after addition of cucumber sap proteins fractionated by exclusion chromatography**

After a 24 h AAP on artificial medium containing CABYV purified virus (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and supplemented or not with cucumber sap proteins (30 to 40  $\mu\text{g}$ ) from concentrated fractions obtained after size exclusion chromatography, 20 *M. persicae* were transferred to healthy *M. perfoliata* seedlings for a 4-day IAP. Four to nine test plants were inoculated with the viruliferous aphids for each condition in each of the three independent experiments. NP : no protein added to the virus.



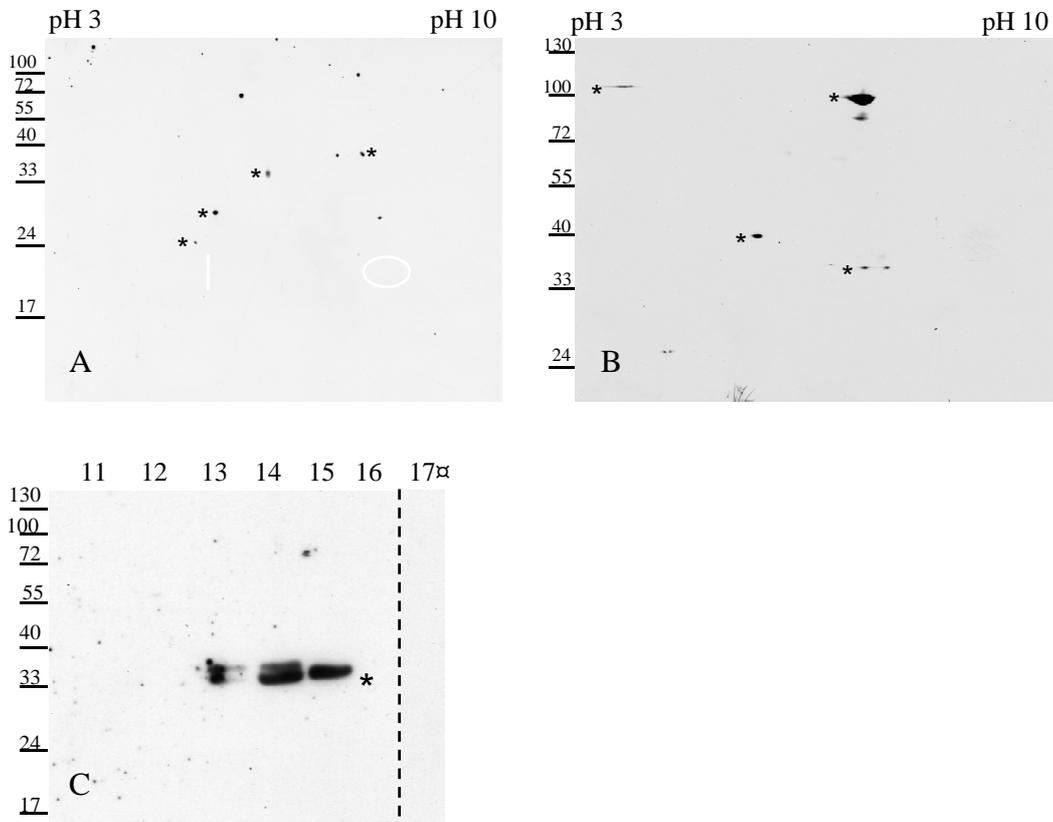
**Figure 4: RNaseA sensitivity assay of CABYV particles**

Purified CABYV particles (210 ng equivalent to 42 ng of RNA) mixed with purified AtPP2-A1 (10 µg) in TN buffer (Tris HCl 0.1 M pH 7,5; NaCl 15 mM) were treated with RNase A ( $1.10^{-2}$ ,  $6.10^{-3}$  and  $3.10^{-3}$  µg/µl). After 30 min incubation at 37°C, RNA was phenol-extracted and reverse transcribed, followed by polymerase chain reaction (PCR). Primers complementary or identical to nucleotides 4088 to 4105 and 3503 to 3520, respectively, of the CABYV genome were used. RT-PCR products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose gel and were viewed after ethidium bromide staining. C-: RT-PCR negative control (water). C+: RT-PCR positive control (CABYV virions without RNase A treatment). This experiment was carried out twice and gave similar results.



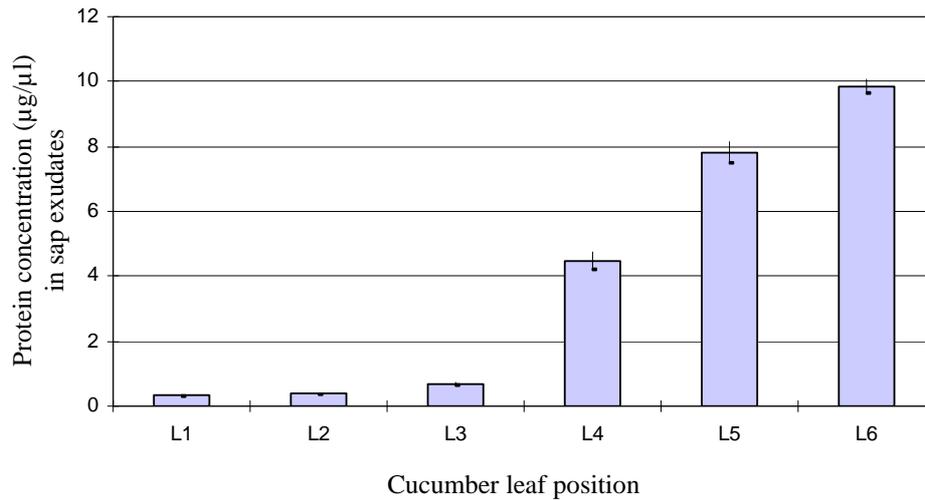
**Figure 5: Accumulation of CABYV genomes in aphids measured by Q-RT-PCR**

Number of CABYV genomes accumulated in aphids which have acquired CABYV virions supplemented or not with 30 µg of purified AtPP2-A1. Batches of 10 aphids were analyzed in duplicate after being transferred on healthy plants for 4 days to empty the lumen of the digestive tract of virions.

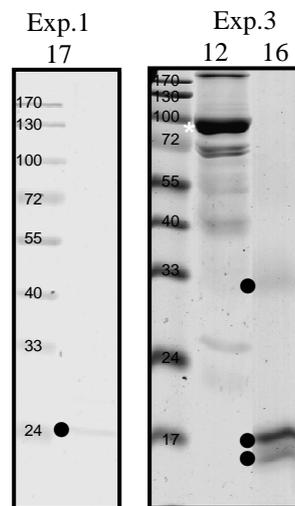


**Figure S1: Cross reactions between phloem sap proteins and antibodies directed against CABYV**

A and B) Sap proteins from *C. sativus* were separated on a 2D-gel electrophoresis before being transferred onto nitrocellulose and incubated with CABYV-specific antibodies. Sap proteins reacting with CABYV antiserum are labeled with a star. C) A similar experiment with sap proteins fractionated by size exclusion chromatography and separated on 1D-gel electrophoresis.



**Figure S2: Protein concentration in cucumber sap collected at different leaf positions**  
 Sap was collected by exudation from individual cucumber leaves. L1 corresponds to the oldest leaf and L6 to the youngest. Protein concentration was determined with the Bradford protein assay kit using BSA as a standard.



**Figure S3: Protein composition of fractions exhibiting a stimulatory effect on aphid transmission of CABYV**  
 Sap proteins were fractionated on a gel exclusion chromatography column and protein composition of fractions 17 (from experiment 1) and fractions 12 and 16 (from experiment 3) (see Figure 3) were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis on a 12% polyacrylamide gel. Twenty µg of proteins were loaded on the gel (10 µg for fraction 17 Exp 1) and stained with Colloidal blue. The size of the molecular markers are indicated in kDa. Predominant proteins are indicated in each fraction (•).

**Table 1: Identification of proteins from cucumber sap separated by electrophoresis on a 2D-gel that putatively interact *in vitro* with CABYV virions**

Observed signals	Frequency of observed signals	Protein identification <sup>a</sup>	Organisms	Accession n <sup>o</sup>	Match peptides <sup>b</sup>	Cover (%)	Theoretical		Experimental		Nb of MS identification <sup>c</sup>		
							MW	<i>pI</i>	MW	<i>pI</i>			
18-22 kDa (tetrad)	4/5	No identification							18.48-20.70 <sup>d</sup>	7.50-7.70			
									18.48-20.70	7.65-8.00			
									19.68-22.70	7.50-7.70			
									19.68-22.70	7.65-8.00			
24-27 kDa	2/5	26 kDa phloem lectin <sup>e</sup>	<i>C. sativus</i>	22023939/ 21952270 <sup>f</sup>	7-19 11	37-68 44	26.67/25.03	8.85/9.01	24.00	7.15-7.37	2		
									27.10	6.10			
		No identification							26.49-26.70	5.90-6.20			
									26.49-26.70	5.40-5.60			
		No signal							26.49-26.70	5.70-5.85			
32-34 kDa	2/5	No identification							32.00	7.00			
												34.00	6.00
												34.83	6.78

<sup>a</sup>The criteria to accept peptide matches is the protein score ( $-10 \cdot \log(P)$ ), where P is the probability that the observed match is a random event. Only the proteins with scores greater than 78 are significant ( $p < 0.05$ ) were considered as potential CABYV partner

<sup>b</sup>Peptide matches are based on MALDI-MS data

<sup>c</sup>Number of identification of the protein by mass spectrometry

<sup>d</sup>Identification by Nano LC-MS/MS was conducted on this protein spot. It reveals the presence of at least two proteins, one which could potentially be the 17 kDa phloem lectin from *C. sativus* and the other a non-identified protein (see Table S1)

<sup>e</sup>Identification by MALDI-MS

<sup>f</sup>Two sequences of the 26 kDa protein from *C. sativus* are referenced in databases. Only 5 amino acids out of 213 are different between the two sequences and one of the sequence is lacking the first 12 amino acids.

**Table 2: Identification of proteins from cucumber sap obtained after size fractionation, separated by electrophoresis on a 1D-gel that putatively interact *in vitro* with CABYV virions**

Observed signals	Frequency of observed signals	Protein identification <sup>a</sup>	Organisms	Accession n <sup>o</sup>	Match peptides <sup>b</sup>	Cover (%)	Molecular weight		Nb of MS identification <sup>c</sup>
							Theoretical	Experimental	
16-19 kDa	3/9	17 kDa Phloem lectin <sup>c</sup>	<i>C. sativus</i>	21745315	10	60	17.60	16.00	1
		Csf-2 <sup>c</sup>	<i>C. sativus</i>	5762258	15	80	17.86	17.00	1
		Translationally controlled tumor-related protein <sup>c</sup>	<i>C. melo</i>	7208434	12	66	18.80	19.30	1
22-29 kDa	8/9	26 kDa phloem lectin <sup>c</sup>	<i>C. sativus</i>	22023939/21952270	11; 17	44; 50	26.67/25.03	22.00 - 26.60	2
		Cytosolic ascorbate peroxidase	<i>C. sativus</i>	1669585	19	71	27.55	23.70	1
		P0677H8.27 <sup>c</sup>	<i>Oriza sativa</i>	34908654	19	57	25.67	25.10 - 29.00	1
		No identification						24.70, 25.00, 27.00, 33.00	
53-57 kDa	3/9	No signal						23.11, 24.22	
		Hypothetical protein similar to Hydroxymethyltransferase of <i>A. thaliana</i> <sup>c</sup>	<i>C. melo</i>	62149091	22	53	35.39	53.80 - 57.40	1
100 kDa	2/9	Lipoxygenase / 13S-lipoxygenase <sup>c,e</sup>	<i>C. sativus</i> / <i>C. melo</i>	1017772/82547876 <sup>c</sup>	21; 33	17; 31	99.50/100.02	96.30 - 100.09	2

<sup>a</sup>The criteria to accept peptide matches is the protein score ( $-10 \cdot \log(P)$ ), where P is the probability that the observed match is a random event. Only the proteins with scores greater than 78 are significant ( $p < 0.05$ ) were considered as potential CABYV partner

<sup>b</sup>Peptide matches are based on MALDI-MS data

<sup>c</sup>Number of identification of the protein by mass spectrometry

<sup>d</sup>Identification by MALDI-MS

<sup>e</sup>Identification by Nano LC-MS/MS (see Table S1)

<sup>f</sup>This protein was identified 4 times as a Lipoxygenase by Maldi-MS and once as a 13S-lipoxygenase by LC-MS/MS. These two proteins share 93% of identical amino acid identity.

**Table 3: Aphid transmission of purified CABYV after addition of cucumber phloem exudates<sup>a</sup>**

CABYV supplemented with :	Exp. 1-5	Exp. 6	Exp. 7	Exp. 8	Exp. 9
NP	3/49 <sup>b</sup> (6%)	1/8 (13%)	0/7 (0%)	0/7 (0%)	1/8 (13%)
Cucumber sap <sup>c</sup>	31/52 (60%)	/	/	/	/
Sap from plant 1 <sup>d</sup>		1/8	3/8	4/5	7/8
Sap from plant 2		2/8	1/8	0/5	0/6
Sap from plant 3		2/7	1/8	0/4	0/3
Sap from plant 4		6/8	1/6	0/4	0/4
Sap from plant 5		1/6	2/6	1/5	/
Sap from plant 6		/	4/8	/	/
		12/37 (32%)	12/44 (27%)	5/23 (22%)	7/21 (33%)

<sup>a</sup>After a 24 h AAP on artificial medium containing CABYV purified virus (25 µg/ml) and supplemented or not with cucumber sap exudates (15 µl of phloem sap containing 150 to 200 µg protein was added to the virus suspension). After being allowed to feed on the virus suspensions, groups of 20 *M. persicae* were transferred to healthy *M. perfoliata* seedlings for a 4-day IAP

<sup>b</sup>Number of plants infected (determined by DAS-ELISA 3 weeks after virus inoculation) compared to number of aphid-inoculated plants

<sup>c</sup>Phloem exudates collected from several individual plants were mixed in the diet

<sup>d</sup>Phloem exudates were collected from individual plants (plant 1 to 6)

NP: no sap proteins added to the purified virus.

**Table 4: Aphid transmission of purified CABYV and TuYV after addition of purified proteins<sup>a</sup>**

Virus source	CABYV <sub>50</sub>	CABYV <sub>100</sub>	CABYV <sub>50</sub> + PP2-A1	CABYV <sub>50</sub> + PP2-A2	CABYV <sub>50</sub> + BSA	CABYV <sub>50</sub> + casein	CABYV <sub>50</sub> + lyzosome	CABYV <sub>50</sub> + Cyto c	CABYV <sub>50</sub> + Carb Anh	CABYV <sub>50</sub> + LcH	CABYV <sub>50</sub> + MPA	TuYV <sub>10</sub>	TuYV <sub>10</sub> + PP2-A1
Inf plants/aphid-inoc plant <sup>b</sup>	2/72 <sup>c</sup> (2.7%)	24/30 <sup>d,e</sup> (80%)	50/75 <sup>f</sup> (70.5%)	18/20 (90%)	28/42 <sup>c</sup> (66.7%)	10/10 (100%)	9/10 (90%)	8/10 (80%)	10/10 (100%)	0/9 (0%)	0/9 (0%)	1/15 <sup>g</sup> (6%)	15/15 <sup>g</sup> (100%)

<sup>a</sup>After a 24 h AAP on artificial medium containing CABYV (50 µg/ml, CABYV<sub>50</sub> or 100 µg/ml, CABYV<sub>100</sub>) or TuYV (10 µg/ml, TuYV<sub>10</sub>) purified viruses supplemented or not with purified proteins (30 µg), 10 *M. persicae* were transferred to healthy *M. perfoliata* seedlings for a 4-day IAP

<sup>b</sup>Number of plants infected (determined by DAS-ELISA 3 weeks after virus inoculation) compared to number of aphid-inoculated plants

<sup>c</sup>The results combine 8 independent experiments

<sup>d</sup>For these experiments, AAP was extended to 48h and 20 aphids were transferred on each test plant

<sup>e</sup>The results combine 3 independent experiments

<sup>f</sup>The results combine 5 independent experiments

<sup>g</sup>The results combine 2 independent experiments

PP2-A1 and PP2-A2: purified protein from *A. thaliana*; BSA: Bovine serum albumin acetylated; Cyto c: Cytochrome c; Carb Anh: Carbonic anhydrase; LcH: lectin from *Lens culinaris*; MPA: lectin from *Maclura pomifera*.

### Acknowledgments:

The authors are very grateful to Catherine Reinbold (INRA, Colmar, France) for the transmission electron microscopy observations of virions in cucumber sap. Ken Richards is greatly thanked for critical reading of the manuscript. This work was supported by the French National Agency of Research (ANR). We gratefully acknowledge the INRA SPE (Santé des Plantes et Environnement) department for a post-doctoral fellowship to B. Bencharki.

### References

- Aoki, K., Suzui, N., Fujimaki, S., Dohmae, N., Yonekura-Sakakibara, K., Fujiwara, T., Hayashi, H., Yamaya, T., and Sakakibara, H. 2005. Destination-selective long-distance movement of phloem proteins. *The Plant cell* 17:1801-1814.
- Balachandran, S., Xiang, Y., Schobert, C., Thompson, G.A., and Lucas, W.J. 1997. Phloem sap proteins from *Cucurbita maxima* and *Ricinus communis* have the capacity to traffic cell to cell through plasmodesmata. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:14150-14155.
- Barnes, A., Bale, J., Constantinidou, C., Ashton, P., Jones, A., and Pritchard, J. 2004. Determining protein identity from sieve element sap in *Ricinus communis* L. by quadrupole time of flight (Q-TOF) mass spectrometry. *Journal of experimental botany* 55:1473-1481.
- Beneteau, J., Renard, D., Marché, L., Douville, E., Lavenant, L., Rabhé, Y., Dupont, D., Vilaine, F., and Dinant, S. 2009. A new role for the high-mannose N-glycans and O-linked N-acetylglucosamine-binding PP2-A1 phloem lectin in *Arabidopsis*. Submitted.
- Brault, V., Herrbach, E., and Reinbold, C. 2007. Electron microscopy studies on luteovirid transmission by aphids. *Micron* 38:302-312.
- Brault, V., Mutterer, J., Scheidecker, D., Simonis, M.T., Herrbach, E., Richards, K., and Ziegler-Graff, V. 2000. Effects of point mutations in the readthrough domain of the beet western yellows virus minor capsid protein on virus accumulation in planta and on transmission by aphids. *Journal of virology* 74:1140-1148.
- Brault, V., Bergdoll, M., Mutterer, J., Prasad, V., Pfeffer, S., Erdinger, M., Richards, K.E., and Ziegler-Graff, V. 2003. Effects of point mutations in the major capsid protein of beet western yellows virus on capsid formation, virus accumulation, and aphid transmission. *Journal of virology* 77:3247-3256.
- Brault, V., van den Heuvel, J.F., Verbeek, M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer, A., Herrbach, E., Garaud, J.C., Guilley, H., Richards, K., and Jonard, G. 1995. Aphid transmission of beet western yellows luteovirus requires the minor capsid read-through protein P74. *The EMBO journal* 14:650-659.
- Bruyère, A., Brault, V., Ziegler-Graff, V., Simonis, M.T., Van den Heuvel, J.F., Richards, K., Guilley, H., Jonard, G., and Herrbach, E. 1997. Effects of mutations in the beet western yellows virus readthrough protein on its expression and packaging and on virus accumulation, symptoms, and aphid transmission. *Virology* 230:323-334.
- Chay, C.A., Gunasinge, U.B., Dinesh-Kumar, S.P., Miller, W.A., and Gray, S.M. 1996. Aphid transmission and systemic plant infection determinants of barley yellow dwarf luteovirus-PAV are contained in the coat protein readthrough domain and 17-kDa protein, respectively. *Virology* 219:57-65.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., and Coupland, G. 2007. FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science (New York)* 316:1030-1033.
- Cristofolletti, P.T., Ribeiro, A.F., Deraison, C., Rahbe, Y., and Terra, W.R. 2003. Midgut adaptation and digestive enzyme distribution in a phloem feeding insect, the pea aphid *Acyrtosiphon pisum*. *J Insect Physiol* 49:11-24.
- D'Arcy, C.J., and De Zoeten, G.A. 1979. Beet yellows western virus in phloem tissue of *Thlaspi arvense*. *Phytopathology* 69:1194-1198.
- Dafoe, N.J., Zamani, A., Ekramoddoullah, A.K., Lippert, D., Bohlmann, J., and Constabel, C.P. 2009. Analysis of the poplar phloem proteome and its response to leaf wounding. *Journal of proteome research* 8:2341-2350.
- Deraison, C., Darboux, I., Dupontets, L., Gorojankina, T., Rahbe, Y., and Jouanin, L. 2004. Cloning and characterization of a gut-specific cathepsin L from the aphid *Aphis gossypii*. *Insect molecular biology* 13:165-177.

- Dinant, S., Clark, A.M., Zhu, Y., Vilaine, F., Palauqui, J.C., Kusiak, C., and Thompson, G.A. 2003. Diversity of the superfamily of phloem lectins (phloem protein 2) in angiosperms. *Plant physiology* 131:114-128.
- Drucker, M., Froissart, R., Hebrard, E., Uzest, M., Ravallec, M., Esperandieu, P., Mani, J.C., Pugniere, M., Roquet, F., Fereres, A., and Blanc, S. 2002. Intracellular distribution of viral gene products regulates a complex mechanism of cauliflower mosaic virus acquisition by its aphid vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99:2422-2427.
- Esau, K., and Hoefert, L.L. 1972. Ultrastructure of sugarbeet leaves infected with beet western yellows virus. *Journal of ultrastructure research* 40:556-571.
- Fidantsef, A.L., Stout, M.J., Thaler, J.S., Duffey, S.S., and Bostock, R.M. 1999. Signal interactions in pathogen and insect attacks: expression of lipoxygenase, proteinase inhibitor II, and pathogenesis-related protein P4 in the tomato, *Lycopersicon esculentum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 54:97-114.
- Fisher, D.B., Wu, Y., and Ku, M.S. 1992. Turnover of Soluble Proteins in the Wheat Sieve Tube. *Plant physiology* 100:1433-1441.
- Giavalisco, P., Kapitza, K., Kolasa, A., Buhtz, A., and Kehr, J. 2006. Towards the proteome of Brassica napus phloem sap. *Proteomics* 6:896-909.
- Gildow, F. 1999. Luteovirus transmission mechanisms regulating vector specificity. Pages 88-111 in: *The Luteoviridae*. H.G. Smith and H. Barker, eds. CAB International, Oxon, UK.
- Gildow, F.E., Reavy, B., Mayo, M.A., Duncan, G.H., Woodford, J.A., Lamb, J.W., and Hay, R.T. 2000. Aphid Acquisition and Cellular Transport of Potato leafroll virus-like Particles Lacking P5 Readthrough Protein. *Phytopathology* 90:1153-1161.
- Golecki, B., Schulz, A., and Thompson, G.A. 1999. Translocation of structural P proteins in the phloem. *The Plant cell* 11:127-140.
- Gomez, G., and Pallas, V. 2001. Identification of an in vitro ribonucleoprotein complex between a viroid RNA and a phloem protein from cucumber plants. *Mol Plant Microbe Interact* 14:910-913.
- Gomez, G., and Pallas, V. 2004. A long-distance translocatable phloem protein from cucumber forms a ribonucleoprotein complex in vivo with Hop stunt viroid RNA. *Journal of virology* 78:10104-10110.
- Gomez, G., Torres, H., and Pallas, V. 2005. Identification of translocatable RNA-binding phloem proteins from melon, potential components of the long-distance RNA transport system. *Plant J* 41:107-116.
- Ham, B.K., Bandom, J.L., Xoconostle-Cazares, B., Ringgold, V., Lough, T.J., and Lucas, W.J. 2009. A polypyrimidine tract binding protein, pumpkin RBP50, forms the basis of a phloem-mobile ribonucleoprotein complex. *The Plant cell* 21:197-215.
- Herrbach, E., Lemaire, O., Ziegler-Graff, V., Lot, H., Rabenstein, F., and Bouchery, Y. 1991. Detection of BMV and BWV isolates using monoclonal antibodies and radioactive RNA probes, and relationships among luteoviruses. *Annals of Applied Biology* 118:127-138.
- Ishiwatari, Y., Fujiwara, T., McFarland, K.C., Nemoto, K., Hayashi, H., Chino, M., and Lucas, W.J. 1998. Rice phloem thioredoxin h has the capacity to mediate its own cell-to-cell transport through plasmodesmata. *Planta* 205:12-22.
- Kehr, J. 2006. Phloem sap proteins: their identities and potential roles in the interaction between plants and phloem-feeding insects. *Journal of experimental botany* 57:767-774.
- Kehr, J., and Buhtz, A. 2008. Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *Journal of experimental botany* 59:85-92.
- Khelifa, M., Journou, S., Krishnan, K., Gargani, D., Esperandieu, P., Blanc, S., and Drucker, M. 2007. Electron-lucent inclusion bodies are structures specialized for aphid transmission of cauliflower mosaic virus. *The Journal of general virology* 88:2872-2880.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lecoq, H., Bourdin, D., Wipf-Scheibel, C., Bon, M., Lot, H., Lemaire, O., and Herrbach, E. 1992. A new yellowing disease of cucurbits caused by a luteovirus, cucurbit aphid-borne yellows virus. *Plant Pathology* 41:749-761.
- 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:9136-9140.
- Lin, M.K., Lee, Y.J., Lough, T.J., Phinney, B.S., and Lucas, W.J. 2009. Analysis of the pumpkin phloem proteome provides insights into angiosperm sieve tube function. *Mol Cell Proteomics* 8:343-356.

- Lough, T.J., and Lucas, W.J. 2006. Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking. *Annual review of plant biology* 57:203-232.
- MacDonald, S.M., Rafnar, T., Langdon, J., and Lichtenstein, L.M. 1995. Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science (New York)* 269:688-690.
- Martiniere, A., Gargani, D., Uzest, M., Lautredou, N., Blanc, S., and Drucker, M. 2009a. A role for plant microtubules in the formation of transmission-specific inclusion bodies of Cauliflower mosaic virus. *Plant J* 58:135-146.
- Moreno, J.I., Martin, R., and Castresana, C. 2005. Arabidopsis SHMT1, a serine hydroxymethyltransferase that functions in the photorespiratory pathway influences resistance to biotic and abiotic stress. *Plant J* 41:451-463.
- Murdock, L.L., and Shade, R.E. 2002. Lectins and protease inhibitors as plant defenses against insects. *Journal of agricultural and food chemistry* 50:6605-6611.
- Mutterer, J.D., Stussi-Garaud, C., Michler, P., Richards, K.E., Jonard, G., and Ziegler-Graff, V. 1999. Role of the beet western yellows virus readthrough protein in virus movement in *Nicotiana clevelandii*. *The Journal of general virology* 80:2771-2778.
- Nakamura, S., Hayashi, H., Mori, S., and Chino, M. 1993. Protein phosphorylation in the sieve tubes of rice plants. *Plant and Cell Physiology* 34:927-933.
- Owens, R.A., Blackburn, M., and Ding, B. 2001. Possible involvement of the phloem lectin in long-distance viroid movement. *Mol Plant Microbe Interact* 14:905-909.
- Peter, K.A., Liang, D., Palukaitis, P., and Gray, S.M. 2008. Small deletions in the potato leafroll virus readthrough protein affect particle morphology, aphid transmission, virus movement and accumulation. *The Journal of general virology* 89:2037-2045.
- Peter, K.A., Gildow, F., Palukaitis, P., and Gray, S.M. 2009. The C terminus of the polerovirus p5 readthrough domain limits virus infection to the phloem. *Journal of virology* 83:5419-5429.
- Powell, K.S., Spence, J., Bharathi, M., Gatehouse, J.A., and Gatehouse, A.M. 1998. Immunohistochemical and developmental studies to elucidate the mechanism of action of the snowdrop lectin on the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Stal). *J Insect Physiol* 44:529-539.
- Prufer, D., Wipf-Scheibel, C., Richards, K., Guilley, H., Lecoq, H., and Jonard, G. 1995. Synthesis of a full-length infectious cDNA clone of cucurbit aphid-borne yellows virus and its use in gene exchange experiments with structural proteins from other luteoviruses. *Virology* 214:150-158.
- Rabilloud, T., Strub, J.M., Luche, S., van Dorsselaer, A., and Lunardi, J. 2001. A comparison between Sypro Ruby and ruthenium II tris (bathophenanthroline disulfonate) as fluorescent stains for protein detection in gels. *Proteomics* 1:699-704.
- Read, S.M., and Northcote, D.H. 1983. Subunit structure and interactions of the phloem proteins of *Cucurbita maxima* (pumpkin). *European journal of biochemistry / FEBS* 134:561-569.
- Reinbold, C., Gildow, F.E., Herrbach, E., Ziegler-Graff, V., Goncalves, M.C., van Den Heuvel, J.F., and Brault, V. 2001. Studies on the role of the minor capsid protein in transport of Beet western yellows virus through *Myzus persicae*. *The Journal of general virology* 82:1995-2007.
- Requena, A., Simon-Buela, L., Salcedo, G., and Garcia-Arenal, F. 2006. Potential involvement of a cucumber homolog of phloem protein 1 in the long-distance movement of Cucumber mosaic virus particles. *Mol Plant Microbe Interact* 19:734-746.
- Revollon, S., Strub, J.M., Fitchette, A.-C., Wiss, L., Gomord, V., Van Dorsselaer, A., and Brault, V. 2009. 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. submitted.
- Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cazares, B., and Lucas, W.J. 2001. The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Current opinion in plant biology* 4:202-209.
- Schulz, A. 1986. Wound phloem in transition to bundle phloem in primary roots of *Pisum sativum* L. II. The plasmic contact between wound-sieve tubes and regular phloem. *Protoplasma* 130:27-40.
- Seddas, P., and Boissinot, S. 2006. Glycosylation of beet western yellows virus proteins is implicated in the aphid transmission of the virus. *Archives of virology* 151:967-984.
- Seddas, P., Boissinot, S., Strub, J.M., Van Dorsselaer, A., Van Regenmortel, M.H., and Pattus, F. 2004. Rack-1, GAPDH3, and actin: proteins of *Myzus persicae* potentially involved in the transcytosis of beet western yellows virus particles in the aphid. *Virology* 325:399-412.
- Shepardson, S., Esau, K., and McCrum, R. 1980. Ultrastructure of potato leaf phloem infected with potato leafroll virus. *Virology* 105:379-392.
- Siedow, J.N. 1991. Plant lipoxygenases: Structure and function. *Annual Review of Plant Molecular Biology* 42:145-188.

- Stadler, R., Lauterbach, C., and Sauer, N. 2005. Cell-to-cell movement of green fluorescent protein reveals post-phloem transport in the outer integument and identifies symplastic domains in Arabidopsis seeds and embryos. *Plant physiology* 139:701-712.
- Suyama, T., Yamada, K., Mori, H., Takeno, K., and Yamaki, S. 1999. Cloning cDNAs for genes preferentially expressed during fruit growth in cucumber. *Journal of American Society for Horticultural Science* 124:136-139.
- Taliansky, M., and Barker, H. 1999. Movement of luteoviruses in infected plants. Pages 69-83 in: *The Luteoviridae*. H.G. Smith and H. Barker, eds. CAB International, Oxon, UK.
- Turgeon, R., and Wolf, S. 2009. Phloem transport: cellular pathways and molecular trafficking. *Annual review of plant biology* 60:207-221.
- Van Bel, A.J.E. 2003. The phloem, a miracle of ingenuity. *Plant, Cell and Environment* 26:215-149.
- Van den Heuvel, J.F., Boerma, T.M., and Peters, D. 1991. Transmission of potato leafroll virus from plants and artificial diets by *Myzus persicae*. *Phytopathology* 81:150-154.
- van den Heuvel, J.F., Bruyere, A., Hogenhout, S.A., Ziegler-Graff, V., Brault, V., Verbeek, M., van der Wilk, F., and Richards, K. 1997. The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to Buchnera GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *Journal of virology* 71:7258-7265.
- Voelckel, C., Weisser, W.W., and Baldwin, I.T. 2004. An analysis of plant-aphid interactions by different microarray hybridization strategies. *Molecular ecology* 13:3187-3195.
- Walz, C., Juenger, M., Schad, M., and Kehr, J. 2002. Evidence for the presence and activity of a complete antioxidant defence system in mature sieve tubes. *Plant J* 31:189-197.
- Walz, C., Giavalisco, P., Schad, M., Juenger, M., Klose, J., and Kehr, J. 2004. Proteomics of curcubit phloem exudate reveals a network of defence proteins. *Phytochemistry* 65:1795-1804.
- Wolf, S., Deom, C.M., Beachy, R.N., and Lucas, W.J. 1989. Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science (New York, N.Y)* 246:377-379.
- Xoconostle-Cazares, B., Ruiz-Medrano, R., and Lucas, W.J. 2000. Proteolytic processing of CmPP36, a protein from the cytochrome b(5) reductase family, is required for entry into the phloem translocation pathway. *Plant J* 24:735-747.
- Xoconostle-Cazares, B., Xiang, Y., Ruiz-Medrano, R., Wang, H.L., Monzer, J., Yoo, B.C., McFarland, K.C., Franceschi, V.R., and Lucas, W.J. 1999. Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science (New York)* 283:94-98.
- Yang, X., Thannhauser, T.W., Burrows, M., Cox-Foster, D., Gildow, F.E., and Gray, S.M. 2008. Coupling genetics and proteomics to identify aphid proteins associated with vector-specific transmission of polerovirus (luteoviridae). *Journal of virology* 82:291-299.
- Yoo, B.C., Kragler, F., Varkonyi-Gasic, E., Haywood, V., Archer-Evans, S., Lee, Y.M., Lough, T.J., and Lucas, W.J. 2004. A systemic small RNA signaling system in plants. *The Plant cell* 16:1979-2000.

## Figures legends

### Figure 1: Virus-overlay assays on cucumber sap proteins separated by 2D-gel electrophoresis

A and C) Two independent experiments of virus-overlay assays in which 300 µg of total sap proteins were separated by 2D-gel electrophoresis, transferred onto nitrocellulose and incubated with 20 µg of purified CABYV. Complexes between SE proteins and CABYV were revealed using CABYV-specific antibodies. B and D) Similar gels loaded with the same sap extracts and stained with Colloidal blue. Positions of the proteins sequenced by mass spectrometry are indicated on the stained gel. \*: background reactions due to antibodies directed against CABYV. The plain arrow indicates the more reproducible signal observed in 4 experiments out of 5 performed whereas open arrows indicate less reproducible signals. The size of the molecular markers are indicated in kDa. N.I.: non-identified by mass spectrometry.

### Figure 2: Virus-overlay assay on cucumber sap proteins separated by 1D-gel electrophoresis

A) An example of virus-overlay assay in which 20 µg of proteins from column fractions 11 to 17 were loaded on a 12% gel SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose before being incubated with 10 µg of purified CABYV. Complexes between phloem proteins and CABYV were revealed using CABYV-specific antibodies. B) A similar gel loaded with the same protein extract and stained with Colloidal blue. Positions of the proteins sequenced by mass spectrometry are indicated on the stained gel.

α Lane from a separate gel in which proteins were separated on a 13,5% gel SDS-PAGE. \*: background reaction due to antibodies directed against CABYV. Plain arrows represent the more reproducible signals observed in 8 experiments out of 9 performed whereas open arrows indicate less reproducible signals. The size of the molecular markers are indicated in kDa. HMT: Hydroxymethyltransferase; CsLec17: 17 kDa phloem lectin from *C. sativus*; CsLec26: 26 kDa phloem lectin from *C. sativus*.

### Figure 3: Aphid transmission of purified CABYV after addition of cucumber sap proteins fractionated by exclusion chromatography

After a 24 h AAP on artificial medium containing CABYV purified virus (50 µg/ml) and supplemented or not with cucumber sap proteins (30 to 40 µg) from concentrated fractions obtained after size exclusion chromatography, 20 *M. persicae* were transferred to healthy *M. perfoliata* seedlings for a 4-day IAP. Four to nine test plants were inoculated with the viruliferous aphids for each condition in each of the three independent experiments. NP : no protein added to the virus.

### Figure 4: RNaseA sensitivity assay of CABYV particles

Purified CABYV particles (210 ng equivalent to 42 ng of RNA) mixed with purified AtPP2-A1 (10 µg) in TN buffer (Tris HCl 0.1 M pH 7,5; NaCl 15 mM) were treated with RNase A ( $1 \cdot 10^{-2}$ ,  $6 \cdot 10^{-3}$  and  $3 \cdot 10^{-3}$  µg/µl). After 30 min incubation at 37°C, RNA was phenol-extracted and reverse transcribed, followed by polymerase chain reaction (PCR). Primers complementary or identical to nucleotides 4088 to 4105 and 3503 to 3520, respectively, of the CABYV genome were used. RT-PCR products were analyzed by electrophoresis in 1% agarose gel and were viewed after ethidium bromide staining. C-: RT-PCR negative control (water). C+: RT-PCR positive control (CABYV virions without RNase A treatment). This experiment was carried out twice and gave similar results.

### Figure 5: Accumulation of CABYV genomes in aphids measured by Q-RT-PCR

Number of CABYV genomes accumulated in aphids which have acquired CABYV virions supplemented or not with 30 µg of purified AtPP2-A1. Batches of 10 aphids were analyzed in duplicate after being transferred on healthy plants for 4 days to empty the lumen of the digestive tract of virions.

**Legends of figures in supplementary data:**

**Figure S1: Cross reactions between phloem sap proteins and antibodies directed against CABYV**

A and B) Sap proteins from *C. sativus* were separated on a 2D-gel electrophoresis before being transferred onto nitrocellulose and incubated with CABYV-specific antibodies. Sap proteins reacting with CABYV antiserum are labeled with a star. C) A similar experiment with sap proteins fractionated by size exclusion chromatography and separated on 1D-gel electrophoresis.

**Figure S2: Protein concentration in cucumber sap collected at different leaf positions**

Sap was collected by exudation from individual cucumber leaves. L1 corresponds to the oldest leaf and L6 to the youngest. Protein concentration was determined with the Bradford protein assay kit using BSA as a standard.

**Figure S3: Protein composition of fractions exhibiting a stimulatory effect on aphid transmission of CABYV**

Sap proteins were fractionated on a gel exclusion chromatography column and protein composition of fractions 17 (from experiment 1) and fractions 12 and 16 (from experiment 3) (see Figure 3) were analyzed by SDS-PAGE electrophoresis on a 12% polyacrylamide gel. Twenty µg of proteins were loaded on the gel (10 µg for fraction 17 Exp 1) and stained with Colloidal blue. The size of the molecular markers are indicated in kDa. Predominant proteins are indicated in each fraction (•).



# 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

S. Revollon<sup>1</sup>, J.M. Strub<sup>3</sup>, A-C. Fitchette<sup>2</sup>, L. Wiss<sup>1</sup>, V. Gomord<sup>2</sup>, A. Van Dorsselaer<sup>3</sup> and V. Brault<sup>1‡</sup>

<sup>1</sup> INRA, Université de Strasbourg UMR SVQV, 28 rue de Herrlisheim BP 20507, 68021 Colmar, France

<sup>2</sup> LU GLYCAD, IFRMP 23, Université de Rouen, 76821 Mont Saint Aignan, France

<sup>3</sup> Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, IPHC-DSA, UDS, CNRS, UMR 7178, 25 rue Becquerel 67087-Strasbourg, France

‡ corresponding author

[veronique.brault@colmar.inra.fr](mailto:veronique.brault@colmar.inra.fr)

tel: +33 3 89 22 49 34

fax: +33 3 89 22 49 33

## Abstract

Poleroviruses are strictly transmitted by aphids. The ability of *Turnip yellows virus* (TuYV) to bind lectins *in vitro*, together with the nontransmissibility of virions submitted to a chemical deglycosylation, previously led to the hypothesis that glycosylation of virions is required for aphid transmission. Using different approaches based on (i) a lectin binding assay, (ii) use of specific complex glycan antibodies and (iii) mass spectrometry, we found no evidence that the structural proteins of TuYV and *Cucurbit aphid-borne yellow virus* (CABYV) carry glycan residues. Moreover, mutation of each of the four potential *N*-glycosylation sites of the structural protein sequences of CABYV indicated that *N*-glycosylation is not involved in aphid transmission. These results did not corroborate the previous hypothesis for the role of glycosylation in aphid transmission. They, however, revealed the systematic presence of a glycosylated plant protein in purified polerovirus suspensions, whose function in aphid transmission should be evaluated.

**Keywords:** glycosylation, aphid transmission, polerovirus

## Introduction

*Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV, *Polerovirus*, *Luteoviridae*) is a plant virus that is phloem-limited and obligatorily transmitted by aphids in a circulative and nonpropagative manner. Virus particles, acquired by aphids when feeding on infected plants, cross the gut epithelium at the mid- and hindgut levels (Reinbold, Herrbach, and Brault, 2003) before being released in the hemolymph. From there, virions gain access to the accessory salivary glands cells, are transported through these cells and are finally released in the salivary duct and then into plants together with saliva (Brault, Herrbach, and Reinbold, 2007; Gildow, 1999). In both field and laboratory conditions, CABYV is efficiently transmitted by two aphid species, *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* (Lecoq et al., 1992). The isometric virion of approximately 25 nm in diameter contains a single-stranded genomic RNA of ca. 5.6 kb which has been fully sequenced (Guilley et al., 1994) and for which a full-length infectious clone is available (Prüfer et al., 1995). Polerovi-

rus particles are composed of two types of protein, the major capsid protein (CP) of 22 kDa and a minor species of 74 kDa known as readthrough (RT) protein. RT protein is an extended form of the CP produced by an episodic suppression of the CP stop codon (Brown, Dinesh-Kumar, and Miller, 1996; Bruyère et al., 1997). Both structural proteins have been shown to be required for efficient polerovirus transmission (Brault et al., 2003; Brault et al., 2000; Brault et al., 1995; Bruyère et al., 1997; Chay et al., 1996; Jolly and Mayo, 1994; Peter et al., 2008). While the major capsid protein, which controls virion formation, is essential in the transmission process, the RT protein is not strictly required for virus gut transport (Reinbold, Herrbach, and Brault, 2003). This protein must, however, be incorporated into virus particles for efficient retention of virions in the hemolymph and transport through the accessory salivary gland cells (Brault et al., 1995; Reinbold et al., 2001; van den Heuvel et al., 1997).

Virions transport through the insect cells relies on an endocytosis-exocytosis mechanism which is dependent on the presence of virus-specific receptors which have not yet been characterized. Several aphid proteins which can bind to purified polerovirus virions *in vitro* (Seddas et al., 2004) have, however, been identified as have specific aphid proteins only present in efficient polerovirus-transmitters (Yang et al., 2008).

A previous study (Seddas and Boissinot, 2006) on *Turnip yellows virus* (TuYV; previously referred as *Beet western yellows virus*, *Polerovirus*), a close relative to CABYV, showed that deglycosylation of purified virus with *N*-glycosidase F or  $\alpha$ -D-galactosidase abrogates aphid transmission of the virus, suggesting that structural glycosylated proteins could be involved in virus recognition or transport in the vector. Enveloped animal viruses like *Human immunodeficiency virus* (Koch et al., 2003; Li et al., 1993; Pollakis et al., 2001; Wei et al., 2003), *Dengue virus* (Bryant et al., 2007), *Hepatitis C virus* (Fournillier et al., 2001), *Influenza virus* (Vigerust et al., 2007) and *West Nile virus* (Li et al., 2006) rely on *N*- or *O*-linked glycosylated proteins anchored into the envelope for virus-receptor recognition and entry into host cells as well as for additional functions like proteolytic processing, protein trafficking or escape from neutralizing antibodies. In contrast, the vast majority of non-enveloped viruses, with the exception of the rotaviruses (Estes and Cohen, 1989), do not contain glycoproteins. In contrast to the animal kingdom, plant viruses are mostly non-enveloped. There is evidence for the presence of glycosylated residues on structural proteins for *Potato virus X* (Baratova et al., 2004) and *Plum pox virus* (PPV) (Fernandez-Fernandez et al., 2002), although the function of this modification in the virus cycle is still unclear. Thus, virus spread and titre were slightly affected in *Arabidopsis* mutated in the *O*-linked *N*-acetylglucosamine transferase (SEC mutant) that is responsible for glycan addition on PPV coat protein sequence (Chen et al., 2005; Scott et al., 2006). *N*-glycosylation of a protein anchored in the virion envelope has been reported to play a role in the transmission of *Tomato spotted wilt virus* by its thrips vector (Whitfield, Ullman, and German, 2004).

In this paper, the glycosylation status of CABYV and TuYV particles was assayed by different techniques and the precise role of *N*-glycosylation in polerovirus transmission by aphids was more addressed by studying the transmissibility by aphids of CABYV mutants affected in the potential *N*-glycosylation sites of the structural capsid proteins. The results do not support the presence of glycosylated residues on the structural proteins of either virus and argue against a role for glycosylation of such proteins in the aphid transmission process.

## Materials and methods

### **Protein Sequence analysis**

SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) was used to identify the sequence of a putative signal peptide of secreted proteins on the CABYV structural protein sequences. ScanProsite (<http://www.expasy.ch/tools/scanprosite/>) was used to identify *N*-linked glycosylation sites and NetOGlyc 3.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>) was used to predict *O*-linked *N*-acetylgalactosamine glycosylation sites on poliovirus structural protein sequences.

### **Construction of CABYV mutants**

All point mutants were created by PCR mutagenesis using pCA<sub>0</sub>WT DNA as template (Prüfer et al., 1995). Mutagenic primers were designed to substitute asparagines residues by glutamine at position 70 (5'AAGGACCAACTCACGGGCAGTTCC3' and 5'CCGTGAGTTGGTCCTTTGAAAATACAAATG3' for mutant Ngly1) and 178 (5'AAAGGGCAAGGATCTTCCTCGGTTG3' and 5'GAAGATCCTTGCCCTTTATAGAGGATCTT3' for mutant Ngly2) on the CABYV-CP sequence and at position 408 (5'CTTCGTATCAATACACCGTCTCATACGG3' and 5'CGGTGTATTGATACGAAGAATCCTTCTG3' for mutant Ngly3) and 415 (5'TACGGGCAATACACGGAGAAATATTGC3' and 5'CCGTGTATTGCCCGTATGAGACGGTG3' for mutant Ngly4) on the CABYV-RT sequence. Bold characters indicate mutated nucleotides. Oligonucleotides CA<sub>11</sub> (nucleotides [nt] 3071 to 3088 on CABYV RNA) and CA<sub>12</sub> (complementary to nt 4059 to 4076) were used as external primers to construct mutants in the CP, and oligonucleotides CA<sub>EagI</sub> (nt 4261 to 4278 on CABYV RNA) and CA<sub>20</sub> (complementary to nt 5656 to 5670) for mutants in the RT. The amplified fragment was further digested by *EcoRI* and *EagI* for Ngly1 and Ngly2 or by *EagI* and *Sall* for Ngly3 and Ngly4, and introduced into pCA<sub>0</sub>WT DNA submitted to cleavage by similar restriction enzymes. Constructs for agroinfection were made by replacing the wild type CABYV cDNA sequences in the binary vector pBin35SCA-WT (Prüfer et al., 1995). The resulting plasmids were introduced into *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (Holsters et al., 1980) for agroinoculation (Prüfer et al., 1995).

### **Infection of protoplasts and plants**

Protoplasts of *Chenopodium quinoa* were inoculated with viral RNA transcripts as described previously (Bruyère et al., 1997). *A. tumefaciens* harboring the mutant constructs was grown to an optical density of 0.8 at 600 nm and agroinfiltrated (Prüfer et al., 1995) into *Montia perfoliata*. Infected plants were identified 3 weeks post-inoculation by double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) (Clark and Adams, 1977) with a rabbit polyclonal antiserum raised against CABYV (SEDIAG, France).

### **Aphid transmission assays from infected plants and purified virus**

Virus-free colonies of *Myzus persicae* and *Aphis gossypii* were reared on caged pepper (*Capsicum annuum*) or cucumber (*Cucumis sativus*) seedlings, respectively, at 20°C with a 16 h photoperiod. Aphid transmission experiments used either purified virus or detached leaves from agroinfected plants as a source of inoculum (Bruyère et al., 1997). Purified suspensions of virus were obtained from agroinfected *M. perfoliata* as previously described (Van den Heuvel, Boerma, and Peters, 1991) and offered to aphids in a solution of 0.1 M sodium citrate, pH 6, and 20% sucrose. Third- and fourth-instar nymphs or adults were given a 48 h acquisition access period (AAP) before being trans-

ferred to *M. perfoliata* test plants for a 4-day inoculation access period (IAP). Aphid were then eliminated by an insecticide treatment and test plant infection was monitored by DAS-ELISA 3 weeks later.

### **Western and Northern blotting**

Viral structural proteins in total protein extracts of infected protoplasts or plants were detected by Western blot using a CABYV polyclonal antiserum (Lecoq et al., 1992) or a CABYV-C<sub>term</sub>RT specific antiserum (Braut et al., 2005). Detection of CABYV structural proteins was performed with an enhanced chemiluminescence Western-blotting kit (Bio-Rad, France). Total RNA was extracted from similar plant material using Rneasy Extraction kit (Qiagen, France) and viral RNA was detected by Northern-blot using a digoxigenin-labeled probe (Roche, France) complementary to the noncoding 3'-terminal 201 nt of CABYV genome (Guilley et al., 1994).

### **RNase sensitivity assay**

RNA extraction from 200 mg of CABYV-infected leaves was performed either in 400 µl of buffer (200 mM Tris-HCl pH 9.0, 400 mM KCl, 200 mM sucrose, 35 mM MgCl<sub>2</sub>, 25 mM EDTA) which protects from attack by endogenous plants RNases or in a non-protecting buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>). Prior to RNA phenol extraction and ethanol precipitation, leaf extract obtained with the non-protecting buffer was submitted to a 30 min incubation at 37°C. RNA was finally resuspended in 20 µl of RNase-free H<sub>2</sub>O.

### **Analysis of viral progeny RNA**

The stability of the mutations in progeny viral RNA following agroinfection or aphid transmission was examined by amplifying a DNA fragment spanning the mutation site by reverse transcription followed by PCR (RT-PCR) as described elsewhere (Braut et al., 1995). For the Ngly1 and Ngly2 mutants, reverse transcription was primed with oligonucleotide CA<sub>08</sub> (complementary to nt 4088 to 4105), and a PCR product was synthesized with the additional oligonucleotide CA<sub>07</sub> (nt 3505 to 3520). For the Ngly3 and Ngly4 mutants, reverse transcription was primed with oligonucleotide CA<sub>20</sub> (complementary to nt 5656 to 5670), and a PCR product was synthesized with the additional oligonucleotide CA<sub>EagI</sub> (nt 4261 to 4278). The PCR product was then digested with one of the following pairs of enzymes (numbers in parentheses refer to the position of each restriction site): *Bam*HI(4006)/*Eco*RI(4544), *Eag*I (4268)/*Sal*I(5669) depending on the mutant to be analyzed. The appropriate fragments were cloned into a pBluescript KS+ plasmid (Stratagene, Heidelberg, Germany) cut with the appropriate enzymes, and the insert sequences were determined from randomly selected clones.

### **Analysis of glycosylation by immunodetection**

Protein extracts were separated on a 15% SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose. Immunodetection of glycoproteins containing plant complex glycans was performed with anti-β(1,2)-xylose-, anti-β(1,3)-fucose- or anti-Lewis a antibodies according to Faye *et al* (1993). and Fichette-Lainé *et al.* (1997). Affinodetection of high-mannose *N*-glycans was carried out using the concanavalin A/peroxidase method (Faye and Chrispeels, 1985).

### **Mass spectrometry**

Protein preparation for in gel digestion.

Purified CABYV suspension was loaded on a 10% SDS-PAGE and the structural proteins were visualized after staining with colloidal blue 0.1% (Serva Blue G) prepared in 17% of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.5% acetic acid and 34% methanol. After an over-night incubation at room temperature, the gel was destained by successive washes in  $\text{H}_2\text{O}$ . The gel pieces containing CABYV structural proteins were cut out and successively washed with 50  $\mu\text{l}$  of 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  and 50  $\mu\text{l}$  of acetonitrile (three times), and dehydrated with 100  $\mu\text{l}$  of acetonitrile before reduction in the presence of 10 mM DTT in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (1 h at 57°C) and alkylation in the presence of 55 mM iodoacetamide in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ . For tryptic digestion, the gel pieces were resuspended in 2 volumes of trypsin (12.5 ng/ $\mu\text{l}$ ; V5111 Promega, USA) freshly diluted in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  and incubated overnight at 37°C. The digested peptides were then extracted from the gel in a buffer containing 34.9%  $\text{H}_2\text{O}$ , 65% acetonitrile, and 0.1%  $\text{HCOOH}$ , the concentration of acetonitrile was reduced by evaporation (SpeedVac) and the sample was analyzed by nanoLC-MS/MS.

#### ***Chromatography conditions on NanoAcquity.***

The analysis was performed on a nanoACQUITY Ultra- Performance-LC (UPLC, Waters, Milford, USA). The samples were trapped on a 20 x 0.18 mm, 5  $\mu\text{m}$  Symmetry C18 pre-column (Waters, Milford, USA), and the peptides were separated on a ACQUITY UPLC® BEH130 C18 column (Waters, Milford, USA), 75  $\mu\text{m}$  x 200 mm, 1.7  $\mu\text{m}$  particle size. The solvent system consisted of 0.1% formic acid in water (solvent A) and 0.1% formic acid in acetonitrile (solvent B). Trapping was performed during 3 min at 5  $\mu\text{l}/\text{min}$  with 99% of solvent A and 1% of solvent B. Elution was performed at a flow rate of 400 nl/min, using 1-40% gradient (solvent B) over 35 min at 45°C followed by 65% (solvent B) over 5 min.

#### ***MS and MS/MS conditions on SYNAPT mass spectrometer.***

The MS and MS/MS analyzes were performed on a SYNAPT™ an hybrid quadrupole orthogonal acceleration time-of-flight tandem mass spectrometer (Waters, Milford, USA) equipped with a Z-spray ion source and a lock mass system. With the system operating in positive mode, the capillary voltage was set at 3.5 KV and the cone voltage at 30 V for protein identification, but for glycan determination the cone voltage was set at 50 V. Mass calibration of the TOF was achieved using phosphoric acid ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) on the [50;2000] m/z range. Online correction of this calibration was performed with Glu-fibrino-peptide B as the lock-mass. The ion ( $\text{M}+2\text{H}$ ) at m/z 785.8426 was used to calibrate MS data and the fragment ion ( $\text{M}+\text{H}$ ) at m/z 684.3469 was used to calibrate MS/MS data during the analysis.

For tandem MS experiments, the system was operated with automatic switching between MS and MS/MS modes (MS 0.5 s/scan on m/z range [250;1500] and MS/MS 0.7 s/scan on m/z range [50;2000]). The 3 most abundant peptides (intensity threshold 60 counts/s), preferably doubly and triply charged ions, were selected on each MS spectrum for further isolation and CID fragmentation with 2 energies set using collision energy profile. Fragmentation was performed using argon as the collision gas. The complete system was fully controlled by MassLynx 4.1 (SCN 566, Waters, Milford, USA). Raw data collected during nanoLC-MS/MS analyses were processed and converted with the software tool ProteinLynx Global Server (version 2.3; Waters, Milford, USA) into pkl peak list format. Normal background subtraction type was used for both MS and MS/MS with 5% threshold and polynomial correction of order 5, and no deisotoping was performed.

### ***Data analysis and protein identification.***

The MS/MS data were analyzed using MASCOT 2.2.0 algorithm (Matrix Science, UK) to search against NCBI nr data base (2<sup>nd</sup> December 2009) concatenated with reversed copies of all sequences (20168488 entries). Spectra were searched with a mass tolerance of 30 ppm for MS and 0.05 Da for MS/MS data, allowing a maximum of one missed cleavage site by trypsin and with carbamidomethylation of cysteines and oxidation of methionines fixed as variable modifications. Protein identifications were validated when at least two peptides were identified with Mascot ion score greater than 35 for each MS/MS spectra. For the estimation of the false positive rate in protein identification, a target-decoy database search was performed (Elias and Gygi, 2007). The false positive rate was close to 0.5%. Criteria used for protein identifications followed the general guidelines for reporting proteomic experiments (MIAPE; <http://www.psdev.info>).

### ***MALDI-TOF mass spectrometry conditions***

Mass measurements were carried out on an Ultraflex™ MALDI-TOF/TOF mass spectrometer (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany). This instrument was used at a maximum accelerating potential of 25 kV in positive mode and was operated in reflector mode at 26 kV. The delay extraction was fixed at 110 ns and the frequency of the laser (nitrogen 337 nm) was set at 20 Hz. The acquisition mass range was set to 400-4000 m/z with a matrix suppression deflection (cut off) set to 500 m/z. The equipment was first externally calibrated with a standard peptide calibration mixture that contained 7 peptides (Bruker Peptide Calibration Standard #206196, Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) covering the 1000-3200 m/z range and thereafter every spectrum was internally calibrated using selected signals arising from trypsin autoproteolysis (Promega V5111 Madison, WI, USA) (842.510 m/z and 2211.105 m/z peptides) to reach a typical mass measurement accuracy of  $\pm 30$  ppm. Each raw spectrum was opened with flexAnalysis 2.4 build 11 (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) software and processed using the following parameters: signal-to-noise threshold of 1, Savitzky-Golay algorithm for smoothing, median algorithm for baseline subtraction, and SNAP algorithm for monoisotopic peak detection and labelling. In all cases, resolution was higher than 9000.

Sample preparation was performed with the dried droplet method using a mixture of 0.5  $\mu$ l of sample with 0.5  $\mu$ l of matrix solution dry at room temperature. The first matrix solution was prepared from a saturated solution of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid in water/acetonitrile 50/50 diluted three times in water/acetonitrile/trifluoroacetic acid 50/49.9/0.1. The second matrix solution was prepared from a 10 mg/ml of 2,5-dihydroxybenzoic acid in water/acetonitrile 50/50.

### ***Data analysis and protein identification.***

Mass data collected during MALDI-TOF analyses were processed using the software tool flexAnalysis (version 2.4; Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany). The MS data were analyzed using the MASCOT 2.2.0. algorithm (Matrix Science, UK) to search against the NCBI nr data base. The research was done with a mass tolerance of 30 ppm, allowing a maximum of one missed cleavage site by trypsin and with carbamidomethylation of cysteines and oxidation of methionines fixed as variable modifications.

## Results

### ***Infectivity, stability and aphid-transmissibility of N-glycosylation CABYV mutants***

In order to address the role of putative glycosylation of CABYV structural proteins, an *in silico* analysis was first performed to identify putative glycosylation sites on the viral protein sequence. Four potential *N*-glycosylation sites, harboring the N-x-S/T pattern (in which “x” represents any amino acid except a proline) were located on the virus structural protein sequences; two in the major CP sequence (amino acid [aa] 70 and 178), and two in the RT sequence (aa 408 and 415). Sequence comparison with other poleroviruses (Table S1) revealed the presence of from 3 to 7 potential *N*-glycosylation sites on the structural protein sequences but the position of the putative sites is not conserved among the viruses. Sequence analysis also predicted 5 potential *O*-glycosylation sites, all located in the proline tract of the RT sequence of CABYV located just downstream the CP-stop codon. As this sequence is highly conserved among poleroviruses (Guilley et al., 1994), similar *O*-glycosylation sites were found in the CP sequences of the other poleroviruses analyzed (Table S1).

Because *N*-glycosylation has been reported to affect aphid transmission of TuYV (Seddas and Boissinot, 2006), we constructed four CABYV mutants each modified in one of the four potential *N*-glycosylation sites (the mutants are referred to Ngly-1, -2, -3, -4; Figure 1). For each putative site, the conserved Asparagine (N) was modified into Glutamine (Q) to minimize change in the secondary structure of the protein. This modification induces, however, a modification of the 17 kDa protein sequence for Ngly1 and -2 mutants, because the 17 kDa sequence is embedded in the CP sequence in a different reading frame (Figure 1). The effect of the introduced mutations in virus replication was first analyzed in *C. quinoa* protoplasts. Full-length CABYV-RNA transcripts containing the different mutations in potential *N*-glycosylation sites were introduced into *C. quinoa* protoplasts which were harvested 48 h postinoculation. Total RNA was extracted and CABYV genomic RNA accumulation was analyzed by Northern blot. We observed that the mutant transcripts were replication competent and produced progeny genomic RNA in the protoplasts (Figure 2A). Genomic RNA accumulation for each mutant was comparable to that of the wild-type virus which suggested that the mutations introduced into the viral sequence had no apparent effect on virus replication. In the transcript-infected protoplasts, the mutants directed synthesis of CP and RT proteins at approximately wild-type levels (Figure 2B), which shows that the introduced mutations had no impact on CP or RT synthesis.

To further analyze CABYV-mutants behavior in whole plants, the viral cDNA containing the mutations were transferred into the binary vector pBin19 under the control of the *Cauliflower mosaic virus* 35S promoter and agroinoculated to the host plant *M. perfoliata*. Virus accumulation in agroinoculated and non-inoculated leaves of *M. perfoliata* was analyzed by DAS-ELISA 3 to 4 weeks postinoculation. All constructs were infectious in *M. perfoliata* (Table 1) and accumulated in agroinoculated leaves in amounts comparable to the wild type virus except for Ngly2 mutant in which virus accumulation was reduced. In systemic leaves, only the Ngly4 mutant accumulated to wild type levels whereas Ngly1 and -3 accumulation was impaired and Ngly2 was only detected at a very low level in 10% of the agroinoculated plants (Table 1). The difference in virus accumulation for mutants Ngly1 and -3 is not related to reduced CABYV-antiserum recognition because DAS-ELISA absorbance values of series of dilutions of both purified mutants were identical to those of a wild type virus reference (Table S2). Although the structural protein

sequence was modified in the mutants, no epitope conformation change was induced, at least in Ngly1, -3 and -4 mutants. Consistent with the accumulation rates in systemic leaves measured by DAS-ELISA, progeny genomic RNA of Ngly4 accumulated to levels similar to the wild type virus whereas genomic RNA was detected at a reduced level in plants infected with Ngly1, -2 and -3 (Figure 3).

An RNase-protection assay was carried out to determine whether any of the introduced mutation interfered with packaging of viral RNA into virions. Agroinoculated leaf extracts were harvested 7 days postinoculation and incubated 30 min at 37°C under conditions in which nonencapsidated CABYV-RNA is degraded by endogenous RNases. The extract was then subjected to phenol extraction, and protected viral RNA was detected by Northern blot hybridization. A similar RNA extraction was performed without the 37°C incubation step to evaluate the accumulation of total viral RNA present in the sample. For all mutants, except Ngly2, significant amounts of the progeny genomic RNAs in the leaf extract were resistant to degradation by this treatment (Figure 4). Ngly2-genomic RNA was only detected with difficulty after RNase treatment, suggesting that the mutation introduced in the CP sequence of this mutant interfered with packaging of viral RNA into an RNase-resistant form. To evaluate virion stability of the different mutants we also performed purification of the different *N*-glycosylation mutants either from systemic infected leaves for Ngly1, Ngly3 and Ngly4 or from agroinfiltrated tissues for Ngly2. Typical virus peaks with an absorbance maximum at 260 nm were observed in the sucrose gradients loaded with CABYV wild type virus, Ngly1, Ngly3 and Ngly4 mutants (Figure S1). In contrast, no typical peak was observed for the mutant Ngly2 (in three independent experiments, Figure S1). However, when aliquots of the sucrose gradient loaded with the Ngly2 were analyzed by transmission electron microscopy, typical virus particles were observed (Figure S2). Therefore, the mutation introduced into the Ngly2 mutant does not abolish virion formation per se but could interfere with virion stability *in planta*, impairing efficient recover of whole virions. This packaging defect is presumably responsible, at least in part, for the lower yield of progeny viral RNA from systemically infected leaves of agroinoculated plants.

Stability of the introduced point mutations during virus multiplication in agroinfected plants was investigated by RT-PCR. Total RNA was isolated from systemically infected leaves 3 weeks postinoculation, and a region of the genome encompassing the mutations was selectively amplified by RT-PCR. The amplified cDNA was then cloned, and the inserts of 8 randomly selected clones, obtained from two independent reverse transcription-PCRs, were sequenced. All the sequence alterations detected in the RT-PCR clones obtained from infected *M. perfoliata* are summarized in Figure 5. Variation in the wild-type progeny sequences was observed and is presumably due to a combination of natural sequence "drift" during the relatively error-prone viral RNA multiplication process and errors introduced during reverse transcription-PCR amplification of the sequence to be analyzed. In the Ngly1 viral progeny, we observed, in 3 out of the 8 clones analyzed, three mutations around the CP-stop codon located approximately 380 nucleotides downstream of the introduced mutation. Two of these mutations resulted in amino acid changes in the CP sequence but these changes did not restore or obviously compensate for the mutated site. One of the mutations eliminated the CP-stop codon. Except for this modification, no sharp difference in secondary mutation accumulation was observed between the *N*-glycosylation mutants and the wild type virus, no reverse mutation was observed in the mutants and no compensatory mutations were noticed in any of the sequences analyzed.

### ***Aphid transmission of mutated viruses from agroinfected plants, and purified virus***

To evaluate the effect of the mutations introduced in the putative *N*-glycosylation sites on virus-vector interactions, *M. perfoliata* agroinfected with the *N*-glycosylation mutants or purified virus were used as virus source in aphid transmission experiments. When *M. persicae* or *A. gossypii* were allowed to feed on systemic infected leaves, Ngly1, -3 and -4 were transmitted although at a reduced level compared to the wild type virus (Table 2). This difference in virus transmission efficiency can be attributed, at least for Ngly1 and Ngly3, to the lower virus accumulation in infected systemic leaves (Table 1, Figure 3). Indeed, virus transmissibility of both mutants increased when using purified virus and attained levels similar to those of wild type virus in the case of Ngly1 mutant (Table 2). In contrast, the reduced transmissibility of Ngly4 mutant from systemic infected leaves, in which it accumulated at a level very similar to the wild type virus (Figure 3 and Table 1), could be due to a lower accessibility of the mutated virus to the aphids. This hypothesis suggests that the mutation introduced could interfere with virus loading in sieve elements. When this mutant was offered to aphids from a purified suspension through a parafilm membrane, the rate of virus transmissibility was restored to the wild type level, confirming that the mutation introduced in the Ngly4 mutant does not strictly impair virus transmission by aphids (Table 2).

Because the Ngly2 mutant is highly impaired in systemic movement and do not form stable particles that can be purified from infected plants, virus transmission of this mutant was addressed using agroinoculated leaves as virus source. Ten days after agroinoculation, aphids were allowed to acquire the virus for 48 h AAP before being transferred to test plants for a 4-day IAP (20 aphids were transferred on each test plant). Ngly2 aphid transmission was analyzed by RT-PCR performed on total RNA extracted from these test plants 7 days after aphid deposition and the expected 600 bp PCR fragment (nt 3505 to 4105 on the CABYV sequence) was detected in 3 test plants out of 3. Accumulation of Ngly2 in test-plants was, however, too low to be detected by ELISA (data not shown).

The stability of the introduced point mutations in aphid-inoculated plants was investigated by RT-PCR as already described above. The various sequence alterations detected in the RT-PCR clones obtained from aphid-inoculated *M. perfoliata* did not show selection of a particular virus progeny from the source leaf after aphid transmission nor were reversion or compensatory mutations detected in the sequences analyzed (Figure 5). In the Ngly1 virus progeny, amino acid changes were again observed around the CP-stop codon in 2 clones out of 8 analyzed, although the observed changes were not similar to the one found in the viral progeny of Ngly1-agroinfected plants. As nucleotide modifications also occurred around the CP stop codon in the wild-type virus progeny in aphid-infected plants (in two clones out of 8 sequenced), we conclude that this sequence is highly subject to modification independently of the presence of engineered mutations.

### ***Detection of glycosylated residues on structural proteins using lectins or glycan-specific antibodies***

CABYV structural proteins could potentially be co-translationally modified by *N*-glycosylation during their synthesis at the endoplasmic reticulum (RE) membrane. *N*-

glycosylation consists of the en-bloc transfer of a glycan precursor onto the asparagine of the consensus site N-x-S/T. This *N*-glycan precursor can be matured successively into high-mannose *N*-glycan and a complex *N*-glycan, while the protein passes through ER and Golgi apparatus to reach its final destination in the secretory pathway (Lerouge et al., 1998). Mature glycoproteins carry a mixture of complex glycans as well as some high-mannose *N*-glycans that have escaped terminal glycosylation.

To detect high-mannose *N*-glycans on CABYV structural proteins, purified suspension of the virus was first subjected to SDS-PAGE. The structural proteins were then transferred onto nitrocellulose before being detected with the lectin, Concanavalin A (ConA), specific for high-mannose *N*-glycans, followed by an incubation with horseradish peroxidase (Faye and Chrispeels, 1985). Addition of the enzyme substrate shows a signal of about 24 kDa (corresponding to the CABYV-CP) respectively, and another at about 90 kDa (Figure 6). Specificity of the interaction was evaluated by incubation with ConA in the presence of a lectin sugar competitor (methyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside) or after submitting the virus extract to on-blot periodate oxidation, which cleaves the glycol ring of the sugar moiety, thus preventing ConA binding. Only the 90 kDa signal was specific (signal disappearance after incubation in the presence of competitor sugar or after periodate treatment, Figure 6). The 24 kDa signal observed on the blot was due to a nonspecific reaction between CABYV-CP and horseradish peroxidase (Figure 6D). When the virus extract was incubated with a biotin-bound ConA prior to addition of alkaline phosphatase bound to streptavidine, a similar nonspecific reaction was observed between the CABYV-CP and alkaline phosphatase bound to streptavidine (data not shown). Therefore, no definitive conclusion could be drawn concerning the presence of high-mannose *N*-glycans on the CABYV-CP. No other signal of about 65 kDa, corresponding to the CABYV-RT protein incorporated into virions (Prüfer et al., 1995), was observed on the blot suggesting that no high-mannose *N*-glycan was present on the minor virion compound (Figure 6). We should mention here that, as reported before for polioviruses, a C-terminally processed RT protein of about 65 kDa (thereafter referred as RT\*) is incorporated into virions (Bahner et al., 1990; Brault et al., 1995). Similar results were obtained when TuYV purified virus was used to detect high-mannose *N*-glycans: a nonspecific reaction was observed between TuYV-CP and the purified horseradish peroxidase whereas the truncated RT protein (about 65 kDa), incorporated into virions, did not exhibit the presence of high-mannose *N*-glycans (Figure S3). As observed before (Figure 6), the only protein specifically bound to high-mannose *N*-glycans was the one at about 90 kDa (Figure S3).

Detection of plant complex glycans on CABYV structural proteins was performed using an on-blot procedure similar to the one described above, except incubations were performed with plant antibodies specific for oligosaccharide motifs present on plant complex *N*-glycans (core  $\beta$ (1,2)-xylose, core  $\alpha$ (1,3)-fucose and terminal anti-Lewis a) (Fichette-Lainé et al., 1997) followed by an incubation with peroxidase-bound secondary antibodies. After enzyme substrate addition, a signal of about 90 kDa was observed in the virus extract after incubation with any of the three antibodies directed against plant-specific complex glycans (Figure 7). No other signal corresponding to CABYV structural proteins (CABYV-CP of 24 kDa or CABYV-RT\* of 65 kDa) were detected, which suggests the absence of complex *N*-linked glycans on the viral proteins. Similar experiments performed with TuYV purified virus led to similar conclusions; except for the presence of complex glycans on a 90 kDa protein, no other signal was detected on TuYV structural proteins (Figure S4).

The 90 kDa glycoprotein, possessing both high-mannose- and plant complex *N*-glycans, was repeatedly present in purified preparation of CABYV and TuYV. This protein was further gel-extracted and identified by mass spectrometry as a plant protein (O. Lemaire and P. Schellenbaum, personal communication).

### ***Mass-spectrometry on CABYV and TuYV structural proteins***

Mass spectrometry analyses were performed to detect the presence of glycans on the CABYV structural proteins. The MALDI-TOF mass spectrometry analyses were conducted with two different matrixes ( $\alpha$ -cyano-4 hydroxy cinnamic acid, 2,5-dihydroxybenzoic acid). As already mentioned above, purified CABYV virions are composed of the 24 kDa CP and the 65 kDa RT\*. The cleavage site of the RT protein has not been identified with precision but based on sequence homology between the RT sequences of members in the *Luteoviridae* family, it is thought to be located around the highly conserved DE (431-432, Figure 8) (Guilley et al., 1994). In addition to confirming the identity of the structural CABYV proteins, the MALDI-TOF peptide mass fingerprint analysis after in-gel tryptic digestion also suggests that the cleavage site of the RT protein could be located 9 amino acids (or more) downstream from the DE motif. 79% of the tryptic peptides obtained were of viral origin and if we consider the arginine located at 440 as the more distal amino acid of the RT\* protein, the sequence coverage of the CP and RT\* was 57% and 53% respectively (Figure 8A). Trypsic peptides (69-97, 177-188, 404-419) with *N*-glycosylation consensus sites (N-x-S/T) were detected as non-modified peptide, which provides further evidence that the structural CABYV proteins forming the particles are not glycosylated (Figure 8A). The MALDI-TOF peptide mass fingerprint performed on the structural proteins of TuYV gave a high coverage of the proteins (84% for CP and 70% for RT\*) and confirms that four of the five potential *N*-glycosylation sites were not modified (coverage by the tryptic peptides 155-175, 180-191, 260-274, 384-400), whereas no definite conclusion could not be drawn for the site positioned at amino acid 50 in an arginine-enriched region (Figure S5), which was not covered by the sequencing. Similarly as for CABYV, the putative cleavage site of the TuYV-RT protein was estimated to be located at least 9 amino acids downstream the conserved DE (Figure S5).

The nano LC-MS/MS analysis allows us to identify the CABYV CP and RT\* proteins with 47% and 42% of sequence coverage respectively. The coverage for the RT\* protein was estimated based on the previous last amino acid identified by MALDI-TOF analysis (position 440). This position is still hypothetical because it was not confirmed by the nano LC-MS/MS analysis. Trypsic peptides (69-97, 177-188, 404-419) covering the putative *N*-glycosylation sites were detected as non-modified peptides (Figure 8), whereas, for TuYV, four of the five potential *N*-glycosylation sites were covered by the tryptic peptides (155-175, 180-191, 260-274, 384-400) corresponding to 70% and 71% of the CP and RT\* sequence respectively. It can be noticed that both mass sequencing analysis end up with a similar C-terminal amino acid (lysine at position 437) which shows that the cleavage site of the TuYV-RT protein is definitely located downstream the conserved DE. A nano LC-MS was performed at high energy cone voltage (50 V) to induce in source fragmentation of the glycan chains. Specific ions of glycan fragmentation ( $M+H^+$ : 163.1, 204.1, 292.1, 366.1, 657.2) corresponding to hexose glycan, *N*-acetylhexosamine glycan, sialic acid glycan, *N*-acetylhexosamine and hexose glycan were extracted from the chro-

matogram. All spectra show that no specific ions were liberated from the CP (Figure 9, Figure S6) and the RT proteins (data not shown) of both viruses. Absence of sialic acid residues is, however, expected because the biochemical machinery for terminal sialylation of *N*-linked complex oligosaccharides in mammalian systems is absent in plants (Lerouge et al., 1998). These results are in agreement with the results obtained by MALDI-TOF and clearly demonstrate that the CABYV and TuYV structural proteins do not possess glycosylated residues.

## Discussion

CABYV, a polerovirus in the *Luteoviridae* family, is transmitted by aphids in a circulative and propagative manner, which implies specific recognition of virions by receptors localized at the intestinal and accessory salivary gland levels. Previous work from several laboratories has demonstrated the involvement of both structural capsid proteins in the efficient transport of virions through the aphid (Brault et al., 2003; Brault et al., 2000; Brault et al., 1995; Bruyère et al., 1997; Chay et al., 1996; Jolly and Mayo, 1994; Peter et al., 2008) and it is well accepted that transport relies on direct interactions between capsid proteins and surface receptors in the aphid. It has been proposed that receptors localized on the intestinal cells could recognize the major coat protein (CP) whereas those located on the ASG cells would bind the minor capsid compound (RT protein) (Chay et al., 1996; Reinbold et al., 2001). The polerovirus receptors still remain unknown but intensive studies are now being carried out in several laboratories to identify these molecules. It is therefore of particular importance to know the exact nature of the viral capsid proteins participating in the interaction in order to develop techniques adapted to their identification. Earlier work showing that treatment of TuYV virions PNGase-F, which cleaves almost all common asparagine-linked glycan chains from glycoproteins, inhibits aphid transmission of the virus was taken as evidence that the virus particles were glycosylated and that this modification could control a major step of the transmission process (Seddas and Boissinot, 2006). By analogy with the presence in animal viruses of envelop glycoproteins which control virus recognition and entry into cells, it was hypothesized that glycosylated polerovirus structural proteins could also control virus internalization into insect cells.

We decided to develop several alternative approaches to detect the presence of glycosylated residues on the structural proteins of CABYV. Whenever possible, we also tested for the presence of glycosylated residues on the structural proteins of TuYV. Mutation of each of the four putative *N*-glycosylation sites localized in the CABYV structural coat protein sequences led to the production of four virus mutants (Ngly1 to -4) whose replication in plants protoplasts was not altered by these modifications. When agroinoculated to plants, Ngly1, -2 and -3 accumulated at a lower level compared to the wild type virus in systemic leaves whereas only Ngly2 displayed impaired accumulation in agroinoculated leaves. In summary, except for Ngly4, the other mutants were apparently affected in local or long distance movement. Polerovirus particles are thought to be the viral entities moving over long distances through the sieve elements (Esau and Hoefert, 1972; Mutterer et al., 1999; Shepardson, Esau, and McCrum, 1980), but nothing is known about the viral entity responsible for cell to cell movement. These two types of movement, however, require both structural capsid proteins together with the movement protein encoded by ORF4 (Bruyère et al., 1997; Chay et al., 1996; Lee, Palukaitis,

and Gray, 2002; Nurkiyanova et al., 2000; Ziegler-Graff et al., 1996). All the mutants we engineered harbour a mutation in the major capsid protein (Ngly1 and 2) or in the minor capsid compound (Ngly3 and 4) which can explain the defect in virus movement. In addition, the engineered mutation in the ORF3 of Ngly1 and 2 introduced an additional mutation in the overlapping reading frame (ORF4) which encodes the host-specific movement protein (Lee, Palukaitis, and Gray, 2002; Ziegler-Graff et al., 1996). We also observed that the stability of Ngly2 particles was greatly impaired which could, by itself, be responsible for the reduced movement of this mutant in the plant. From these results, we had no evidence that the effect we observed on virus accumulation in plant was related to a modification of the glycosylation of the structural proteins.

To test the previously proposed hypothesis that glycosylated virions were required for aphid transmission, we performed aphid transmission experiments using infected plants or purified virus, as virus source. We observed that all the mutants, even the Ngly2 mutant with unstable particles, could be transmitted by aphids. Thus, unless more than one site on the structural protein was glycosylated, these experiments showed that single *N*-glycosylation was not involved in aphid transmission. Analysis of the viral progeny in the agroinfected plants or the aphid-inoculated plants revealed that no selective pressure was applied on the mutated sites even in the case of the mutants affected in virus accumulation in plants. This also suggests that the modifications did not affect functions that were absolutely required in virus cycle.

Presence of high-mannose *N*-glycans or complex glycans on the structural proteins of CABYV or TuYV was further evaluated using a lectin-binding assay or with glycan-specific antibodies. No complex glycans were present on either structural protein, suggesting that none of them are addressed to the Golgi apparatus, the site of complex glycans processing. No clear conclusion could be drawn about the presence of *N*-linked oligomannosidic glycans on the CP of both viruses, due to nonspecific binding of the CP to purified horseradish peroxidase. On the other end, the RT\* proteins incorporated into CABYV and TuYV virions contained no such residues.

Mass spectrometry analysis of CABYV and TuYV structural proteins clearly demonstrated that no glycans of any kind (oligomannosidic or complex) were present on either structural protein: all the peptides, except one located in the TuYV-CP, carrying the putative *N*-glycosylated sites on the CP and RT sequences were identified by mass spectrometry without any mass modification and no glycans among the most common found in nature were released from the structural proteins of both viruses submitted to high voltage fragmentation. These experiments definitively show that CABYV and TuYV structural proteins are not glycosylated, unless addition of the glycan is occurring at a non-conventional site on the sequence and/or if the proteins are modified by an unusual glycan.

Reinvestigation of the presence of glycosylated residues on virus structural proteins of *Cowpea mosaic virus*, which was initially reported to contain significant amounts of carbohydrates (Partridge et al., 1974), also showed that the virions were devoid of glycans when a more sensitive technique (reverse-phase high-performance chromatography) was performed (Altmann and Lomonosoff, 2000). In the case of *Hepatitis E virus*, the capsid protein was shown to be glycosylated when expressed in mammalian cells but no evidence of the presence of *N*-glycosylated residues was obtained after site-directed mutagenesis (Graff et al., 2008), suggesting that the observed glycosylation could have been an artefact of overproduction of the protein. Therefore, so far, the vast majority of nonenveloped viruses in the animal and vegetal kingdom do not contain *N*-linked oligosaccharides. Rotavirus may be the only example of a nonenveloped virus bearing this

kind of modification (Estes and Cohen, 1989), but it should be noted that, in the rotaviruses, the outer glycosylated viral capsid protein is an integral ER membrane protein and the ER is not only the site of virus assembly (Kabcenell and Atkinson, 1985) but also the site of *N*-glycan addition.

It is still unclear why the previous authors (Seddas and Boissinot, 2006) obtained several lines of evidence that TuYV particles were glycosylated. One possible explanation for the reported lectin-binding capacity of purified virions would be a nonspecific binding to hydrophobic domains in the structural proteins that are exposed under denaturing conditions during SDS-PAGE. It has indeed been shown that lectins can bind to hydrophobic noncarbohydrate ligands (Roberts and Goldstein, 1982; Stoitsova, Boteva, and Doyle, 2003). Moreover, the lectin-binding assay used by Boissinot and Seddas was not validated by competitive experiments with appropriate sugars, suggesting that the observed reaction could have been nonspecific.

Taking into account the results of the various experiments performed, it thus appears that glycosylation of CABYV and TuYV structural proteins is highly unlikely. However, we observed a glycosylated plant protein that was reproducibly present in purified virus preparations of CABYV and TuYV. It is conceivable that the effect of the PNGaseF treatment on TuYV aphid transmission (Seddas and Boissinot, 2006) could be due to an indirect effect on this glycosylated protein. This assumes, of course, that this protein is involved in a step of the transmission process, an hypothesis which is currently being investigated in our laboratory.

Agroinfected <i>M. perfoliata</i> <sup>a</sup>				
	Agroinfected leaves		Systemic Leaves	
Ngly1	36/39 (92 %) <sup>b</sup>	1.61 ± 0.23 <sup>c</sup>	121/196 (61 %)	0.75 ± 0.26
Ngly2	38/47 (81 %)	0.70 ± 0.09	7/66 (10 %)	0.25 ± 0.08
Ngly3	8/8 (100 %)	1.91 ± 0.23	38/52 (73 %)	0.38 ± 0.17
Ngly4	8/8 (100 %)	2.51 ± 0.31	52/52 (100 %)	1.75 ± 0.27
WT	39/39 (100 %)	2.20 ± 0.48	61/61 (100%)	1.76 ± 0.31

**Table 1:** ELISA detection of CABYV *N*-glycosylation mutants in agroinfected and systemically infected leaves.

Virus accumulation was measured by DAS-ELISA 1 week post-inoculation (p.i.) or 3 weeks p.i on agroinoculated or systematic leaves respectively.

<sup>a</sup> Results from 2 to 7 independent experiments were combined.

<sup>b</sup> Number of plants infected/number of plants agroinoculated. In parentheses, the percentage of infected plants.

<sup>c</sup> Mean absorbance ± standard error at 405 nm after 2 h of substrate incubation. The background absorbance observed with healthy plant extract (typically 0.12) has been subtracted.

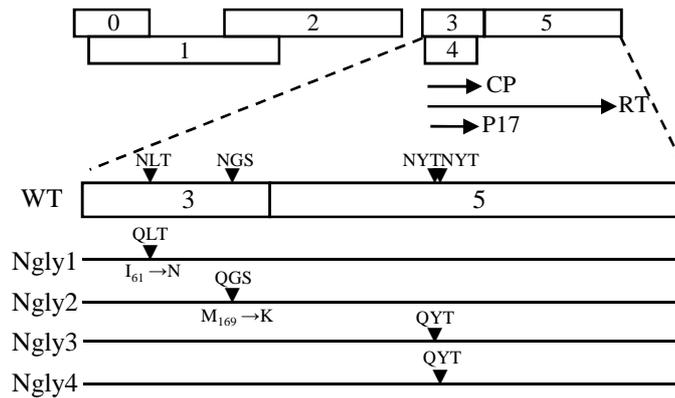
Transmission				
	Agroinfected <i>M. perfoliata</i> <sup>a</sup>		Purified Virus <sup>b</sup>	
	<i>A. gossypii</i>	<i>M. persicae</i>	<i>M. persicae</i>	
Ngly1	3/24 (13 %) <sup>c</sup>	5/40 (13 %)	14/19 (74 %)	
Ngly3	3/17 (18 %)	3/18 (17 %)	4/9 (44 %)	
Ngly4	9/18 (50 %)	10/19 (53 %)	16/21 (76 %)	
WT	26/26 (100 %)	27/30 (90 %)	14/19 (74 %)	

**Table 2:** Aphid transmission of CABYV *N*-glycosylation mutants from infected plants and from purified virus preparations.

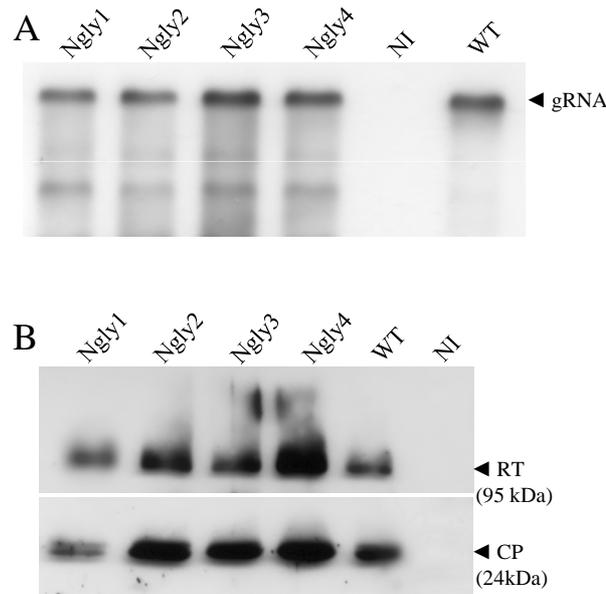
<sup>a</sup> After a 48 h AAP on plants infected with CABYV wild-type (WT) or CABYV *N*-glycosylation mutants, 20 aphids were transferred to test plants for a 4-day IAP.

<sup>b</sup> After a 48 h AAP on purified virus (final concentration 100 µg/ml), 20 aphids were transferred to test plants for a 4-day IAP.

<sup>c</sup> Number of plants infected after aphid transmission (determined by DAS-ELISA)/number of plants tested. In parentheses, the percentage of infected plants.

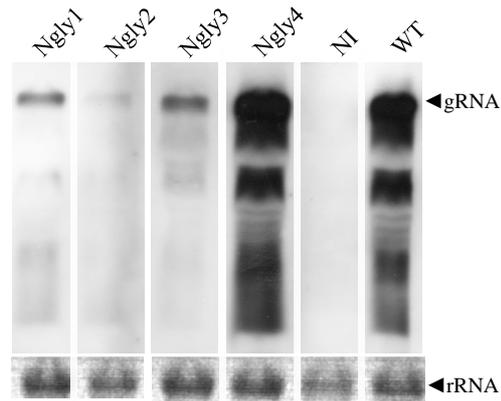


**Figure 1: Schematic representation of ORFs 3 and 5 of CABYV N-glycosylation mutants**  
 The genetic organization of CABYV genome encoding the six ORFs is presented. The encoded major (CP) and minor (RT) coat proteins and the product of ORF4 (P17) are indicated by arrows. Positions and amino acid sequence of the potential N-glycosylation sites are indicated on the wild-type sequence (WT). For the different mutants, amino acid replacement in structural proteins (CP and RT) is indicated. For the Ngly1 and Ngly2 mutants the amino acid changes introduced in the P17 sequence by the N-glycosylation site mutation are noted below the CP sequence.



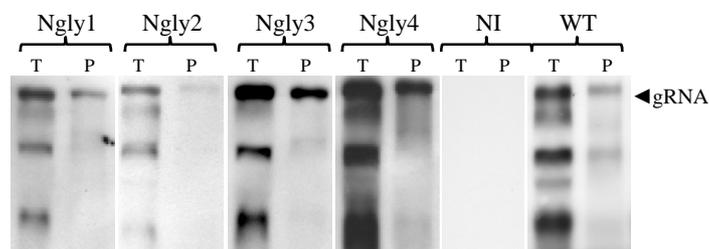
**Figure 2: Amplification in protoplasts of CABYV mutants affected in potential N-glycosylation sites**

(A) Northern blot analysis of total RNA extracted from protoplasts inoculated with transcripts of Ngly1, Ngly2, Ngly3, Ngly4 mutants and wild-type virus (WT). The position of genomic RNA (gRNA) is indicated. (B) Immunodetection of CABYV-CP and -RT proteins in protein extracts from protoplasts infected with transcripts of Ngly1, Ngly2, Ngly3, Ngly4 and wild-type virus (WT). The upper part of the blot was probed with a CABYV C<sub>term</sub> RT specific antiserum, and the lower part was probed with a CABYV polyclonal antiserum. The positions of CABYV-CP and -RT are indicated with apparent molecular masses in parentheses. It should be mentioned that the RT-protein of CABYV and other members in the *Luteoviridae* family has a SDS-gel electrophoresis mobility of a ca. 95 kDa which is higher than the 74 kDa calculated molecular weight (Bahner et al., 1990). NI : Non-inoculated protoplasts.



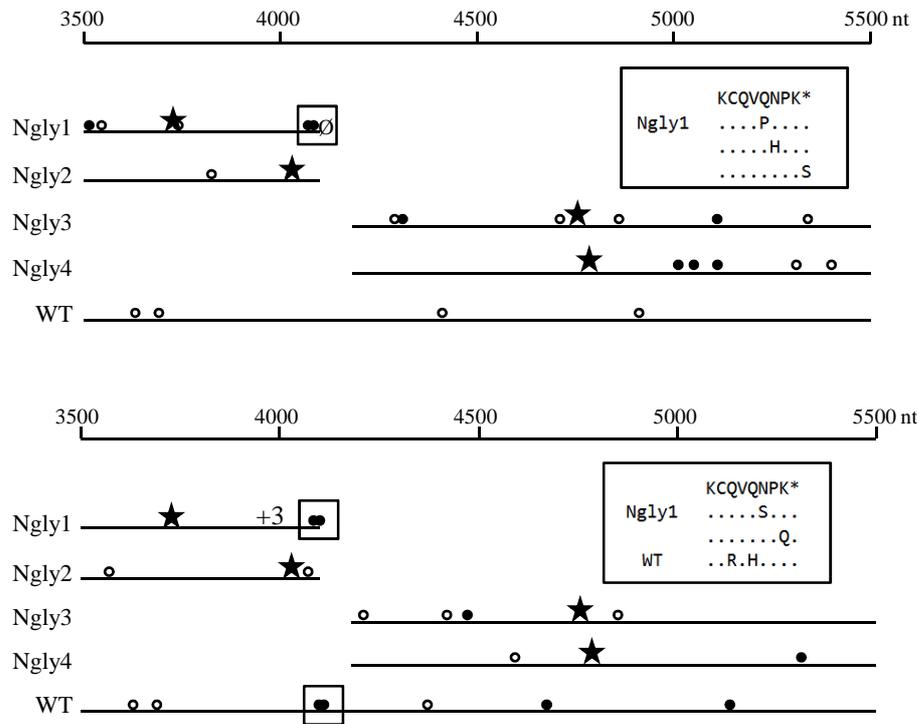
**Figure 3: Accumulation of viral RNA of CABYV *N*-glycosylation mutants in systemic leaves**

Northern blot analysis of total RNA extracted from *M. perfoliata* systemic leaves 4 weeks after agroinoculation with Ngly1, Ngly2, Ngly3, Ngly4 mutants and wild-type virus (WT). Position of genomic RNA (gRNA) is indicated. Ribosomal RNA (rRNA) were stained with ethidium bromide. NI: Non-inoculated plant.



**Figure 4: Accumulation of viral RNA of CABYV wild-type (WT) or CABYV *N*-glycosylation mutants after endogenous plant RNase treatment**

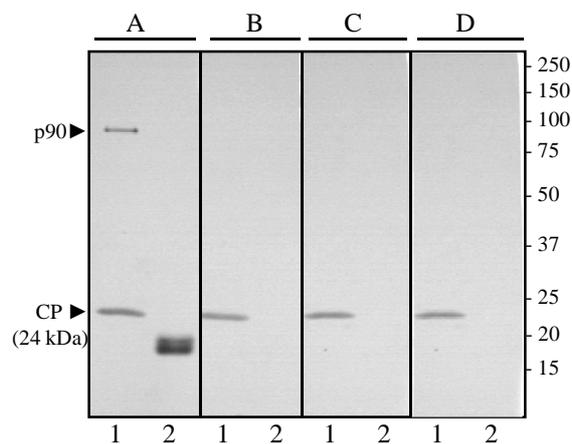
Northern-blot analysis of total RNA (T) extracted 7 days post-inoculation or protected RNA (P). For protected RNA, extraction was performed under conditions in which only virion-packaged RNA remains intact. Position of virus genomic RNA (gRNA) is indicated.



**Figure 5: Distributions of nucleotide mutations detected in viral progeny RNA following agroinfection or aphid transmission**

Nucleotide mutations in viral progeny following agroinoculation of *M. perfoliata* with CABYV wild-type (WT) or CABYV *N*-glycosylation mutants (A) or after transmission by aphid (B). For each construct, 8 RT-PCR clones were sequenced after RNA extraction from 2 plants. The boxed sequences are enlarged and the precise amino acid changes are mentioned.

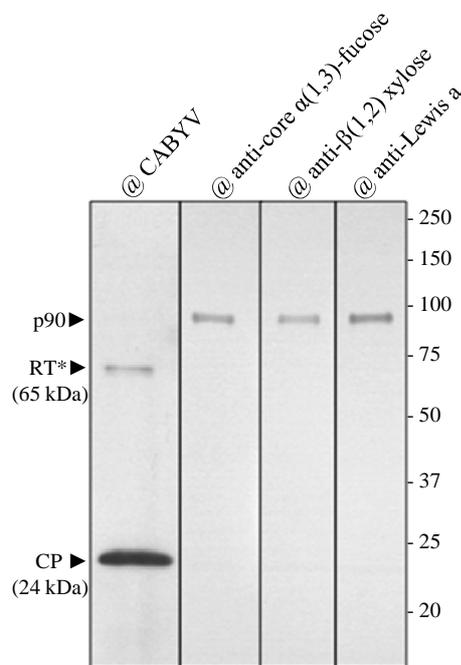
★ Introduced mutations; The circles represent second-site nucleotide mutations detected in the viral progeny: ○ silent mutation; ● mutation resulting in amino acid change; Ø Elimination of the stop codon; +3: 3 nucleotides added.



**Figure 6: High-mannose *N*-glycan detection on CABYV structural proteins**

Four  $\mu\text{g}$  of purified CABYV were loaded on lanes 1 and 0.5  $\mu\text{g}$  of Ribonuclease B on lanes 2. This latter protein of approximately 15 kDa possesses high-mannose *N*-glycans and serves as positive control in this experiment. Proteins were separated on a 15 % SDS-PAGE gel before being transferred onto nitrocellulose. Incubation was performed with ConA/peroxidase (Panel A), in similar conditions with the addition of a competitor sugar, methyl  $\beta$ -D-mannopyranoside (panel B), or in similar conditions but after on-blot periodate oxidation of the sugars (panel C). In panel D, ConA was omitted and incubation was performed only with peroxidase. Position of CABYV-CP and of the 90 kDa protein is indicated.

Sizes (in kDa) of protein ladder are indicated on the right.



**Figure 7: Detection of plant complex *N*-glycans on CABYV structural proteins**

Four  $\mu\text{g}$  of purified virus were loaded in each lane. Proteins were separated on a 15 % SDS-PAGE gel before being transferred onto nitrocellulose. Strips of the membrane were treated with anti-core  $\alpha(1,3)$ -fucose-, anti- $\beta(1,2)$ -xylose- or anti-terminal Lewis a antibodies. Structural CABYV proteins CP and RT are positioned on the left after incubation of the nitrocellulose strip with the antiserum directed against CABYV (first lane).

Sizes (in kDa) of protein ladder are indicated on the right. Position of CABYV-CP, -RT\* and the 90 kDa protein is indicated.

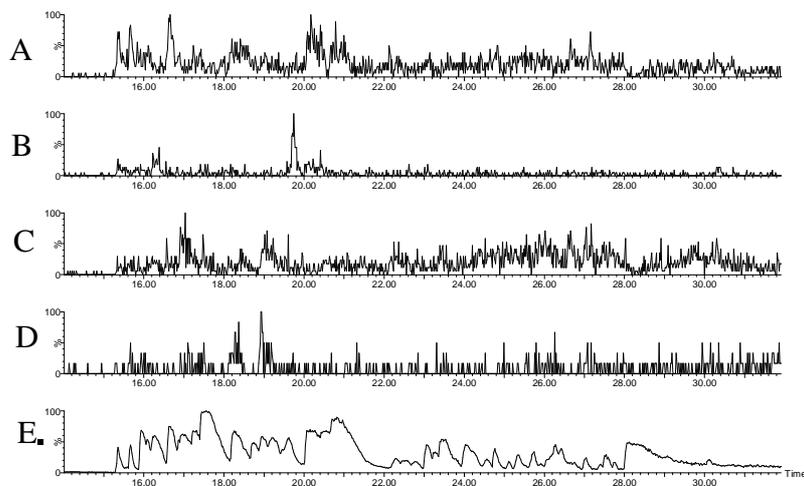
The carbohydrate sequence of Lewis a is  $\text{Gal}\beta 1,3[\text{Fuc}\alpha 1,4]\text{GlcNAc}$  (Gal: galactose, Fuc: fucose, GlcNAc: *N*-acetyl glucosamine).

A)	B)
1 MNTVAARNQN AGRRRRRNQR PARRDRVVVW NPIGGPPRGR RQRRNRRRPN	1 MNTVAARNQN AGRRRRRNQR PARRDRVVVW NPIGGPPRGR RQRRNRRRPN
51 RGGRRARRGSP GETFVFSKDN <u>LTGSSTGSIT</u> FGPSLSESPA FSSGILKAYH	51 RGGRRARRGSP GETFVFSKDN <u>LTGSSTGSIT</u> FGPSLSESPA FSSGILKAYH
101 EYKIIMVQLE FISEASSTSS GSISYELDPH CKLSSLQSTI NKFGITKSGL	101 EYKIIMVQLE FISEASSTSS GSISYELDPH CKLSSLQSTI NKFGITKSGL
151 RRWTAKQING MEWHDATEDQ <u>FKILYKNGS</u> SSVAGSFRIT IKCQVQNPKY	151 RRWTAKQING MEWHDATEDQ <u>FKILYKNGS</u> SSVAGSFRIT IKCQVQNPKY
201 VDGSSPPPPS PSPTPPPPPP PQQPQPQCAQ RFWGYEGNPQ NKILTAENSR	201 VDGSSPPPPS PSPTPPPPPP PQQPQPQCAQ RFWGYEGNPQ NKILTAENSR
251 NIDSRPLNFV QMYKWEDEKW DKVNLQAGYS RNDRRCMETY LTIPADKGF	251 NIDSRPLNFV QMYKWEDEKW DKVNLQAGYS RNDRRCMETY LTIPADKGF
301 HVYLEADGEF VVKHIGDELD GSWLGNIAVD VSQRGWNVGN YKGCKITNYQ	301 HVYLEADGEF VVKHIGDELD GSWLGNIAVD VSQRGWNVGN YKGCKITNYQ
351 SNTVFVAGHP DATMNGKSFDTARAVEVDWF ASFELECDDE EGSWAIYPPP	351 SNTVFVAGHP DATMNGKSFDTARAVEVDWF ASFELECDDE EGSWAIYPPP
401 IQKDSSYNYT <u>VSYGNYTEKY</u> CEWGAISVSI <i>DEDNNGNEPR</i> RIPRRGVMAW	401 IQKDSSYNYT <u>VSYGNYTEKY</u> CEWGAISVSI <i>DEDNNGNEPR</i> RIPRRGVMAW
451 STPEPSFSGD DSQRQDFNTP SLEERGSDAL ESEEKKEEDN LLDLEENIP	451 STPEPSFSGD DSQRQDFNTP SLEERGSDAL ESEEKKEEDN LLDLEENIP
501 DVDDDDLWKG ISRASEAGTA EDDRASTSSR LRGNLKPKGL PKPQPTRTIT	501 DVDDDDLWKG ISRASEAGTA EDDRASTSSR LRGNLKPKGL PKPQPTRTIT
551 EFNPGPDLIE VWRPDLAPGY SKADVAAATV LAGGSVHEGR DMLERREAKV	551 EFNPGPDLIE VWRPDLAPGY SKADVAAATV LAGGSVHEGR DMLERREAKV
601 MDSRKKWGIL SSTSSLTSGA LKKLSAQSEK LATLTTGERV QYQRLKNSMG	601 MDSRKKWGIL SSTSSLTSGA LKKLSAQSEK LATLTTGERV QYQRLKNSMG
651 STVAAEYLEK VLADKTS	651 STVAAEYLEK VLADKTS

**Figure 8: MALDI-TOF and Nano LC-MS/MS analysis of CABYV structural proteins**

On the CABYV structural proteins sequence are shown, in bold, peptides identified by MALDI-TOF by peptide mass fingerprinting (A) and by nano LC-MS/MS (B).

Potential *N*-glycosylation consensus sites are underlined. Conserved DE motif is italicized. CP stop codon is indicated in grey.



**Figure 9: Nano LC-MS mass spectrometry analysis of the tryptic digest of CABYV-CP**

(A) Nano LC-MS chromatogram at 50 V cone voltage of the tryptic digest of CABYV-CP. (B) Extracted ion chromatogram of  $m/z$  163.1 ( $M+H^+$ ) corresponding to hexose glycan. (C) Extracted ion chromatogram of  $m/z$  204.1 ( $M+H^+$ ) corresponding to *N*-acetylhexosamine glycan. (D) Extracted ion chromatogram of  $m/z$  292.1 ( $M+H^+$ ) corresponding to sialic acid glycan. (E) Extracted ion chromatogram of  $m/z$  366.14 ( $M+H^+$ ) corresponding to *N*-acetylhexosamine and hexose glycan.

	Potential N-glycosylation sites <sup>a</sup>		Potential O-glycosylation sites <sup>b</sup>
	In CP	In RT	In RT
CABYV	2 (70, 178)	2 (408, 415)	5 (204, 205, 210, 212, 214)
CYDV	2 (11, 79)	2 (337, 349)	5 (213, 217, 225, 227, 493)
PLRV	0	3 (273, 410, 603)	5 (217, 219, 223, 225, 317)
TuYV	3 (50, 162, 181)	2 (267, 388)	2 (221, 480)
MABYV	2 (70, 178)	5 (406, 413, 432, 539, 547)	5 (207, 210, 212, 219, 557)

**Table S1:** Localization of *N*- and *O*-glycosylation sites among poleroviruses structural protein sequences.

<sup>a</sup>Number of potential *N*-glycosylation sites. In parentheses, position of the *N*-glycosylated arginine on the amino acid sequence of the viral structural protein.

<sup>b</sup>Number of potential *O*-glycosylation sites. In parentheses, position of the *O*-glycosylated serine or threonine on the amino acid sequence of the viral structural protein.

Accession numbers ID for *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV / NC\_003688.1), *Cereal yellow dwarf virus* (CYDV / NP\_840025.2), *Potato leafroll virus* (PLRV / NC\_001747.1), *Turnip yellow virus* (TuYV / NP\_620487.1, formerly referred to as *Beet western yellows virus* or BWYV) and *Melon aphid borne yellows virus* (MABYV / NC\_010809.1)

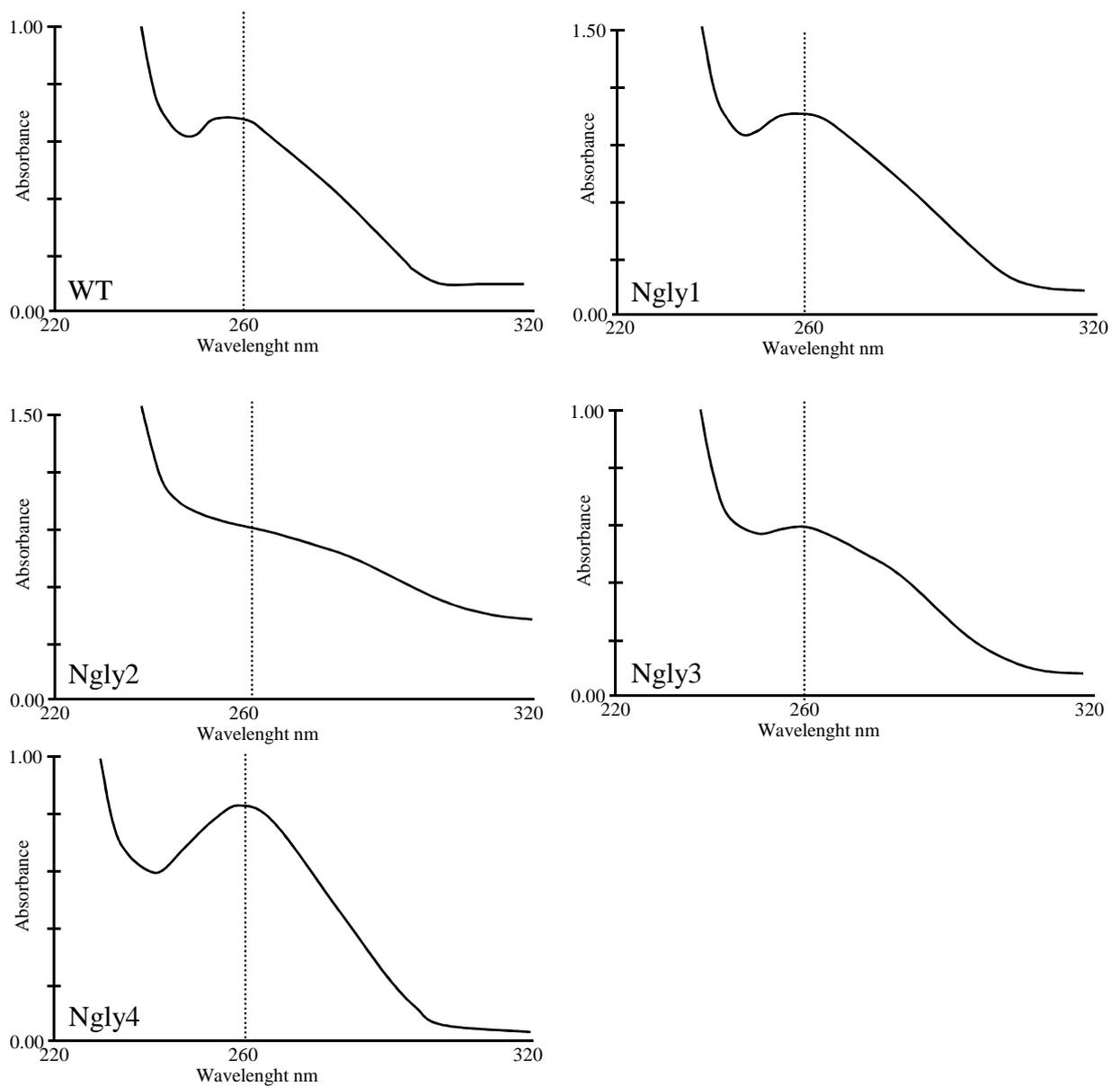
Virus	WT	Ngly1	Ngly3	Ngly4
2 µg	2,16	2,05	1,98	2,33
1 µg	1,65	1,45	1,68	1,53
400 ng	0,84	0,90	0,75	0,79
200 ng	0,45	0,50	0,32	0,48

**Table S2:** Reactivity of the antiserum used for DAS-ELISA towards the purified mutated viruses Ngly1, -3 and -4. Different amounts of virus were deposited in the ELISA plate and DAS-ELISA assay was performed as described in Clark and Adams, 1977 using a polyclonal antiserum directed against CABYV virions. Values represent the absorbance at 405 nm after 2 hours substrate incubation. WT: wild type CABYV virions.

The quantity of purified Ngly2 virions obtained after purification was not enough to conduct such an analysis.

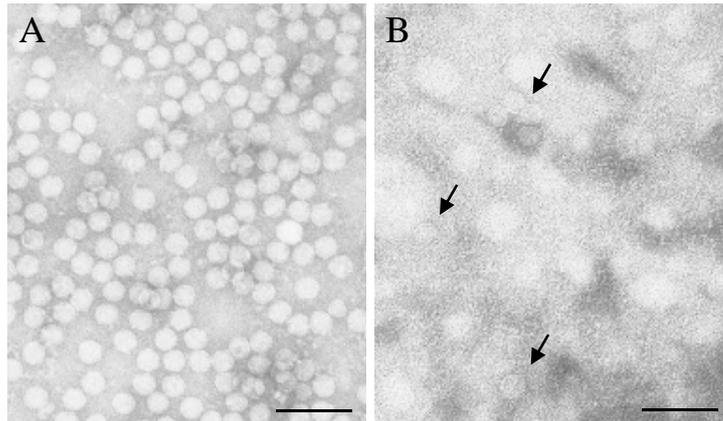
**Clark, M. F. & Adams, A. N. (1977).** Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of general virology* **34**, 475-483.

**Lecoq, H., D. Bourdin, C. Wipf-Scheibel, et al. (1992).** A new yellowing disease of cucurbits caused by a luteovirus, cucurbit aphid-borne yellows virus. *Plant Pathology* **41**, 749-761.

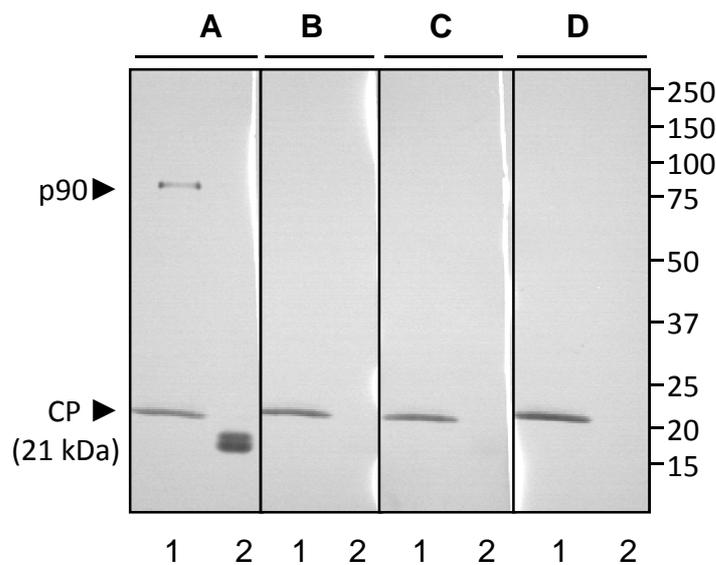


**Figure S1:** Absorbance spectra of the purified CABYV mutants (Ngly1, Ngly2, Ngly3, Ngly4). Purification was performed from agroinfected *Montia perfoliata* as described in van den Heuvel *et al.*, 1991. Virus concentration is evaluated using the formula: 1 unit  $OD_{260nm} = 0.118 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ . WT: wild type virus.

**Van den Heuvel, J., T. Boerma and D. Peters (1991).** Transmission of potato leafroll virus from plants and artificial diets by *Myzus persicae*. *Phytopathology* **81**, 150-154.

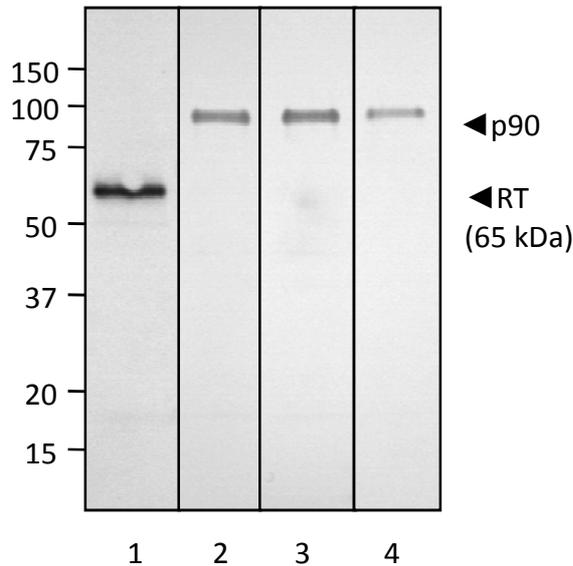


**Figure S2:** Electron micrographs of purified particles of (A) CABYV wild type and (B) Ngly2. Aliquots of the sucrose gradient were deposited on the grid. Uranyl acetate staining. Particles of Ngly2 are indicated by arrows. The bar corresponds to 100 nm.



**Figure S3:** High-mannose *N*-glycan detection on TuYV structural proteins.

Four  $\mu\text{g}$  of purified TuYV were loaded on lanes 1 and 0.5  $\mu\text{g}$  of Ribonuclease B on lanes 2. This protein of approximately 15 kDa possesses high-mannose *N*-glycans and serves as positive control in this experiment. Proteins were separated on a 15 % SDS-PAGE gel before being transferred onto nitrocellulose. Incubation was performed with Concanavalin A/peroxidase (Panel A), in similar conditions with the addition of a competitor sugar, methyl  $\alpha$ -D-mannopyranoside (panel B), or in similar conditions but after on-blot periodate oxidation of the sugars (panel C). In panel D, Concanavalin A was omitted and incubation was performed with peroxidase only. Position of TuYV-CP and of the 90 kDa protein is indicated. Sizes (in kDa) of protein ladder are indicated on the right.



**Figure S4:** Plant complex glycan detection on TuYV structural proteins.

Four  $\mu\text{g}$  of purified virus were loaded on each lane. Proteins were separated in a 15 % SDS-PAGE gel before being transferred onto nitrocellulose. Strips of the membrane were detected with (2) anti-core  $\alpha(1,3)$ -fucose-, (3) anti- $\beta(1,2)$ -xylose- or (4) anti-Lewis a antibodies. TuYV truncated RT protein of about 65 kDa is positioned on the right after incubation of the nitrocellulose strip with the antiserum directed against TuYV-RT (first lane).

Sizes (in kDa) of protein ladder are indicated on the left.

The carbohydrate sequence of Lewis a is:  $\text{Gal}\beta 1,3[\text{Fuc}\alpha 1,4]\text{GlcNAc}$  (Gal: galactose, Fuc: fucose, GlcNAc: N-acetyl glucosamine).

A

```

1  MNTVVGRRII NGRRRPRRQT RRAQRQPQPVV VVQTSRATQR RPRRRRRGNN
51  RTGRTVPTRG AGSSETFVFS KDNLAGSSSG AITFGPSLSD CPAFSNGMLK
101 AYHEYKISMV ILEFVSEASS QNSGSIAYEL DPHCKLNSLS STINKFGITK
151 PGKRAFTASY INGTEWHDVA EDQFRILYKG NGSSSIAGSF RITIKCQFHN
201 PKYVDEEPPG SPGPSPSPQP TPQKKYRFIV YTGVPVTRIM AQSTDDAISL
251 YDMPQRFRY IEDENMNWTN LDSRWYSQNS LKAIPMIIVP VPQGEWTVEI
301 SMEGYQPTSS TDPNKDKQD GLIAYNDLDS EGWNVGIYNN VEITNNKADN
351 TLKYGHPDME LNGCHFNOGQ CLERDGLTLC HIKTTGDNAS FVVGPAVQK
401 QSKYNYAVSY GAWTDRMMEI GMIAIALDEQ GSSGSVKTER PKRVGHSMVA
451 STWETIKLPE KGNSEGYETS QRQDSKTPTT ASGGSDDLTV EEGGLPLPVE
501 EEIPDFVGDN PWSDLSTKNS QEEEMSSSES GLRPQLKPPG LPKQPPIRTI
551 RNFDPDPLV EAWRPDVNPG YSKADVAAT IIAGGSIKDG RSMIDKRNKA
601 VLDGRKSWGSLASSLTGGT LKASAKSEKL AKLTTSERAR YERIKRQQGS
651 TRASEFLESL LAGEDPDSRF

```

MALDI - CP: 84% - RT: 70%

B

```

1  MNTVVGRRII NGRRRPRRQT RRAQRQPQPVV VVQTSRATQR RPRRRRRGNN
51  RTGRTVPTRG AGSSETFVFS KDNLAGSSSG AITFGPSLSD CPAFSNGMLK
101 AYHEYKISMV ILEFVSEASS QNSGSIAYEL DPHCKLNSLS STINKFGITK
151 PGKRAFTASY INGTEWHDVA EDQFRILYKG NGSSSIAGSF RITIKCQFHN
201 PKYVDEEPPG SPGPSPSPQP TPQKKYRFIV YTGVPVTRIM AQSTDDAISL
251 YDMPQRFRY IEDENMNWTN LDSRWYSQNS LKAIPMIIVP VPQGEWTVEI
301 SMEGYQPTSS TDPNKDKQD GLIAYNDLDS EGWNVGIYNN VEITNNKADN
351 TLKYGHPDME LNGCHFNOGQ CLERDGLTLC HIKTTGDNAS FVVGPAVQK
401 QSKYNYAVSY GAWTDRMMEI GMIAIALDEQ GSSGSVKTER PKRVGHSMVA
451 STWETIKLPE KGNSEGYETS QRQDSKTPTT ASGGSDDLTV EEGGLPLPVE
501 EEIPDFVGDN PWSDLSTKNS QEEEMSSSES GLRPQLKPPG LPKQPPIRTI
551 RNFDPDPLV EAWRPDVNPG YSKADVAAT IIAGGSIKDG RSMIDKRNKA
601 VLDGRKSWGSLASSLTGGT LKASAKSEKL AKLTTSERAR YERIKRQQGS
651 TRASEFLESL LAGEDPDSRF

```

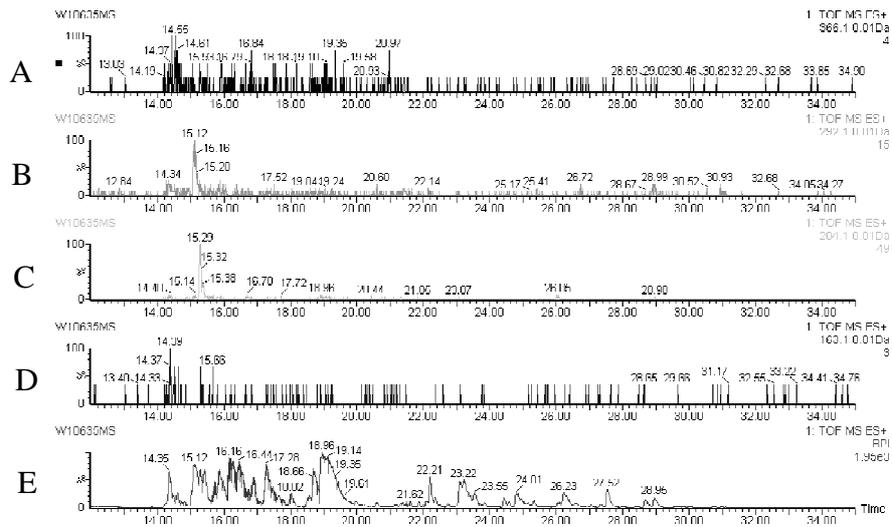
LC-MS/MS - CP: 70% - RT: 71%

**Figure S5:** MALDI-TOF and Nano LC-MS/MS analysis of TuYV structural proteins

On the TuYV structural proteins sequence are shown, in bold, peptides identified by MALDI-TOF by peptide mass fingerprinting (A) and by nano LC-MS/MS (B).

Potential *N*-glycosylation consensus sites are underlined. Conserved DE motif is italicized.

CP stop codon is indicated in grey.



**Figure S6:** Nano LC-MS mass spectrometry analysis of the tryptic digest of TuYV-CP

(A) Nano LC-MS chromatogram at 50 V cone voltage of the tryptic digest of TuYV-CP. (B) Extracted ion chromatogram of  $m/z$  163.1 (M+H<sup>+</sup>) corresponding to hexose glycan. (C) Extracted ion chromatogram of  $m/z$  204.1 (M+H<sup>+</sup>) corresponding to *N*-acetylhexosamine glycan. (D) Extracted ion chromatogram of  $m/z$  292.1 (M+H<sup>+</sup>) corresponding to sialic acid glycan. (E) Extracted ion chromatogram of  $m/z$  366.14 (M+H<sup>+</sup>) corresponding to *N*-acetylhexosamine and hexose glycan.

## References

- Altmann, F., and Lomonosoff, G. P. (2000). Glycosylation of the capsid proteins of cowpea mosaic virus: a reinvestigation shows the absence of sugar residues. *J Gen Virol* **81**(4), 1111-4.
- Bahner, I., Lamb, J., Mayo, M. A., and Hay, R. T. (1990). Expression of the genome of potato leafroll virus: readthrough of the coat protein termination codon in vivo. *J Gen Virol* **71**(10), 2251-6.
- Baratova, L. A., Fedorova, N. V., Dobrov, E. N., Lukashina, E. V., Kharlanov, A. N., Nasonov, V. V., Serebryakova, M. V., Kozlovsky, S. V., Zayakina, O. V., and Rodionova, N. P. (2004). N-Terminal segment of potato virus X coat protein subunits is glycosylated and mediates formation of a bound water shell on the virion surface. *Eur J Biochem* **271**(15), 3136-45.
- Brault, V., Bergdoll, M., Mutterer, J., Prasad, V., Pfeffer, S., Erdinger, M., Richards, K. E., and Ziegler-Graff, V. (2003). Effects of point mutations in the major capsid protein of beet western yellows virus on capsid formation, virus accumulation, and aphid transmission. *J Virol* **77**(5), 3247-56.
- Brault, V., Herrbach, E., and Reinbold, C. (2007). Electron microscopy studies on luteovirid transmission by aphids. *Micron* **38**(3), 302-12.
- Brault, V., Mutterer, J., Scheidecker, D., Simonis, M. T., Herrbach, E., Richards, K., and Ziegler-Graff, V. (2000). Effects of point mutations in the readthrough domain of the beet western yellows virus minor capsid protein on virus accumulation in planta and on transmission by aphids. *J Virol* **74**(3), 1140-8.
- Brault, V., Perigon, S., Reinbold, C., Erdinger, M., Scheidecker, D., Herrbach, E., Richards, K., and Ziegler-Graff, V. (2005). The polerovirus minor capsid protein determines vector specificity and intestinal tropism in the aphid. *J Virol* **79**(15), 9685-93.
- Brault, V., van den Heuvel, J. F., Verbeek, M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer, A., Herrbach, E., Garaud, J. C., Guilley, H., Richards, K., and Jonard, G. (1995). Aphid transmission of beet western yellows luteovirus requires the minor capsid read-through protein P74. *Embo J* **14**(4), 650-9.
- Brown, C. M., Dinesh-Kumar, S. P., and Miller, W. A. (1996). Local and distant sequences are required for efficient readthrough of the barley yellow dwarf virus PAV coat protein gene stop codon. *Journal of virology* **70**(9), 5884-92.
- Bruyère, A., Brault, V., Ziegler-Graff, V., Simonis, M. T., Van den Heuvel, J. F., Richards, K., Guilley, H., Jonard, G., and Herrbach, E. (1997). Effects of mutations in the beet western yellows virus readthrough protein on its expression and packaging and on virus accumulation, symptoms, and aphid transmission. *Virology* **230**(2), 323-34.
- Bryant, J. E., Calvert, A. E., Mesesan, K., Crabtree, M. B., Volpe, K. E., Silengo, S., Kinney, R. M., Huang, C. Y., Miller, B. R., and Roehrig, J. T. (2007). Glycosylation of the dengue 2 virus E protein at N67 is critical for virus growth in vitro but not for growth in intrathoracically inoculated *Aedes aegypti* mosquitoes. *Virology* **366**(2), 415-23.
- Chay, C. A., Gunasinge, U. B., Dinesh-Kumar, S. P., Miller, W. A., and Gray, S. M. (1996). Aphid transmission and systemic plant infection determinants of barley yellow dwarf luteovirus-PAV are contained in the coat protein readthrough domain and 17-kDa protein, respectively. *Virology* **219**(1), 57-65.

- Chen, D., Juarez, S., Hartweck, L., Alamillo, J. M., Simon-Mateo, C., Perez, J. J., Fernandez-Fernandez, M. R., Olszewski, N. E., and Garcia, J. A. (2005). Identification of secret agent as the O-GlcNAc transferase that participates in Plum pox virus infection. *J Virol* **79**(15), 9381-7.
- Clark, M. F., and Adams, A. N. (1977). Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J Gen Virol* **34**(3), 475-83.
- Elias, J. E., and Gygi, S. P. (2007). Target-decoy search strategy for increased confidence in large-scale protein identifications by mass spectrometry. *Nat Methods* **4**(3), 207-14.
- Esau, K., and Hoefert, L. L. (1972). Development of infection with beet western yellows virus in the sugarbeet. *Virology* **48**(3), 724-38.
- Estes, M. K., and Cohen, J. (1989). Rotavirus gene structure and function. *Microbiol Rev* **53**(4), 410-49.
- Faye, L., and Chrispeels, M. J. (1985). Characterization of N-linked oligosaccharides by affino blotting with concanavalin A-peroxidase and treatment of the blots with glycosidases. *Anal Biochem* **149**(1), 218-24.
- Faye, L., Gomord, V., Fitchette-Lainé, A. C., and Chrispeels, M. J. (1993). Affinity purification of antibodies specific for Asn-linked glycans containing alpha 1-->3 fucose or beta 1-->2 xylose. *Anal Biochem* **209**(1), 104-8.
- Fernandez-Fernandez, M. R., Camafeita, E., Bonay, P., Mendez, E., Albar, J. P., and Garcia, J. A. (2002). The capsid protein of a plant single-stranded RNA virus is modified by O-linked N-acetylglucosamine. *J Biol Chem* **277**(1), 135-40.
- Fitchette-Lainé, A. C., Gomord, V., Cabanes, M., Michalski, J. C., Saint Macary, M., Foucher, B., Cavelier, B., Hawes, C., Lerouge, P., and Faye, L. (1997). N-glycans harboring the Lewis a epitope are expressed at the surface of plant cells. *Plant J* **12**(6), 1411-7.
- Fournillier, A., Wychowski, C., Boucreux, D., Baumert, T. F., Meunier, J. C., Jacobs, D., Muguet, S., Depla, E., and Inchauspe, G. (2001). Induction of hepatitis C virus E1 envelope protein-specific immune response can be enhanced by mutation of N-glycosylation sites. *J Virol* **75**(24), 12088-97.
- Gildow, F. (1999). Luteovirus transmission mechanisms regulating vector specificity. In "The Luteoviridae" (H. G. Smith, and H. Barker, Eds.), pp. 88-111. CAB International, Oxon, UK.
- Graff, J., Zhou, Y. H., Torian, U., Nguyen, H., St Claire, M., Yu, C., Purcell, R. H., and Emerson, S. U. (2008). Mutations within potential glycosylation sites in the capsid protein of hepatitis E virus prevent the formation of infectious virus particles. *J Virol* **82**(3), 1185-94.
- Guilley, H., Wipf-Scheibel, C., Richards, K., Lecoq, H., and Jonard, G. (1994). Nucleotide sequence of cucurbit aphid-borne yellows luteovirus. *Virology* **202**(2), 1012-7.
- Holsters, M., Silva, B., Van Vliet, F., Genetello, C., De Block, M., Dhaese, P., Depicker, A., Inze, D., Engler, G., Villarroel, R., and et al. (1980). The functional organization of the nopaline A. tumefaciens plasmid pTiC58. *Plasmid* **3**(2), 212-30.
- Jolly, C. A., and Mayo, M. A. (1994). Changes in the amino acid sequence of the coat protein readthrough domain of potato leafroll luteovirus affect the formation of an epitope and aphid transmission. *Virology* **201**(1), 182-5.
- Kabcenell, A. K., and Atkinson, P. H. (1985). Processing of the rough endoplasmic reticulum membrane glycoproteins of rotavirus SA11. *J Cell Biol* **101**(4), 1270-80.

- Koch, M., Pancera, M., Kwong, P. D., Kolchinsky, P., Grundner, C., Wang, L., Hendrickson, W. A., Sodroski, J., and Wyatt, R. (2003). Structure-based, targeted deglycosylation of HIV-1 gp120 and effects on neutralization sensitivity and antibody recognition. *Virology* **313**(2), 387-400.
- Lecoq, H., Bourdin, D., Wipf-Scheibel, C., Bon, M., Lot, H., Lemaire, O., and Herrbach, E. (1992). A new yellowing disease of cucurbits caused by a luteovirus, cucurbit aphid-borne yellows virus. *Plant Pathology* **41**(6), 749-761.
- Lee, L., Palukaitis, P., and Gray, S. M. (2002). Host-dependent requirement for the Potato leafroll virus 17-kda protein in virus movement. *Mol Plant Microbe Interact* **15**(10), 1086-94.
- Lerouge, P., Cabanes-Macheteau, M., Rayon, C., Fischette-Laine, A. C., Gomord, V., and Faye, L. (1998). N-glycoprotein biosynthesis in plants: recent developments and future trends. *Plant Mol Biol* **38**(1-2), 31-48.
- Li, J., Bhuvanankantham, R., Howe, J., and Ng, M. L. (2006). The glycosylation site in the envelope protein of West Nile virus (Sarafend) plays an important role in replication and maturation processes. *J Gen Virol* **87**(3), 613-22.
- Li, Y., Luo, L., Rasool, N., and Kang, C. Y. (1993). Glycosylation is necessary for the correct folding of human immunodeficiency virus gp120 in CD4 binding. *J Virol* **67**(1), 584-8.
- Mutterer, J. D., Stussi-Garaud, C., Michler, P., Richards, K. E., Jonard, G., and Ziegler-Graff, V. (1999). Role of the beet western yellows virus readthrough protein in virus movement in *Nicotiana clevelandii*. *J Gen Virol* **80**(10), 2771-8.
- Nurkiyanova, K. M., Ryabov, E. V., Commandeur, U., Duncan, G. H., Canto, T., Gray, S. M., Mayo, M. A., and Taliansky, M. E. (2000). Tagging potato leafroll virus with the jellyfish green fluorescent protein gene. *J Gen Virol* **81**(3), 617-26.
- Partridge, J. E., Shannon, L. M., Gumpf, D. J., and Colbaugh, P. (1974). Glycoprotein in the capsid of plant viruses as a possible determinant of seed transmissibility. *Nature* **247**, 391-392.
- Peter, K. A., Liang, D., Palukaitis, P., and Gray, S. M. (2008). Small deletions in the potato leafroll virus readthrough protein affect particle morphology, aphid transmission, virus movement and accumulation. *J Gen Virol* **89**(8), 2037-45.
- Pollakis, G., Kang, S., Kliphuis, A., Chalaby, M. I., Goudsmit, J., and Paxton, W. A. (2001). N-linked glycosylation of the HIV type-1 gp120 envelope glycoprotein as a major determinant of CCR5 and CXCR4 coreceptor utilization. *J Biol Chem* **276**(16), 13433-41.
- Prüfer, D., Wipf-Scheibel, C., Richards, K., Guilley, H., Lecoq, H., and Jonard, G. (1995). Synthesis of a full-length infectious cDNA clone of cucurbit aphid-borne yellows virus and its use in gene exchange experiments with structural proteins from other luteoviruses. *Virology* **214**(1), 150-8.
- Reinbold, C., Gildow, F. E., Herrbach, E., Ziegler-Graff, V., Goncalves, M. C., van Den Heuvel, J. F., and Brault, V. (2001). Studies on the role of the minor capsid protein in transport of Beet western yellows virus through *Myzus persicae*. *J Gen Virol* **82**(8), 1995-2007.
- Reinbold, C., Herrbach, E., and Brault, V. (2003). Posterior midgut and hindgut are both sites of acquisition of Cucurbit aphid-borne yellows virus in *Myzus persicae* and *Aphis gossypii*. *J Gen Virol* **84**(12), 3473-84.
- Roberts, D. D., and Goldstein, I. J. (1982). Hydrophobic binding properties of the lectin from lima beans (*Phaseolus lunatus*). *J Biol Chem* **257**(19), 11274-7.

- Scott, C. L., Hartweck, L. M., de Jesus Perez, J., Chen, D., Garcia, J. A., and Olszewski, N. E. (2006). SECRET AGENT, an *Arabidopsis thaliana* O-GlcNAc transferase, modifies the Plum pox virus capsid protein. *FEBS Lett* **580**(25), 5829-35.
- Seddas, P., and Boissinot, S. (2006). Glycosylation of beet western yellows virus proteins is implicated in the aphid transmission of the virus. *Arch Virol* **151**(5), 967-84.
- Seddas, P., Boissinot, S., Strub, J. M., Van Dorsselaer, A., Van Regenmortel, M. H., and 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**(2), 399-412.
- Shepardson, S., Esau, K., and McCrum, R. (1980). Ultrastructure of potato leaf phloem infected with potato leafroll virus. *Virology* **105**(2), 379-92.
- Stoitsova, S. R., Boteva, R. N., and Doyle, R. J. (2003). Binding of hydrophobic ligands by *Pseudomonas aeruginosa* PA-I lectin. *Biochim Biophys Acta* **1619**(2), 213-9.
- Van den Heuvel, J., Boerma, T., and Peters, D. (1991). Transmission of potato leafroll virus from plants and artificial diets by *Myzus persicae*. *Phytopathology* **81**(2), 150-154.
- van den Heuvel, J. F., Bruyère, A., Hogenhout, S. A., Ziegler-Graff, V., Brault, V., Verbeek, M., van der Wilk, F., and Richards, K. (1997). The N-terminal region of the luteovirus readthrough domain determines virus binding to *Buchnera* GroEL and is essential for virus persistence in the aphid. *J Virol* **71**(10), 7258-65.
- Vigerust, D. J., Ulett, K. B., Boyd, K. L., Madsen, J., Hawgood, S., and McCullers, J. A. (2007). N-linked glycosylation attenuates H3N2 influenza viruses. *J Virol* **81**(16), 8593-600.
- Wei, X., Decker, J. M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J. C., Wu, X., Salazar-Gonzalez, J. F., Salazar, M. G., Kilby, J. M., Saag, M. S., Komarova, N. L., Nowak, M. A., Hahn, B. H., Kwong, P. D., and Shaw, G. M. (2003). Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature* **422**(6929), 307-12.
- Whitfield, A. E., Ullman, D. E., and German, T. L. (2004). Expression and characterization of a soluble form of tomato spotted wilt virus glycoprotein GN. *J Virol* **78**(23), 13197-206.
- Yang, X., Thannhauser, T. W., Burrows, M., Cox-Foster, D., Gildow, F. E., and Gray, S. M. (2008). Coupling genetics and proteomics to identify aphid proteins associated with vector-specific transmission of polerovirus (luteoviridae). *J Virol* **82**(1), 291-9.
- Ziegler-Graff, V., Brault, V., Mutterer, J., Simonis, M., Herrbach, E., Guilley, H., Richards, K., and Jonard, G. (1996). The coat protein of beet western yellows luteovirus is essential for systemic infection but the viral gene products P29 and P19 are dispensable for systemic infection and aphid transmission. *Mol Plant Microbe Interact* **9**, 501-510.