



HAL
open science

Etude de l'activation de la transmission du Turnip mosaic virus par pucerons

Edwige Berthelot

► **To cite this version:**

Edwige Berthelot. Etude de l'activation de la transmission du Turnip mosaic virus par pucerons. Sciences agricoles. Montpellier SupAgro, 2018. Français. NNT : 2018NSAM0039 . tel-02533857

HAL Id: tel-02533857

<https://theses.hal.science/tel-02533857>

Submitted on 6 Apr 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

Pour obtenir le grade de
Docteur

Délivré par **Montpellier SupAgro**

Préparée au sein de l'école doctorale GAIA
Et de l'unité de recherche BGPI

Spécialité : **Biologie des Interactions**

Présentée par **Edwige BERTHELOT**

Etude de l'activation de la transmission du *Turnip mosaic virus* par pucerons

Soutenue le 29 novembre 2018 devant le jury composé de

Juan José LÓPEZ-MOYA , CSIC Associate Professor CRAG	Rapporteur
Christophe ROBAGLIA , Professeur AMU, UMR BVME	Rapporteur
Isabelle JUPIN , Dir. de recherche CNRS, UMR 7592	Présidente du jury
Mylène OGLIASTRO , Dir. de recherche INRA, UMR DGIMI	Examinatrice
Cécile DESBIEZ , Chargée de recherche INRA, UR 407	Examinatrice
Mounia KHELIFA , Ingénieure de recherche, FN3PT/RD3PT	Co-encadrante
Martin DRUCKER , Dir. de recherche INRA, UMR SVQV	Co-directeur de thèse
Stéphane BLANC , Dir. de recherche INRA, UMR BGPI	Directeur de thèse



*Je dédie cette thèse à
toutes les personnes qui m'ont
soutenu et qui ont cru en moi*

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse d'avoir accepté d'évaluer mon travail de doctorat, mes deux rapporteurs, **Juan José López-Moya** et **Christophe Robaglia**, ainsi que mes trois examinatrices, **Isabelle Jupin**, **Mylène Ogliastro** et **Cécile Desbiez**. Je remercie également les membres de mon comité de thèse pour le suivi de mon travail de doctorat et pour leurs recommandations, **Hélène Vanacker**, **Sylvie German-Retana**, **Anas Cherqui** et **Ana Rivero**.

Je remercie Monsieur **Yves Begue**, Monsieur **Bernard Queré**, Madame **Virginie Gobert**, Monsieur **Yves Le Hingrat** et l'ANRT (Association Nationale de la Recherche et de la Technologie) de m'avoir accordé une bourse CIFRE avec l'entreprise SIPRE (Semence Innovation Protection Recherche Environnement) qui s'est poursuivie avec la FN3PT (Fédération Nationale des Producteurs de Plants de Pomme de Terre).

Je remercie mon directeur de thèse, **Martin Drucker**, pour son accompagnement tout au long de ce doctorat. Je le remercie de m'avoir laissé autant d'autonomie, pour ses corrections remarquables et pour la transmission de ses connaissances. Je remercie ma co-encadrante de thèse, **Mounia Khelifa**, pour sa disponibilité, sa souplesse de travail et ses relectures. Je remercie mon co-directeur de thèse, **Stéphane Blanc**, pour son écoute, ses bonnes intentions, ses encouragements et sa perspicacité. Je vous remercie tous les trois de m'avoir fait confiance pour mener à bien cette thèse.

Un grand merci à **Claire Neema** d'avoir été présente tout au long de ma thèse : de mon accueil et mon intégration à l'unité en passant par mes comités de thèse et mes séminaires jusqu'aux moments où j'ai eu besoin de conseils. Ta présence et ta considération ont été très importantes pour moi et m'ont beaucoup touché.

Merci mille fois à toutes les personnes qui m'ont aidé dans la réalisation de mes expériences. Merci du fond du cœur à **Jean-Luc Macia** pour tous les tests de transmission que nous avons

réalisés ensemble en musique, toutes nos discussions, ton écoute, ton soutien et tous les arrangements que tu as faits pour m'aider au mieux. Je ne pouvais pas espérer meilleur coéquipier pour m'accompagner dans cette thèse. Un énorme merci à **Marie Ducouso** qui m'a montré tout ce qu'il y avait à savoir au labo, pour toutes les inoculations hebdomadaires ainsi que la réalisation des expériences de Duolink®. Ton travail soigneux et méticuleux, tes connaissances et ton exigence ont été pour moi de précieuses qualités que j'ai pu ensuite mettre à profit lors de mes propres expériences. Merci beaucoup **Sophie** pour les milliers de navets que tu as préparés pour moi et pour la gestion de toute la maintenance qu'il y avait autour, un travail qui m'a fait gagner un temps précieux. Merci beaucoup **Agnès** pour ton aide avec la biolistique et pour ton protocole (je n'en avais jamais lu un d'aussi bonne qualité). Merci **Michel Y.** de m'avoir montré ta super technique d'extraction et pour les petites mises au point que tu as fait pour moi. Merci **Anas** pour ton aide dans la récolte de la salive de pucerons. Merci à **Romain** et **Gaël** pour leur aide dans les analyses statistiques de mes résultats. Merci **Katia** pour ton travail pour l'équipe, ta gentillesse et ta bonne humeur.

Merci mille fois à toute mon équipe pour tous les moments passés ensemble au labo, en réunions, pour régler les problèmes et pour avoir été présents à l'annonce des bonnes nouvelles. Un grand merci à **Jean-Louis** pour ses conseils, son écoute et sa compagnie au labo. Tu es le seul à être resté au labo 69 avec moi du début à la fin de ma thèse et à nous deux, nous avons guidés des dizaines de personnes dans ce labo. Merci beaucoup **Daniel** d'être venu faire tes pauses dans le labo pendant que je « prototais » et pour ton sourire quotidien contagieux. Je te souhaite encore une merveilleuse retraite. Merci beaucoup **Romain** pour ton soutien, nos discussions, tes mails qui m'ont fait pleurer de rire et pour toutes les inspirations que tu m'as donné pour mes présentations orales. Merci **Manuella**, **Marilyne**, **Martine**, **Cica** et **Michel P.** pour tous les mots aussi sincères que gentils que vous avez eu pour moi, ils m'ont mis du baume au cœur, m'ont réconforté et m'ont aidé à prendre de l'assurance. Merci **Marie-Stéphanie**, **Michel Y.**, **Elodie** et **Sophie** pour la bonne ambiance dans l'équipe et toutes vos petites attentions qui consolident encore plus la belle cohésion d'équipe que nous avons. Merci **Bastien**, **Baptiste** et **Caroline** pour toutes les petites astuces de labo que vous m'avez montré et qui font la différence.

Merci beaucoup à **Michel Amphoux** et **Maryse Lenarduzzi** pour leur grande aide administrative. Merci **Michel A.** de faire autant de blagues et de toujours trouver le mot pour rire en toute circonstance.

Un grand merci au groupe des BOGOS (Bande Organisée pour la Gestion et l'Orientation des Séminaires), **Matthieu, Marilyne, Manuella, Monique, Stéphane, Thomas, Jean, Elisabeth, Nicolas, Jean-Heinrich** et **Dominique** avec qui j'ai eu le privilège d'organiser les séminaires et les journées scientifiques pour notre unité pendant ces trois années de doctorat. J'ai pris beaucoup de plaisir à organiser ces rencontres scientifiques avec vous.

Un immense merci à toute l'équipe d'organisation du Printemps de Baillarguet 2016 dont j'ai fait parti. Je souhaiterai remercier plus particulièrement **Pachka Hammami** qui m'a tout montré et tout appris sur la préparation d'évènements scientifiques et **Dominique Lagrenée**, la meilleure gestionnaire et secrétaire que je connaisse. Merci à toutes les deux pour votre travail de précision, ça a été un vrai bonheur pour moi de travailler avec des personnes aussi organisées que vous.

Merci beaucoup au **comité des fêtes de BGPI** pour tous les moments conviviaux que vous nous avez préparés pour Noël, pour les tournois de pétanque et les BGPlades.

Merci infiniment à tous les doctorants de l'unité avec qui j'ai passé le plus de temps dans l'unité et de nombreux autres moments en dehors. Vous avez tous joué un rôle à part entière durant mes trois années de doctorat. Merci **Mireille** et **Diariatou**, deux rayons de soleil africains, toujours enthousiastes et pétillantes. Merci **Mahsa** d'avoir été aussi merveilleuse et de m'avoir mis à l'aise pour parler en anglais ensemble. Merci **Emeline** pour tous tes fous rires entraînant qui me donnent envie d'éclater de rire aussi. Merci **Maud** de toujours trouver le bon côté des choses et de toujours proposer ton aide. Merci **Mathias** pour ton humour et tes petites blagues quotidiennes. Merci **Faihad** pour ta confiance, tes secrets et pour tes conseils cinématographiques. Merci **Thomas** pour ton passage au bureau chaque matin et tes somptueux kouign-amann. Merci **Kevin** pour ton dévouement à chaque occasion et la bonne volonté que tu y mets. Merci **Pascal** pour tes histoires de voyages, de cultures et de bébés et pour notre point commun d'amateur de potins. Merci **Diana** pour ta

jovialité et tes paroles réconfortantes qui m'ont guidé et permis de garder à l'esprit l'essentiel. Merci **Jérémy** de t'être accommodé de tout si facilement, tu es quelqu'un avec qui je me suis toujours sentie à l'aise et avec qui je peux facilement parler de tout. Merci **Faustine** pour ta bienveillance, ta douceur et toute ton affection, tu es une amie en or. Merci **Maëlle** pour toutes tes confidences, notre complicité et pour ce soutien mutuel et permanent qui fait que l'on se réjouit l'une pour l'autre et qu'on s'entraide dans les moments difficiles. Merci **Coralie**, mon alliée avec qui j'ai traversé toutes les épreuves de la thèse aux mêmes moments et d'autres épreuves plus personnelles qui nous ont encore plus rapprochées. Merci à **Beatriz**, toujours pétillante et pleine de vie, avec qui j'ai partagé mon bureau, qui était également ma voisine de paillasse et qui était dans la même sous équipe que moi. Je vous souhaite à tous une merveilleuse thèse et une belle carrière !

Je terminerai en remerciant ma famille qui m'a toujours soutenu et cru en moi : merci **Maman, Papa, Elodie, Mamie, Papi, Paty et les Zuber**. Merci à mon bébé chat **Luffy** d'être aussi mignonne et pour tous tes ronrons. Merci **Albin** pour tout ce que tu m'as apporté et donné depuis le premier regard que tu as posé sur moi.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

- SH : Groupement thiol
ADN : Acide désoxyribonucléique
AJ : Acide jasmonique
ARN : Acide ribonucléique
AS : Acide salicylique
AT : Activation de la transmission
C : Cystéine
Ca²⁺ : Ion calcium
DAMPs : Damage-associated molecular patterns
ET : Ethylène
ETI : Effector triggered immunity
NADPH : Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
O₂⁻ : Ion superoxyde
O-GlcNAc : O-N-acétylglucosaminylation
poly A : Queue polyadénylée
PTI : Plant triggered immunity
qPCR : PCR quantitative en temps réel
RdRp : RNA-dependent RNA polymerase
RE : Réticulum endoplasmique
ROS : Espèces réactives de l'oxygène
S : Sérine
SDS-PAGE : Polyacrylamide dodécylsulfate de sodium

Répertoire des espèces et virus cités

- A. thaliana* : *Arabidopsis thaliana*
BTV : Bluetongue virus
CaMV : *Cauliflower mosaic virus*
M. persicae : *Myzus persicae*

PVY : *Potato virus Y*

TuMV : *Turnip mosaic virus*

Répertoire des produits et réactifs

AMV : Avian myeloblastosis virus

BCIP : 5-Bromo-4-chloro-3'-indolyl phosphate p-toluidine salt

CaCl₂ : Chlorure de calcium

GlcNAc : N-acétylglucosamine

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

KCl : Chlorure de potassium

LaCl₃ : Lanthanum(III) chloride

NBT : Nitro-Blue tetrazolium chloride

NEM : N-éthylmaléimide

O-GlcNAc : O-N-acétylglucosaminylation

Répertoire des gènes et protéines

6K1 : *6kDa protein 1*

6K2 : *6kDa protein 2*

CI : *Cylindrical inclusion protein*

CP : *Coat protein*

eEF1A : *Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1*

eIF4E : *Eukaryotic translation initiation factor 4E*

HC-Pro : *Helper component proteinase*

HIP2 : *(HC-Pro)-interacting protein 2*

HSC70-3 : *Heat-shock protein 70*

Mp1 : *Myzus persicae 1*

Mp2 : *Myzus persicae 2*

NIa : *Nuclear inclusion protein a*

NIb : *Nuclear inclusion protein b*

P1 : *Protease virale 1*

P3 : *Protease virale 3*

PABP2 : *Poly(A)-binding protein 2*

PIPO : *Pretty interesting Potyviridae ORF*

RAV2 : *Rous associated virus 2*

RBOH : *Respiratory burst oxidase homolog*

RTM : *Restricted Tobacco etch virus movement*

VPg : *Viral genome linked protein*

LISTE DES FIGURES, TABLEAUX ET ANNEXES

Figure 1. Représentation schématique du génome d'un *Potyvirus* (p. 19)

Figure 2. Symptômes du TuMV sur navet (*Brassica rapa*) (p. 20)

Figure 3. Représentation schématique des régions et motifs de HC-Pro (p. 22)

Figure 4. Représentation schématique des différentes étapes du cycle d'infection d'une cellule végétale par un virus à ARN positif (p. 27)

Figure 5. L'AT du CaMV par les pucerons (p. 51)

Figure 6. Emplacement des cystéines dans la séquence de HC-Pro de la souche UK1 du TuMV (p. 91)

Figure 7. Effet des substitutions de cystéines sur l'accumulation des mutants cystéines dans les navets infectés (p. 93)

Figure 8. Taux de transmission des mutants cystéines (p. 95)

Figure 9. Analyse du profil d'oligomères de HC-Pro par SDS PAGE/Western blot à partir de protoplastes infectés par les mutants cystéines (p. 96)

Figure 10. Effet de la durée de contact des pucerons avec une solution de protoplastes sur l'oligomérisation de HC-Pro (p. 121)

Figure 11. Effet des acides galacturoniques sur l'oligomérisation de HC-Pro (p. 123)

Figure 12. Effet de la salive liquide et des gaines salivaires sur l'oligomérisation de HC-Pro (p. 125)

Figure 13. Effet d'extraits totaux de pucerons sur l'oligomérisation de HC-Pro (p. 126)

Figure 14. Effet de Mp1 et Mp2 sur l'oligomérisation de HC-Pro (p. 127)

Figure 15. Effet de modifications de la membrane plasmique sur l'oligomérisation de HC-Pro (p. 129)

Figure 16. Récolte de la salive des pucerons (p. 143)

Figure 17. Protéines contenues dans les extraits de pucerons (p. 145)

Tableau 1. Viabilité des mutants cystéines générés (p. 92)

Tableau 2. Résultats des tests de transmission préliminaires des mutants cystéines (p. 94)

Tableau 3. Liste des mutants obtenus sur la protéine HC-Pro de la souche UK1 du TuMV
(p. 138)

Annexe 1. Alignement de 56 séquences de HC-Pro (p. 168)

Annexe 2. Préparation du milieu artificiel pour pucerons (p. 171)

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	4
LISTE DES ABRÉVIATIONS	8
LISTE DES FIGURES, TABLEAUX ET ANNEXES	11
TABLE DES MATIÈRES	13
INTRODUCTION	16
Introduction générale	17
1. Les Potyvirus	18
1.1. Présentation générale	18
1.2. Caractéristiques biologiques et biochimiques des protéines des potyvirus	20
1.2.1. La protéine P1	20
1.2.2. La protéine HC-Pro	21
1.2.3. Les protéines P3 et P3N-PIPO	23
1.2.4. La protéine CI	23
1.2.5. Les protéines 6K1 et 6K2	24
1.2.6. La protéine VPg- NIaPro	24
1.2.7. La protéine NIb	25
1.2.8. La protéine CP	26
1.3. Multiplication virale	26
1.4. Mouvement dans la plante	28
1.4.1. Mouvement sur de courtes distances	29
1.4.2. Mouvement sur de longues distances	29
2. La transmission	31
<u>REVIEW</u> : Insect transmission of plant viruses: Multilayered interactions optimize viral propagation	33
3. Les réponses des plantes face à la transmission	53
3.1. Reconnaissance du vecteur par la plante	53
3.2. Voies de signalisations	54
3.2.1. La signalisation calcique	54
3.2.2. La signalisation ROS	56
3.2.3. La signalisation via les phytohormones	57
3.3. Mécanismes de défenses	57
3.4. Le détournement des défenses de la plante par le virus et son vecteur	59
4. Objectifs de la thèse	59

CHAPITRE 1 : Le TuMV active sa transmission en détournant les réponses de la plante	61
1. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la transmission du TuMV	62
1.1. Contexte et objectif	62
1.2. <u>ARTICLE 1</u> : <i>Turnip mosaic virus</i> is a second virus to use transmission activation for plant-to-plant propagation by aphids	63
1.3. Conclusion et perspectives	90
2. Recherche des cystéines impliquées dans la formation des ponts disulfures pour l'oligomérisation de HC-Pro	91
2.1. Présentation des mutants cystéines	91
2.2. Quantification de la charge virale des mutants cystéines	93
2.3. Tests de l'efficacité de la transmission pour les mutants cystéines	94
2.4. Western blot à partir de protoplastes infectés par les mutants cystéines	95
2.5. Conclusion et perspectives	97
CHAPITRE 2 : Comparaison de l'activation de la transmission entre le CaMV et le TuMV	100
1. Contexte et objectifs	101
2. <u>ARTICLE 2</u>: Pharmacological analysis of transmission activation of two aphid-vectored plant viruses, <i>Turnip mosaic virus</i> and <i>Cauliflower mosaic virus</i>	101
3. Conclusion et perspectives	117
CHAPITRE 3 : Recherche d'éliciteurs de l'activation de la transmission du TuMV	118
1. Contexte et objectifs	119
2. Stress de piqûre	120
2.1. L'hypothèse de l'élicitation par la blessure	120
2.2. L'hypothèse de l'élicitation par les acides galacturoniques	122
3. Stress lié à la salive du puceron	124
4. Stress de la membrane plasmique	127
5. Conclusion et perspectives	129
CONCLUSION GÉNÉRALE	131

MATÉRIEL ET MÉTHODES	137
1. Réalisation des mutants cystéines	138
1.1. QuickChange® et Q5®	138
1.2. Purification des plasmides	139
1.3. Biolistique	139
1.4. Extraction d'ARN, RT-PCR et qPCR	140
1.5. Analyses statistiques	141
2. Pucerons	142
2.1. Synchronisation des pucerons	142
2.2. Récolte de la salive liquide et des gaines de pucerons	142
2.3. Concentration de la salive liquide des pucerons	143
2.4. Préparation des protéines et extraits totaux de pucerons	144
3. Traitement des protoplastes	145
3.1. Stress de piqûre	145
3.2. Stress de puceron	146
3.3. Stress de la membrane plasmique	147
4. Protéomique SDS/PAGE et western blot	147
4.1. SDS-PAGE	147
4.2. Western blot	148
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	149
ANNEXES	167

INTRODUCTION

Introduction générale

Les plantes sont exposées à de nombreux stress abiotiques comme par exemple la sécheresse, le froid, des carences nutritives, mais également à de nombreux stress biotiques induits par des agents pathogènes dont les virus. Parmi ces derniers, le genre *Potyvirus* constitue l'un des groupes les plus nombreux et les plus importants infectant d'innombrables cultures. Les potyvirus, comme l'ensemble des virus, sont des parasites obligatoires, c'est-à-dire qu'ils ne peuvent se répliquer qu'en parasitant une cellule végétale vivante et ainsi déclencher l'infection de la cellule. Pour ce faire, ils doivent franchir une barrière : la paroi cellulaire qui protège les cellules végétales. Cela se fait à travers les blessures ou des piqûres générées par des insectes vecteurs dans les cellules.

Pour leur propagation, la plupart des virus, dont les potyvirus, dépendent d'une transmission assurée par l'intermédiaire de vecteurs leur garantissant de passer facilement d'un hôte à l'autre. Parmi ces vecteurs, les insectes piqueurs-suceurs, constitués principalement d'hémiptères comme les pucerons, sont les plus fréquents. Evidemment, la dissémination a pour répercussion l'apparition de maladies virales, ou viroses, qui diffèrent selon l'hôte et la sévérité des symptômes provoqués. Ces dégâts génèrent une perte économique plus ou moins importante selon la culture affectée.

Ces maladies virales sont d'autant plus préjudiciables qu'il n'existe actuellement aucune molécule chimique qui permet d'éradiquer les virus de manière curative. De ce fait, seule la lutte préventive peut-être envisagée (sélection génétique, utilisation de matériel de propagation indemne de virus, élimination des vecteurs...). Afin de proposer des méthodes de lutte efficaces il est nécessaire de comprendre comment s'effectue le cycle infectieux des virus depuis la phase d'introduction dans les tissus d'une plante hôte jusqu'à la dissémination à travers le champ. Dans ces étapes, la réplication du virus, son mouvement dans l'hôte et les interactions avec les défenses des plantes figurent parmi les plus étudiés. Il est donc urgent de mieux comprendre les bases moléculaires de la transmission, résultat des interactions virus-vecteurs-plantes. Ces recherches pourraient aider à trouver de nouvelles solutions plus respectueuses de l'environnement, plus durables, plus rapides à mettre en place, moins coûteuses et plus efficaces pour agir sur ces maladies et ainsi limiter les impacts agronomiques qui en découlent.

Une partie de l'équipe Interactions Virus Insecte Plante (VIP) s'intéresse depuis une trentaine d'années à la transmission non-circulante des virus de plante par les pucerons selon la stratégie moléculaire « facteur assistant de la transmission ». En ayant pour modèle d'étude le *Cauliflower mosaic virus* (CaMV, genre *Caulimovirus*), les recherches portant sur les interactions du virus avec la cellule végétale avant, pendant et après l'arrivée du puceron ont mis en avant le phénomène de « l'activation de la transmission » (AT) qui permet au virus d'être efficacement acquis par son vecteur. Ce fait apporte de nouvelles connaissances sur ce mode de transmission et fait l'objet de mon sujet de thèse portant sur l'identification et la caractérisation de l'AT pour le genre *Potyvirus*.

Quatre parties seront présentées dans cette introduction générale. La première constituera la présentation du genre *Potyvirus*. La deuxième développera la transmission des virus par leurs vecteurs et le phénomène d'AT. La troisième portera sur les mécanismes de signalisation et de défenses des plantes déclenchées par les pucerons. Enfin, la quatrième partie exposera les objectifs de cette thèse.

1. Les *Potyvirus*

1.1. Présentation générale

Le genre *Potyvirus* appartient à la famille des *Potyviridae* comptant également sept autres genres : *Brambyvirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Poacevirus*, *Rymovirus*, *Tritimovirus* et *Bymovirus* (International Committee on Taxonomy of Viruses, 10^{ème} édition). Le genre *Potyvirus* fait parti des genres les plus répandus parmi les virus de plante. En effet, il constitue à lui seul plus du tiers des virus de plantes actuellement connus. Leur particule virale est non enveloppée et correspond à des filaments flexibles d'environ 11 à 13 nm de diamètre sur 680 à 900 nm de longueur (Adams *et al.*, 2011). Leur génome est monopartite pour une taille d'environ 10 kb. Il s'agit d'un ARN simple brin linéaire de polarité positive. Une petite protéine virale, la *Viral genome linked protein* (VPg) est attachée à son extrémité 5' et l'extrémité 3' possède une queue polyadénylée. L'ARN génomique code pour une polyprotéine qui est maturée par protéolyse, résultant de l'activité de trois protéases virales,

en 11 produits de clivages (ou 11 protéines) fonctionnel(le)s (Merits *et al.*, 2002 ; Wei *et al.*, 2010a) (figure 1).

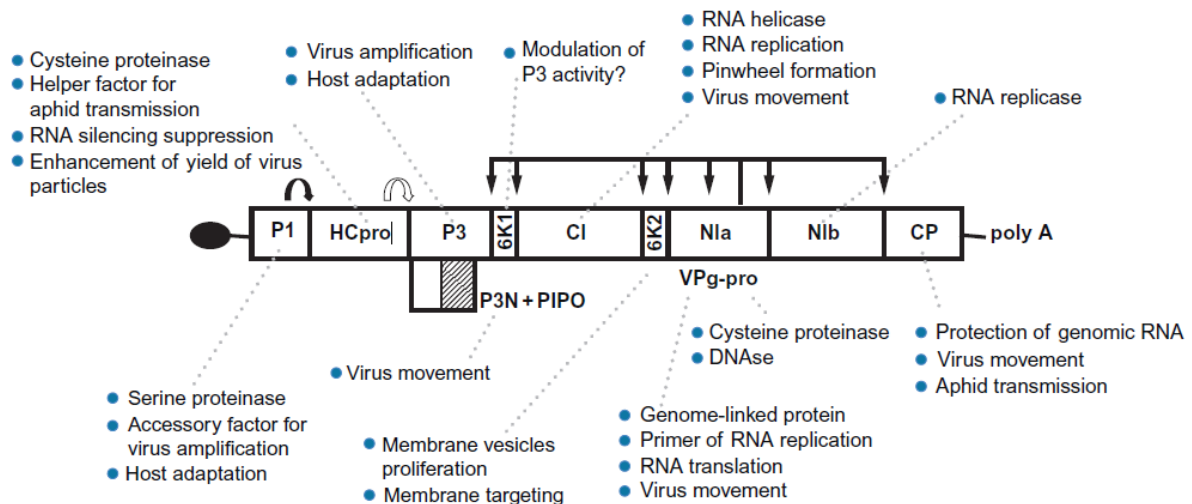


Figure 1. Représentation schématique du génome d'un Potyvirus (extrait de Revers et García, 2015). Le génome est présenté par un rectangle horizontal. La VPg est représentée par un cercle noir à l'extrémité 5' et la queue poly-A se situe à l'extrémité 3'. Le principal cadre de lecture de l'ARN génomique code pour une polyprotéine. Les activités protéolytiques de la P1 (flèche courbée noire) et de HC-Pro (flèche courbée blanche) libèrent P1 et HC-Pro de la polyprotéine. Toutes les autres protéines sont libérées par l'activité de la NIa (ensemble de flèches noires) et représentées par les rectangles supérieurs. Un second cadre de lecture existe pour la protéine PIPO (rectangles inférieurs). Les fonctions pour chaque protéine sont également indiquées.

VPg : *Viral genome linked protein* ; P1 : *Protease virale 1* ; HC-Pro : *Helper component proteinase* ; P3 : *Protease virale 3* ; PIPO : *Pretty interesting Potyviridae ORF* ; 6K1 : *6kDa protein 1* ; CI : *Cylindrical inclusion protein* ; 6K2 : *6kDa protein 2* ; NIa : *Nuclear inclusion protein a* ; NIb : *Nuclear inclusion protein b* ; CP : *Coat protein* ; poly A : queue polyadénylée

L'ensemble des potyvirus comprend une gamme d'hôtes très importantes qui s'étend à différentes familles de plantes. Parmi elles, on retrouve de nombreuses plantes d'intérêt agricole telles que les pommes de terre, les pruniers, le soja, le pois ou encore le tabac. Les symptômes qu'ils peuvent induire varient en fonction du génotype de l'hôte, de l'isolat viral et des conditions environnementales. La majorité des potyvirus en milieu cultivé provoque des symptômes forts, causant un nanisme des plants infectés accompagnés d'une mosaïque jaune et d'un éclaircissement chlorotique des nervures (figure 2). Les autres organes de la plante sont eux aussi affectés par les potyvirus : les fleurs, les graines et les

fruits peuvent présenter des nécroses. Ces dégâts engendrent des pertes dans les cultures qui ont un impact agronomique et économique important (Shukla *et al.*, 1994).



Figure 2. Symptômes du TuMV sur navet (*Brassica rapa*). La feuille de gauche est infectée par le TuMV. Elle présente des symptômes de gaufrages, de mosaïque jaune, et un éclaircissement chlorotique des nervures. La feuille de droite est saine.

Etant très répandu chez les végétaux et pouvant avoir des conséquences économiques lourdes, le genre *Potyvirus* est le genre viral le plus étudié. Leur étude couvre de nombreux aspects de la virologie végétale, tels que la caractérisation fonctionnelle des protéines virales, les interactions moléculaires avec leurs hôtes et leurs vecteurs, la structure, la taxonomie, l'évolution, l'épidémiologie, ou encore le diagnostic.

1.2. Caractéristiques biologiques et biochimiques des protéines des potyvirus

1.2.1. La protéine P1

P1 est le premier produit de clivage depuis l'extrémité N-terminale de la polyprotéine des potyvirus. Elle a un domaine riche en sérines qui s'auto-clive à son extrémité C-terminale et qui est bien conservé entre les différents potyvirus (Verchot *et al.*, 1991). Cependant, cette protéine a une taille pouvant varier entre 30 et 63 kDa suivant les espèces, ce qui fait d'elle la protéine potyvirale avec la plus grande variabilité au niveau de sa taille et de sa séquence (Adams *et al.*, 2005 ; Yoshida *et al.*, 2012).

P1 est importante pour l'amplification du génome (Verchot et Carrington, 1995). Son clivage en C-terminal est indispensable pour la viabilité du virus. En effet, en l'absence d'auto-clivage, P1 altère la fonction de HC-Pro maintenant ainsi une amplification virale en-dessous des niveaux préjudiciables à la plante pour maintenir une capacité répliquative à plus long terme (Pasin *et al.*, 2014).

Une troisième fonction est associée à cette protéine. Il s'agit de l'adaptation du virus à son hôte, d'où la grande variabilité de séquence de P1 entre les différents potyvirus (Mengual-Chuliá *et al.*, 2016). L'activité de P1 dans la suppression de l'ARN interférent peut ou non dépendre d'un facteur hôte et est donc classée, selon l'espèce viral, comme une activité de suppression du silencing de type A, dépendant de facteurs hôtes, ou de type B, indépendant des facteurs hôtes (Rodamilans *et al.*, 2013).

1.2.2. La protéine HC-Pro

La protéine *helper component protease* (HC-Pro) est la protéine des potyvirus la plus étudiée. Le nom de cette protéine vient de la première fonction qu'on lui ait attribuée, celle de facteur assistant de la transmission par les pucerons (Govier *et al.*, 1977). Elle est également très connue pour sa fonction de suppresseur de l'ARN interférence (Anandalakshmi *et al.*, 1998 ; Kasschau et Carrington, 1998) et son rôle dans le mouvement de cellule à cellule et le mouvement systémique dans la plante (Kasschau *et al.*, 1997). HC-Pro a une taille d'environ 52 kDa et contient un domaine protéase riche en cystéines qui auto-clive HC-Pro de la polyprotéine à son extrémité C-terminale (Carrington *et al.*, 1989).

HC-Pro joue un rôle central dans la transmission par les pucerons, puisqu'elle est l'une des deux protéines indispensables pour la formation du complexe transmissible, composé de la particule virale (virion) et de HC-Pro qui interagit avec le puceron pour la transmission. En effet, HC-Pro lie le virion aux stylets du puceron. HC-Pro contient sur sa partie C-terminale un motif « PTK » interagissant avec le motif « DAG » de la protéine de capsid (Blanc *et al.*, 1997; Peng *et al.*, 1998). Cette interaction a été démontrée comme jouant un rôle indispensable dans la transmission des potyvirus par les pucerons. Actuellement, ni le lieu ni le moment de la formation de ce complexe n'est connue. Il pourrait se former dans les cellules infectées, au moment de l'acquisition, ou dans les stylets du puceron, ou les deux. De plus, HC-Pro dispose également sur sa partie N-terminale d'un motif conservé « KITC » qui est impliqué dans la liaison aux stylets des pucerons (Blanc *et al.*, 1998 ; Granier *et al.*,

1993 ; Robaglia *et al.*, 1989 ; Seo *et al.*, 2010) et d'un éventuel motif en doigt de zinc très conservé contenant quatre cystéines (Huet *et al.*, 1994 ; Peng *et al.*, 1998) (figure 3). Des recherches ont montré que HC-Pro se trouve sous forme dimérique, et probablement sous d'autres formes oligomériques, dans les cellules végétales. Ces mêmes travaux suggèrent qu'il s'agirait de la forme active pour la transmission (Plisson *et al.*, 2003; Ruiz-Ferrer *et al.*, 2005; Thornbury *et al.*, 1985).

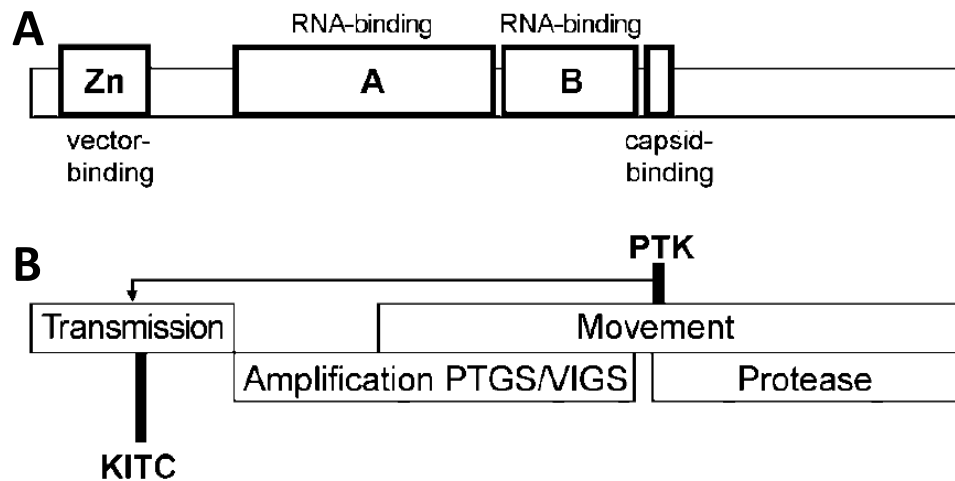


Figure 3. Représentation schématique des régions et motifs de HC-Pro (adapté de Plisson *et al.*, 2003). (A) Localisation des régions putatives de liaison au vecteur, à l'ARN, et à la capsid virale dans la séquence HC-Pro. Zn, doigt de zinc putatif ; A et B, domaines de liaison à l'ARN. (B) Fonctions biologiques des différentes régions de HC-Pro et position des motifs conservés. La flèche indique que le motif PTK est également impliqué dans la transmission.

Cette protéine multifonctionnelle est également un suppresseur de silencing, mécanisme de défense de la plante lors de l'infection virale. HC-Pro peut se lier avec les ARN simple brin, réduire des petits ARN de 21 nucléotides, interférer avec la méthylation des micros et des petits ARN et réguler négativement l'accumulation des petits ARN interférents (Anandalakshmi *et al.*, 1998 ; Valli *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2008).

HC-Pro peut interagir avec de nombreuses protéines virales et hôtes. Cependant, à l'exception de son interaction avec la protéine CP pour la transmission par les pucerons, la pertinence fonctionnelle de ces autres interactions doit encore être caractérisée en détails. En effet, des études ont montré que HC-Pro peut interagir, avec les protéines virales P1 (Merits *et al.*, 1999), CI (Choi *et al.*, 2000) et NIa-VPg (Guo *et al.*, 2001). Des recherches ont

également mis en évidence que HC-Pro peut interagir avec des protéines de la plante hôte telles qu'une protéine liée à la calmoduline (Anandalakshmi *et al.*, 2000 ; Nakahara *et al.*, 2012), le facteur de transcription *Rous associated virus 2* (RAV2) induite par l'éthylène (Endres *et al.*, 2010) ou encore la protéine (*HC-Pro*)-*interacting protein 2* (HIP2) associée aux microtubules (Guo *et al.*, 2003 ; Haikonen *et al.*, 2013). Pour toutes ces interactions, le rôle fonctionnel reste à élucider.

1.2.3. Les protéines P3 et P3N-PIPO

Contrairement à la plupart des protéines potyvrales, P3 ne se lie pas à l'ARN viral. On lui attribue une implication dans l'amplification du virus (Klein *et al.*, 1994) et dans l'adaptation à l'hôte (Sardaru *et al.*, 2018 ; Suehiro *et al.*, 2004). Cette protéine d'environ 41 kDa est associée aux inclusions cylindriques cytoplasmiques formées par CI (Rodríguez-Cerezo *et al.*, 1993) et aux inclusions nucléaires formées par NIa et NIb (Langenberg et Zhang, 1997). P3 a également été localisée sur les membranes du réticulum endoplasmique (RE) et retrouvée avec des vésicules de réplication. Une région hydrophobe située dans sa partie C-terminale a été montrée comme étant responsable du ciblage RE par P3 (Cui *et al.*, 2010).

La protéine P3N-PIPO (\approx 25 kDa) est impliquée dans le mouvement des potyvirus (Vijayapalani *et al.*, 2012). Elle permet une propagation efficace du génome viral de cellule à cellule en passant par les plasmodesmes. Une étude plus récente a également mis en évidence que l'accumulation de P3N-PIPO du *Clover yellow vein virus* était reconnue par le gène de résistance Cyn1 de son hôte, le pois (Atsumi *et al.*, 2016).

1.2.4. La protéine CI

La protéine *cylindrical inclusion* (CI) a une taille d'environ 71 kDa. Elle tient son nom des inclusions cylindriques qu'elle forme dans le cytoplasme des cellules infectées par les potyvirus (Edwardson et Christie, 1996). Plusieurs expériences suggèrent que cette formation d'inclusions cylindriques faciliterait le mouvement du potyvirus dans la plante (Wei *et al.*, 2010a). Dans ce sens, la CI a été trouvée associée aux extrémités des virions, où elle aiderait à la translocation du virus *via* les plasmodesmes pour le mouvement de cellule à cellule (Gabrenaite-Verkhovskaya *et al.*, 2008).

Cette protéine multifonctionnelle possède aussi une activité d'ARN hélicase et d'ARN réplécase (Lain *et al.*, 1990) qui est impliquée dans la réplication de l'ARN viral (Fernández *et al.*, 1997).

1.2.5. Les protéines 6K1 et 6K2

La protéine 6K1 (≈ 6 kDa) est l'une des protéines potyvrales les moins bien caractérisées. Elle aurait un rôle important pour la réplication virale au stade précoce de l'infection (Cui et Wang, 2016). Les autres données actuellement disponibles sur cette protéine suggèrent qu'elle agirait plus ou moins comme la protéine P3, c'est-à-dire qu'elle serait impliquée dans la multiplication du virus et dans l'adaptation à l'hôte. En effet, compte tenu du fait que le clivage entre P3 et 6K1 n'est pas essentiel pour l'infection virale, il a été proposé que P3-6K1 puisse constituer le principal produit fonctionnel. Cependant, en altérant la jonction entre les protéines P3 et 6K1, l'expression des symptômes est affectée, ce qui suggère que 6K1 seul peut jouer un rôle important dans l'infection par les potyvirus (Riechmann *et al.*, 1995). De plus, des expériences ont montré que 6K1 était située sur la périphérie cellulaire, ce qui ne correspond pas à la localisation P3 qui se trouve dans le RE (Hong *et al.*, 2007).

Tout comme 6K1, la protéine 6K2 a une taille d'environ 6 kDa et n'est pas bien caractérisée. Elle s'accumule dans les membranes cellulaires hôtes, participe au mouvement à longue distance, au développement des symptômes (Rajamäki et Valkonen, 1999), et elle est capable d'induire la formation de vésicules de réplication du virus dans les membranes du RE (Thivierge *et al.*, 2008). Récemment, une équipe a démontré que 6K2 recrute 6K1 sur les complexes de réplication virale puis détourne la protéine *Photosystem II oxygen evolution complex* de *Nicotiana benthamiana* pour réguler la réplication du potyvirus (Geng *et al.*, 2017).

1.2.6. La protéine VPg-NlaPro

Les domaines VPg et NlaPro de Nla sont séparés par un site autoprotéolytique utilisé de manière inefficace (Schaad *et al.*, 1996), ce qui implique que des quantités abondantes de produits Nla, VPg et NlaPro traités coexistent dans les cellules infectées à tout moment du processus d'infection. La VPg est une protéine multifonctionnelle impliquée, au moins, dans la réplication virale (Puustinen et Mäkinen, 2004), la traduction (Eskelin *et al.*, 2011), et le

mouvement (Schaad *et al.*, 1997). La protéine *nuclear inclusion a* (Nla) a une taille d'environ 50 kDa. Elle tient son nom de sa capacité à former des inclusions cristallines dans les noyaux (Kassanis, 1939). NlaPro est une sérine protéase qui reconnaît spécifiquement des motifs conservés de sept acides aminés dans la polyprotéine virale et, en cis et en trans, les clive entre les positions 6 et 7 pour produire la plupart des produits protéiques viraux (Carrington et Dougherty, 1987). NlaPro a également une activité de liaison à l'ARN (Daròs et Carrington, 1997), interagit avec l'ARN polymérase virale dépendante de l'ARN (protéine Nlb) et intervient dans la réplication virale (Daròs *et al.*, 1999). Enfin, Nla-Pro intervient dans la manipulation de la physiologie des plantes hôtes pour attirer des pucerons (Casteel *et al.*, 2014). En effet, une étude récente a mis en évidence que Nla-Pro se relocalise au niveau des vacuoles en présence de pucerons et démontre que cette relocalisation lui permet d'inhiber les défenses de la plante et ainsi, d'augmenter la fécondité du vecteur sur les plantes hôtes (Bak *et al.*, 2017).

1.2.7. La protéine Nlb

La protéine *nuclear inclusion b* (Nlb) a une taille d'environ 59 kDa et forme elle aussi des inclusions cristallines dans les noyaux, d'où son nom (Kassanis, 1939). Nlb, également appelée RNA-dependent RNA polymerase (RdRp), est responsable de la réplication du génome potyviral (Hong et Hunt, 1996). Elle est associée à des structures membranaires, où a lieu la réplication de l'ARN viral. Pour former des complexes de réplication fonctionnels, Nlb interagit avec les protéines hôtes *heat-shock protein 70* (Hsc70-3, chaperonne), *poly(A)-binding protein* (PABP, un facteur de traduction) et *eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1* (eEF1A, un facteur d'élongation de la traduction) (Dufresne *et al.*, 2008 ; Thivierge *et al.*, 2008). Ces interactions seront développées dans la partie 1.3. de l'introduction. De plus, Nlb interagirait dans le noyau et dans le cytoplasme avec l'enzyme de conjugaison SUMO SCE1 et cette interaction amènerait à une multiplication accrue du virus (Xiong et Wang, 2013). Nlb peut aussi être sumoylée par SUMO3. Cette modification post-traductionnelle favorise l'infection en relocalisant Nlb du noyau vers le cytoplasme et supprime également les réponses immunitaires de l'hôte (Cheng *et al.*, 2017).

1.2.8. La protéine CP

La protéine de capsid, *coat protein* (CP) a pour fonction principale l'encapsidation du génome viral dans la particule virale mature. Chaque particule est composée d'environ 2000 sous-unités de CP, agencées de manière hélicoïdale autour de l'ARN génomique (Adams *et al.*, 2011). La CP est évidemment impliquée dans la transmission par vecteurs puisqu'elle permet la formation du complexe transmissible HC-Pro/virion via un motif « DAG » localisé à son extrémité N-terminale (comme déjà décrit dans la partie 1.2.2.).

La région centrale de la CP est très conservée entre les potyvirus (Dolja *et al.*, 1991). Elle représente le noyau de la CP. Les régions N-terminale et C-terminale sont moins conservées mais essentielles pour les interactions entre les sous-unités de CP puisqu'elles sont impliquées dans l'assemblage du virus (Dolja *et al.*, 1994).

Deux principaux types de modifications post-traductionnelles de la CP des potyvirus sont fréquemment rencontrés. Le premier correspond à la phosphorylation de la CP, c'est-à-dire, à l'ajout d'un phosphoryl PO_3^{2-} au niveau des sérines et des thréonines (Ivanov *et al.*, 2003). La O-N-acétylglucosamylation (O-GlcNAc) constitue le second et consiste en l'addition d'un résidu de N-acétylglucosamine (GlcNAc) sur le groupement hydroxyle d'une sérine ou d'une thréonine (Kim *et al.*, 2011 ; Subr *et al.*, 2010). Ce dernier peut entrer en compétition avec la phosphorylation sur les mêmes résidus de sérine ou de thréonine ou sur des résidus voisins. Ainsi, si la protéine est phosphorylée elle n'est pas O-GlcNAc à la même position et vice-versa. Ces modifications post-traductionnelles seraient impliquées dans les processus cellulaires de régulation de la traduction, de réplication et de propagation au cours des différentes étapes de l'infection (Pérez *et al.*, 2013).

1.3. Multiplication virale

La multiplication des potyvirus suit le cycle d'infection typique des virus à ARN positif (figure 4). Plus précisément, elle commence avec l'inoculation des virions dans les cellules végétales, par l'intermédiaire d'une blessure ou lors d'une transmission par vecteur. L'ARN viral est alors libéré dans le cytoplasme et est directement traduit. Les potyvirus initient cette traduction au niveau du RE et forment les vésicules 6K2 (Wei *et al.*, 2010b). Ces dernières sont produites par le remodelage des organites composant le système endomembranaire de l'hôte (Grangeon *et al.*, 2012). Ces inclusions peuvent ou non contenir des virions. Les potyvirus répliquent leur génome dans ces vésicules cytoplasmiques et plus

précisément au niveau des chloroplastes, où elles s'assemblent et induisent des retournements membranaires (Wei *et al.*, 2010b). Ces vésicules se déplacent dans la cellule pour atteindre les plasmodesmes et parviennent ainsi aux cellules voisines pour y délivrer des génomes sous forme de complexes ribonucléoprotéiques qui vont initier un autre cycle de réplication des potyvirus (Grangeon *et al.*, 2013).

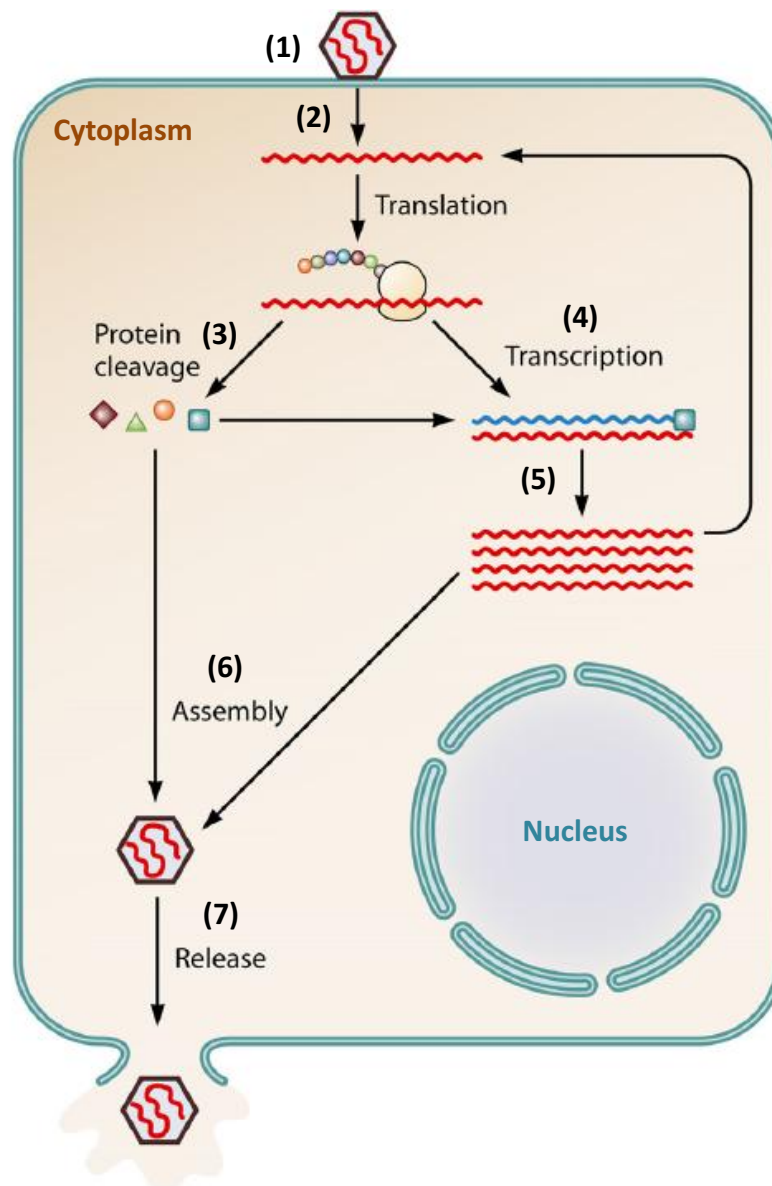


Figure 4. Représentation schématique des différentes étapes du cycle d'infection d'une cellule végétale par un virus à ARN positif (adapté de Li *et al.*, 2013). (1) Le virus pénètre dans la cellule végétale à l'aide de son vecteur ou par contact lors d'une blessure. (2) Une fois entré, le virus est décapsidé et l'ARN viral est ainsi libéré. L'ARN viral (+) (en rouge) sert directement d'ARN messager (ARNm). Le génome de polarité positive est traduit directement en une grande polyprotéine qui est ensuite clivée en plusieurs protéines. (3) La maturation de ces dernières fait intervenir plusieurs clivages en cascade. (4) La réplicase (carré bleu) va synthétiser un brin

(-) (en bleu) pour aboutir à la forme répliquative constituée d'un brin (-) et d'un brin (+) appariés en double hélice. (5) Le brin (-) va servir à la synthèse de nouveaux brins (+). (6) Ces nouveaux ARN s'encapsident par autoassemblage du brin (+) et des protéines capsidiales afin de former de nouveaux virions. (7) Des génomes sous forme de complexes entre le génome viral et des protéines vont alors pouvoir circuler et envahir le reste de la plante, notamment *via* les plasmodesmes, alors que les génomes sous forme de virions vont pouvoir être véhiculés, grâce à leurs vecteurs, sur d'autres plantes.

De nombreuses protéines potyvirales jouent un rôle direct ou indirect dans la multiplication des potyvirus. En effet, les protéines P3, CI, 6K2, NIa-VPg-Pro et NIb ont été identifiées dans des vésicules de réplication potyvirale (Beauchemin *et al.*, 2007 ; Cotton *et al.*, 2009 ; Cui *et al.*, 2010 ; Dufresne *et al.*, 2008 ; Merits *et al.*, 2002). La protéine P3, par exemple, ne se lie pas à l'ARN viral et son rôle dans la multiplication pourrait être indirect, lié au fait qu'elle interagit avec plusieurs autres protéines virales qui elles sont impliquées dans la réplication (Guo *et al.*, 2001 ; Zilian et Maiss, 2011). L'implication de CI est liée à sa fonction d'hélicase d'ARN (Eagles *et al.*, 1994). La protéine 6K2 est quant à elle impliquée dans la formation des vésicules de réplication. Pour NIa-VPg-Pro, il s'agit de sa liaison à l'extrémité 5' de l'ARN viral et à son interaction avec NIb et 6K2 (Fellers *et al.*, 1998). En effet, la protéine NIb possède une fonction de RdRp essentielle pour la multiplication virale (Hong et Hunt, 1996). La protéine HC-Pro détient elle aussi un rôle important puisqu'elle supprime l'ARN interférence et protège ainsi les intermédiaires répliquatifs et les brins génomiques non encapsidés de l'ARN viral (Burguán et Havelda, 2011).

Des facteurs d'hôtes interfèrent avec des protéines potyvirales impliquées dans cette multiplication. On en retrouve qui interagissent avec la VPg, comme la protéine *Eukaryotic translation initiation factor 4E* (eIF4E, facteur d'initiation de la traduction, et ses isoformes) mais également avec NIb, comme les protéines HSC70-3, PABP2 et eEF1A. Hsc70-3 est un composant du complexe de réplication viral puisqu'il se relocalise dans les vésicules lorsqu'il est associé à NIb (Dufresne *et al.*, 2008).

1.4. Mouvement dans la plante

Une fois le potyvirus multiplié, il va infecter son hôte entièrement. Pour ce faire, les potyvirus ont besoin de se déplacer dans toute la plante. Ces déplacements peuvent avoir lieu sur de courtes distances, c'est-à-dire d'une cellule à l'autre grâce aux plasmodesmes qui

assurent la continuité symplasmique entre les cellules. Sur de longues distances, les potyvirus se déplacent à partir du mésophile *via* les cellules des parenchymes périvasculaire et phloémien et *via* les cellules compagnes, pour atteindre la sève phloémienne avec laquelle ils seront transportés vers les niveaux foliaires supérieur et vers les racines.

1.4.1. Mouvement sur de courtes distances

Revers et García (2015) ont proposé un modèle pour le mouvement de cellule-à-cellule des potyvirus. Tout d'abord, P3N-PIPO interagit avec CI et le dirige vers les plasmodesmes (Wei *et al.*, 2010a). L'ancrage du complexe CI/P3N-PIPO dans les plasmodesmes est réalisé grâce à l'interaction entre le domaine PIPO et le facteur hôte PCAP1 (Vijayapalani *et al.*, 2012). Ensuite, un plus grand nombre de molécules CI se lie au complexe CI/P3N-PIPO/PCaP1, *via* une auto-interaction de CI, pour former des structures coniques. Enfin, la CP et les molécules d'ARN viraux nouvellement synthétisées sont libérées des vésicules de réplication et se déplacent le long des filaments d'actine vers les plasmodesmes. Par la suite, les complexes ribonucléoprotéiques sont formés et se lient aux structures coniques de CI puis se déplacent à travers les plasmodesmes en direction des cellules connexes (Roberts *et al.*, 1998). Pour faciliter ce passage, il a été démontré que la CP et HC-Pro sont capables d'augmenter la limite d'exclusion de taille des plasmodesmes (Rojas *et al.*, 1997).

1.4.2. Mouvement sur de longues distances

Le déplacement des potyvirus sur de longues distances à l'intérieur de la plante implique plusieurs étapes : leur entrée dans les cellules du mésophylle *via* les cellules du parenchyme périvasculaire, puis leur mouvement au niveau du parenchyme phloémien, des cellules compagnes, et à travers les éléments de la sève phloémienne. Les potyvirus sont ensuite propagés sur de nouvelles zones et y établissent de nouveaux foyers d'infection. Ces différentes étapes nécessitent la mise en place d'interactions spécifiques entre les virus et les facteurs hôtes (Hipper *et al.*, 2013).

Du côté des facteurs viraux, deux protéines virales sont actuellement connues pour être impliquées dans le mouvement à longue distance des potyvirus : la VPg et la CP. Pour la VPg, son domaine central serait impliqué dans le mouvement du virus sur de longues distances (Rajamäki et Valkonen, 1999). En effet, une hypothèse selon laquelle la VPg serait une protéine de mouvement vasculaire a été émise. D'autre part, on sait que la VPg a une

activité de suppression de l'ARN interférence, et ayant été localisée dans les cellules compagnes, il a été suggéré que sa fonction au début de l'infection pourrait être de supprimer certains mécanismes de résistance très précoces (Cheng et Wang, 2017 ; Rajamäki et Valkonen, 2003). De même, les parties N-terminale et C-terminale de la CP permettent (de manière inconnue) la propagation sur de longues distances (Andersen et Johansen, 1998 ; López-Moya et Pirone, 1998 ; Tatineni et French, 2014). Cet effet serait spécifique de l'hôte et de l'isolat viral (Carbonell *et al.*, 2013).

Du côté des facteurs de l'hôte, aucun n'a été identifié pour favoriser les déplacements des potyvirus sur de longues distances. Cependant, certains ont été identifiés pour freiner ces déplacements. Parmi eux, les gènes *Restricted Tobacco etch virus movement* (RTM) ont été décrits comme facteurs de résistance aux mouvements sur de longues distances (Mahajan *et al.*, 1998). (Revers et García, 2015) proposent des hypothèses sur le mécanisme de fonctionnement de ces RTM dans la résistance aux potyvirus. Une première hypothèse serait que les particules virales en cours de chargement dans les cellules du phloème puissent être séquestrées par le complexe RTM. Une autre hypothèse serait que ce complexe réduirait l'accessibilité de facteurs ou de structures cellulaires requis pour le déplacement des potyvirus sur de longues distances. Enfin, une dernière hypothèse suggérerait que le complexe RTM pourrait activer une réponse qui limiterait les mouvements dans la plante suite à une infection virale.

Lorsque la plante est entièrement infectée par le potyvirus, celui-ci doit atteindre une nouvelle plante hôte pour assurer son maintien dans l'environnement. Ce passage vers un nouvel hôte, la transmission, dépend de son vecteur naturel, le puceron.

2. La transmission (article de revue)

La transmission est une étape centrale du cycle d'infection des virus puisqu'elle contrôle leur dissémination dans l'environnement. La transmission permet aux virus de couvrir la distance entre deux hôtes et de s'affranchir de la barrière imposée par la paroi cellulaire chez les plantes. Les virus ont donc dû développer des stratégies sophistiquées pour garantir le bon résultat de cet événement qui est très souvent assuré par un organisme tier, dénommé vecteur. L'interaction est alors dite tripartite entre le virus, le vecteur et la plante. Les vecteurs concernés sont pour la majorité des arthropodes, notamment ceux ayant un comportement alimentaire de type piqueur-suceur comme les pucerons, les mouches blanches et les cicadelles (Whitfield *et al.*, 2015).

Il existe deux modes d'interactions virus-vecteur : la transmission non circulante et la transmission circulante. Dans la transmission non circulante, le virus ne circule pas dans le vecteur, il reste accroché dans les pièces buccales du vecteur ou sur la cuticule qui recouvre la face interne de l'œsophage (Kennedy *et al.*, 1962). Deux « stratégies » d'interaction moléculaire entre le virus et le vecteur sont décrites pour ce mode de transmission : soit la particule virale (virion) se lie directement à la cuticule du puceron (Bricault and Perry, 2013; Perry *et al.*, 1998), soit une protéine virale non-structurale, le facteur assistant de la transmission, fait le lien entre le virion et le vecteur (Pirone and Blanc, 1996). Dans la transmission circulante, le virus circule à travers le corps du vecteur avant d'être inoculé sur un nouvel hôte (Kennedy *et al.*, 1962).



Outre les interactions moléculaires, la transmission du virus dépend aussi du comportement des vecteurs qui peut être altéré par le virus lui-même de manière directe ou indirecte. En effet, des études ont montré que le vecteur était davantage attiré par les plantes infectées lorsqu'il ne contenait pas de virus et inversement, le vecteur est davantage attiré par les plantes saines lorsqu'il contient du virus. (Ingwell *et al.*, 2012 ; Rajabaskar *et al.*, 2014). En plus de ces modifications directes liées à l'absence/présence du virus dans le vecteur, des modifications indirectes altèrent également leur comportement. Il s'agit de modifications de la morphologie et/ou du métabolisme de la plante générées par l'infection du virus. Celles-ci favorisent, par exemple, l'attraction ou la répulsion des vecteurs,

notamment par la production de substances volatiles ou encore par le changement de couleur de la plante (Medina-Ortega *et al.*, 2009 ; Ngumbi *et al.*, 2007).

Pour caractériser le plus précisément possible la transmission des potyvirus, il est nécessaire d'avoir des connaissances générales sur la transmission des virus végétaux. Cela est présenté dans la revue suivante, publiée dans le journal *Insect Science*. Elle décrit dans un premier temps les différents modes de transmission et les facteurs moléculaires impliqués. Ensuite, elle détaille l'influence du comportement des vecteurs sur la transmission, pouvant être altéré de manière directe et indirecte par le virus. Une autre partie présente le rôle des défenses de plantes impliquées dans la transmission du virus mais celle-ci sera abordée dans la section « 3. Les réponses des plantes face à la transmission », plus loin dans l'introduction. Dans cette revue, j'ai rédigé plus particulièrement la partie qui développe les interactions moléculaires existantes entre les virus et leurs vecteurs pour la transmission ainsi que la figure 1.

REVIEW

Insect transmission of plant viruses: Multilayered interactions optimize viral propagation

Beatriz Dáder^{1,*}, Christiane Then^{1,*}, Edwige Berthelot^{1,*}, Marie Ducouso¹, James C. K. Ng² 
and Martin Drucker¹ 

¹INRA, UMR 385 BGPI (CIRAD-INRA-SupAgroM), Montpellier, France and ²Department of Plant Pathology and Microbiology and Center for Disease Vector Research, University of California, Riverside, USA

Abstract By serving as vectors of transmission, insects play a key role in the infection cycle of many plant viruses. Viruses use sophisticated transmission strategies to overcome the spatial barrier separating plants and the impediment imposed by the plant cell wall. Interactions among insect vectors, viruses, and host plants mediate transmission by integrating all organizational levels, from molecules to populations. Best-examined on the molecular scale are two basic transmission modes wherein virus–vector interactions have been well characterized. Whereas association of virus particles with specific sites in the vector’s mouthparts or in alimentary tract regions immediately posterior to them is required for noncirculative transmission, the cycle of particles through the vector body is necessary for circulative transmission. Virus transmission is also determined by interactions that are associated with changes in vector feeding behaviors and with alterations in plant host’s morphology and/or metabolism that favor the attraction or deterrence of vectors. A recent concept in virus–host–vector interactions proposes that when vectors land on infected plants, vector elicitors and effectors “inform” the plants of the confluence of interacting entities and trigger signaling pathways and plant defenses. Simultaneously, the plant responses may also influence virus acquisition and inoculation by vectors. Overall, a picture is emerging where transmission depends on multilayered virus–vector–host interactions that define the route of a virus through the vector, and on the manipulation of the host and the vector. These interactions guarantee virus propagation until one or more of the interactants undergo changes through evolution or are halted by environmental interventions.

Key words arbovirus; defense; host plant; insect vector; interactions; plant virus; transmission

Introduction

Viruses are obligate parasites that rely on their prokaryotic or eukaryotic hosts for all steps of their replication

Correspondence: Martin Drucker, INRA, UMR 385 BGPI (CIRAD-INRA-SupAgroM), Montpellier, France. Tel: +33 499624819; fax: +33 499624822; email: martin.drucker@inra.fr

*Authors Beatriz Dáder, Christiane Then, and Edwige Berthelot contributed equally.

cycle. The hosts provide the energy and infrastructures necessary for the multiplication, encapsidation, and where applicable, spread of the virus within the host. However, once replication is completed and the host’s resources are depleted, viruses must overcome the hurdle of having to cross physical and spatial barriers to reach and invade another host. This process, transmission, is achieved by using different but specific strategies. Transmission can be vertical (Gray & Banerjee, 1999), meaning that the pathogen passes from an infected progenitor directly to the next generation. Transmission can also be

horizontal, wherein the virus is transmitted from one individual host to another of the same species or even one that is potentially unrelated. In the simplest case, viruses lyse host cells and then diffuse freely by Brownian movement through the medium (or extracellular matrix) to reach new host cells. This vector-less and support-less transmission is found, for example, among microbe-infecting viruses such as virophages and bacteriophages. Transmission by direct or indirect contact, for example through open wounds, as reported for animal, human, fungal and plant viruses, also belongs to this category of transmission. In airborne transmission, viruses use inert supports to reach and infect new hosts. For example, human rhinoviruses and other viruses are contained within aerosols produced by sneezing and are distributed in the air to be inhaled by new hosts; while other viruses are dispersed by hitching a ride on dust and other solid particles. All other modes of horizontal transmission rely on vectors, biological entities that help viruses to bridge the distance between 2 hosts. The reasons for the success of vector transmission are quite obvious: contrary to passive distribution by wind or water, vectors are capable of actively and directionally seeking and moving towards new hosts. Moreover, many insect vectors are sap- or blood-feeding parasites, and can deliver viruses directly into cells and vessels of a new host. In fact, the needle-like mouthparts of piercing-sucking insects—unlike those of chewing ones—inflict minimal damage on their hosts, leaving the punctured cells and tissues mostly intact and thus compatible for virus infection and propagation. The term “flying syringes” has been coined to illustrate this fact. Vectors are found among different phyla. However, other than the less frequently encountered vectors like fungal spores and nematodes, most vectors transmitting animal, human, or plant viruses are arthropods. Of the different classes of arthropods, insects and arachnids play especially important roles as plant, invertebrate and vertebrate virus vectors, although parasitic crustaceans may also vector viruses (Overstreet *et al.*, 2009). Recent reviews have provided thorough coverage of discrete biological and molecular aspects of insect vector-mediated plant virus transmission (Blanc & Gutiérrez, 2015; Drucker & Then, 2015; Ng & Zhou, 2015; Rosen *et al.*, 2015; Whitfield *et al.*, 2015; Mauck *et al.*, 2016). In a departure from these archetypal reviews, we present here instead a general conspectus of the biology of insect transmission of plant viruses, from molecular vector–virus interactions (how viruses are transported by insects) to the ecology of virus transmission (how viruses modify vector and host performance to promote transmission).

Molecular virus–vector determinants of transmission

Viruses need to interact physically with vectors during all steps of transmission. During the transmission process, the requirements change drastically. After acquisition during vector feeding, the virus must be retained in the vector's body in a transmissible form meaning it must protect itself from the potentially hostile environment in the vector. Then, the virus must be inoculated at the right time into a new host. This necessitates opposing actions: acquisition is only possible by physical binding to the vector and inoculation only by physical release from the latter, and the intermediate retention phase must neither interfere with acquisition nor inoculation. In this chapter, we discuss the different molecular virus–insect interactions that have evolved to accomplish the 3 steps (acquisition, retention, and inoculation) of transmission.

Most insect vectors of plant viruses belong to the order Hemiptera and have piercing-sucking mouthparts, called stylets, designed for feeding in the phloem. Consequently, the stylets are the first zone of contact between viruses and vectors when the latter feed on infected plants. Differences in the feeding behaviors of different phytophagous hemipteran insects (Ng & Zhou, 2015; Ng & Walker, 2016) notwithstanding, the initial exploratory stages of feeding all involve some form of probing activities in which vectors insert their stylets briefly into plant cells to assess the suitability of the plant as a feeding host. When a suitable plant is identified, the stylets ultimately penetrate into the phloem for sustained feeding. In both cases, some saliva is first injected into the target and then a mixture of saliva and cell or sieve tube contents is ingested and passes through the stylets, the foregut and eventually into the intestine. Virus particles (virions) contained in the ingested fluid are thus temporarily (cells) or continuously (phloem sap) flushed through the digestive system. Viruses must find a way in this set-up to bind to the vector for retention and later for inoculation. Two virion binding locations have been identified, each with its own uniqueness but both are superbly geared toward the common goal of optimizing virus delivery. One location is the stylets or regions farther up in the alimentary tract referred to as the foregut. The advantage of binding to the stylets is that the retention site can also be used for inoculation when the insect switches from ingestion to salivation or egestion/regurgitation. The disadvantage is that there is only an extremely small window of time during which virions flushing through can bind, and that virions are retained in the vector only for a short time (Table 1).

Table 1 Characteristics of the different viral transmission strategies by vectors (with data from Gray & Banerjee, 1999; Brault *et al.*, 2010; Whitfield *et al.*, 2015).

Transmission mode	Noncirculative (nonpersistent, semipersistent)		Circulative (persistent)	
	Capsid	Helper	Nonpropagative	Propagative
Transmission strategy			Nonpropagative	Propagative
Acquisition time	Seconds to minutes		Hours to days	
Latency period	None		Hours to days	Days to months
Inoculation time	Seconds to minutes		Minutes to hours	
Retention time	Minutes to hours or days		Days to lifetime	Lifetime
Retention place for inoculation	Stylets and foregut		(Accessory) salivary glands	
Virus retained after molt	No		Yes	
Multiplication in the vector	No		No	Yes
Transmission to the progeny	No		Sometimes	
Acquisition from	Epidermis, mesophyll, phloem		Phloem	
Inoculation into	Epidermis, mesophyll, sometimes xylem		Epidermis, mesophyll, phloem	
Particularity		Allows transcomplementation		Insects and plants are virus hosts
Examples (virus)	<i>Cucumovirus</i> , <i>Alfamovirus</i> , <i>Crinivirus</i>	<i>Potyvirus</i> , <i>Caulimovirus</i> , <i>Waikavirus</i>	<i>Luteovirus</i> , <i>Polerovirus</i> , <i>Begomovirus</i>	<i>Phytoreovirus</i> , <i>Fijivirus</i> , <i>Oryzavirus</i>
Examples (insects)	Aphids, whiteflies, planthoppers	Aphids, whiteflies, leafhoppers	Aphids, whiteflies, beetles	Aphids, planthoppers, thrips

Nonetheless, this transmission mode, named nonpersistent transmission (Watson & Roberts, 1939) or, to reflect the fact that virions do not cycle through the vector, noncirculative transmission (Kennedy *et al.*, 1962), is used by hundreds of viruses. Virus-binding to vector mouthparts is often considered as being similar to contact transmission, requiring no particular prerequisites (from either the virus or the vector). Yet there is a conspicuous degree of vector specificity in that a noncirculative virus can be transmitted by several species of 1 insect family but not by members of another insect family. For example, *Cucumber mosaic virus* (CMV) is transmitted by at least 80 aphid species (Zitter & Murphy, 2009), but by no whitefly species. This suggests that noncirculative transmission is not the result of the nonspecific contamination of vector mouthparts. Many noncirculative viruses use their capsid for binding to the vector mouthparts. The reason for this is certainly that the capsid protects the viral genome from potential dangers that exist throughout the transmission process including unfavorable environments in the mouthparts and that epitopes unique to coat proteins can serve as specific vector binding sites. For example, specific regions in the coat protein of CMV are determinants of capsid stabil-

ity and/or vector interaction (Perry *et al.*, 1998; Bricault & Perry, 2013). Capsid determinants of transmission have also been identified for other noncirculative viruses (Table 2). While many viruses bind like CMV directly, others bind indirectly, relying for this on viral encoded nonstructural proteins, so-called Helper Components (HCs). HCs contain vector-binding and virion-binding regions that function as molecular bridges to mediate virion binding to vector ligands (Pirone & Blanc, 1996). The HCs identified in various potyviruses and the caulimovirus *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) have been best studied (Table 2). A remarkable feature of helper-mediated transmission is that virions may exist in 2 forms, either complexed to the HC or not. Furthermore, it has been shown that transmissible complexes can form in infected plant cells, before or at the time of acquisition, or in the vector. Since HCs bind to vectors independently of virions, sequential acquisition of HC and virions is possible. This enables the phenomenon called HC-transcomplementation (Froissart *et al.*, 2002), where a HC acquired initially by the vector assists in the transmission of virions located in the same cell, in other cells, or even in other host plants probed by the

Table 2 Examples of viral proteins involved in vector interaction. Only proteins for which virus–vector interaction domains have been characterized are listed.

Virus	Family	Vector	Helper	Vector interaction	Reference
Noncirculative viruses					
<i>Cucumber mosaic virus</i>	Bromoviridae	Aphids	No	Coat protein	Chen & Francki (1990); Perry et al. (1998); Ng et al. (2000)
<i>Lettuce infectious yellows virus</i>	Closteroviridae	Whiteflies	No	Minor coat protein	Tian et al. (1999); Chen et al. (2011)
<i>Tobacco vein mottling virus, Potato virus Y, Tobacco etch virus</i>	Potyviridae	Aphids	Yes	HC-Pro	Atreya et al. (1992); Wang et al. (1996); Blanc et al. (1998); Peng et al. (1998)
<i>Cauliflower mosaic virus</i>	Caulimoviridae	Aphids	Yes	P2	Woolston et al. (1987); Moreno et al. (2005); Leh et al. (1999)
Circulative viruses					
<i>Barley yellow dwarf virus</i>	Poleroviridae	Aphids	No	Coat protein, Readthrough protein	Chay et al. (1996)
<i>Beet western yellow virus, Potato leaf roll virus</i>	Poleroviridae	Aphids	No	Coat protein, Readthrough protein	Reinbold et al. (2001); Peter et al. (2008)
<i>Abutilon mosaic virus</i>	Geminiviridae	Whiteflies	No	Coat protein	Höhnle et al. (2001)
<i>Potato yellow dwarf virus</i>	Rhabdoviridae	Leafhopper	Yes	Coat protein G	Gaedigk et al. (1986)
<i>Rice dwarf virus, Wound tumor virus</i>	Reoviridae	Leafhopper	Yes	Coat proteins P2 and P8, nonstructural protein Psn4	Omura and Yan (1999); Chen et al. (2015)
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	Bunyaviridae	Thrips	Yes	Coat protein G _N , Nonstructural protein NSs	Whitfield et al. (2008); Margaria et al. (2014)

vector. HC-transcomplementation has been speculated to increase diversity of the transmitted virus population because it favors assembly of transmission units from different plant sites (Froissart et al., 2002). However, it might just as well serve to economize cell resources by forming transmission units only when they are needed, that is, when vectors probe on plants, leaving the virions and HCs available for accomplishing other steps in the replication cycle the rest of the time.

After binding to still unknown ligands and retaining in the stylets or foreguts following acquisition feeding, non-circulative viruses must be inoculated into a new host to complete the transmission cycle. The conceptual problem is that the retention sites are also the sites from which virions are inoculated, and must be compatible with binding and release. The current hypothesis is that different biochemical conditions (pH, redox potential, fluid composition) in ingested saliva/plant sap and secreted saliva favor virus binding and release, respectively. This

theory provides a credible framework for explaining the inoculation of virions bound to the common canal (located at the stylet tips) formed by the convergence of the food and the salivary canals that run parallel to each other (Uzest *et al.*, 2007). This common region is constantly exposed to fluids whose constituents include inward streaming (ingested) virus-containing plant sap or outward streaming saliva. The situation is less well understood for foregut-borne viruses like whitefly-transmitted criniviruses (Chen *et al.*, 2011; Ng, unpublished). It would seem less dependable for alternating ingestion/salivation processes to mediate the transmission of such viruses since the virions are localized way posterior to the junction of the food and the salivary canals.

The second binding sites for acquired virions are located deeper in the vector's digestive system, in the mid- and the hindgut (Brault *et al.*, 2010). Here, available immobilization times can be much longer, but the virions must resist the lytic conditions in the gut lumen. Furthermore, the digestive tube is a one-way flow system toward the anus and the retention sites cannot function as launch pads for virus inoculation. Instead, virions must traverse the gut epithelia into the body cavity (hemocoel) and invade the salivary glands. From there, virions are inoculated together with saliva into a new host. This transmission mode is named persistent transmission (Watson & Roberts, 1939) or circulative transmission (Kennedy *et al.*, 1962), because the viruses cycle through the vector and vectors remain transmitters for long periods of time (Table 1).

Clearly, circulative transmission requires highly specific virus–insect interactions. The viral capsid is a part of the virion that is the most exposed to the environment and also to the vector. Therefore, as with noncirculative transmission, the capsid not only protects the viral genome, but it must also facilitate virion passage through the vector. Indeed, motifs on capsid and capsid-associated proteins have been implicated in circulative transmission (Table 2). Insects use like animals besides paracellular transport receptor-mediated and receptor-independent endocytosis for the uptake of specific ligands present in the gut lumen (Schelhaas, 2010), and also for the internalization of hemocoel components by organs including the salivary glands. Electron microscopy studies have indicated that viruses hijack one or both endocytosis systems for gut-hemocoel and hemocoel-salivary glands transfer (Brault *et al.*, 2007; Ammar *et al.*, 2009). For this to happen, virions must interact specifically with endocytosis components, for example natural ligands, endocytosis receptors, adapter proteins and others. The coat proteins of specific viruses have been implicated to be involved in such interactions, but their insect targets are largely

unknown (Table 2). An exception is membrane alanyl aminopeptidase N, a putative gut receptor protein of the *Pea enation mosaic virus* (PEMV) (Linz *et al.*, 2015). Interestingly, this protein is also involved in endocytosis of animal enteroviruses (i.e., Delmas *et al.*, 1992), suggesting that viruses infecting phyla as different as plants, insects, and animals evolved independently similar strategies for internalization. A problem that endocytosed virions must avoid is degradation in lysosomes, the usual destination of endocytic vesicles. How circulative plant viruses achieve this is unknown.

A unique form of circulative transmission involves the propagation of viruses, referred to as propagative transmission. Viruses exhibiting this mode of transmission replicate in plants as well as in various vector organs. It is proposed that circulative propagative viruses are insect viruses that have acquired the ability to invade plant tissues (Nault, 1997). Thus, there are a few insect viruses such as *Nilaparvata lugens reovirus* (NLRV) that can be insect-to-insect-transmitted through plant tissue, but do not infect the plant (Nakashima & Noda, 1995).

Taken together, an overarching theme concerning the molecular virus–vector determinants of transmission appears to be one in which the virus capsid or capsid-associated proteins are involved in controlling acquisition, retention, and inoculation for both noncirculative and circulative virus transmission, while corresponding contributions from the vector constitute different, and still very poorly understood, insect components. One fundamental distinction between noncirculative and circulative transmission is that extracellular cuticular factors in the mouthparts or the foregut are used for noncirculative acquisition/retention, while intracellular components are used for circulative acquisition/retention. Saliva, on the other hand, is involved in the inoculation of all circulative and most noncirculative viruses, with the situation for foregut-borne viruses being less clear. Why do two very different transmission modes exist? The answers may fall beyond our complete understanding. However, we are clear about some of the benefits that the viruses derive from these systems. For example, the short time that noncirculative viruses spend retaining in their vectors might be counteracted by the benefit of their immediate transmissibility. In addition, unlike for circulative viruses, which are dependent on closely related vector species for transmission, the much lower vector specificity of noncirculative viruses enhances their chances to encounter a suitable vector. Thus, noncirculative and circulative transmission might represent generalist and specialist strategies, respectively.

Viruses modify vector performance and behavior to enhance transmission

The continuum of processes occurring during insect-mediated plant virus transmission (Ng & Zhou, 2015) extends beyond the mere molecular contacts between the virus, vector, and plant host. They consider as well how virus infection in plants alters insect vector behaviors associated with host plant selection. Host plant selection by insects is a complex process involving different stimuli and responses (Feres & Moreno, 2009). This process is best-described for aphids, but it basically applies to other species of the orders Hemiptera or Thysanoptera as well. The process comprises 4 steps: (1) visual and chemical attraction to a host plant, (2) alighting and initial assessment of the leaf surface, (3) probing on epidermis and mesophyll tissues, and (4) sustained feeding of phloem sap. Each of these steps can be influenced by the physiological status of the plant, and since viral infection changes plant physiology, it can, in principle, also change host selection by insects. Indeed, many studies have provided evidence that viruses themselves might alter specific aspects of host plant phenotypes in ways that enhance virus transmission. This has been conceptualized in the Vector Manipulation Hypothesis (VMH) proposed by Ingwell *et al.* (2012). Plant viruses influence vector–host interactions in 2 different manners: (1) direct effects due to the presence of virions in the vector’s body and (2) indirect effects mediated by viral interference with the host plant. This review will focus on both, beginning with the latter.

Indirect vector manipulation

Plant color and volatile organic compounds (VOC) can both be modified by virus infection and, in turn, alter the initial attractiveness of the infected plants to vectors (Feres & Moreno, 2009). Then, after alighting, insects probe the infected plants for quality as hosts and either commit to staying and colonizing, or leave. Theoretical considerations suggest that both noncirculative and circulative viruses would enhance vector attraction to infected plant hosts as a strategy to improve virus acquisition efficiency. However, once attracted, it is reasonable to surmise that noncirculative and circulative viruses would require different feeding arrestment periods and behaviors in their insect vectors to mediate optimal pathogen spread (Mauck *et al.*, 2012). Rapid degradation and low nutrition quality of plants would discourage long-term settlement and induce quick vector dispersal from the deteriorating plant. For noncirculative viruses, this would increase transmission efficiency because 1 feature of noncircula-

tive transmission is that vectors acquire viruses quickly, but retain the transmission ability only for brief periods after probing on infected plants (Hodge & Powell, 2008). In contrast, this would clearly be a disadvantage for circulative viruses where acquisition periods are considerably longer. Therefore, the decline in plant quality should be slower for circulative virus-infected plants to favor sustained feeding on the infected host (Mauck *et al.*, 2012).

What evidence exists that supports or refutes the models of noncirculative virus-induced changes (in plants) on vector manipulation? In free-choice assays, *Acyrtosiphon pisum* Harris aphids settled preferentially on leaf disks infected with *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) compared to healthy disks (Hodge & Powell, 2008). *Aphis gossypii* Glover alates preferred plants infected with CMV over mock-inoculated plants up to 30 min after insect release, but later aphids changed their behavior and settled on healthy plants. This behavior can be correlated with the initial acquisition of virions from infected plants by aphids, followed by the migration of these viruliferous aphids and their inoculation of virions to healthy plants (Carmo-Sousa *et al.*, 2014). The soybean aphid *Aphis glycines* Matsumura was attracted to plants infected with *Soybean mosaic virus* (SMV) for up to 60 min (Peñaflor *et al.*, 2016). Within this period, aphids initiated sustained feeding on SMV-infected plants more so than on mock-inoculated plants, a behavior disadvantageous to transmission of noncirculative viruses like SMV (Hodge & Powell, 2008). By contrast, SMV-infected soybean plants did not attract aphids *Myzus persicae* Sulzer and *Rhopalosiphum maidis* Fitch, but the latter remained for a shorter period on the infected plants before taking off. This potentially increases the probability of probing on another healthy host before the vector loses transmissibility of the virus (Feres *et al.*, 1999). These and other examples (Table 3A) might seem controversial, but they clearly reflect on the complexity of specific plant–virus–vector interactions and their impacts on virus transmission.

Evidence of aphid attraction to circulative virus-infected plants was mostly obtained from studies on viruses from the family Luteoviridae (Table 3B). The emerging picture gathered from these studies appears to be more cohesive than that of noncirculative viruses. Thus, *M. persicae* settling on potato leaves was significantly more marked on plants infected by the circulative *Potato leafroll virus* (PLRV) than on plants infected by the noncirculative *Potato virus Y* (PVY), the nonvectored *Potato virus X* (PVX), or on virus-free plants (Castle *et al.*, 1998). In separate studies, olfactometer tests and emigration bioassays showed again the preference

Table 3 Indirect and direct effects of viruses on behavior and performance of insect vectors.

Viruses	Family	Vector	Host	Vector response	Reference
(A) Indirect effects of noncirculative viruses					
Vector settlement					
<i>Bean yellow mosaic virus</i>	Potyviriidae	<i>A. pisum</i>	<i>V. faba</i>	+	Hodge & Powell (2008)
<i>Cucumber mosaic virus</i>	Bromoviridae	<i>A. gossypii</i>	<i>C. sativus</i>	+, up to 30 min	Carmo-Sousa <i>et al.</i> (2014)
<i>Turnip mosaic virus</i>	Potyviriidae	<i>M. persicae</i>	<i>N. benthamiana</i>	+	Casteel <i>et al.</i> (2015)
<i>Soybean mosaic virus</i>	Potyviriidae	<i>A. glycines</i>	<i>G. max</i>	+, up to 60 min	Peñaflor <i>et al.</i> (2016)
Vector arrestment					
<i>Soybean mosaic virus</i>	Potyviriidae	<i>R. maidis</i>	<i>G. max</i>	-	Fereres <i>et al.</i> (1999)
<i>Cucumber mosaic virus</i>	Bromoviridae	<i>A. gossypii</i>	<i>C. sativus</i>	-	Carmo-Sousa <i>et al.</i> (2014)
<i>Soybean mosaic virus</i>	Potyviriidae	<i>M. persicae</i>	<i>G. max</i>	0	Fereres <i>et al.</i> (1999)
Vector fitness					
<i>Turnip mosaic virus</i>	Potyviriidae	<i>M. persicae</i>	<i>B. rapa</i>	+	Hodgson (1981)
<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>	Potyviriidae	<i>A. gossypii</i>	<i>C. pepo</i>	+	Blua & Perring (1992)
<i>Turnip mosaic virus</i>	Potyviriidae	<i>M. persicae</i>	<i>A. thaliana</i>	+	Casteel <i>et al.</i> (2014, 2015)
<i>Turnip mosaic virus</i>	Potyviriidae	<i>M. persicae</i>	<i>N. benthamiana</i>	+	Casteel <i>et al.</i> (2015)
<i>Turnip mosaic virus</i>	Potyviriidae	<i>B. brassicae</i>	<i>B. rapa</i>	-	Hodgson (1981)
<i>Wheat streak mosaic virus</i>	Potyviriidae	<i>S. graminum</i>	<i>T. aestivum</i>	-	Michels <i>et al.</i> (1994)
<i>Alfalfa mosaic virus</i>	Bromoviridae	<i>A. glycines</i>	<i>G. max</i>	-	Donaldson & Gratton (2007)
<i>Bean pod mottle virus</i>	Secoviridae	<i>A. glycines</i> (nonvector)	<i>G. max</i>	-	Donaldson & Gratton (2007)
<i>Soybean mosaic virus</i>	Potyviriidae	<i>A. glycines</i>	<i>G. max</i>	-	Peñaflor <i>et al.</i> (2016)
<i>Bean pod mottle virus</i>	Secoviridae	<i>E. varivestis</i>	<i>P. vulgaris</i>	+	Musser <i>et al.</i> (2003)
<i>Southern bean mosaic virus</i>	Sobemovirus	<i>E. varivestis</i>	<i>P. vulgaris</i>	+	Musser <i>et al.</i> (2003)
Vector feeding behavior					
<i>Potato Virus Y</i>	Potyviriidae	<i>M. persicae</i>	<i>C. annuum</i>	+	Collar <i>et al.</i> (1997)
<i>Cucumber mosaic virus</i>	Bromoviridae	<i>A. gossypii</i>	<i>C. sativus</i>	+	Carmo-Sousa <i>et al.</i> (2014)

(to be continued)

Table 3 Continue.

Virus	Family	Vector	Host	Vector response	Reference
(B) Indirect effects of circulative viruses					
Vector settlement					
<i>Potato leaf roll virus</i>	Poleroviridae	<i>M. persicae</i>	<i>S. tuberosum</i>	+	Castle et al. (1998); Eigenbrode et al. (2002); Alvarez et al. (2007); Werner et al. (2009); Rajabaskar et al. (2013)
<i>Barley yellow dwarf virus</i>	Poleroviridae	<i>R. padi</i>	<i>T. aestivum</i>	+	Jiménez-Martínez et al. (2004b)
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	Bunyaviridae	<i>F. occidentalis</i>	<i>C. annuum</i>	+	Maris et al. (2004)
<i>Pea enation mosaic virus</i>	Poleroviridae	<i>A. pisum</i>	<i>V. faba</i>	+	Hodge & Powell (2008)
<i>Bean leaf roll virus</i>	Poleroviridae	<i>A. pisum</i>	<i>P. sativum</i>	+	Wu et al. (2014)
<i>Pea enation mosaic virus</i>	Poleroviridae	<i>A. pisum</i>	<i>P. sativum</i>	+	Wu et al. (2014)
Vector fitness					
<i>Potato leaf roll virus</i>	Poleroviridae	<i>M. persicae</i>	<i>S. tuberosum</i>	+	Castle & Berger (1993)
<i>Barley yellow dwarf virus</i>	Poleroviridae	<i>S. avenae</i>	<i>T. aestivum</i>	+	Fereres et al. (1989)
<i>Barley yellow dwarf virus</i>	Poleroviridae	<i>S. graminum</i>	<i>A. sativa</i>	+	Montllor & Gildow (1986)
<i>Barley yellow dwarf virus</i>	Poleroviridae	<i>R. padi</i>	<i>T. aestivum</i>	+	Jiménez-Martínez et al. (2004a)
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	Bunyaviridae	<i>F. occidentalis</i>	<i>C. annuum</i>	+	Maris et al. (2004)
<i>Bean leaf roll virus</i>	Poleroviridae	<i>A. pisum</i>	<i>P. sativum</i>	+	Wu et al. (2014)
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	Geminiviridae	<i>B. tabaci</i>	<i>S. lycopersicum</i>	+	Maluta et al. (2014)
<i>Barley yellow dwarf virus</i>	Poleroviridae	<i>S. avenae</i>	<i>T. aestivum</i>	-	Fiebig et al. (2004)
Vector feeding behavior					
<i>Barley yellow dwarf virus</i>	Poleroviridae	<i>S. graminum</i>	<i>A. sativa</i>	+	Montllor & Gildow (1986)
<i>Potato leaf roll virus</i>	Poleroviridae	<i>M. persicae</i>	<i>S. tuberosum</i>	+	Alvarez et al. (2007)
<i>Cucarbit aphid-borne yellows virus</i>	Poleroviridae	<i>A. gossypii</i>	<i>C. sativus</i>	+	Carmo-Sousa et al. (2016)
<i>Barley yellow dwarf virus</i>	Poleroviridae	<i>R. padi</i>	<i>A. sativa</i>	0	Montllor & Gildow (1986)

(to be continued)

Table 3 Continue.

Viruses	Family	Vector	Host	Vector response	Reference
(C) Direct effects of circulative viruses					
Vector settlement					
<i>Barley yellow dwarf virus</i>	Polteroviridae	<i>R. padi</i>	<i>T. aestivum</i>	+	Medina-Ortega <i>et al.</i> (2009); Ingwell <i>et al.</i> (2012); Rajabaskar <i>et al.</i> (2014)
<i>Potato leaf roll virus</i>	Polteroviridae	<i>M. persicae</i>	<i>S. tuberosum</i>	+	Rajabaskar <i>et al.</i> (2014)
<i>Cucurbit aphid-borne yellows virus</i>	Polteroviridae	<i>A. gossypii</i>	<i>C. sativus</i>	+	Carmo-Sousa <i>et al.</i> (2016)
<i>Soybean vein necrosis virus</i>		<i>N. variabilis</i>	<i>G. max</i>	+	Keough <i>et al.</i> (2016)
<i>Southern rice black-streaked dwarf virus</i>	Reoviridae	<i>Sogatella furcifera</i>	<i>Oryza sativa</i>		Lu <i>et al.</i> (2016)
Vector arrestment					
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	Geminiviridae	<i>B. tabaci</i>	<i>S. lycopersicum</i>	+	Moreno-Delafuente <i>et al.</i> (2013)
Vector fitness					
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	Geminiviridae	<i>B. tabaci</i>	<i>S. lycopersicum</i>	+	Maluta <i>et al.</i> (2014)
<i>Soybean vein necrosis virus</i>	Bunyaviridae	<i>N. variabilis</i>	<i>G. max</i>	+	Keough <i>et al.</i> (2016)
Vector feeding behavior					
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	Bunyaviridae	<i>F. occidentalis</i>	<i>D. stramonium</i>	+	Stafford <i>et al.</i> (2011)
<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	Geminiviridae	<i>B. tabaci</i>	<i>S. lycopersicum</i>	+	Moreno-Delafuente <i>et al.</i> (2013)

+: positive, -: negative, 0: neutral effect.

of *M. persicae* for PLRV-infected potato leaves over non-infected ones. The attraction increased over time for up to 60 min after aphid release, and was correlated to VOCs released by the plants (Eigenbrode *et al.*, 2002; Alvarez *et al.*, 2007; Werner *et al.*, 2009; Rajabaskar *et al.*, 2013). Attraction to infected plants, assisted by VOC, was also found for other Luteoviridae–aphid pathosystems (Table 3B), strongly suggesting that this phenomenon is characteristic for circulative viruses, or, at minimum, for members of the Luteoviridae.

Considering vector fitness, the model outlined above predicts that noncirculative viruses reduce the quality of the host and this, in turn, imposes adverse effects on aphid fitness. In support of this, infection by *Turnip mosaic virus* (TuMV) of Chinese cabbage shortened the life of *Brevicoryne brassicae* L. colonies, prolonged the nymphal period, and reduced the live weight of adults (Hodgson, 1981). Furthermore, Mauck *et al.* (2014) showed that CMV infection decreased the nutritional value of infected plants, but concurrently made the plants more attractive for vectors by changing VOC and ethylene production, thereby encouraging an attraction/deterrence behavior to favor transmission.

However, beneficial effects of noncirculative virus infection were also reported (Table 3A). Nymphs of *M. persicae* reached maturity faster, and adults were heavier and deposited larvae more frequently on TuMV-infected Chinese cabbage (Hodgson, 1981). Increased fitness of *M. persicae* was also observed on TuMV-infected tobacco and *Arabidopsis* (Casteel *et al.*, 2014; 2015), and of *A. gossypii* on *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV)-infected squash plants (Blua & Perring, 1992). Interestingly, in this case aphid fitness changed with infection stage. Fitness was higher on recently infected plants than on older infected plants, concomitant with rejection of the older plants and conducive with transmission. Thus, as with the attractiveness studies, apparently contradictory results have been reported from studies on the effect of noncirculative virus infection on vector fitness.

In contrast with noncirculative viruses, it seems beneficial for circulative viruses to augment aphid fitness by increasing the plant host's quality as a strategy to prolong feeding arrestment and optimize virus acquisition. Indeed, *M. persicae* showed significantly increased growth rates and intrinsic rates of natural increase on PLRV-infected potato plants than on uninfected ones (Castle & Berger, 1993). The same response, that is, better vector fitness, has been reported for other viruses (Table 3B). Contrasting results have been reported as well. Fiebig *et al.* (2004) found that BYDV negatively affected *Sitobion avenae* Fabricius development. However, that study also showed

that more alate insects developed on the infected plants. Since alates potentially spread BYDV better than wingless forms, this possibly neutralizes the negative impact. Thus, most results support the general notion that circulative viruses increase vector fitness, at least in the case of aphid vectors. Less data on the influences of virus infection (in plants) on vector fitness are available for other hemipteran vectors. The results provided in the few available reports (Table 3B) are all in line with those of aphid vectors, which is not surprising given the similarities in feeding behaviors among phytophagous hemipterans. It should be noted that better performance of vectors on infected plants might not always be specific for a pathosystem, since increased fitness has also been reported for the chewing-biting Mexican bean beetle (*Epilachna varivestis* Mulsant) feeding on bean plants infected with *Southern bean mosaic virus* (SBMV, which it vectors) or with BPMV (which it does not transmit) (Musser *et al.*, 2003).

Taken together, it seems that circulative viruses show more consistent effects on attraction and fitness of vectors than do noncirculative viruses. This could be attributed to the intimate and more specific/sustained relationships between circulative viruses and their vectors, which might not allow large variations of the parameters controlling transmission. Noncirculative virus–vector interactions are transient and less specific, and other interaction parameters that are usually not considered by the general models might greatly impact noncirculative transmission. Plant longevity is an example of one such parameter that can play a role on vector fitness. Hily *et al.* (2014) showed that CMV-infected *Arabidopsis* plants with a short-lived genotype supported larger *M. persicae* populations and were more susceptible to infection than plants with a long-lived genotype, with consequences for their role as pathogen reservoirs.

Another parameter impacting not only transmission but also vector fitness, is insect feeding behavior. Using Electrical Penetration Graph (EPG) technique, which analyzes tissue penetration and sap ingestion by vector mouthparts in real time, several authors have identified modified probing behaviors of aphids that are potentially associated with the enhanced transmission of noncirculative viruses. *Myzus persicae* probed more frequently on PVY-infected pepper plants, and transmission of PVY was associated with shorter than average probes during acquisition feeding (Collar *et al.*, 1997). Carmo-Sousa *et al.* (2014) observed that *A. gossypii* made more intracellular probing punctures on CMV-infected cucumbers. At the same time, the aphids showed increased phloem feeding deterrence. An implicit explanation for these observations is that noncirculative viruses are lost when aphids are allowed to probe, after virus acquisition,

the phloem on the same plant (Ferreles & Moreno, 2009).

The modification of vector feeding behavior by circulative viruses has also been observed. *Schizaphis graminum* Rondani aphids on BYDV-infected oats displayed increased feeding activity, characterized by a shorter time before phloem ingestion and an increase in ingestion duration, whereas *R. padi* did not (Montllor & Gildow, 1986). EPG results obtained for *M. persicae* on PLRV-infected or healthy potato plants suggested a reduction in plant resistance to stylet penetration on infected plants, with fewer numbers of short duration probes before the first phloem activity (Alvarez *et al.*, 2007). Similar results were obtained in other pathosystems (Table 3B). Most studies support the view that virus infection incites phloem feeding, which would speed up virus acquisition of the often phloem-restricted circulative viruses.

Collectedly, this short review section of the literature shows that there is reasonable evidence that infection in plants by circulative and noncirculative viruses tends toward the specific alterations of insect feeding behaviors that impact the transmission of specific viruses.

Direct modification of the behavior of viruliferous vectors

Besides plant-mediated indirect modification of insect behaviors and performance, studies have also documented that the sole presence of viruses in insect vectors is associated with changes in the vectors' behaviors that are amenable to transmission. For example, BYDV-viruliferous *R. padi* preferred to feed on noninfected wheat plants, while nonviruliferous aphids preferred BYDV-infected plants (Medina-Ortega *et al.*, 2009; Ingwell *et al.*, 2012). Similar observations were made for the *M. persicae*/PLRV (Rajabaskar *et al.*, 2014) and *A. gossypii*/CABYV pathosystems (Carmo-Sousa *et al.*, 2016). This differential behavior, depending on the virus-carrying status of the aphid, may promote pathogen spread since the nonviruliferous vectors' preference for infected plants and the viruliferous vectors' preference for noninfected plants tend toward the promotion of virus acquisition and inoculation, respectively. At least in some cases, the altered preferences might be mediated by volatiles (Ngumbi *et al.*, 2007; Medina-Ortega *et al.*, 2009). Studies on the direct modification of behavior in other viruliferous vector species yielded similar results as for aphids (Table 3C).

Thus, many examples show that circulative viruses modify vector behavior and it is easily imaginable that viruses do so by interfering/interacting with insect com-

ponents during their passage through the vector. Although the mechanisms underpinning these associations are unknown, possible vector targets could be localized in the gut, the salivary glands, and even the nervous system. It is not assumed that the presence of noncirculative viruses in insects changes behaviors, but it is principally imaginable that they, too, interact with ligands lining the mouthparts or the intestine and thereby alter feeding behavior. Evidence for this might come from the work by Collar *et al.* (1997) who reported that viruliferous aphids transmitting PVY from infected pepper plants had different feeding behavior than those that did not transmit the virus from the same plants. Since not all cells are infected in PVY-infected leaves, one could speculate that the feeding behavior changed when aphids probed infected cells, possibly due to a viral component or a virus-induced plant factor. Another example are *Bemisia tabaci* Gennadius whiteflies viruliferous with the noncirculative, semipersistent *Cucurbit chlorotic yellows virus* that showed different behaviors than virus-free whiteflies (Lu *et al.*, 2017).

Overall, substantial data on viruses' manipulation of insects and plants have been obtained. They show clearly that viruses may interfere at all stages of insect–plant interactions to enhance transmission. These “manipulations” are extremely different from one virus–plant–insect pathosystem to another. However, it seems that circulative viruses modify different plant–insect pathosystems more similarly than noncirculative viruses do. A challenge for the future will be to reveal the mechanisms behind these, especially in regards to how the vector's preferences are modulated in the vector itself.

Plant defense-related pathways involved in virus transmission

Plant defense responses against herbivores such as callose deposition, phloem clogging, and VOC synthesis, render plants unattractive or inaccessible for insects, and deter them from feeding. This is not advantageous for plant viruses that depend on insect vectors for transmission. However, viruses and insect vectors have the capacity to engage each other in synergism and beneficial mutualism to manipulate plant defense responses to their benefit.

Typical plant defense against herbivorous insects follows the 2-staged “Zigzag” model that was initially proposed for the defense against microbes (Jones & Dangl, 2006). These plant defenses rely on recognition by the plant of broad-specificity pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) in the first step, pathogen-triggered

immunity (PTI), and on that of highly specific pathogen molecules in the second step, effector-triggered immunity (ETI). They drive fast defense responses like reactive oxygen bursts and callose deposition and slower defense responses that by mediation of phytohormones propagate throughout the plant and install systemically acquired resistance.

Viruses can interfere with these defense systems and decrease plant defenses against insects, and, in so doing, increase plant quality for the vectors and vector fitness. The rationale is that better insect survival will increase the number of vectors loaded with virus, thus promoting virus transmission. One example of a pathogen effector is CMV protein 2b that tampers with jasmonic acid signaling (Lewsey *et al.*, 2010) to possibly promote aphid infestation and transmission (Ziebell *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2017). In another example, Casteel *et al.* (2014) demonstrated that TuMV infection suppresses callose deposition and increases aphid fecundity on tobacco and *Arabidopsis* plants. A single conserved TuMV protein, NIa-Pro, was found to suppress the resistance against aphids. Concomitantly, the NIa-Pro-associated interference of the plant defense system was accompanied by modified ethylene signaling (Casteel *et al.*, 2015). The underlying mechanisms remain unknown. More is known about *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCV)–*B. tabaci* interaction. Here the viral satellite-coded β C1 protein interacts with the host protein AS1 to suppress a set of jasmonic acid responses. This correlates with an increase in fitness of whiteflies (Zhang *et al.*, 2012). β C1 interacts also with the host transcription factor MYC2 and reduces the synthesis of toxic terpenes, again boosting the survival of whiteflies (Li *et al.*, 2014).

There is yet another perspective when considering the interactions associated with virus transmission, and that is the insect vectors themselves. Their interactions with plant defenses might pave the way for viral infection and transmission. For example, some insect- or tick-transmitted animal viruses are more efficiently transmitted by ticks or by artificial inoculation with saliva-coated needles than by inoculation with uncoated needles. This phenomenon, termed “saliva-activated transmission” (Nuttall *et al.*, 2000), is due to the tampering of saliva proteins with the immune system (i.e., Thangamani *et al.*, 2010; Lieskovská *et al.*, 2015). For the transmission of plant viruses, the interference of plant defenses by effector proteins in the saliva of insect vectors may be thought of as an equivalent of saliva-activated transmission used to facilitate virus inoculation. Several studies have alluded to this possibility. In a study by Will *et al.* (2007), an unknown factor in aphid saliva was found to prevent sieve tube clogging; it is tempting to speculate that this or other

factors might also participate in the inoculation of viruses. Saliva components are also assumed to modify PTI, ETI and other defense responses, but hardly any candidates are known (reviewed by Kaloshian & Walling, 2016; van Bel & Will, 2016) and their possible role in facilitating virus transmission is even less explored. On a promising note, there are ongoing efforts to analyze the roles of aphid saliva in plant defense mitigation (i.e., Jaouanet *et al.*, 2014; Kettles & Kaloshian, 2016; Mugford *et al.*, 2016; Rodriguez *et al.*, 2017) and we are hopeful that specific gaps in knowledge might soon be filled. Taken together, plant defenses may play a prominent role in virus transmission. This role is mostly indirect and involves changing plant and insect performances to favor transmission. However, there is recent evidence on a possible direct role of plant defenses in transmission. The noncirculative CaMV responds to aphid probing by inducing within seconds transmissible virus forms that are acquired by the insects (Bak *et al.*, 2013; Martinière *et al.*, 2013). Likewise, the potyviral NIa-Pro protein relocalizes transiently to vacuoles when aphids probe on TuMV-infected leaves and this correlates with inhibition of plant defenses (Bak *et al.*, 2017). It has been suggested that early steps of plant defense against aphids are somehow deviated by these viruses to enable these reactions.

Outlook

Transmission is the result of multilayered interactions at each step of the transmission process (Fig. 1). In the beginning, virus-modified plant parameters (volatiles, color, nutrients, etc.) may attract/deter vectors, then viral transmission-specific proteins and, in some cases, vector-induced formation of transmission morphs may control the acquisition step. Subsequently, again with the influences of virus-modified plant parameters (phloem composition, volatiles, etc.), vector fitness and behaviors may be altered to determine the duration of virus acquisition and to encourage the vector to seek out a new host. Finally, viruses may modify vector performance directly, by interacting with vector factors, to guide transmission. And, to complete the cycle (Fig. 1), insects could interact with plant defenses during plant probing and infestation to facilitate viral infection.

Despite the large body of evidence documenting changes in infected plants and vectors that are related to transmission, the molecular determinants, especially on the plant and vector sides, are only beginning to be revealed. It is a challenge for the future to identify these pathways and mechanisms, for pure scientific pleasures

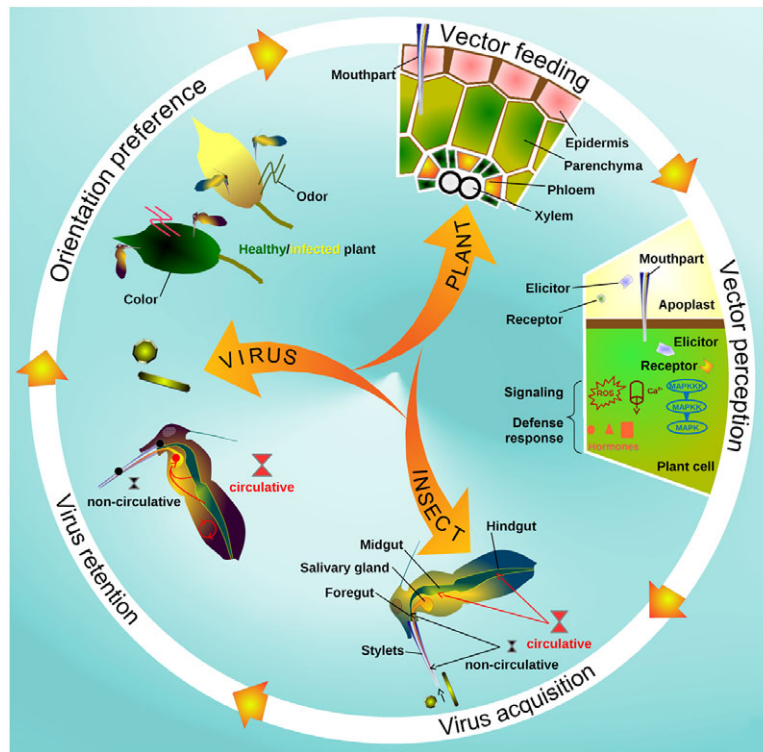


Fig. 1 The transmission cycle. Virus-free insect vectors are more attracted to infected plants than to healthy ones. This is due to plant color, odor, metabolism etc. altered by viruses, which provide positive or negative cues for subsequent virus acquisition during insect feeding. Again, acquisition is often facilitated by viral modifications of the plants promoting “acquisition-friendly” feeding behavior, for example, longer feeding for circulative and deterrence for noncirculative viruses. For this, viruses, working on altering plant defense responses and other pathways, may interfere with the perception of insects by plants, with plant defense responses and with other pathways. At least one virus (CaMV) responds instantly to the vector’s presence by forming transmission morphs. Viruses are retained in the insects after acquisition for short (noncirculative viruses) or longer (circulative viruses) periods. During retention, insects may be manipulated by viruses to promote transmission, for example, encouraging viruliferous vectors to prefer healthy over infected plants or enhancing their fitness to allow for longer-lasting transmissibility. After virus inoculation in a new host, which could be assisted by vector factors, the cycle restarts.

but also because their knowledge will help to develop new virus and insect control strategies.

Acknowledgments

Thanks to the reviewers for constructive criticism. Our work is supported by INRA SPE department (to M.D.), the ANR grant 12-BSV7-005-01 (to M.D.), and by the HFSP research grant RGP0013/2015 (to M.D. and J.C.K.N.). Studies on crinivirus–whitefly interactions are supported by a grant (#1146797) from the NSF (to J.C.K.N.). B.D. is supported by the AgreeSkills fellowship program which has received funding from the EU’s Seventh Framework Program under grant agreement N° FP7-609398 (AgreeSkills+ contract), and E.B. acknowledges a CIFRE fellowship (No. 1115/2015).

Disclosure

The authors have declared that no competing interests exist.

References

- Alvarez, A.E., Garzo, E., Verbeek, M., Vosman, B., Dicke, M. and Tjallingii, W.F. (2007) Infection of potato plants with *Potato leafroll virus* changes attraction and feeding behaviour of *Myzus persicae*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 125, 135–144.
- Ammar, E.D., Tsai, C.W., Whitfield, A.E., Redinbaugh, M.G. and Hogenhout, S.A. (2009) Cellular and molecular aspects of rhabdovirus interactions with insect and plant hosts. *Annual Review of Entomology*, 54, 447–468.

- Atreya, C.D., Atreya, P.L., Thornbury, D.W. and Pirone, T.P. (1992) Site-directed mutations in the *Potyvirus HC-Pro* gene affect helper component activity, virus accumulation, and symptom expression in infected tobacco plants. *Virology*, 191, 106–111.
- Bak, A., Cheung, A.L., Yang, C., Whitham, S.A. and Casteel, C.L. (2017) A viral protease relocates in the presence of the vector to promote vector performance. *Nature Communications*, 8, 14493.
- Bak, A., Gargani, D., Macia, J.L., Malouvet, E., Vernerey, M.S., Blanc, S. et al. (2013) Virus factories of *Cauliflower mosaic virus* are virion reservoirs that engage actively in vector transmission. *Journal of Virology*, 87, 12207–12215.
- van Bel, A.J.E. and Will, T. (2016) Functional evaluation of proteins in watery and gel saliva of aphids. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1840.
- Blanc, S., Ammar, E.D., Garcia-Lampasona, S., Dolja, V.V., Llave, C., Baker, J. et al. (1998) Mutations in the *Potyvirus* helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *Journal of General Virology*, 79, 3119–3122.
- Blanc, S. and Gutiérrez, S. (2015) The specifics of vector transmission of arboviruses of vertebrates and plants. *Current Opinion in Virology*, 15, 27–33.
- Blua, M.J. and Perring, T.M. (1992) Effects of *Zucchini yellow mosaic virus* on colonization and feeding behavior of *Aphis gossypii* (Homoptera: Aphididae) alatae. *Environmental Entomology*, 21, 578–585.
- Brault, V., Herrbach, E. and Reinbold, C. (2007) Electron microscopy studies on luteovirid transmission by aphids. *Micron*, 38, 302–312.
- Brault, V., Uzest, M., Monsion, B., Jacquot, E. and Blanc, S. (2010) Aphids as transport devices for plant viruses. *Comptes Rendus Biologies*, 333, 524–538.
- Bricault, C.A. and Perry, K.L. (2013) Alteration of intersubunit acid-base pair interactions at the quasi-threefold axis of symmetry of *Cucumber mosaic virus* disrupts aphid vector transmission. *Virology*, 440, 160–170.
- Carmo-Sousa, M., Moreno, A., Garzo, E. and Fereres, A. (2014) A non-persistently transmitted-virus induces a pull-push strategy in its aphid vector to optimize transmission and spread. *Virus Research*, 186, 38–46.
- Carmo-Sousa, M., Moreno, A., Plaza, M., Garzo, E. and Fereres, A. (2016) *Cucurbit aphid-borne yellows virus* (CABYV) modifies the alighting, settling and probing behaviour of its vector *Aphis gossypii* favouring its own spread. *Annals of Applied Biology*, 169, 284–297.
- Casteel, C.L., De Alwis, M., Bak, A., Dong, H., Whitham, S.A. and Jander, G. (2015) Disruption of ethylene responses by *Turnip mosaic virus* mediates suppression of plant defense against the green peach aphid vector. *Plant Physiology*, 169, 209–218.
- Casteel, C.L., Yang, C., Nanduri, A.C., De Jong, H.N., Whitham, S.A. and Jander, G. (2014) The Nla-Pro protein of *Turnip mosaic virus* improves growth and reproduction of the aphid vector, *Myzus persicae* (green peach aphid). *The Plant Journal*, 77, 653–663.
- Castle, S.J. and Berger, P.H. (1993) Rates of growth and increase of *Myzus persicae* on virus-infected potatoes according to type of virus-vector relationship. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 69, 51–60.
- Castle, S.J., Mowry, T.M. and Berger, P.H. (1998) Differential Settling by *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) on various virus infected host plants. *Annals of the Entomological Society of America*, 91, 661–667.
- 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.
- Chen, A.Y.S., Walker, G.P., Carter, D. and Ng, J.C.K. (2011) A virus capsid component mediates virion retention and transmission by its insect vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 16777–16782.
- Chen, B. and Francki, R.I.B. (1990) Cucumovirus transmission by the aphid *Myzus persicae* is determined solely by the viral coat protein. *Journal of General Virology*, 71, 939–944.
- Chen, Q., Zhang, L., Chen, H., Xie, L. and Wei, T. (2015) Non-structural protein Pns4 of rice dwarf virus is essential for viral infection in its insect vector. *Virology Journal*, 12, 211.
- Collar, J.L., Avilla, C. and Fereres, A. (1997) New correlations between aphid stylet paths and nonpersistent virus transmission. *Environmental Entomology*, 26, 537–544.
- Delmas, B., Gelfi, J., L'Haridon, R., Vogel, L.K., Sjöström, H., Norén, O. et al. (1992) Aminopeptidase N is a major receptor for the entero-pathogenic coronavirus TGEV. *Nature*, 357, 417–420.
- Donaldson, J.R. and Gratton, C. (2007) Antagonistic effects of soybean viruses on soybean aphid performance. *Environmental Entomology*, 36, 918–925.
- Drucker, M. and Then, C. (2015) Transmission activation in non-circulative virus transmission: a general concept? *Current Opinion in Virology*, 15, 63–68.
- Eigenbrode, S.D., Ding, H., Shiel, P. and Berger, P.H. (2002) Volatiles from potato plants infected with potato leafroll virus attract and arrest the virus vector, *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae). *Proceedings: Biological Sciences*, 269, 455–460.
- Fereres, A., Kampmeier, G.E. and Irwin, M.E. (1999) Aphid attraction and preference for soybean and pepper plants infected with Potyviridae. *Annals of the Entomological Society of America*, 92, 542–548.

- Fereres, A., Lister, R.M., Araya, J.E. and Foster, J.E. (1989) Development and reproduction of the English grain aphid (Homoptera: Aphididae) on wheat cultivars infected with *Barley yellow dwarf virus*. *Environmental Entomology*, 18, 388–393.
- Fereres, A. and Moreno, A. (2009) Behavioural aspects influencing plant virus transmission by homopteran insects. *Virus Research*, 141, 158–168.
- Fiebig, M., Poehling, H.M. and Borgemeister, C. (2004) *Barley yellow dwarf virus*, wheat, and *Sitobion avenae*: a case of trilateral interactions. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 110, 11–21.
- Froissart, R., Michalakakis, Y. and Blanc, S. (2002) Helper component-transcomplementation in the vector transmission of plant viruses. *Phytopathology*, 92, 576–579.
- Gaedigk, K., Adam, G. and Mundry, K.W. (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, 2763–2773.
- Gray, S.M., Banerjee, N. (1999) Mechanisms of arthropod transmission of plant and animal viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63, 128–148.
- Hily, J.M., García, A., Moreno, A., Plaza, M., Wilkinson, M.D., Fereres, A. *et al.* (2014) The relationship between host lifespan and pathogen reservoir potential: an analysis in the system *Arabidopsis thaliana*-*Cucumber mosaic virus*. *PLoS Pathogens*, 10, e1004492.
- Hodge, S. and Powell, G. (2008) Do plant viruses facilitate their aphid vectors by inducing symptoms that alter behavior and performance? *Environmental Entomology*, 37, 1573–1581.
- Hodgson, C.J. (1981) Effects of infection with the cabbage black ringspot strain of turnip mosaic virus on turnip as a host to *Myzus persicae* and *Brevicoryne brassicae*. *Annals of Applied Biology*, 98, 1–14.
- Höhnle, M., Höfer, P., Bedford, I.D., Briddon, R.W., Markham, P.G. and Frischmuth, T. (2001) Exchange of three amino acids in the coat protein results in efficient whitefly transmission of a nontransmissible *Abutilon mosaic virus* isolate. *Virology*, 290, 164–171.
- Ingwell, L.L., Eigenbrode, S.D. and Bosque-Pérez, N.A. (2012) Plant viruses alter insect behavior to enhance their spread. *Scientific Reports*, 2, 578.
- Jaouannet, M., Rodriguez, P.A., Thorpe, P., Lenoir, C.J.G., MacLeod, R. and Escudero-Martinez, C. *et al.* (2014) Plant immunity in plant-aphid interactions. *Frontiers in Plant Science*, 5, 663.
- Jiménez-Martínez, E.S., Bosque-Pérez, N.A., Berger, P.H. and Zemetra, R.S. (2004a) Life history of the bird cherry-oat aphid, *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae), on transgenic and untransformed wheat challenged with *Barley yellow dwarf virus*. *Journal of Economic Entomology*, 97, 203–212.
- Jiménez-Martínez, E.S., Bosque-Pérez, N.A., Berger, P.H., Zemetra, R.S., Ding, H. and Eigenbrode, S.D. (2004b) Volatile cues influence the response of *Rhopalosiphum padi* (Homoptera: Aphididae) to *Barley yellow dwarf virus*-infected transgenic and untransformed wheat. *Environmental Entomology*, 33, 1207–1216.
- Jones, J.D.G. and Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature*, 444, 323–329.
- Kaloshian, I. and Walling, L.L. (2016) Hemipteran and dipteran pests: effectors and plant host immune regulators. *Journal of Integrative Plant Biology*, 58, 350–361.
- Kennedy, J.S., Day, M.F. and Eastop, V.F. (1962) *A Conspectus of Aphids as Vectors of Plant Viruses*. Commonwealth Inst. Entomol., London.
- Keough, S., Han, J., Shuman, T., Wise, K. and Nachappa, P. (2016) Effects of *Soybean vein necrosis virus* on life history and host preference of its vector, *Neohydatothrips variabilis*, and evaluation of vector status of *Frankliniella tritici* and *Frankliniella fusca*. *Journal of Economic Entomology*, 109, 1979–1987.
- Kettles, G.J. and Kaloshian, I. (2016) The potato aphid salivary effector Me47 is a glutathione-S-transferase involved in modifying plant responses to aphid infestation. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1142.
- Leh, V., Jacquot, E., Geldreich, A., Hermann, T., Leclerc, D., Cerutti, M. *et al.* (1999) Aphid transmission of *Cauliflower mosaic virus* requires the viral PIII protein. *EMBO Journal*, 18, 7077–7085.
- Lewsey, M.G., Murphy, A.M., Maclean, D., Dalchau, N., Westwood, J.H., Macaulay, K. *et al.* (2010) Disruption of two defensive signaling pathways by a viral RNA silencing suppressor. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23, 835–845.
- Li, R., Weldegergis, B.T., Lie, J., Jung, C., Qu, J. and Sun, Y.W. *et al.* (2014) Virulence factors of geminivirus interact with MYC2 to subvert plant resistance and promote vector performance. *Plant Cell*, 26, 4991–5008.
- Lieskovská, J., Páleníková, J., Širmarová, J., Elsterová, J., Kotsyfakis, M., Campos Chagas, A. *et al.* (2015) Tick salivary cystatin sialostatin L2 suppresses IFN responses in mouse dendritic cells. *Parasite Immunology*, 37, 70–78.
- Linz, L.B., Liu, S., Chougule, N.P. and Bonning, B.C. (2015) *In vitro* evidence supports membrane alanine aminopeptidase N as a receptor for a plant virus in the pea aphid vector. *Journal of Virology*, 89, 11203–11212.
- Lu, G., Zhang, T., He, Y. and Zhou, G. (2016) Virus altered rice attractiveness to planthoppers is mediated by volatiles and related to virus titre and expression of defence and volatile-biosynthesis genes. *Scientific Reports*, 6, 38581.
- Lu, S., Li, J., Wang, X., Song, D., Bai, R., Shi, Y. *et al.* (2017) A semipersistent plant virus differentially manipulates feeding behaviors of different sexes and biotypes of its whitefly vector. *Viruses*, 9.

- Maluta, N.K.P., Garzo, E., Moreno, A., Lopes, J.R.S., Fereres, A. (2014) *Tomato yellow leaf curl virus* benefits population growth of the Q biotype of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Neotropical Entomology*, 43, 385–392.
- Margarita, P., Bosco, L., Vallino, M., Ciuffo, M., Mautino, G.C., Tavella, L. et al. (2014) The NSs protein of *Tomato spotted wilt virus* is required for persistent infection and transmission by *Frankliniella occidentalis*. *Journal of Virology*, 88, 5788–5802.
- Maris, P.C., Joosten, N.N., Goldbach, R.W. and Peters, D. (2004) *Tomato spotted wilt virus* infection improves host suitability for its vector *Frankliniella occidentalis*. *Phytopathology*, 94, 706–711.
- Martinière, A., Bak, A., Macia, J.L., Lautredou, N., Gargani, D., Doumayrou, J. et al. (2013) A virus responds instantly to the presence of the vector on the host and forms transmission morphs. *eLife*, 2, e00183.
- Mauck, K., Bosque-Pérez, N.A., Eigenbrode, S.D., De Moraes, C.M. and Mescher, M.C. (2012) Transmission mechanisms shape pathogen effects on host-vector interactions: evidence from plant viruses. *Functional Ecology*, 26, 1162–1175.
- Mauck, K.E., De Moraes, C.M. and Mescher, M.C. (2014) Biochemical and physiological mechanisms underlying effects of *Cucumber mosaic virus* on host-plant traits that mediate transmission by aphid vectors. *Plant, Cell & Environment*, 37, 1427–1439.
- Mauck, K.E., De Moraes, C.M. and Mescher, M.C. (2016) Effects of pathogens on sensory-mediated interactions between plants and insect vectors. *Current Opinion in Plant Biology*, 32, 53–61.
- Medina-Ortega, K.J., Bosque-Perez, N.A., Ngumbi, E., Jimenez-Martinez, E.S. and Eigenbrode, S.D. (2009) *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) responses to volatile cues from *Barley yellow dwarf virus*-infected wheat. *Environmental Entomology*, 38, 836–845.
- Michels, G.J., Rush, C.M., Whitaker-Deerberg, R.L. and Heidel, G.B. (1994) Deleterious effects of *Wheat streak mosaic virus* infection of winter wheat on greenbug (Homoptera: Aphididae) reproduction. *Southwestern Entomologist*, 19, 109–113.
- Montllor, C.B. and Gildow, F.E. (1986) Feeding responses of two grain aphids to *Barley yellow dwarf virus*-infected oats. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 42, 63–69.
- Moreno, A., Hébrard, E., Uzest, M., Blanc, S. and Fereres, A. (2005) A single amino acid position in the helper component of cauliflower mosaic virus can change the spectrum of transmitting vector species. *Journal of Virology*, 79, 13587–13593.
- Moreno-Delafuente, A., Garzo, E., Moreno, A. and Fereres, A. (2013) A plant virus manipulates the behavior of its whitefly vector to enhance its transmission efficiency and spread. *PLoS ONE*, 8, e61543.
- Mugford, S.T., Barclay, E., Drurey, C., Findlay, K.C. and Hogenhout, S.A. (2016) An immuno-suppressive aphid saliva protein is delivered into the cytosol of plant mesophyll cells during feeding. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI*, 29, 854–861.
- Musser, R.O., Hum-Musser, S.M., Felton, G.W. and Gergich, R.C. (2003) Increased larval growth and preference for virus-infected leaves by the Mexican bean beetle, *Epilachna varivestis* Mulsant, a plant virus vector. *Journal of Insect Behavior*, 16, 247–256.
- Nakashima, N. and Noda, H. (1995) Nonpathogenic *Nilaparvata lugens reovirus* is transmitted to the brown planthopper through rice plant. *Virology*, 207, 303–307.
- Nault, L.R. (1997) Arthropod transmission of plant viruses: a new synthesis. *Annals of the Entomological Society of America*, 90, 521–541.
- Ng, J.C., Liu, S. and Perry, K.L. (2000) *Cucumber mosaic virus* mutants with altered physical properties and defective in aphid vector transmission. *Virology*, 276, 395–403.
- Ng, J.C.K. and Walker, G.P. (2016) Whitefly feeding behavior and its relationship with non-circulatively transmitted viruses. *Vector-Mediated Transmission of Plant Pathogens* (ed. J.K. Brown), 510 pp. APS Press, St. Paul, MN, USA.
- Ng, J.C.K. and Zhou, J.S. (2015) Insect vector-plant virus interactions associated with non-circulative, semi-persistent transmission: current perspectives and future challenges. *Current Opinion in Virology*, 15, 48–55.
- Ngumbi, E., Eigenbrode, S.D., Bosque-Pérez, N.A., Ding, H. and Rodriguez, A. (2007) *Myzus persicae* is arrested more by blends than by individual compounds elevated in headspace of PLRV-infected potato. *Journal of Chemical Ecology*, 33, 1733–1747.
- Nuttall, P.A., Paesen, G.C., Lawrie, C.H. and Wang, H. (2000) Vector-host interactions in disease transmission. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 2, 381–386.
- Omura, T. and Yan, J. (1999) Role of outer capsid proteins in transmission of *Phytoreovirus* by insect vectors. *Advances in Virus Research*, Vol. 54 (eds. K. Maramorosch, F.A. Murphy & A.J. Shatkin), pp. 15–43. Academic Press, London, Oxford, Boston, New York, San Diego.
- Overstreet, R.M., Jovonovich, J. and Ma, H. (2009) Parasitic crustaceans as vectors of viruses, with an emphasis on three penaeid viruses. *Integrative & Comparative Biology*, 49, 127–141.
- Peñaflor, M.F.G.V., Mauck, K.E., Alves, K.J., De Moraes, C.M. and Mescher, M.C. (2016) Effects of single and mixed infections of *Bean pod mottle virus* and *Soybean mosaic virus* on host-plant chemistry and host-vector interactions. *Functional Ecology*, 30, 1648–1659.

- Peng, Y.H., Kadoury, D., Gal-On, A., Huet, H., Wang, Y. and Raccah, B. (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, 897–904.
- Perry, K.L., Zhang, L. and Palukaitis, P. (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, 204–210.
- 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. *Journal of General Virology*, 89, 2037–2045.
- Pirone, T. and Blanc, S. (1996) Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annual Review of Phytopathology*, 34, 227–247.
- Rajabaskar, D., Bosque-Pérez, N.A. and Eigenbrode, S.D. (2014) Preference by a virus vector for infected plants is reversed after virus acquisition. *Virus Research*, 186, 32–37.
- Rajabaskar, D., Wu, Y., Bosque-Pérez, N.A. and Eigenbrode, S.D. (2013) Dynamics of *Myzus persicae* arrestment by volatiles from *Potato leafroll virus*-infected potato plants during disease progression. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 148, 172–181.
- Reinbold, C., Gildow, F.E., Herrbach, E., Ziegler-Graff, V., Gonçalves, M.C. and van Den Heuvel, J.F. *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, 1995–2007.
- Rodriguez, P., Escudero-Martinez, C., Bos, J. (2017) An aphid effector targets trafficking protein VPS52 in a host-specific manner to promote virulence. *Plant Physiology*, 173, 1892–1903.
- Rosen, R., Kanakala, S., Kliot, A., Cathrin Pakkianathan, B., Farich, B.A., Santana-Magal, N. *et al.* (2015) Persistent, circulative transmission of begomoviruses by whitefly vectors. *Current Opinion in Virology*, 15, 1–8.
- Schelhaas, M. (2010) Come in and take your coat off-how host cells provide endocytosis for virus entry. *Cellular Microbiology*, 12, 1378–1388.
- Stafford, C.A., Walker, G.P., Ullman, D.E. (2011) Infection with a plant virus modifies vector feeding behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108, 9350–9355.
- Thangamani, S., Higgs, S., Ziegler, S., Vanlandingham, D., Tesh, R., Wikel, S. (2010) Host immune response to mosquito-transmitted *Chikungunya virus* differs from that elicited by needle inoculated virus. *PLoS ONE*, 5, e12137.
- Tian, T., Rubio, L., Yeh, H.H., Crawford, B., Falk, B.W. (1999) *Lettuce infectious yellows virus*: *in vitro* acquisition analysis using partially purified virions and the whitefly *Bemisia tabaci*. *Journal of General Virology*, 80, 1111–1117.
- Uzest, M., Gargani, D., Drucker, M., Hébrard, E., Garzo, E., Candresse, T. *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 of the United States of America*, 104, 17959–17964.
- Wang, R.Y., Ammar, E.D., Thornbury, D.W., Lopez-Moya, J.J., Pirone, T.P. (1996) Loss of *Potyvirus* transmissibility and helper-component activity correlate with non-retention of virions in aphid stylets. *Journal of General Virology*, 77, 861–867.
- Watson, M.A. and Roberts, F.M. (1939) A comparative study of the transmission of *Hyocymus virus 3*, *Potato virus Y* and cucumber virus by the vector *Myzus persicae* (Sulz), *M. circumflexus* (Buckton) and *Macrosiphum gei* (Koch). *Proceedings of the Royal Society of London*, 127, 543–576.
- Werner, B.J., Mowry, T.M., Bosque-Pérez, N.A., Ding, H. and Eigenbrode, S.D. (2009) Changes in green peach aphid responses to *Potato leafroll virus*-induced volatiles emitted during disease progression. *Environmental Entomology*, 38, 1429–1438.
- Whitfield, A.E., Falk, B.W. and Rotenberg, D. (2015) Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology*, 479–480, 278–289.
- Whitfield, A.E., Kumar, N.K.K., Rotenberg, D., Ullman, D.E., Wyman, E.A., Zietlow, C. *et al.* (2008) A soluble form of the *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) glycoprotein G(N) (G(N)-S) inhibits transmission of TSWV by *Frankliniella occidentalis*. *Phytopathology*, 98, 45–50.
- Will, T., Tjallingii, W.F., Thönnessen, A. and van Bel, A.J.E. (2007) Molecular sabotage of plant defense by aphid saliva. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 10536–10541.
- Woolston, C., Czaplewski, L., Markham, P., Goad, A., Hull, R. and Davies, J. (1987) Location and sequence of a region of *Cauliflower mosaic-virus* gene-2 responsible for aphid transmissibility. *Virology*, 160, 246–251.
- Wu, D., Qi, T., Li, W.X., Tian, H., Gao, H., Wang, J. *et al.* (2017) Viral effector protein manipulates host hormone signaling to attract insect vectors. *Cell Research*, 27, 402–415.
- Wu, Y., Davis, T.S. and Eigenbrode, S.D. (2014) Aphid behavioral responses to virus-infected plants are similar despite divergent fitness effects. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 153, 246–255.
- Zhang, T., Luan, J.B., Qi, J.F., Huang, C.J., Li, M., Zhou, X.P. *et al.* (2012) Begomovirus-whitefly mutualism is achieved through repression of plant defences by a

- virus pathogenicity factor. *Molecular Ecology*, 21, 1294–1304.
- Ziebell, H., Murphy, A.M., Groen, S.C., Tungadi, T., Westwood, J.H., Lewsey, M.G. et al. (2011) *Cucumber mosaic virus* and its 2b RNA silencing suppressor modify plant-aphid interactions in tobacco. *Scientific Reports*, 1, 187.
- Zitter, T.A. and Murphy, J.F. (2009) Cucumber mosaic. *The Plant Health Instructor*. <https://doi.org/10.1094/PHI-I-2009-0518-01>
- Manuscript received November 4, 2016
Final version received April 5, 2017
Accepted April 6, 2017

Cette revue énumère les étapes de la transmission et les différents mécanismes qui y interviennent. Cependant, les événements précis au cours de l'acquisition du virus par son vecteur sont encore mal renseignés, qu'il s'agisse de la transmission circulante ou non circulante. Par exemple, dans la transmission non circulante, la liaison des particules du virus aux pièces buccales du vecteur est souvent considérée comme « passive », sans prérequis particulier. Cependant, dans la transmission non circulante, il existe également un certain degré de spécificité entre le virus et son vecteur, ce qui suggère que ce mode de transmission n'est pas un événement aléatoire. En effet, l'existence des facteurs assistants étant spécialisés dans la liaison au vecteur indique que la transmission non circulante est plus complexe (Blanc *et al.*, 2014). L'équipe d'accueil VIP de l'UMR BGPI s'intéresse à cette problématique. Elle a mis en évidence que le virus non circulant CaMV participe activement à sa transmission (Bak *et al.*, 2013; Martinière *et al.*, 2013). Leurs travaux ont démontré que le CaMV réagit à son vecteur en formant précisément au moment de l'arrivée du vecteur des formes spécifiques à sa transmission (figure 5).

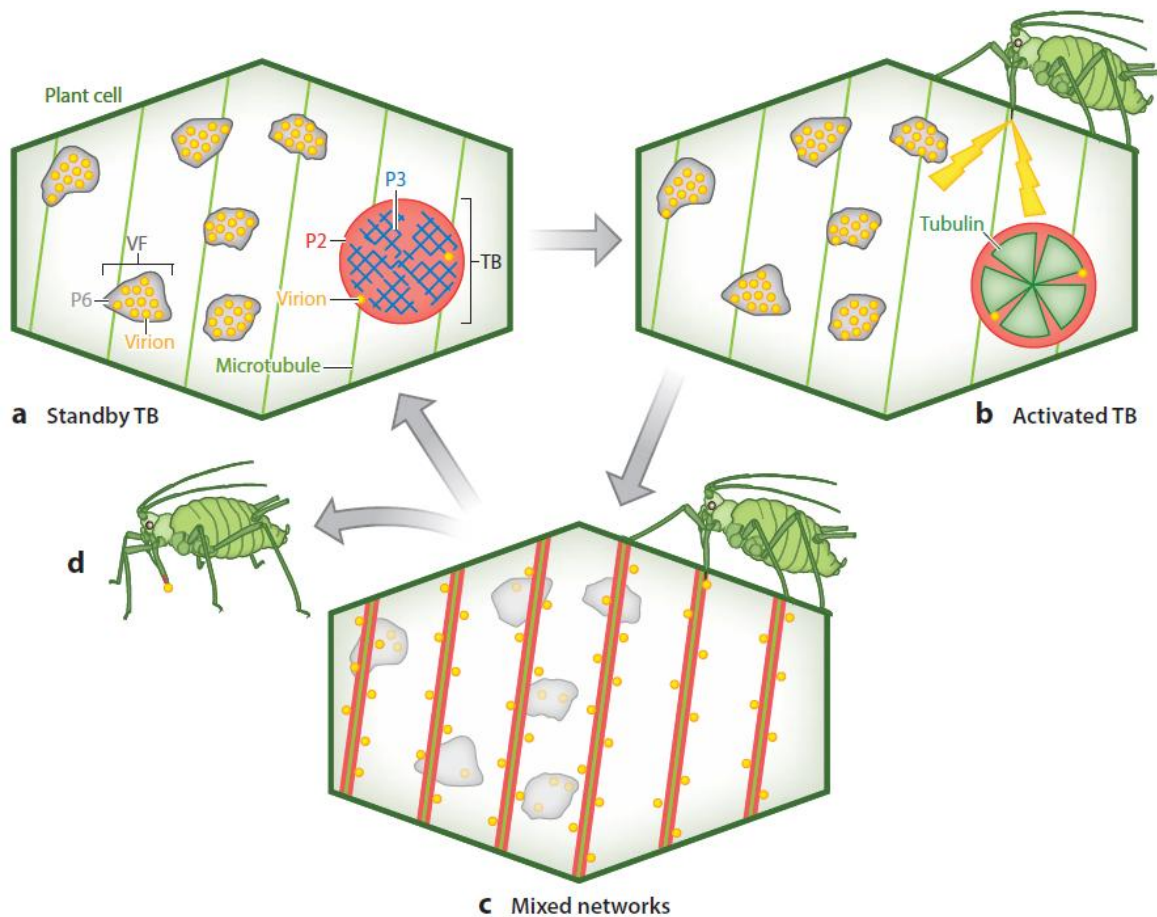


Figure 5. L'activation de la transmission du CaMV par les pucerons (Blanc *et al.*, 2014, d'après Martinière *et al.*, 2013). (a) En l'absence du vecteur, les cellules végétales infectées contiennent de nombreuses usines virales (VF) contenant la plupart des virions qui sont enfermés dans une matrice de la protéine virale P6 (en gris). Ces cellules comprennent également un unique corps à transmission (TB) contenant la totalité de la protéine virale P2, le facteur assistant du CaMV indispensable pour la transmission, et P3, la protéine aidant à la fixation de P2 aux virions. (b) Lorsqu'un puceron vecteur atterrit sur une plante et insère ses stylets, la piqûre élicite (éclairs oranges) une réaction de défense de la plante et une réaction des VF et du TB. Cela induit un afflux de la tubuline (vert du TB) dans le TB qui se désintègre instantanément, et son contenu en P2 se relocalise sur les microtubules. Simultanément, les VF libèrent des virions. (c) Ceci aboutit en quelques secondes à la formation de réseaux mixtes sur les microtubules (traits fins verts) contenant la P2 (bandes rouges) et les virions. Ces complexes transmissibles sont alors répartis dans toute la cellule et facilement accessibles pour le puceron. (d) Le mécanisme présenté sur cette figure est réversible et, quelques minutes après le départ du puceron, la cellule infectée repasse de l'état « c » à l'état « a ».

Plus tard, ce phénomène a été nommé « activation de la transmission » (Drucker et Then, 2015). Ce mécanisme est défini comme le passage de l'état pour lequel le virus n'est pas transmissible à l'état où il le devient, en présence de son vecteur. Ce résultat soulève de nombreuses questions de recherche en virologie. Parmi elles, une question pertinente, et constituant également le cœur de mon travail de thèse, est : L'AT est-elle utilisée par d'autres virus pour stimuler leur transmission ? Afin de répondre à cette question, les travaux réalisés au cours de cette thèse se sont focalisés sur un potyvirus, le virus de la mosaïque du navet, *Turnip mosaic virus* (TuMV). Le choix s'est porté sur ce virus puisqu'il est transmis par les pucerons de manière non circulante et utilise la stratégie de transmission passant par un facteur assistant, tout comme le CaMV. De plus, les potyvirus comme le TuMV sont des ravageurs importants pour l'agriculture. Ainsi, les étudier permettrait d'obtenir de nouvelles connaissances exploitables pour aider à les éradiquer. Les connaissances sur l'AT du CaMV ont fait office de point de départ pour initier les recherches d'une éventuelle AT du TuMV. Pour la plante, la piqûre du puceron dans une cellule constitue un stress mécanique (piqûre et/ou mouvement des stylets) ou chimique (composants protéiques ou non de la salive), et induit une réponse de la plante qui est interceptée par le CaMV et provoque à la formation des réseaux mixtes (Figure 5). Pour que cette formation ait lieu, le stress induit par la piqûre du puceron est donc perçu par la cellule végétale qui met en place des mécanismes de signalisation et de défense qui déclenchent l'apparition de formes virales actives pour la transmission. L'AT requière donc une

reconnaissance du vecteur par la cellule végétale suivie par la mise en place de réponses précoces de la plante.

3. Les réponses des plantes face à la transmission

Les plantes sont soumises à des stress lorsque les insectes vecteurs viennent se nourrir. Cela génère la mise en place de mécanismes de reconnaissance, de signalisation et de défense par les cellules de la plante attaquée pour tenter de contrer ces stress. Les plantes réagissent avec un arsenal de défenses qui peut être de nature morphologique, biochimique ou moléculaire (Jander et Howe, 2008 ; Jones et Dangl, 2006). La revue citée dans la partie « 2. La transmission » de l'introduction, présente de manière générale le dialogue entre la plante, le virus et le vecteur qui aboutit à une interaction compatible ou incompatible entre plante et virus ou entre plante et vecteur. Cependant, ce dialogue joue aussi un rôle majeur dans la transmission des virus. Par exemple, la transmission dépend de l'attraction et de la répulsion des insectes vecteurs par les plantes infectées. Ces préférences ou aversions pour une plante donnée sont dépendantes des mécanismes de défenses déclenchés par la plante suite à l'infection virale.

3.1. Reconnaissance du vecteur par la plante

De nombreuses études ont montré que les insectes, y compris les pucerons, produisent et sécrètent lors de la reconnaissance et de l'alimentation sur la plante de nombreuses molécules qui peuvent agir comme éliciteurs et effecteurs, et qui peuvent donc être reconnus par les plantes. En effet, des éliciteurs de l'immunité végétale PTI (plant triggered immunity) ont été identifiés chez plusieurs insectes herbivores, dont certains fonctionnent indirectement, causant des dommages aux plantes et la génération de DAMPs (damage-associated molecular patterns) (Hogenhout et Bos, 2011). Une autre forme d'immunité végétale, l'ETI (effector triggered immunity), est activée lors de la reconnaissance des effecteurs parasites par des gènes R. Des reconnaissances par interactions de type gène-pour-gène ont été trouvées dans plusieurs pathosystèmes pucerons-hôtes. Par exemple, des recherches ont identifié des biotypes du puceron

Nasonovia ribisnigri pouvant surmonter des résistances importantes dans la laitue, certainement via une reconnaissance spécifique préalable entre les pucerons et les laitues (ten Broeke *et al.*, 2013). Un autre travail a mis en évidence la capacité de plusieurs biotypes du puceron *Acyrtosiphon pisum* à infester un panel de génotypes de *Medicago truncatula*. Cette étude a montré une variation importante de la capacité d'infestation dépendante des combinaisons pucerons-génotypes hôtes, suggérant là aussi une reconnaissance de type gène pour gène (Kanvil *et al.*, 2014). Plusieurs éliciteurs, contenus dans la salive, ont également été identifiés comme pouvant être reconnus par les plantes et déclencher des mécanismes de défenses (Arimura *et al.*, 2011 ; Kafle *et al.*, 2017). De Vos et Jander (2009) ont montré que la salive provenant de *Myzus persicae* (*M. persicae*), lorsqu'elle était infiltrée dans les feuilles d'*Arabidopsis*, altère l'expression des gènes de défense, de transduction du signal et de sénescence. Deux protéines salivaires de *M. persicae*, Mp10 et Mp42, déclenchent les défenses de la plante hôte et entraînent une réduction de la fécondité des pucerons dans le cas d'une interaction incompatible. Mp10 entraîne une chlorose et la combinaison de Mp10 avec la signalisation de défense déclenchée par le peptide flg22 bactérien a entraîné une baisse de la production de ROS. Ces résultats suggèrent que les composants salivaires des pucerons, ou le produit de leur activité quand il s'agit d'enzymes, sont probablement reconnus par les cellules d'*Arabidopsis*, conduisant à l'activation des défenses (Bos *et al.*, 2010 ; Rodriguez *et al.*, 2014). Aussi, la reconnaissance de la protéine chaperonne GroEL de l'endosymbionte *Buchnera aphidicola* du puceron provoque l'accumulation de ROS suivi d'un dépôt de callose dans les cellules végétales (Chaudhary *et al.*, 2014). De nombreux autres travaux sont en cours pour l'identification de ces mécanismes de reconnaissance qui génèrent des réponses de la plante.

3.2. Voies de signalisations

3.2.1. La signalisation calcique

Chez les animaux comme chez les plantes, la reconnaissance d'un agent pathogène conduit à une série de signalisation, notamment la signalisation via les ions calcium (Ca^{2+}). Lorsque la plante n'a pas subi de stress, les niveaux de Ca^{2+} sont élevés dans les réservoirs de Ca^{2+} comme l'apoplaste, les mitochondries, la vacuole et le RE (environ 1 mM) et très faibles dans le cytosol (environ 0,0001 mM). En réponse à la présence d'un stress abiotique ou

biotique comme un agent pathogène, les ions Ca^{2+} sont rapidement libérés dans le cytosol via les canaux calciques avant d'être à nouveau rapidement exportés vers ces réservoirs par des ATPases qui pompent le Ca^{2+} (Ma et Berkowitz, 2007 ; Ma *et al.*, 2009 ; Verret *et al.*, 2010). Ceci crée une vague de calcium qui déclenche des réactions dans la cellule concernée, mais qui peut aussi être propagée vers les cellules voisines et même à plus longue distance. Dans les cellules animales comme végétales, le Ca^{2+} joue un rôle physiologique clé en tant que second messager intracellulaire (Dodd *et al.*, 2010 ; Kudla *et al.*, 2010).

Lorsque les insectes comme des chenilles blessent la plante avec leur appareil buccal de type broyeur, un afflux de Ca^{2+} est rapidement généré dans le cytosol des cellules de la zone blessée. Il a été montré que ces signaux de Ca^{2+} se propagent sur la feuille attaquée. Cela conduit à une forte dépolarisation du potentiel transmembranaire dépendant du Ca^{2+} dans la zone blessée suivie d'une hyperpolarisation de ce même potentiel à proximité immédiate de cette zone et d'une dépolarisation constante à des distances supérieures à 6-7 mm. Un rôle important de la sécrétion orale des insectes broyeurs dans l'induction de ces fluctuations du Ca^{2+} a également été démontré. En effet, ces sécrétions peuvent contenir soit des effecteurs qui atténuent les réactions de défense de la plante face aux blessures causées, soit des éliciteurs qui, une fois reconnus par la plante, induisent des variations de Ca^{2+} dans le cytosol (Arimura et Maffei, 2010).

La situation est différente pour les insectes piqueur-suceurs, comme les pucerons. Ces derniers ont un comportement alimentaire qui engendre beaucoup moins de lésions sur les plantes par rapport à un comportement d'insecte broyeur. Dans leur cas, il semble que certaines molécules contenues dans la salive, ou libérées par la plante lors de l'alimentation, jouent un rôle dans l'interaction. De nombreux résultats indiquent que la signalisation Ca^{2+} joue aussi un rôle dans les interactions plantes-pucerons. La majorité des études montrent qu'après une infestation de pucerons, une hausse de la régulation des gènes des plantes liés à la signalisation Ca^{2+} est observée (Foyer *et al.*, 2015 ; Vincent *et al.*, 2017). Par exemple, l'alimentation de *M. persicae* provoque des dépolarisations de la membrane plasmique dans les cellules du mésophylle d'*Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) (Bricchi *et al.*, 2012). De même, des flux de Ca^{2+} ont été identifiés dans les cellules de *Nicotiana tabacum* après infestation par *M. persicae* (Ren *et al.*, 2014). Il a été suggéré que le rôle majeur du Ca^{2+} dans les interactions plantes-pucerons serait au niveau du phloème où il bloque la circulation de la sève, coupant ainsi les pucerons de leur source d'alimentation (Furch *et al.*, 2009; Kauss *et*

al., 1983; Will *et al.*, 2007). De plus, un autre rôle de la signalisation calcique a été mis en évidence récemment et impliquerait les réactions de défenses de la plante après génération de piqûres de pucerons (Vincent *et al.*, 2017). La propagation systémique du signal induit par la piqûre et la libération de Ca^{2+} conduirait à une activation des défenses de la plante comme rapporté pour d'autres stress (Kadota *et al.*, 2015). La signalisation du Ca^{2+} est étroitement liée à la signalisation médiée par les ROS et agit sur les mécanismes contrôlant les gènes de défense des plantes. L'ensemble de ces éléments indique que la signalisation Ca^{2+} est un mécanisme favorisant la résistance des plantes face aux insectes dont les pucerons.

3.2.2. La signalisation ROS

Les cellules végétales utilisent les ROS, comme molécules de signalisation pour contrôler de nombreux processus biologiques dont l'infestation par des agents pathogènes (Torres et Dangl, 2005). La signalisation par les ROS agit en tant que messenger secondaire localement et systématiquement pour déclencher des réponses immunitaires (Lamb et Dixon, 1997 ; Suzuki *et al.*, 2011). Pendant la PTI et l'ETI, la production de ROS dépend principalement des nicotinamide adénine dinucléotide phosphate (NADPH) oxydases respiratory burst oxidase homolog (RBOH) (Dangl *et al.*, 2013). Ces enzymes génèrent des ions superoxyde (O_2^-) diffusés dans l'apoplaste qui dismutent rapidement en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en dioxygène (Sumimoto, 2008 ; Suzuki *et al.*, 2011).

La perception des agents pathogènes par les cellules végétales conduit à une production rapide, spécifique et forte de ROS, qui dépend principalement de RBOHD et RBOHF (Kadota *et al.*, 2014; Segonzac *et al.*, 2011). Ces deux gènes détiennent un rôle important dans la signalisation et agissent en synergie lors des réponses physiologiques activées par le système immunitaire de la plante (Suzuki *et al.*, 2011). RBOHD et RBOHF sont majoritairement contrôlés par la liaison directe de Ca^{2+} à leurs motifs EF-hands et par leur phosphorylation via des protéines kinases dépendantes du Ca^{2+} (Boudsocq *et al.*, 2010 ; Ogasawara *et al.*, 2008).

Des études ont permis d'identifier que la signalisation ROS, produite par la NADPH oxydase RBOHD, était impliquée dans le contrôle de l'infestation par le puceron *M. persicae*. Le H_2O_2 qu'elle génère favorise le dépôt de callose et contribue ainsi à l'occlusion du phloème et aux défenses des plantes contre *M. persicae*. Les ROS pourraient également affecter d'autres mécanismes de signalisation et de défense (Louis et Shah, 2013).

3.2.3. La signalisation via les phytohormones

Les plantes emploient diverses réponses médiées par les phytohormones pour se défendre contre les agents pathogènes et les herbivores. De nombreuses recherches ont démontré qu'au moins trois phytohormones, l'acide salicylique (AS), l'acide jasmonique (AJ), et l'éthylène (ET), jouent un rôle majeur dans la mise en place des réponses de défense des plantes (Bari et Jones, 2009 ; Pieterse *et al.*, 2012). En général, la signalisation AS est essentielle pour les réponses de défense contre un large éventail d'agents pathogènes, y compris les virus (Carr *et al.*, 2010 ; Glazebrook, 2005) tandis que la signalisation de AJ et d'ET, est impliquée dans la régulation de la réponse des plantes aux insectes herbivores, dont les pucerons (Glazebrook, 2005 ; Howe et Jander, 2008).

La voie de l'AJ intervient dans la résistance contre *M. persicae*. En effet, Ellis *et al.* (2002) ont identifié que des plantes contenant des niveaux plus élevés en AJ étaient plus résistantes à *M. persicae*. De plus, l'AJ est connu pour favoriser l'accumulation de métabolites dans *Arabidopsis* comme la phytoalexine, la camalexine et le N-acétylornithine, qui sont préjudiciables à *M. persicae* (Adio *et al.*, 2011 ; Zhou *et al.*, 1999).

La production d'ET est élevée dans les plantes infestées de pucerons (Argandoña *et al.*, 2001 ; Mantelin *et al.*, 2009). Différents travaux ont prouvé que la signalisation de l'ET est impliquée dans l'expression de gènes favorisant la résistance à *M. persicae*. Par exemple, dans le melon, Anstead *et al.* (2010) ont mis en évidence que l'expression de la voie de l'ET et des gènes de réponse était fortement régulée à la hausse en présence de pucerons sur des plants résistants, résistance assurée par le gène *Vat*. Ce résultat suggère que la signalisation de l'ET joue un rôle dans l'induction de la résistance médiée par *Vat*. De même, la signalisation de l'ET est nécessaire chez *Arabidopsis* pour la résistance induite par la harpaine, protéine élicitrice stimulant les défenses de plantes, contre *M. persicae*. Le traitement harpaine limite l'installation d'insectes, leur alimentation et leur fécondité sur *Arabidopsis* (Fu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2010).

3.3. Mécanismes de défenses

En réponse à la détection d'une blessure causée par un insecte et/ou des éliciteurs de cet insecte, la plante met en place une signalisation qui conduit à l'activation des gènes de défense. De nombreux mécanismes moléculaires et physiologiques sont utilisés par les plantes pour limiter les infestations par ces insectes. Il s'agit notamment de barrières

préformées, de défenses chimiques, ainsi que de défenses directes et indirectes (Wu et Baldwin, 2010).

La production de métabolites secondaires fait partie des principaux mécanismes de défenses mis en place par les plantes suite à l'arrivée d'un insecte. Par exemple, les phytoalexines sont des métabolites secondaires pouvant rendre indigeste les parois cellulaires et donc être toxiques pour les insectes de type broyeurs (Ahuja *et al.*, 2012). La production de ROS est également très importante dans l'immunité des plantes. En effet, leur présence restreint l'entrée des agents pathogènes en déclenchant des processus tel que la fermeture des stomates ou le renforcement des parois cellulaires de la plante (Bradley *et al.*, 1992 ; Macho *et al.*, 2012). Les ROS eux-mêmes déclenchent aussi la production de ROS localement, entraînant une réponse d'hypersensibilité, et dans les cellules voisines, contribuant ainsi à générer une onde de ROS (Miller *et al.*, 2009) et de calcium ce qui entraîne l'activation des défenses dans les feuilles distales (Choi *et al.*, 2014).

De nombreux travaux ont corrélé la production de différents métabolites avec différentes réponses de défenses de plantes lors de l'infestation par des pucerons. Donze-Reiner *et al.* (2017) ont constaté une augmentation du taux de tréhalose dans des plantes infestées par le puceron *Schizaphis graminum*. Cette augmentation modifie le flux de glucose vers la synthèse de l'amidon privant ainsi les pucerons de sources d'énergie accessibles. Cette étude a également mis en évidence l'augmentation du taux d'acide pipécolique. Ce dernier est un composé de signalisation connu pour la mise en place de la réponse systémique acquise, y compris en réponse à la présence de pucerons (Návarová *et al.*, 2012). Une autre étude, réalisée sur du blé avec le puceron *Diuraphis noxia*, démontre la sur-expression d'oxylipine. La présence d'oxylipine stimule la production d'inhibiteurs et de toxines perturbant ainsi l'alimentation des pucerons (Smith *et al.*, 2010). Un autre métabolite, le N-acétylornithine, induit une diminution de la reproduction de *M. persicae*. Ce résultat suggère un effet toxique ou dissuasif direct de N-acétylornithine sur les pucerons (Adio *et al.*, 2011). Parmi les phytoalexines, l'implication de la camalexine dans les défenses de la plante face aux pucerons a été montrée. En effet, des niveaux élevés de camalexine ont pu être observés dans les tissus végétaux de plantes infestées par le puceron *Brevicoryne brassicae* (Mewis *et al.*, 2012). L'une des premières réactions de défenses des plantes face à l'attaque des pucerons est une forte augmentation de la teneur en H₂O₂. H₂O₂ favorise le dépôt de callose et contribue ainsi à l'occlusion des tubes criblés du phloème occasionnant

une gêne pour l'alimentation des pucerons. Ce résultat a été obtenu pour différentes interactions plante-puceron (Czerniewicz *et al.*, 2017 ; Kerchev *et al.*, 2012 ; Zhao *et al.*, 2016).

L'ensemble de ces données indique la complexité des mécanismes de défense mis en place par les plantes durant l'infestation par les pucerons. Ces processus se révèlent souvent être un frein pour l'alimentation des insectes vecteurs. Cependant, l'acquisition des virus, dépendante de l'alimentation des vecteurs, a lieu puisque la transmission des virus à de nouvelles plantes est largement observée. Cela implique un contournement des défenses de la plante par le vecteur ou un rôle important du virus pour aider à son acquisition.

3.4. Le détournement des défenses de la plante par le virus et son vecteur

Les insectes vecteurs et les virus peuvent interférer à différents niveaux avec la mise en place des défenses de la plante. Du côté des insectes vecteurs, et plus particulièrement des pucerons, de nombreux travaux ont mis en évidence que des protéines salivaires modifiaient des réponses de la plante. Cette action a pour effet secondaire d'améliorer l'acquisition et l'inoculation des virus et donc leur transmission (van Bel et Will, 2016 ; Kaloshian et Walling, 2016). Du côté du virus, certaines protéines altèrent des mécanismes de défenses de la plante (Casteel *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2014; Ziebell *et al.*, 2011) ou les manipulent (Hyodo *et al.*, 2017 ; Martinière *et al.*, 2013) d'une manière qui augmente potentiellement le succès de la transmission. La dernière partie de la revue présentée dans la partie « 2. La transmission » de l'introduction développe ces idées.

4. Objectifs de la thèse

L'objectif général de ma thèse est de déterminer si le phénomène d'AT existe pour les potyvirus puis de caractériser les différentes étapes qui la composent. La finalité de mon sujet de thèse est d'acquérir de nouvelles connaissances sur le déroulement du processus de transmission des potyvirus par les pucerons. Ainsi, il serait possible d'envisager de nouvelles perspectives de lutte contre la propagation de ces virus en ciblant des étapes de l'AT.

La première partie de ma thèse consiste à caractériser les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'AT d'un potyvirus, le TuMV. Cette partie montre que l'AT du TuMV est activée par les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et dépendante de la signalisation calcique. De plus, cette AT est corrélée avec la formation d'oligomères par ponts disulfures du facteur assistant de la transmission HC-Pro et avec la formation de complexes transmissibles composés de particules de TuMV et de HC-Pro.

La deuxième partie compare l'AT identifiée pour le CaMV avec celle caractérisée pour le TuMV. Cette partie met en évidence des étapes communes et des étapes très différentes pour l'acquisition et l'AT de ces deux virus.

La troisième partie est consacrée à l'identification d'un ou plusieurs éliciteur(s) produits par le puceron ou induit(s) par son arrivée sur la plante. Ce ou ces éliciteurs déclencheraient une signalisation chez la plante qui serait captée par le virus TuMV pour activer sa transmission. Des candidats ont été testés à plusieurs niveaux : protéines de dégradation de la paroi, protéines salivaires du puceron, stress de la membrane plasmique. Ces recherches n'ont pas permis d'identifier un éliciteur de l'AT du TuMV. Cette partie nécessiterait des collaborations avec d'autres équipes de recherche ou la mise au point de techniques sur mesure pour trouver un éliciteur de ce phénomène ; autant de perspectives qui sont proposées et discutées.

CHAPITRE 1 : Le TuMV active sa transmission en détournant les réponses de la plante

1. Mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la transmission du TuMV

1.1. Contexte et objectif

Une étude a révélé que le CaMV contribuait activement à sa transmission (Martinière *et al.*, 2013). Ce virus forme précisément au moment de l'arrivée de son vecteur des formes virales spécifiques pour la transmission, les complexes transmissibles, qui sont acquis et transmis par le vecteur. Les complexes transmissibles sont donc générés suite à la détection du vecteur par la plante. Nous assumons que la plante met en place des mécanismes de signalisation et de défense qui vont modifier l'environnement cellulaire dans lequel se trouve le virus. Ces modifications intracellulaires vont induire la formation des complexes transmissibles du CaMV qui n'existent pas dans les cellules infectées avant l'arrivée du vecteur. Ce phénomène est maintenant nommé « activation de la transmission » (Drucker et Then, 2015). Cette découverte majeure soulève de nombreuses questions et l'une d'entre elles constitue le point de départ de mes recherches dans la première partie de ma thèse : L'AT existe-t-elle chez d'autres virus pour stimuler leur transmission ?

Pour répondre à cette question, je me suis intéressée au TuMV, un virus non apparenté au CaMV, mais similairement transmis par puceron de manière non circulante, selon la stratégie moléculaire « facteur assistant de la transmission ». L'interaction TuMV-puceron dépend de l'implication directe de deux protéines virales, la CP et HC-Pro (Blanc *et al.*, 1997 ; Blanc *et al.*, 1998). En effet, ces deux protéines forment un complexe et HC-Pro crée un lien moléculaire entre la particule virale et un récepteur encore non-identifié dans les stylets du puceron. D'autres travaux ont mis en évidence que la protéine HC-Pro se trouve sous forme oligomérique dans les cellules des plantes infectées. Cet état d'oligomère est considéré comme la forme biologiquement active de HC-Pro dans la transmission du TuMV par les pucerons (Plisson *et al.*, 2003 ; Ruiz-Ferrer *et al.*, 2005 ; Thornbury *et al.*, 1985).

Afin d'identifier si les mécanismes d'acquisition du TuMV comprennent un phénomène qui pourrait être qualifié d'AT, des tests de transmission par les pucerons à partir de protoplastes ont été réalisés. Différents réactifs mimant des mécanismes de signalisation et de défenses dans la plante ont été expérimentés lors de ces tests. A l'issue de ces résultats, j'ai pu confirmer l'existence de l'AT pour le TuMV. L'étape suivante a donc été d'identifier les

formes du TuMV spécifiques à sa transmission. Pour y parvenir, plusieurs expériences ont été menées *in vivo* sur les protéines CP et HC-Pro. Tout d'abord, des tests d'immunomarquage ont été réalisés pour déterminer la localisation de ces deux protéines. Ensuite, des expériences d'interaction protéine-protéine ont été effectuées pour évaluer les interactions entre CP et HC-Pro. Enfin, des western blot ont été réalisés pour identifier des modifications post-traductionnelles sur ces deux protéines. L'ensemble des résultats obtenus sont présentés dans l'article ci-dessous, soumis pour publication à *Journal of Virology* en 2018.

1.2. ARTICLE 1: *Turnip mosaic virus* is a second virus to use transmission activation for plant-to-plant propagation by aphids

1 Turnip mosaic virus is a second example of a virus using transmission
2 activation for plant-to-plant propagation by aphids

3 Edwige Berthelot ^{a,b,c}, Marie Ducouso ^a, Jean-Luc Macia ^a, Florent Bogaert ^d, Volker Baecker ^e,
4 Gaël Thébaud ^a, Romain Gallet ^a, Michel Yvon ^a, Stéphane Blanc ^a, Mounia Khelifa ^{b,c,#}, Martin
5 Drucker ^{a,d,#}

6 ^a BGPI, INRA Centre Occitanie, SupAgro, CIRAD, Université de Montpellier, Montpellier,
7 France

8 ^b Semences Innovation Protection Recherche et Environnement, Achicourt, France

9 ^c Fédération Nationale des Producteurs de Plants de Pomme de Terre, Paris, France

10 ^d SVQV, INRA Centre Grand Est, Université de Strasbourg, Colmar,

11 ^e France Montpellier Ressources Imagerie, Biocampus Montpellier, CNRS, INSERM, Université
12 de Montpellier, Montpellier, France[#]

13 Corresponding authors. E-mail mounia.khelifa@u-picardie.fr and martin.drucker@inra.fr

14 **Abstract**

15 Cauliflower mosaic virus (CaMV, family *Caulimoviridae*) responds to the presence of aphid vectors
16 on infected plants by forming specific transmission morphs. This phenomenon, coined
17 transmission activation (TA), controls plant-to-plant propagation of CaMV. A fundamental
18 question is whether other viruses rely on TA. Here, we demonstrate that transmission of the
19 unrelated Turnip mosaic virus (TuMV, family *Potyviridae*) is activated by the reactive oxygen
20 species H₂O₂ and inhibited by the calcium channel blocker LaCl₃. H₂O₂-triggered TA manifested
21 itself by the induction of intermolecular cysteine bonds between viral HC-Pro molecules and by
22 formation of viral transmission complexes, composed of TuMV particles and HC-Pro that
23 mediates vector-binding. Consistently, LaCl₃ inhibited intermolecular HC-Pro cysteine bonds and
24 HC-Pro interaction with viral particles. These results show that TuMV is a second virus using TA
25 for transmission, but using an entirely different mechanism than CaMV. We propose that TuMV
26 TA requires ROS and calcium signaling and that it is operated by a redox switch.

27 **Importance**

28 Transmission activation, i.e. a viral response to the presence of vectors on infected hosts that
29 regulates virus acquisition and thus transmission, is an only recently described phenomenon. It
30 implies that viruses contribute actively to their transmission, something that has been shown
31 before for many other pathogens but not for viruses. However, transmission activation has been
32 described so far for only one virus, and it was unknown whether other viruses rely also on
33 transmission activation. Here we present evidence that a second virus uses transmission
34 activation, suggesting that it is a general transmission strategy.

35 **Key words**

36 Plant virus; aphid vector; host plant; virus transmission; virus vector host interactions; reactive
37 oxygen species; calcium; signaling

38 **Abbreviations**

39 CaMV, cauliflower mosaic virus; TuMV, turnip mosaic virus; TA, transmission activation; ROS,
40 reactive oxygen species; TB, transmission body; HC, helper component; HC-Pro, helper
41 component protease; CP, capsid protein

42 Introduction

43 Transmission is an obligatory step in the life cycle of parasites but it is also an Achilles's heel,
44 because parasites must leave the comparably comfortable environment of the host they are
45 installed in, and face a potentially adverse environment during the passage to a new host. Some
46 pathogens rely on resistant dormant states like spores to persist in the "wild" until they reach a
47 new host passively, e.g. carried by the wind. Most pathogens, however, actively use vectors for
48 transmission and they can manipulate both hosts and vectors in an impressive number of ways,
49 all potentially increasing transmission (1–4). In the most sophisticated cases, pathogens "*use*
50 *exquisitely controlled mechanisms of environmental sensing and developmental regulation to ensure their*
51 *transmission*" (5). This concept, implying active contribution of the pathogen, is widely accepted
52 for eukaryotic parasites (for example plasmodium, shistosoma, wucheraria, microcoelium), which
53 developed fascinating transmission cycles to control and adapt vector-host or primary-secondary
54 host interactions for their propagation (4). We have recently discovered a remarkable
55 phenomenon for a virus. Cauliflower mosaic virus (CaMV, family *Caulimoviridae*) responds to the
56 presence of aphid vectors on infected host plants by forming transmission morphs at the exact
57 time and location of the plant-aphid contact (6). This process, coined Transmission Activation or
58 TA (7), is characterized by the formation of transmission complexes between CaMV virus
59 particles and the transmission helper component (HC), the CaMV protein P2, which mediates
60 vector-binding (1). P2 and virus particles are spatially separated in infected cells since the cell's
61 pool of P2 is retained in specific cytoplasmic inclusions called transmission bodies (TBs) while
62 most virus particles are contained in another type of viral inclusion, the virus factories (8, 9). In
63 such cells, aphid punctures trigger instant disruption of TBs and the liberated P2 relocates onto
64 microtubules. Simultaneously, the virus factories release virus particles that associate with P2 on
65 the microtubules (10) to form P2/virus particle complexes, which is the virus form that aphid
66 vectors can acquire and transmit. TA is transient; P2 reforms a new TB (6) and the virus particles
67 return to virus factories (10) after aphid departure. TA implies that CaMV passes, induced by yet
68 unknown mechanisms, from a non-transmissible to a transmissible state. It has been suggested
69 that this phenomenon exists to economize host resources and to invest energy in transmission
70 only when relevant, i.e. in the presence of vectors (7). Whether this hypothesis is true or not,
71 inhibiting TA inhibits transmission, pointing to the importance of TA for CaMV. A fundamental
72 question that arises is whether TA, which is reminiscent of the active transmission strategies
73 employed by eukaryotic parasites, is exclusive to CaMV or whether it could be a general
74 phenomenon in the virus world. Therefore, we studied transmission of the turnip mosaic virus
75 (TuMV, family *Potyviridae*), which is entirely unrelated to CaMV, but uses also an HC for aphid

76 transmission. The HC of TuMV and of other potyviruses is the viral protein helper component
77 protease (HC-Pro). It is a multifunctional protein that other its HC function bears no structural,
78 functional or other similarity with P2. Our results show that TuMV is a second virus relying on
79 TA for transmission, but using a totally different mechanism.

80 **Results and discussion**

81 *Signaling molecules modify TuMV transmission by aphids*

82 TA requires a signaling cascade that connects the initial recognition of the presence of aphids,
83 most likely via a yet unknown elicitor, with a cellular response that is hijacked by the virus. Since
84 TA is fast for CaMV and likely also for TuMV, which uses the same transmission mode, reactive
85 oxygen species (ROS) or calcium are good signaling candidates. We therefore tested the effect of
86 the ROS signaling compound hydrogen peroxide (H_2O_2), and of a general inhibitor of calcium
87 signaling, lanthanum(III)chloride ($LaCl_3$), on TuMV transmission, using infected protoplasts as
88 virus source (6, 11). Aphid transmission tests performed with H_2O_2 -treated protoplasts showed a
89 drastic increase of TuMV transmission (Figure 1A) whereas treatment of protoplasts with $LaCl_3$
90 caused a strong reduction of transmission (Figure 1B). This effect was not due to modified cell
91 viability (Figure 1C,D). Furthermore, transmission increase by H_2O_2 and inhibition by $LaCl_3$ was
92 clearly a biological effect requiring living cells, since no effect was observed when the
93 experiments were repeated using cell extracts, i.e. dead cells (Figure 1E,F). The same control
94 experiments indicate also that H_2O_2 and $LaCl_3$ did not modify aphid feeding behavior, which
95 might have been an alternative explanation for the observed differences in transmission rates.
96 Taken together, our data show that TuMV transmission can be artificially enhanced or inhibited.

97 The protoplast system is a useful but simplified biological system because the cells are
98 individualized and not in their natural symplasmic context in a tissue. Hence, we sought to
99 validate the protoplast results by using leaves on intact infected plants as virus source. We applied
100 H_2O_2 or $LaCl_3$ to leaves by spraying treatment (12) and used these plants for aphid transmission
101 assays. To rule out any interference, only one leaf of the same developmental stage was sprayed
102 on each plant and different plants were used for each condition. H_2O_2 treatment increased
103 significantly and $LaCl_3$ treatment decreased significantly plant-to-plant transmission rates of
104 TuMV (Figure 1G,H). This confirmed the results obtained with protoplasts and showed that
105 TuMV TA is observed similarly in intact plants. Compared to the protoplast experiments, higher
106 H_2O_2 and $LaCl_3$ concentrations were required to observe significant effects. This was probably
107 due to dilution of these substances during leaf penetration. Combined, these results suggest that

108 the TA phenomenon exists for TuMV, like for CaMV, and that calcium and ROS signaling might
109 be important for TA of TuMV.

110 *The increase in virus transmission correlates with the formation of HC-Pro/TuMV transmissible complexes*

111 Next, we wanted to know how TuMV TA manifests itself in infected cells. TA of CaMV is
112 characterized by relocalization of CaMV particles and CaMV helper protein P2 from viral
113 inclusions to microtubules (6, 10). Therefore, we performed immunofluorescence experiments on
114 TuMV-infected protoplasts with antibodies directed against HC-Pro and the viral capsid protein
115 CP to determine whether H₂O₂ and LaCl₃ induced relocalization of TuMV virus particles and/or
116 HC-Pro. In untreated cells, HC-Pro and CP localized in the cytoplasm as reported for other
117 potyviruses (13, 14). Treatment with H₂O₂ and LaCl₃ did not induce any visible rearrangement of
118 HC-Pro or of CP (Figure 2). Thus, TA of TuMV is not characterized by the redistribution of
119 HC-Pro and/or virus particles within infected cells.

120 We thus hypothesized that HC-Pro and virus particles, both evenly distributed in the cytoplasm,
121 could pass from a non-associated state to an associated state, i.e. to transmissible HC-Pro-virion
122 complexes, upon TA. To visualize such complexes *in situ*, we resorted to the Duolink® technique
123 (15), an antibody-based version of the proximity ligation assay allowing detection of
124 intermolecular interactions. Duolink® performed with HC-Pro and CP antibodies showed that
125 H₂O₂ treatment indeed increased the number and intensity of HC-Pro/CP interaction spots
126 (Figure 3A,B), indicative of binding of HC-Pro to virus particles. Interestingly, incubation of
127 protoplasts with LaCl₃ decreased the number of transmissible complexes (Figure 3C). Thus, the
128 increase and decrease of HC-Pro/CP interactions, triggered by application of ROS or of a
129 calcium channel blocker, respectively, correlated with an increase and decrease of transmission
130 (compare Figures 1 and 3).

131 *Transmission activation of TuMV is characterized by formation of cysteine bridges between HC-Pro molecules*

132 We wanted to understand how HC-Pro and virus particles could rapidly transit from “free” to
133 virus-associated forms. Since ROS like H₂O₂ change directly or indirectly the cellular redox
134 potential, the formation of HC-Pro/TuMV transmissible complexes might be controlled by the
135 redox state of HC-Pro and CP, both of which contain cysteine residues that can form disulfide
136 bridges under oxidizing conditions. Therefore, we performed non-reducing SDS-PAGE/Western
137 blots to detect HC-Pro and CP migration profiles altered by intramolecular or intermolecular
138 cysteine disulfide bridges. H₂O₂ and LaCl₃ did not modify the migration profile of CP (Figure 4A).
139 However, H₂O₂ treatment increased the amount of oligomeric HC-Pro and especially of its

140 dimeric form (Figure 4B) that was previously reported to be active in transmission (16–18). LaCl_3
141 treatment had the inverse effect and decreased the amount of HC-Pro oligomers (Figure 4B).
142 The effect of H_2O_2 was concentration-dependent and clearly visible using physiologic H_2O_2
143 concentrations (0.25 mM, Figure 4C). Thus, the increase in transmission induced by H_2O_2
144 correlated not solely with formation of HC-Pro/TuMV complexes, but also with the appearance
145 of HC-Pro oligomers hold together by intermolecular cysteine bridges.

146 To have a biological significance, HC-Pro oligomerization should be completed within the
147 duration of an aphid puncture, i.e. within seconds. Kinetics of formation and breakup of HC-Pro
148 oligomers showed that both occurred within 5 seconds of incubation with H_2O_2 and LaCl_3 ,
149 respectively (Figure 4D,E). The effect of both treatments was transient because HC-Pro
150 oligomers disappeared (H_2O_2) or reappeared (LaCl_3) after ~ 30 min incubation. Furthermore,
151 removal of H_2O_2 by washing protoplasts showed reversibility of HC-Pro oligomerization (Figure
152 4D). Induction of HC-Pro oligomers by H_2O_2 was not restricted to TuMV or to turnip hosts,
153 because experiments with lettuce protoplasts infected with another potyvirus, *Lettuce mosaic virus*,
154 yielded similar results (not shown).

155 To better establish that formation of disulfide bridges between HC-Pro monomers contributes to
156 oligomerization, infected protoplasts were treated with the disulfide bonds-reducing agent
157 dithiothreitol (DTT) or with N-ethylmaleimide (NEM) that does not break existing disulfide
158 bridges but prevents formation of new ones by blocking free thiols. Figure 4F shows that DTT
159 treatment abolished appearance of H_2O_2 -induced HC-Pro oligomers in SDS-PAGE/Western
160 blot. This confirmed that oligomerization of HC-Pro requires establishment of intermolecular
161 disulfide bridges. NEM treatment blocked the appearance of HC-Pro oligomers in SDS-
162 PAGE/Western blots when applied before the H_2O_2 treatment, but NEM did not prevent their
163 appearance when applied after H_2O_2 treatment (Figure 4G). This is a further confirmation of the
164 involvement of disulfide bridges in HC-Pro oligomerization. Note that NEM treatment caused a
165 mobility shift of HC-Pro. This might have been due to disulfide shuffling during denaturation of
166 the samples as reported for papilloma virus (19). To establish a direct role of intermolecular HC-
167 Pro disulfide bonds in TuMV transmission, we performed transmission assays. Because of the
168 toxicity of NEM, we did not use plants as virus source but resorted to the protoplast system
169 where exposure of aphids (and the experimenter) to the substance is minimized by confining it in
170 the protoplast medium. The NEM treatment reduced virus transmission drastically (Figure 4H)
171 but did not affect protoplast viability (Figure 4I), suggesting that *de novo* formation of

172 intermolecular HC-Pro disulfide bonds is required for formation of transmissible complexes and
173 thus for aphid acquisition of TuMV.

174 *Model of TuMV transmission activation*

175 In this study, we demonstrate that TA exists for a second virus, TuMV. TuMV TA was induced
176 by the ROS H₂O₂ and inhibited by the calcium channel blocker LaCl₃, ROS and calcium signaling
177 are both important in early perception of parasites including insects (20) and recently aphid
178 punctures were described to induce rapid calcium elevations around feeding sites (21). Since ROS
179 and calcium signaling are often interconnected (22, 23), TuMV TA likely hijacks an early step of
180 at least one of these pathways. The initial eliciting event remains unknown. It might be a direct
181 effect of aphid saliva-contained ROS or ROS-producing peroxidases (24) that are injected into
182 cells during feeding activity. Alternatively, an aphid or aphid-induced plant factor might interact
183 in a classic pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity reaction with a
184 pattern recognition receptor (PRR) (25) that prompts calcium and ROS mediated downstream
185 events. Interestingly, a recent study has demonstrated that the red clover necrotic mosaic virus
186 (RCNMV) requires ROS for replication (26). The authors proposed that plant viruses may have
187 evolved a complex mechanism to manipulate the ROS-generating machinery of plants to
188 improve their infectivity, or, transferred to this case, transmission.

189 TA of TuMV manifests itself by creation of HC-Pro intermolecular disulfide bridges, driven by
190 oxidation of the cellular redox potential. We propose that oxidation of HC-Pro induces a
191 functional switch rendering HC-Pro able to interact with virus particles and form transmissible
192 complexes (Figure 5). Functional switching (moonlighting) by redox-driven modification of
193 disulfide bridges has been reported for other proteins and is operated by conformation changes
194 affecting the secondary, tertiary or quaternary structure of proteins (27–29). Why would there be
195 such a switch? HC-Pro is a multifunctional protein involved not only in aphid transmission (30)
196 but also in pathogenicity (31), viral movement (32) and suppression of plant RNA silencing (33–
197 35). One (or more) functional switches could assist to coordinate these multiple functions by
198 allowing interaction with virions and formation of transmissible complexes only when
199 transmission is possible, i.e. when the aphids puncture cells This would help to economize finite
200 plant resources as proposed earlier (7).

201 Unfortunately, we cannot provide an empirical proof that the aphid punctures directly trigger
202 TuMV TA. In contrast to CaMV, where TA was directly visible using qualitative
203 immunofluorescence observation of P2 and virus particle networks (the characteristic

204 manifestation of CaMV TA) in cells in contact with aphid saliva sheaths, TuMV TA cannot be
205 revealed by a qualitative analysis. The quantitative Duolink® approach we used to demonstrate
206 TuMV HC-Pro/CP interactions in protoplasts required an enormous number of cells for analysis
207 and statistical validation. Identifying a comparable number of cells in tissue and in contact with
208 aphid stylets is barely feasible. The same restrictions apply to electron microscopy techniques to
209 localize HC-Pro on virus particles by immunogold labeling. Thus, proof of aphid implication in
210 TA of TuMV remains indirect, for the time being.

211 Nonetheless, we here demonstrate TA for a second virus, TuMV, different from CaMV,
212 suggesting that transmission activation might be a more general phenomenon. The great
213 phylogenetic distance between TuMV and CaMV makes it likely that the phenomenon of TA
214 arose independently for the two viruses during evolution. An obvious question is whether yet
215 other viruses use TA for their transmission.

216 **Materials and methods**

217 Plants, viruses and inoculation

218 Turnip plants (*Brassica rapa* cv. Just Right) and lettuce (*Lactuca sativa* cv. Mantilla and Trocadero)
219 were grown in a greenhouse at 24/15 °C day/night with a 14/10 h day/night photoperiod. Two-
220 weeks-old turnip plants were mechanically inoculated with wild-type TuMV strain C42J (36), and
221 two-weeks-old lettuce plants with *Lettuce mosaic virus* (LMV) strain E (37). Plants were used for
222 experiments at 14 days post inoculation (dpi).

223 Isolation of protoplasts

224 Protoplasts from turnip leaves were obtained by enzymatic digestion as described (6).

225 Preparation of infected cell extracts

226 TuMV-infected turnip protoplasts were sedimented and resuspended in SAKO buffer (500 mM
227 KPO₄ and 10 mM MgCl₂ pH 8.5) (38). Then sucrose was added to a final concentration of 15 %
228 and the suspension was vortexed to homogenize protoplasts.

229 Drug treatments and cell viability assay

230 For drug treatments of protoplasts, the following substances were added from stock solutions for
231 the indicated times to 500 µl of protoplast suspension: 1 mM LaCl₃ (5 min), 2 mM H₂O₂ (5 min),

232 3 mM NEM (20 min), 5 mM DTT (30 min). Protoplasts were incubated at room temperature
233 with gentle stirring (5 rpm). 15 min after treatments, protoplast viability was determined with the
234 FDA test (39). For drug treatments of plants, one leaf per plant was sprayed with 10 mM LaCl₃,
235 20 mM H₂O₂ or with water, and the leaf, still attached to the plant, used for transmission
236 experiments after the applied solutions had evaporated.

237 Aphid transmission tests

238 A nonviruliferous clonal *Myzus persicae* colony was reared under controlled conditions (22/18 °C
239 day/night with a photoperiod of 14/10 h day/night) on eggplant. The transmission tests using
240 protoplasts were performed as described (6), with an acquisition access period of 15 min and
241 transferring 10 aphids to each test plant. For plant-to-plant transmission tests, an acquisition time
242 of 2 min was used and only one aphid was transferred on each turnip plant for inoculation.
243 Infected plants were identified by visual inspection for symptoms 3 weeks after inoculation.

244 Antisera

245 The following primary antibodies were used: commercial rabbit anti-TuMV (sediag.com) and
246 mouse and rabbit anti-HC-Pro (recognizing HC-Pro from different potyviruses, produced against
247 the conserved peptide SEIKMPTKHHHLVIGNSGDPKYIDL P by proteogenix.fr and
248 eurogentec.com, respectively). The following secondary antibodies were used: Alexa Fluor 488
249 and 594 anti-rabbit and anti-mouse conjugates (thermofisher.com) for immunofluorescence, anti-
250 rabbit IgG conjugated to alkaline phosphatase (www.sigmaaldrich.com) for western blotting and
251 corresponding Minus and Plus probes (www.sigmaaldrich.com) for Duolink®.

252 Immunofluorescence

253 Protoplasts were fixed with 1 % glutaraldehyde and processed as described (6). The primary and
254 secondary antibodies were used at 1:100 and 1:200 dilutions, respectively.

255 Western blotting

256 Drug treatments of protoplasts were stopped by lysing protoplasts in non-reducing 2x Laemmli
257 buffer (v/v) (40) except where indicated otherwise. Optionally, oligomer formation was stabilized
258 by incubating protoplasts with 3 mM NEM for 20 min before lysis. This step yielded sharper
259 oligomer bands. Samples were then resolved by 10 % SDS-PAGE. Proteins were transferred to
260 nitrocellulose membranes and incubated with primary and secondary antibodies as described (6)

261 except that TuMV-specific primary antibodies (1:1000 dilution) were used. Antigens were then
262 revealed by the NBT/BCIP reaction. Equal protein charge on the membranes was verified by
263 coloring the RuBisCO with Ponceau S Red.

264 Duolink® proximity ligation assay

265 *In situ* protein/protein interactions were detected by proximity ligation assay using the Duolink®
266 kit (www.sigmaaldrich.com). Protoplasts were isolated from healthy or infected (14 dpi) turnip
267 leaves and fixed with 3 % paraformaldehyde in 100 mM cacodylate buffer (pH 7.2) or 100 mM
268 phosphate buffer (pH 7.4). The fixed protoplasts were immobilized on L-polylysine-coated slides.
269 Antibody incubation with rabbit anti-TuMV and mouse anti-HC-Pro, ligation and probe
270 amplification were performed according to the manufacturer's instructions. The slides were
271 mounted with Duolink® *in situ* mounting medium with DAPI (www.sigmaaldrich.com).

272 Microscopy

273 Immunolabeled protoplasts were observed with an Olympus BX60 epifluorescence microscope
274 (olympus-lifescience.com) equipped with GFP and Texas Red narrow band filters and images
275 acquired with a color camera. Duolink® images were acquired with a Zeiss LSM700 confocal
276 microscope (zeiss.com) operated in sequential mode. DAPI was excited with the 405 nm laser and
277 fluorescence collected from 405-500 nm, Duolink® probes and chlorophyll were excited with the
278 488 nm laser and fluorescence collected from 490-540 nm (Duolink® signal) or from 560-735 nm
279 (chlorophyll autofluorescence). Raw images were processed using ZEN or ImageJ software.
280 Quantification of Duolink® interactions was performed on maximum intensity projections with
281 the Analyse_Spots_Per_Protoplast macro for ImageJ, developed for this experiment (41).

282 Statistical analysis

283 Statistics and box plots were calculated with R software version 3.4.0 (r-project.org).
284 Transmission rates and cell viability were analyzed with generalized linear models (GLM). Quasi-
285 binomial distributions were used in order to take overdispersion into account, and p-values were
286 corrected with the Holm method (42) to account for multiple comparisons.

287 Analyzing the Duolink® experiments required the calculation of the total fluorescence intensity
288 (F_{tot}) of labeled foci as:

289

290
$$F_{tot} = \frac{n \times \bar{s} \times \bar{I}}{A}$$

291

292 where n is the number of labeled foci, \bar{s} the average size of a focus, \bar{I} the average fluorescence
293 intensity of a focus and A the size of the protoplast. F_{tot} was log-transformed (to normalize the
294 distribution) and analyzed with linear models using “treatment” and “replicate” as categorical
295 explanatory variables.

296 References

- 297 1. Blanc S, Drucker M, Uzest M. 2014. Localizing viruses in their insect vectors. *Annu Rev*
298 *Phytopathol* 52:403–425.
- 299 2. Dáder B, Then C, Berthelot E, Ducouso M, Ng JCK, Drucker M. 2017. Insect transmission of
300 plant viruses: Multilayered interactions optimize viral propagation. *Insect Sci* 24:929–946.
- 301 3. Kuno G, Chang G-JJ. 2005. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new
302 insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clin*
303 *Microbiol Rev* 18:608–637.
- 304 4. Lefèvre T, Adamo SA, Biron DG, Missé D, Hughes D, Thomas F. 2009. Invasion of the body
305 snatchers: the diversity and evolution of manipulative strategies in host-parasite interactions. *Adv*
306 *Parasitol* 68:45–83.
- 307 5. Matthews KR. 2011. Controlling and coordinating development in vector-transmitted parasites.
308 *Science* 331:1149–1153.
- 309 6. Martinière A, Bak A, Macia J-L, Lautredou N, Gargani D, Doumayrou J, Garzo E, Moreno A,
310 Fereres A, Blanc S, Drucker M. 2013. A virus responds instantly to the presence of the vector on the
311 host and forms transmission morphs. *eLife* 2:e00183.
- 312 7. Drucker M, Then C. 2015. Transmission activation in non-circulative virus transmission: a general
313 concept? *Curr Opin Virol* 15:63–68.

- 314 8. Drucker M, Froissart R, Hébrard E, Uzest M, Ravallec M, Espérandieu P, Mani J-C, Pugnère M,
315 Roquet F, Fereres A, Blanc S. 2002. Intracellular distribution of viral gene products regulates a
316 complex mechanism of cauliflower mosaic virus acquisition by its aphid vector. *Proc Natl Acad Sci*
317 *USA* 99:2422–2427.
- 318 9. Espinoza AM, Medina V, Hull R, Markham PG. 1991. Cauliflower mosaic virus gene II product
319 forms distinct inclusion bodies in infected plant cells. *Virology* 185:337–344.
- 320 10. Bak A, Gargani D, Macia J-L, Malouvet E, Vernerey M-S, Blanc S, Drucker M. 2013. Virus factories
321 of Cauliflower mosaic virus are virion reservoirs that engage actively in vector-transmission. *J Virol.*
- 322 11. Martinière A, Macia J-L, Bagnolini G, Jridi C, Bak A, Blanc S, Drucker M. 2011. VAPA, an
323 Innovative “Virus-Acquisition Phenotyping Assay” Opens New Horizons in Research into the
324 Vector-Transmission of Plant Viruses. *PLoS One* 6.
- 325 12. Peng H-C, Walker GP. 2018. Sieve element occlusion provides resistance against *Aphis gossypii* in
326 TGR-1551 melons. *Insect Sci.*
- 327 13. Baunoch DA, Das P, Hari V. 1990. Potato virus Y helper component protein is associated with
328 amorphous inclusions. *J Gen Virol* 71 (Pt 10):2479–2482.
- 329 14. Riedel D, Lesemann DE, Maiss E. 1998. Ultrastructural localization of nonstructural and coat
330 proteins of 19 potyviruses using antisera to bacterially expressed proteins of plum pox potyvirus.
331 *Arch Virol* 143:2133–2158.
- 332 15. Söderberg O, Gullberg M, Jarvius M, Ridderstråle K, Leuchowius K-J, Jarvius J, Wester K,
333 Hydbring P, Bahram F, Larsson L-G, Landegren U. 2006. Direct observation of individual
334 endogenous protein complexes in situ by proximity ligation. *Nat Methods* 3:995–1000.
- 335 16. Plisson C, Drucker M, Blanc S, German-Retana S, Le Gall O, Thomas D, Bron P. 2003. Structural
336 characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. *J Biol Chem* 278:23753–23761.

- 337 17. Ruiz-Ferrer V, Boskovic J, Alfonso C, Rivas G, Llorca O, López-Abella D, López-Moya JJ. 2005.
338 Structural analysis of tobacco etch potyvirus HC-pro oligomers involved in aphid transmission. *J*
339 *Virology* 79:3758–3765.
- 340 18. Thornbury DW, Hellmann GM, Rhoads RE, Pirone TP. 1985. Purification and characterization of
341 potyvirus helper component. *Virology* 144:260–267.
- 342 19. Modis Y, Trus BL, Harrison SC. 2002. Atomic model of the papillomavirus capsid. *EMBO J*
343 21:4754–4762.
- 344 20. Zebelo SA, Maffei ME. 2015. Role of early signalling events in plant-insect interactions. *J Exp Bot*
345 66:435–448.
- 346 21. Vincent TR, Avramova M, Canham J, Higgins P, Bilkey N, Mugford ST, Pitino M, Toyota M,
347 Gilroy S, Miller AJ, Hogenhout SA, Sanders D. 2017. Interplay of Plasma Membrane and Vacuolar
348 Ion Channels, Together with BAK1, Elicits Rapid Cytosolic Calcium Elevations in Arabidopsis
349 during Aphid Feeding. *Plant Cell* 29:1460–1479.
- 350 22. Jeworutzki E, Roelfsema MRG, Anschutz U, Krol E, Elzenga JTM, Felix G, Boller T, Hedrich R,
351 Becker D. 2010. Early signaling through the Arabidopsis pattern recognition receptors FLS2 and
352 EFR involves Ca-associated opening of plasma membrane anion channels. *Plant J* 62:367–378.
- 353 23. Lachaud C, Da Silva D, Amelot N, Béziat C, Brière C, Cotellet V, Graziana A, Grat S, Mazars C,
354 Thuleau P. 2011. Dihydrosphingosine-induced programmed cell death in tobacco BY-2 cells is
355 independent of H₂O₂ production. *Mol Plant* 4:310–318.
- 356 24. Miles PW. 1999. Aphid Saliva. *Biological Reviews* 74:41–85.
- 357 25. Jones JDG, Dangl JL. 2006. The plant immune system. *Nature* 444:323–329.
- 358 26. Hyodo K, Hashimoto K, Kuchitsu K, Suzuki N, Okuno T. 2017. Harnessing host ROS-generating
359 machinery for the robust genome replication of a plant RNA virus. *Proc Natl Acad Sci USA*
360 114:E1282–E1290.

- 361 27. Fan SW, George RA, Haworth NL, Feng LL, Liu JY, Wouters MA. 2009. Conformational changes
362 in redox pairs of protein structures. *Protein Sci* 18:1745–1765.
- 363 28. Mou Z, Fan W, Dong X. 2003. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1
364 function through redox changes. *Cell* 113:935–944.
- 365 29. Zaffagnini M, Fermani S, Costa A, Lemaire SD, Trost P. 2013. Plant cytoplasmic GAPDH: redox
366 post-translational modifications and moonlighting properties. *Front Plant Sci* 4:450.
- 367 30. Govier DA, Kassanis B. 1974. A virus induced component of plant sap needed when aphids acquire
368 potato virus Y from purified preparations. *Virology* 61:420–426.
- 369 31. Atreya CD, Atreya PL, Thornbury DW, Pirone TP. 1992. Site-directed mutations in the potyvirus
370 HC-Pro gene affect helper component activity, virus accumulation, and symptom expression in
371 infected tobacco plants. *Virology* 191:106–111.
- 372 32. Cronin S, Verchot J, Haldeman-Cahill R, Schaad MC, Carrington JC. 1995. Long-distance
373 movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell*
374 7:549–559.
- 375 33. Anandalakshmi R, Marathe R, Ge X, Herr JM, Mau C, Mallory A, Pruss G, Bowman L, Vance VB.
376 2000. A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants.
377 *Science* 290:142–4.
- 378 34. Brigneti G, Voinnet O, Li WX, Ji LH, Ding SW, Baulcombe DC. 1998. Viral pathogenicity
379 determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamiana*. *EMBO J* 17:6739–
380 6746.
- 381 35. Kasschau KD, Carrington JC. 1998. A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of
382 posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95:461–70.

- 383 36. Ohshima K, Tomitaka Y, Wood JT, Minematsu Y, Kajiyama H, Tomimura K, Gibbs AJ. 2007.
384 Patterns of recombination in turnip mosaic virus genomic sequences indicate hotspots of
385 recombination. *J Gen Virol* 88:298–315.
- 386 37. Revers F, Yang SJ, Walter J, Souche S, Lot H, Le Gall O, Candresse T, Dunez J. 1997. Comparison
387 of the complete nucleotide sequences of two isolates of lettuce mosaic virus differing in their
388 biological properties. *Virus Res* 47:167–177.
- 389 38. Sako N, Ogata K. 1981. Different helper factors associated with aphid transmission of some
390 potyviruses. *Virology* 112:762–765.
- 391 39. Widholm JM. 1972. The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining viability of
392 cultured plant cells. *Stain Technol* 47:189–194.
- 393 40. Laemmli UK. 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of
394 Bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685.
- 395 41. Baecker V. 2016. Analyse Spots Per Protoplast - ImageJ-macros - MRI's Redmine.
- 396 42. Holm S. 1979. A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Statist* 6:65–70.
- 397 43. Bak A, Martinière A, Blanc S, Drucker M. 2013. Early interactions during the encounter of plants,
398 aphids and arboviruses. *Plant Signal Behav* 8:e24225.

399 **Acknowledgments**

400 We are grateful to Takii Europe for providing turnip seeds. Our work is financed by INRA SPE
401 department, Agence Nationale de la Recherche (ANR) grant 12-BSV7-005-01, awarded to MD,
402 and grant RGP0013/2015 from Human Frontier Science Program (HFSP), awarded to MD. EB
403 is supported by CIFRE PhD fellowship N° 2015/1115, financed by Association Nationale
404 Recherche Technologie (anrt), Semences Innovation Protection Recherche et Environnement
405 (SIPRE) and Fédération Nationale des Producteurs de Plantes de Pomme de Terre (FN3PT). We
406 thank Albin Teulet for help with the box plots and Sophie Le Blaye for plant care. All authors
407 declare that there is no conflict of interest.

408 **Legends to Figures**

409 **Figure 1.** Effect of H₂O₂ and LaCl₃ on TuMV transmission by aphids. (A-B) Turnip protoplasts
410 were incubated for 5 min with 2 mM H₂O₂ (A) or 1 mM LaCl₃ (B) and then employed in
411 transmission assays. (C-D) Cell viability of protoplasts was measured to determine if the altered
412 transmission rates were due to modified viability. (E-F) Cell extracts from protoplasts were
413 treated identically with H₂O₂ (C) or LaCl₃ (D) and used in transmission assays. (G-H) Leaves on
414 intact plants were sprayed with 20 mM H₂O₂ (E) or 10 mM LaCl₃ (F) and then employed in
415 transmission assays. Means of infected test plants (horizontal black bars in the box plots) are
416 calculated from a pool of three independent experiments in which a total of 360 tests plants were
417 used per condition. Each experiment had 6 repetitions for each condition and 20 tests plants per
418 repetition (see Supplementary Data Set S1 for raw data). *p* designates p-values obtained by
419 generalized linear models (see materials and methods). The box plots here and in the other
420 figures present medians, upper and lower quartiles, the ends of the whiskers present lowest and
421 highest datum still within 1.5 IQR of the lower and higher quartile, respectively, and the circles
422 show outliers.

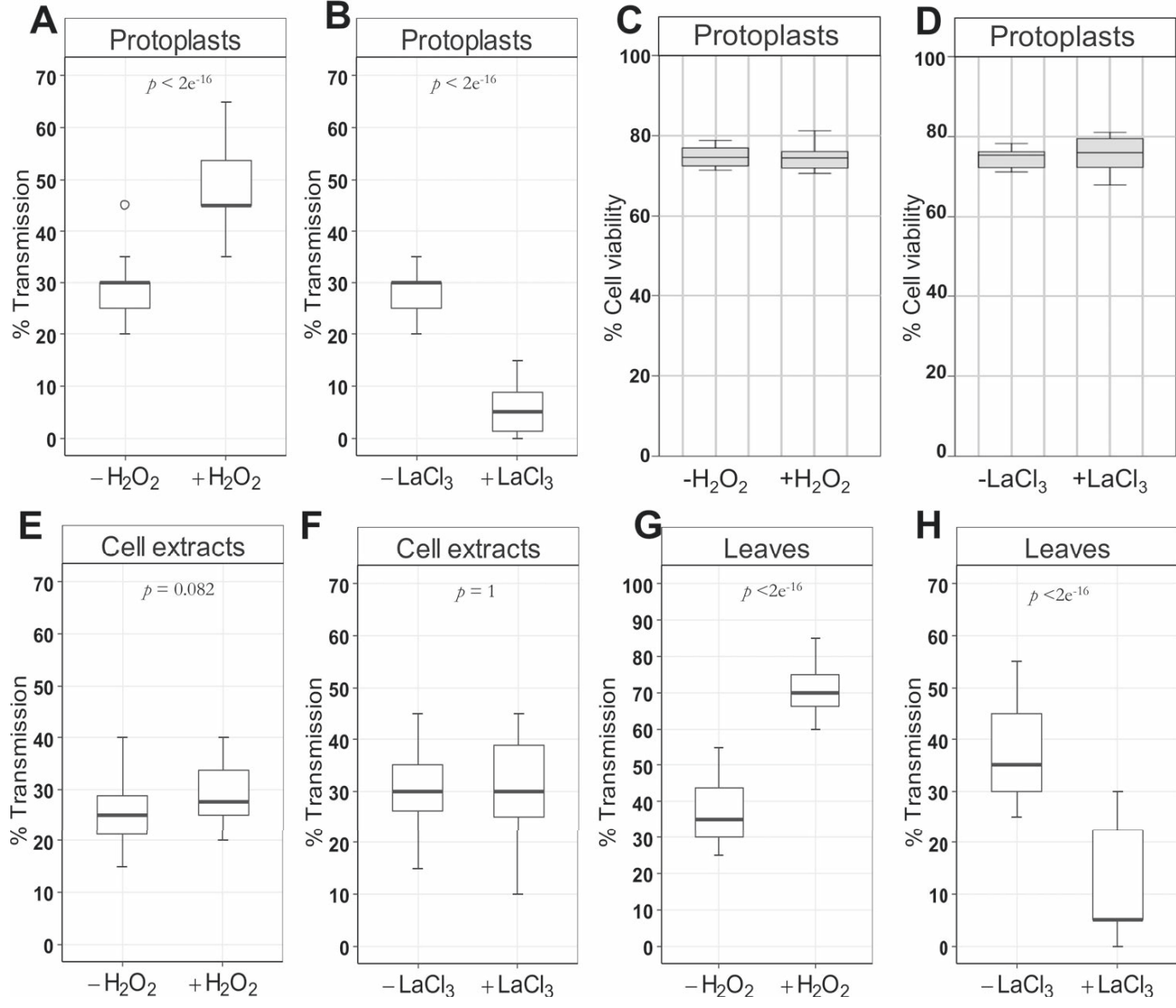
423 **Figure 2.** Immunofluorescence of turnip protoplasts infected with TuMV. TuMV-infected
424 protoplasts were treated as indicated and double-labeled against HC-Pro (green, first column) and
425 viral capsid protein CP (red, middle column). The right column (Merge) represents superposition
426 of HC-Pro and CP labels, with co-labeling appearing in yellow. Control, untreated protoplasts;
427 H₂O₂, incubation with 2 mM H₂O₂ for 15 min, LaCl₃, incubation with 1 mM LaCl₃ for 15 min.
428 Scale bars 50 μm.

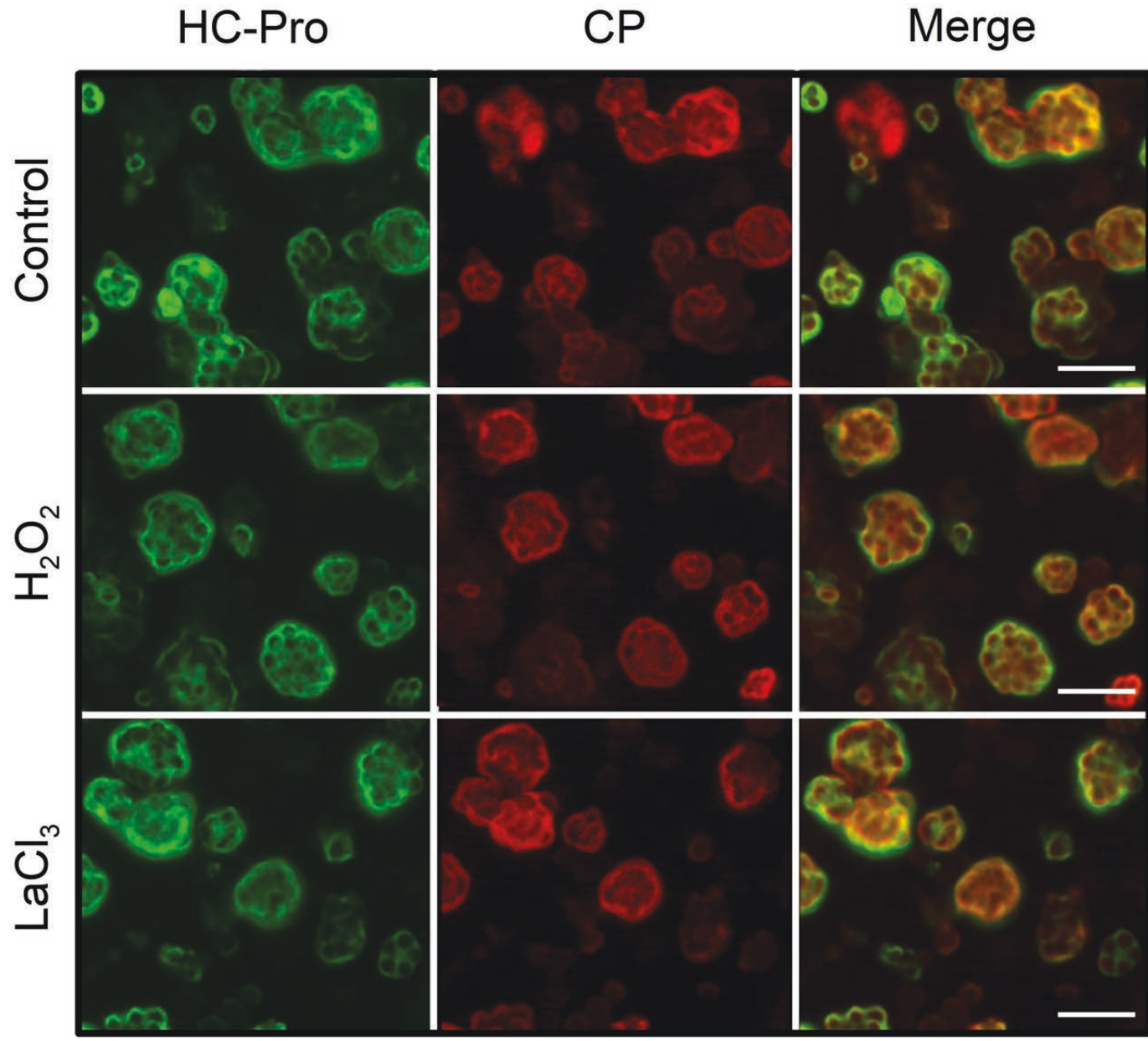
429 **Figure 3.** *In situ* Duolink® proximity ligation assay on turnip protoplasts infected with TuMV.
430 (A) Untreated control protoplasts or protoplasts incubated with either H₂O₂ or LaCl₃ were
431 processed by Duolink® for detection of HC-Pro/TuMV particle interactions using HC-Pro and
432 CP antibodies and corresponding Duolink® probes. Interactions are visible as green fluorescing
433 spots. Nuclei were counterstained with DAPI (blue) and chloroplast autofluorescence is
434 presented in grey to reveal the cell lumen. Scale bars: 20 μm. (B-C) Quantitative analysis of the
435 Duolink® signal shows that (B) H₂O₂ increased and (C) LaCl₃ decreased HC-Pro/CP interactions.
436 The box plots presents data from three independent experiments using between 56-115
437 protoplasts for each condition. The y-axes show HC-Pro/CP interactions, presented as total
438 fluorescent intensity (F_{int}). *p* designates p -values obtained by generalized linear models (see
439 material and methods).

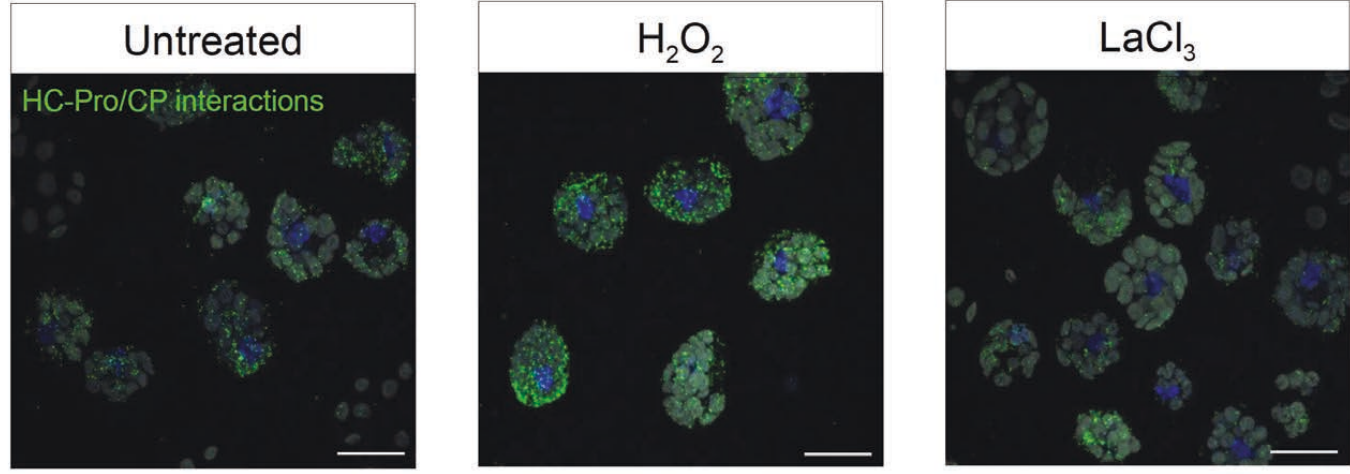
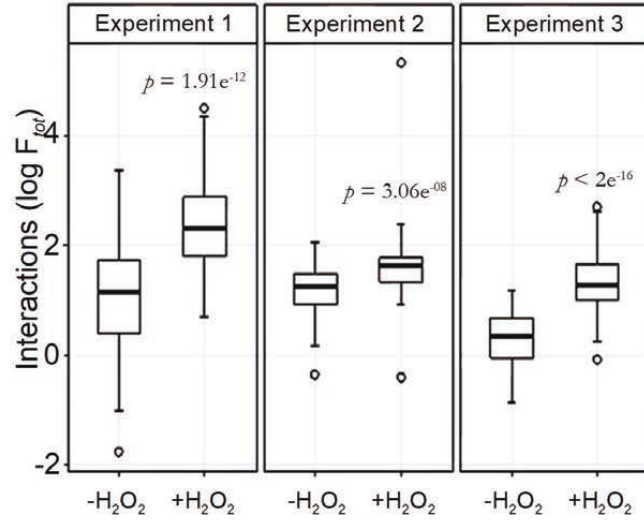
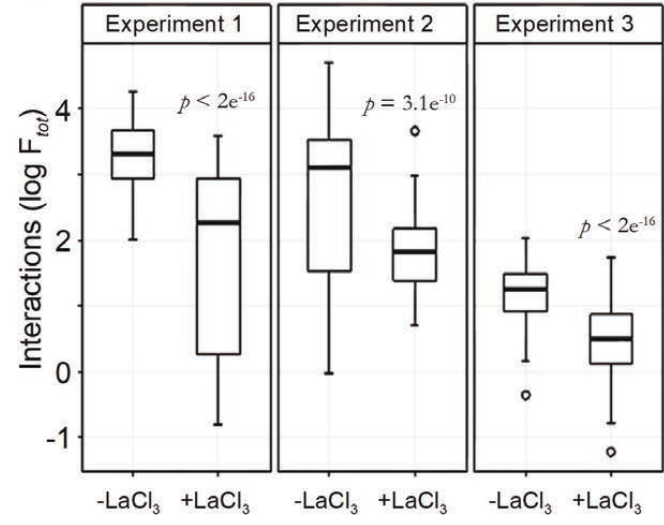
440 **Figure 4.** Non-reducing SDS-PAGE/Western blotting analysis of HC-Pro and CP from TuMV-
441 infected turnip protoplasts. The samples were lysed in a buffer without reducing agents to
442 conserve the disulfide bridges. (A) H_2O_2 and $LaCl_3$ treatments did not modify the migration
443 profile of the capsid protein (CP), whereas they (B) induced (H_2O_2) or inhibited ($LaCl_3$)
444 formation of HC-Pro oligomers. (C-D) The concentration range and the kinetics of H_2O_2
445 incubation shows that HC-Pro oligomerization (C) was induced by a minimum concentration of
446 0.25 mM and (D) that it was rapid and reversible, either by extended H_2O_2 treatment (left panel)
447 or by washing protoplasts (right panel). (E) Also inhibition of HC-Pro oligomerization by $LaCl_3$
448 was rapid and reversible. (F-G) HC-Pro oligomers are formed by intermolecular disulfide bridges
449 because (F) incubation of protoplasts with DTT, either alone or after H_2O_2 treatment, abolished
450 HC-Pro oligomers, and (G) treatment with NEM before but not after previous incubation with
451 H_2O_2 prevented their formation. (H) Transmission tests using NEM-treated protoplasts show a
452 drastic diminution of TuMV transmission. Transmission tests were performed three times using
453 320 plants per condition and analyzed by generalized linear models as described in Figure 1. (I)
454 Protoplast viability assays show that NEM treatment did not change cell viability under the
455 conditions used. TuMV, samples of TuMV-infected protoplasts; Non inf., samples of non
456 infected protoplasts; $LaCl_3$, treatment with 1 mM $LaCl_3$ for 5 min; H_2O_2 , treatment with 2 mM
457 H_2O_2 for 5 min; wash, H_2O_2 was removed by centrifugation and resuspension of protoplasts in
458 fresh medium; DTT, treatment with 5 mM DTT for 30 min; NEM, treatment with 3 mM NEM
459 for 20 min. Equal loading of lanes is shown by Ponceau Red staining of the large RuBisCO
460 subunit (Rub). A precolored ladder and the molecular masses in kDa are indicated at one side of
461 each blot. p in (H) designates p-value obtained by generalized linear models from three
462 independent experiments.

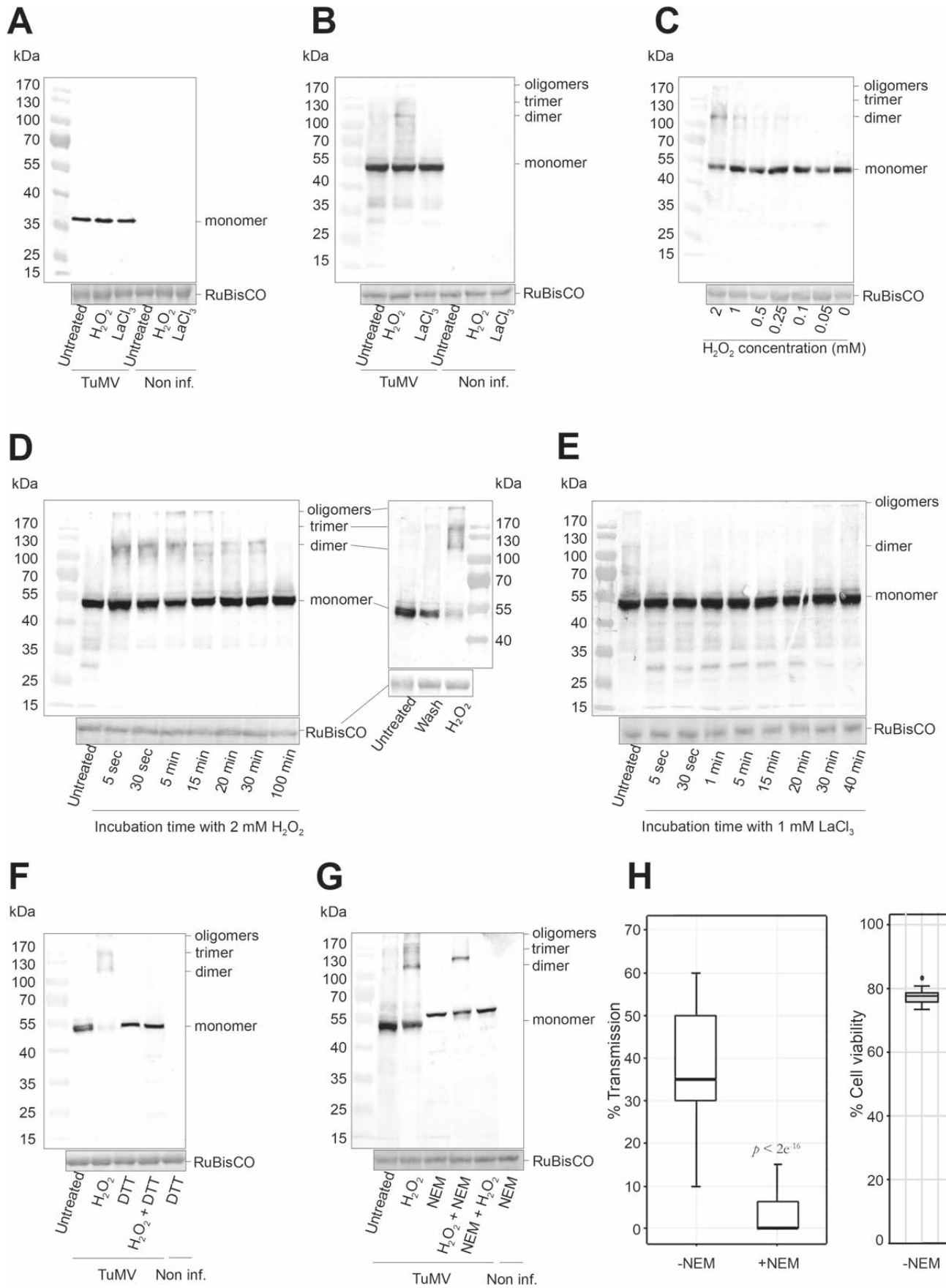
463 **Figure 5.** Model of TuMV acquisition by aphids. For simplicity, aphids, viral components and
464 the plant cell are not drawn to scale. (1) Before the arrival of aphid vectors, the redox potential of
465 the cytosol of TuMV-infected cells has ‘normal’ values, i.e. it is reduced. Consequently, the
466 cytosolic HC-Pro protein (blue circles) is in a reduced form (the red points in HC-Pro present
467 reduced cysteines) and contains no intermolecular disulfide bridges. This form of HC-Pro is
468 presumably not associated with virus particles (purple lines). It is likely but remains to be
469 confirmed whether reduced HC-Pro is dimeric as presented here. (2) When an aphid feeds on a
470 leaf infected with TuMV, an unknown elicitor is recognized by the plant cell and induces the
471 opening of calcium channels (pink cylinder) and triggers directly or indirectly ROS production in
472 the cell. During this activation stage, the ROS in the cytoplasm increases (red lightning) the redox
473 potential of the cell cytoplasm and oxidizes one or more HC-Pro cysteines. This oxidation

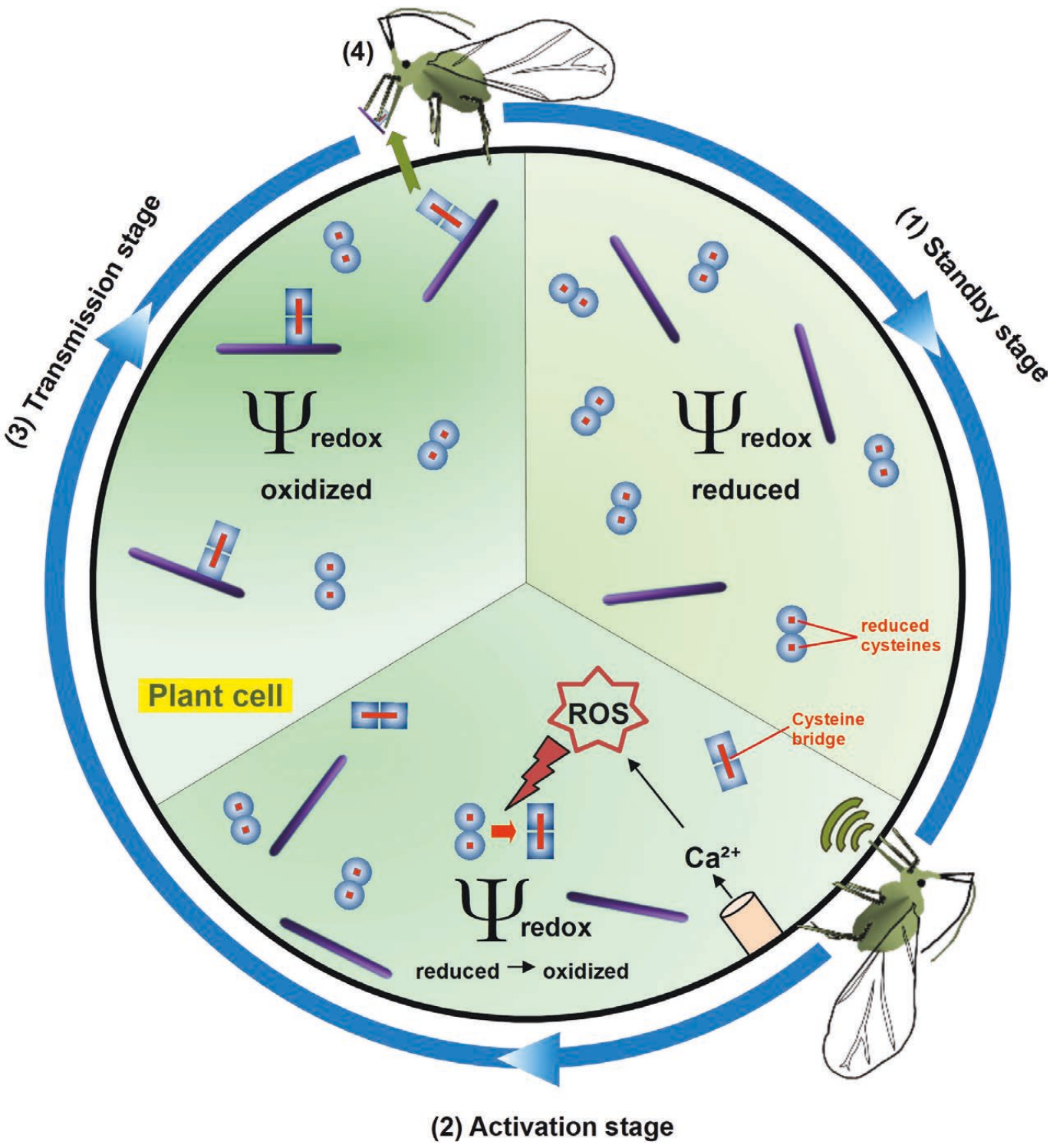
474 generates disulfide bridges (red lines) between different HC-Pro molecules. The intermolecular
475 disulfide bridges either induce oligomerization of a portion of HC-Pro or change the
476 conformation of a part of existing oligomers, presented by the transition of the circles to squares.
477 For simplicity, higher HC-Pro forms are not shown. (3) Whatever the case, oxidation of a
478 fraction of HC-Pro results in a functional switch of the protein and the oxidized tertiary or
479 quaternary conformation allows interaction between HC-Pro and TuMV particles and the
480 formation of TuMV transmissible complexes, symbolized by square HC-Pro aligned with a virion.
481 Now the infected cell is switched into transmission mode and this stage allows efficient
482 acquisition of TuMV. (4) The aphid acquires transmissible complexes and transmits the TuMV
483 during the next punctures on another plant. After vector departure, the redox potential of cell
484 cytoplasm lowers again and HC-Pro is reduced. This changes its conformation and induces
485 dissociation of the transmissible complexes, leaving HC-Pro free to fulfill its other functions
486 during infection. The aphid drawing is modified from (43), published under open CC3.0 license.





A**B****C**





Condition	-H ₂ O ₂	+H ₂ O ₂	-LaCl ₃	+LaCl ₃	-NEM	+NEM
N	1466	1495	1471	1514	1532	1587
% Viability	74.7±2.0	74.2±2.1	74.7±2.1	75.5±3.3	76.2±1.9	76.9±2.0
p-value	0.49		0.67		0.49	

Table S1. Viability tests of protoplasts. TuMV-infected protoplasts were incubated or not for 5 min with 2 mM H₂O₂ or 1 mM LaCl₃ or for 20 min with 3 mM NEM and then the viability determined by the FDA test (Widholm, 1972). Experiments were repeated twice using different protoplasts preparations (biological replicates) counting cells in 7 randomly chosen microscopy fields presenting technical replicates. The average viability \pm standard deviation, the total number of cells counted (N), and the *p*-values are shown. Statistical analysis was by generalized linear models.

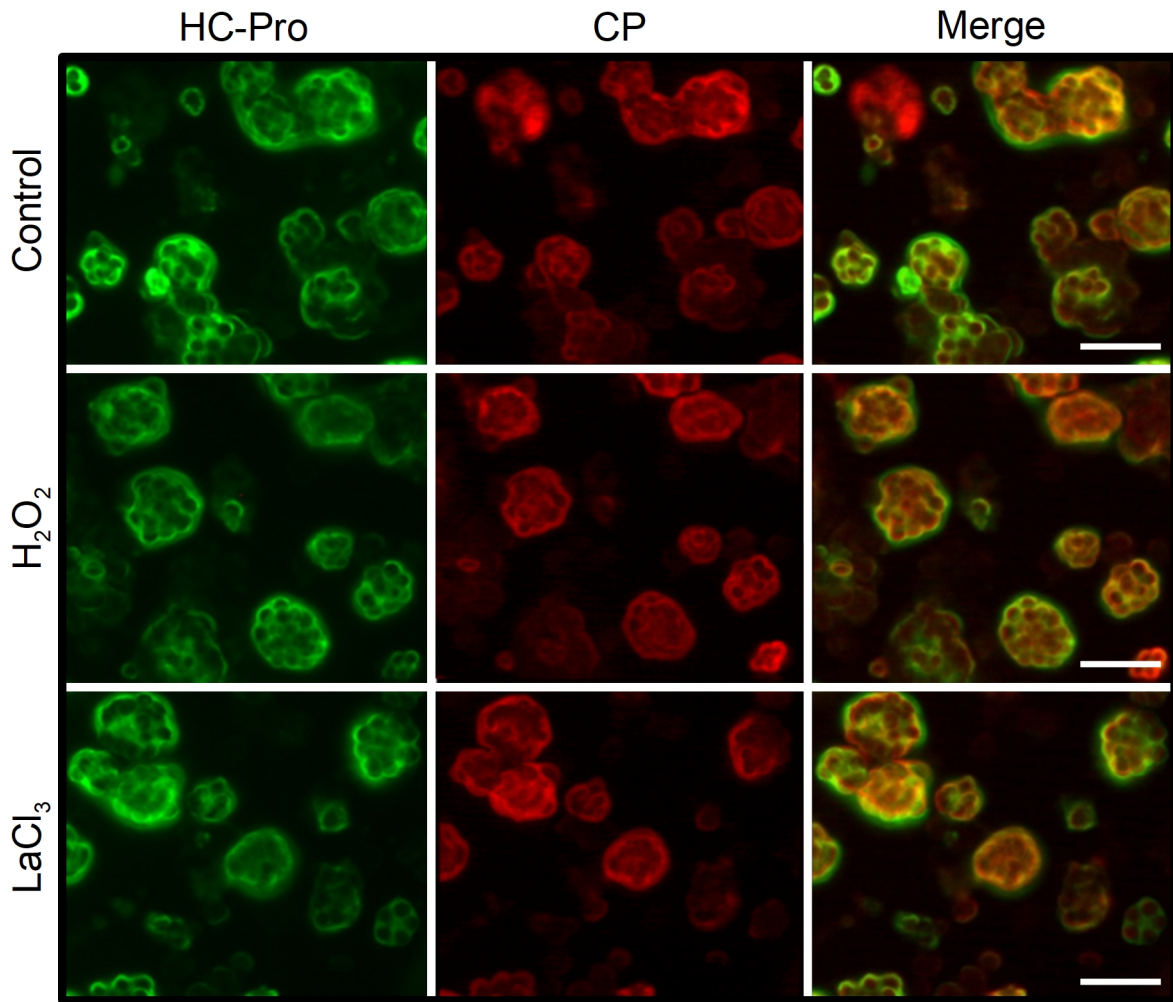


Figure S1. Immunofluorescence of turnip protoplasts infected with TuMV. TuMV-infected protoplasts were double-labeled against HC-Pro (green, first column) and viral capsid protein CP (red, middle column). The right column (Merge) represents superposition of HC-Pro and CP labels, with co-labeling appearing in yellow. Under all conditions, HC-Pro colocalized with CP in the cytoplasm. Control, untreated protoplasts; H₂O₂, incubation with 2 mM H₂O₂ for 15 min, LaCl₃, incubation with 1 mM LaCl₃ for 15 min. Scale bars 50 μ m.

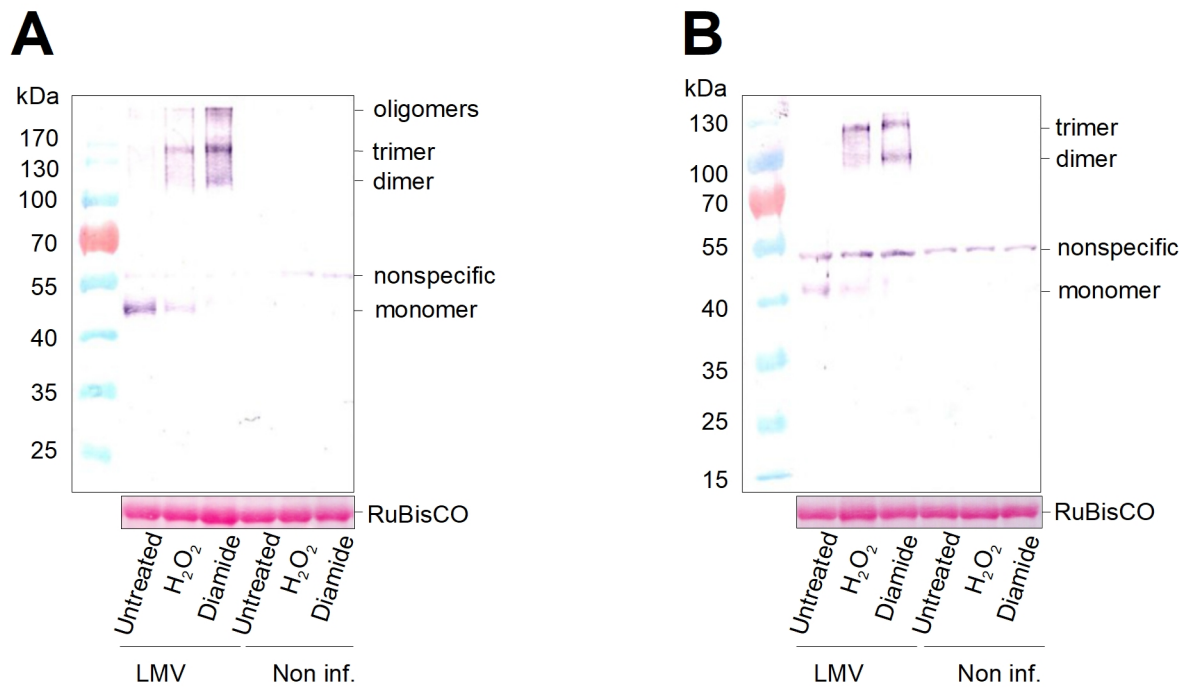


Figure S2. Non-reducing SDS-PAGE/Western blotting analysis of HC-Pro from LMV-infected lettuce protoplasts purified from (A) *Lactuca sativa* var. Mantilla and (B) *L. sativa* var. Trocadero plants. The blots show the induction of HC-Pro oligomeric forms by H₂O₂ and a second ROS, diamide. LMV, LMV-infected protoplasts; Non inf., non infected protoplasts; H₂O₂, treatment with 2 mM H₂O₂ for 5 min; diamide, treatment with 2 mM diamide for 5 min; nonspecific, nonspecific band revealed in non infected and infected protoplasts. Equal protein charge is shown by Ponceau Red staining of RuBisCO. Molecular masses are indicated by annotated prestained protein ladders. The experiment was repeated three times.

1.3. Conclusion et perspectives

Cet article montre des résultats compatibles avec l'hypothèse que le TuMV active son acquisition par le vecteur en utilisant les réponses mise en place par la plante. En effet, les résultats des tests de transmission montrent que les ROS et la signalisation calcique sont impliqués dans la transmission du TuMV. La présence de ROS favorise la transmission du TuMV tandis que le blocage de la signalisation calcique l'inhibe. Ces résultats démontrent que le TuMV est capable d'activer sa transmission très rapidement sous l'effet d'un stress de la plante hôte, tout comme le CaMV (Martinière *et al.*, 2013). L'AT du TuMV est caractérisée par l'augmentation des interactions CP/HC-Pro ainsi que l'apparition de formes oligomériques par ponts disulfures de HC-Pro. La formation d'oligomères HC-Pro en présence de ROS a également été observée pour un autre potyvirus, le *Lettuce mosaic virus*, suggérant que le phénomène serait général à l'ensemble des potyvirus. Des tests de transmission, d'immunomarquage et de western blot ont été réalisés sur le *Potato virus Y* (PVY) mais n'ont pas pu montrer l'AT du PVY à cause de verrous techniques, en particulier l'absence d'un anticorps dirigé contre le HC-Pro du PVY de bonne qualité.

Notre modèle pour l'AT du TuMV est que l'activité des pucerons sur la plante infectée est reconnue par la plante. Ensuite, celle-ci va, dans une étape précoce de défense, activer la signalisation calcique qui, de manière directe ou indirecte, va induire la production des ROS. L'environnement intracellulaire dans lequel se trouve HC-Pro est oxydé par ces ROS, ce qui va générer les oligomères de HC-Pro et favoriser son interaction avec la CP. Une fois le complexe transmissible CP/HC-Pro formé, le TuMV se trouve sous sa forme active pour la transmission et peut être acquis par son vecteur.

Pour valider totalement ce modèle, il reste à caractériser certaines étapes. Par exemple, côté virus, nous ne connaissons pas les cystéines impliquées dans la formation des ponts disulfures pour générer les oligomères de HC-Pro. Le modèle serait consolidé si nous pouvions identifier ces cystéines, puis les substituer par un autre acide aminé dans le contexte viral. Ceci nous procurerait des « mutants cystéine » qui devraient ne plus former d'oligomères sous l'effet des ROS et, parallèlement, qui ne devraient plus être transmissible par pucerons. Ce travail a été débuté mais n'a pas pu être finalisé. Dans la suite de ce chapitre je présente les résultats obtenus à ce jour.

2. Recherche des cystéines impliquées dans la formation des ponts disulfures pour l'oligomérisation de HC-Pro

2.1. Présentation des mutants cystéines

La présence des oligomères de HC-Pro, liés par des ponts disulfures, est corrélée à l'augmentation de la transmission du TuMV et intervient probablement dans le processus d'AT du TuMV. Ces ponts disulfures se forment au niveau des groupements thiols (-SH) des cystéines lorsque celles-ci se trouvent dans un environnement oxydé. Quinze cystéines sont présentes dans la séquence de HC-Pro de la souche UK1 du TuMV (figure 6). Parmi elles, sept sont conservées sur un alignement de 56 séquences de potyvirus (annexe 1).

Saaganfwkgfdr **C**flayrsdnreht **C**ysgldvte **C**gevaalm **C**lamfp **C**gkit **C***pd **C***vtdselsqgqasgpsmkh
rltqlrdvirssyprfkhavqildryeqslssanenyqdfaeiqsisdgvakaafphvknlnailkgatatgeefsqtakhllearylk
nrteniekgslsfrnkisqkahinptlm **C***dnqlrngnfiwgergyhakrffsnfyfeiidpkkgynqyetrvpngsrklaigkl
ivptnfevlreqmkgepvpeypvtve **C***vsklqgdfvha **C*****CC***vttesgdpvlseikmptkhhlvignsgdpkyidlpe
ieenkmyiakegy **C***yinflamlvvnkesqakeftkvvrdklvgelgkwptlldvata **C**yflkvfypdvanaelprmlvdhkt
kiihvdsyglstgyhvlkntntveqlikfr **C**nlesslkhyrvg

Figure 6. Emplacement des cystéines dans la séquence de HC-Pro de la souche UK1 du TuMV. La séquence de HC-Pro contient 15 cystéines, représentées par la lettre c (en rouge et en gras). Les astérisques indiquent les cystéines conservées.

Afin de déterminer quelle(s) cystéine(s) sont impliquée(s) dans la formation des oligomères de HC-Pro, des substitutions de chaque cystéine en sérine (mutants cystéines) ont été réalisées par mutagenèse dirigée. Quinze clones, chacun avec une seule cystéine mutée, ont ainsi été obtenus puis inoculés par biolistique sur de jeunes plantes de navets. Parmi ces quinze clones, seulement huit se sont avérés infectieux (tableau 1). Les génomes des clones viraux dans les plantes présentant des symptômes systémiques ont été contrôlés

par séquençage afin de vérifier la présence de la mutation. Sur les huit clones infectieux, seulement deux sont mutés à une position de cystéine conservée : C197S et C292S.

Position	Cystéine conservée	Nom du mutant cystéine	Infectieux après biolistique
14	non	C14S	non
27	non	C27S	non
36	non	C36S	oui
44	non	C44S	oui
50	non	C50S	oui
55	oui	C55S	non
58	oui	C58S	non
197	oui	C197S	oui
280	oui	C280S	non
292	oui	C292S	oui
293	non	C293S	oui
294	oui	C294S	non
344	oui	C344S	non
389	non	C389S	oui
446	non	C446S	oui

Tableau 1. Viabilité des mutants cystéines générés. Parmi les quinze cystéines, sept sont conservées dans l'ensemble des séquences de potyvirus analysées et parmi les quinze mutants cystéines, huit sont infectieux après biolistique. Seuls C197S et C292S sont mutés à une position de cystéine conservée et sont infectieux après biolistique.

La charge virale des différents clones a été analysée sur les navets infectés afin d'évaluer si les mutations engendraient des modifications d'accumulation du virus qui pourraient aussi expliquer, le cas échéant, une baisse de la transmission. Ensuite, des tests de transmission ont permis de tester si les mutations généraient des changements de taux de transmission. Enfin, des western blot ont été effectués pour visualiser si les mutations ont

eu un effet sur l'accumulation et la présence/absence de formes monomérique et oligomérique de HC-Pro.

2.2. Quantification de la charge virale des mutants cystéines

La charge virale des mutants cystéines a été calculée à partir des unités de fluorescence arbitraires obtenues en q-PCR. Celles-ci ont été mesurées sur une portion de séquence du TuMV (gène d'intérêt) et sur un bout de séquence du gène de l'actine de la plante hôte (gène de référence). Afin de normaliser la quantité de matière végétale analysée dans tous les échantillons, la concentration obtenue pour le gène d'intérêt a été divisée par la concentration obtenue pour le gène de référence. Les ratios obtenus pour chacun des échantillons ont ensuite été analysés avec des modèles statistiques linéaires généralisés.

Les résultats obtenus montrent une différence d'accumulation suivant les mutants (figure 7). Les mutants C197S, C292S et C446S sont moins accumulés dans les plantes que la souche UK1 sauvage. Tous les autres mutants sont accumulés de manière identique à UK1. Ces résultats indiquent que les mutations en position 197, 292 et 446 dans la séquence de HC-Pro ont un impact sur l'accumulation du virus. De ce fait, leur chance d'être acquis par un vecteur pourrait être réduite. Il faudra donc en tenir compte dans l'analyse et l'interprétation des résultats des tests de transmission.

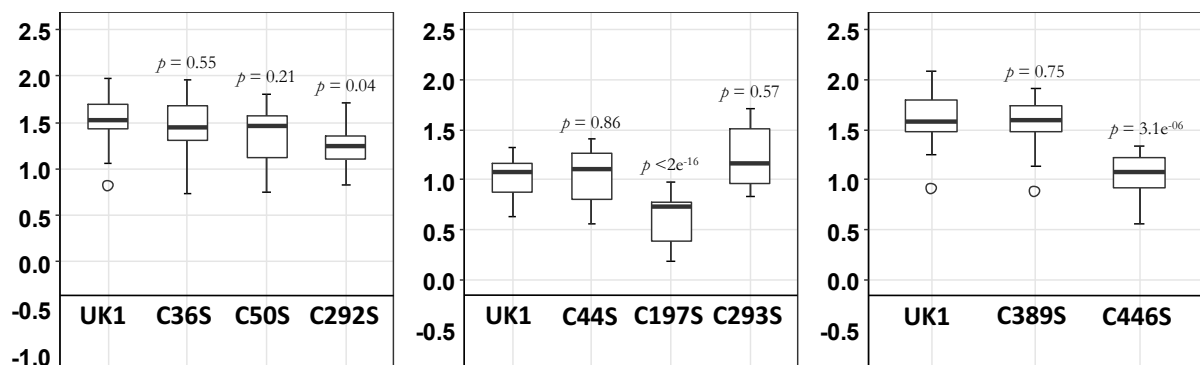


Figure 7. Effet des substitutions de cystéines sur l'accumulation des mutants cystéines dans les navets infectés. L'accumulation virale d'un mutant cystéine a été estimée par q-PCR à partir de 14 à 16 navets infectés par mutant. Les valeurs de fluorescence arbitraire obtenues ont permis de calculer l'accumulation virale normalisée à l'aide du gène de référence. *p* désigne les p-values obtenues dans les analyses statistiques réalisées à l'aide de modèles linéaires généralisés (voir matériel et méthodes)

2.3. Tests de l'efficacité de la transmission pour les mutants cystéines

Après obtention des mutants et vérification de la présence de la mutation par séquençage, des tests de transmission préliminaires ont été réalisés. Ces tests avaient pour but de vérifier si les mutants étaient infectieux et s'ils étaient ou non transmissibles par les pucerons. Les pucerons ont donc été mis à acquérir deux minutes sur les plantes sources puis une dizaine de pucerons ont été déposés sur chaque plante test, conditions sous lesquelles le virus sauvage est transmis à quasiment 100 %. Les résultats de ces tests de transmission ont montré que tous les mutants infectieux étaient transmissibles excepté le mutant en position 197 (tableau 2).

Mutant cystéine	Plantes infectées	Plantes saines	Taux de transmission
UK1	23	1	≈ 96 %
C36S	9	15	≈ 38 %
C44S	18	6	75 %
C50S	10	14	≈ 42 %
C197S	0	24	0 %
C292S	4	20	≈ 17 %
C293S	23	1	≈ 96 %
C389S	12	12	50 %
C446S	10	14	≈ 42 %

Tableau 2. Résultats des tests de transmission préliminaires des mutants cystéines. Tous les mutants cystéines sont transmissibles par leur vecteur excepté le mutant cystéine C197S.

Ensuite, des tests de transmission standard avec un temps d'acquisition de deux minutes et le dépôt d'un seul puceron sur chaque plante test ont été réalisés pour chaque mutant. Les résultats de ces tests ont montré différents taux de transmission en fonction des mutants (figure 8). Les mutants C36S, C50S, C292S, C389S et C446S sont moins bien transmis que la souche UK1 sauvage. Le mutant C197S n'est pas du tout transmis par les pucerons et les mutants C44S et C293S sont transmis de manière identique à UK1. On peut néanmoins déjà supposer que la baisse de transmission des mutants C292S et C446S peut être associée, au moins partiellement, à leur charge virale moins importante par rapport à UK1 (figure 7).

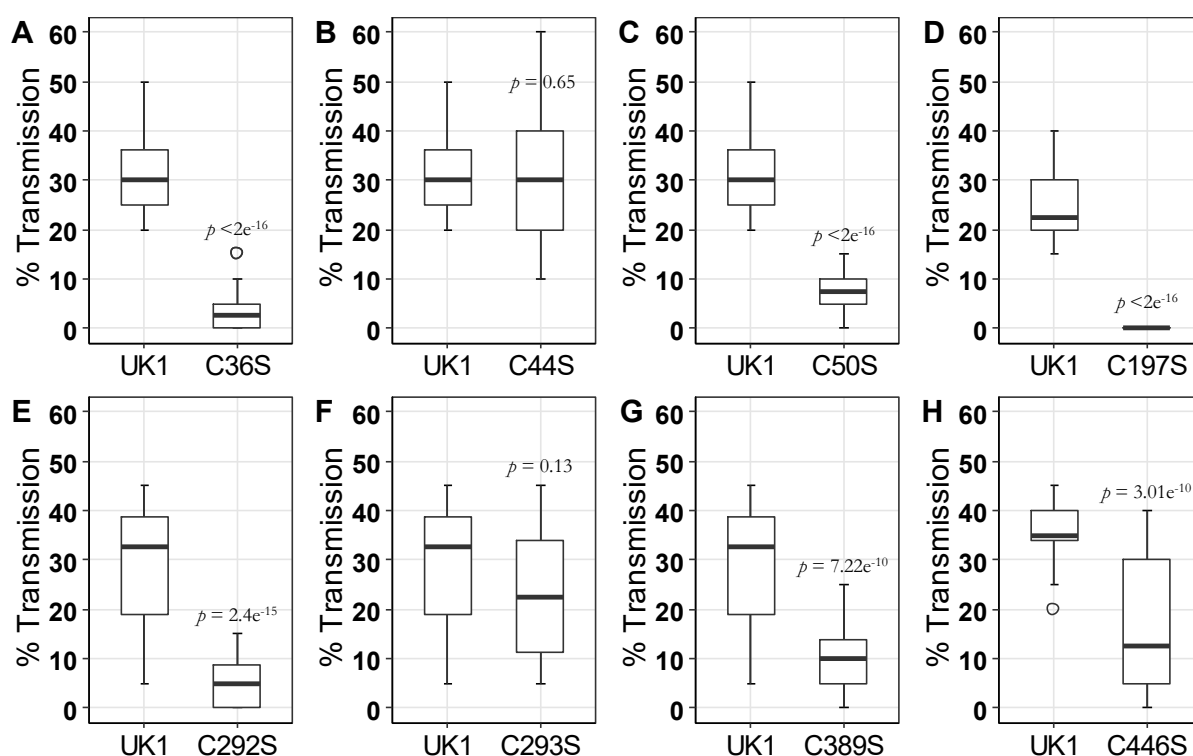


Figure 8. Taux de transmission des mutants cystéines. Les tests de transmission ont été réalisés à partir de plantes sources infectées par la souche UK1 sauvage ou infectées par chacun des mutants cystéines. Après l'acquisition du virus, les pucerons ont été placés pendant 2 à 3 heures sur des navets sains (plantes receveuses) pour inoculer le virus. Chaque condition a été testée au cours de trois expériences indépendantes. Chaque expérience comprenait six plantes sources pour chaque condition et 20 plantes receveuses par plante source. p désigne les p -values obtenues à l'aide de modèles linéaires généralisés (voir matériel et méthodes).

2.4. Western blot à partir de protoplastes infectés par les mutants cystéines

Le profil d'oligomères de HC-Pro a été caractérisé pour tous les mutants par western blot. Des échantillons de protoplastes ont été préparés à partir de plantes infectées puis traités ou non avec H_2O_2 pour générer les oligomères de HC-Pro dans le but de tester une corrélation entre les taux de transmission observés et la capacité à former des oligomères. Les résultats de cette expérience ont révélé la présence des formes oligomériques de HC-Pro pour tous les mutants après l'ajout de H_2O_2 (figure 9). Cette observation signifie malheureusement que la substitution des cystéines testées n'empêche pas la formation des oligomères de HC-Pro. L'oligomérisation de HC-Pro sous l'effet des traitements H_2O_2 pour tous les mutants testés peut s'expliquer par l'implication de plusieurs cystéines dans la

génération des oligomères. En effet, la présence de dimères nécessite l'implication d'au minimum une cystéine de HC-Pro mais des trimères sont également observés et leur formation nécessite au minimum l'implication deux cystéines de HC-Pro. De plus, une bande est observée au-dessus du marqueur de taille et pourrait correspondre à des formes oligomériques supérieures au trimère et donc nécessitant au moins trois cystéines pour leur formation. Dans cette hypothèse, il faudrait peut être réaliser des combinaisons de substitutions d'au moins 2-3 cystéines sur le même clone infectieux pour pouvoir visualiser un profil d'oligomères changé par rapport à la souche UK1 sauvage. Cette combinatoire représente un nombre de mutants extrêmement important, et nous avons décidé de ne pas poursuivre cette approche dans le cadre temporel de ma thèse.

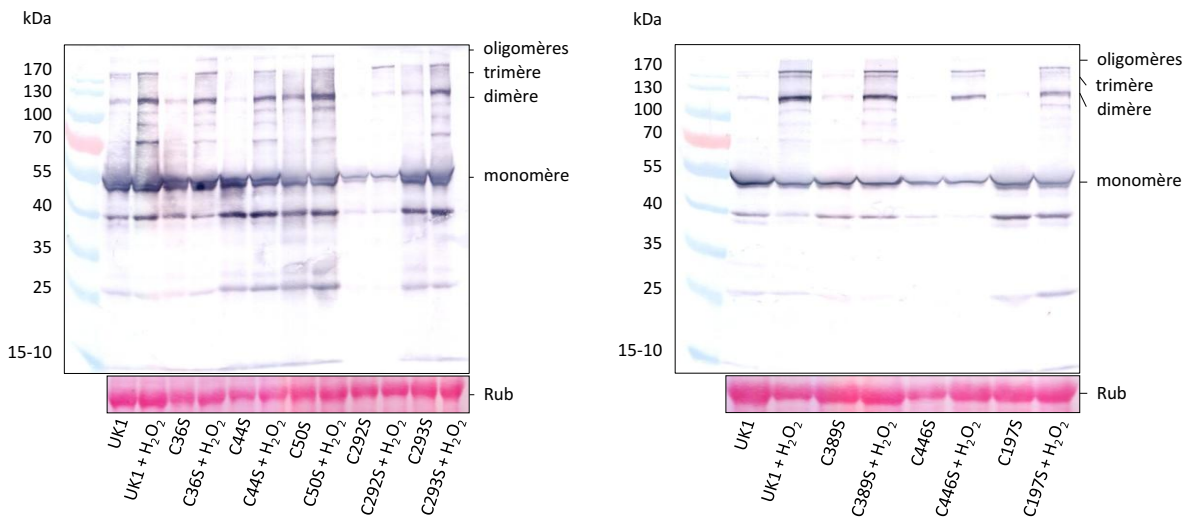


Figure 9. Analyse du profil d'oligomères de HC-Pro par SDS PAGE/Western blot à partir de protoplastes infectés par les mutants cystéines. Des protoplastes infectés par le TuMV UK1 ou par chacun des différents mutants cystéines ont été traités comme indiqué, puis analysés par Western blot après SDS-PAGE en condition non-réductrice. Les échantillons ont été lysés dans un tampon ne contenant pas d'agents réducteurs afin de conserver les ponts disulfures. Le traitement H_2O_2 a induit la formation des oligomères de HC-Pro pour la souche UK1 sauvage ainsi que pour tous les mutants cystéines. H_2O_2 , traitement avec 2 mM H_2O_2 pendant 5 min. La coloration de la RuBisCO (Rub) au rouge de Ponceau au dessous des gels est un contrôle de charge montrant qu'une quantité constante d'échantillon a été déposée dans tous les puits. Le marqueur de taille et les masses moléculaires en kDa figurent à gauche de chaque membrane.

2.5. Conclusion et perspectives

L'étude des mutants cystéines nous a tout d'abord renseigné sur l'importance de ces résidus dans le maintien de l'infectivité du virus (tableau 1). Cette analyse nous a également appris que certaines mutations avaient un impact sur l'accumulation du virus dans les cellules de l'hôte (figure 7) et sur les taux de transmission par pucerons (figure 8). Cependant, les mutations n'ont pas d'effet marqué sur la formation des oligomères de HC-Pro (figure 9).

L'ensemble de ces données ne nous a pas permis d'identifier avec précision une cystéine impliquée dans l'AT du TuMV, liée à la présence/absence d'oligomères de HC-Pro qui serait nécessaire à la transmission (article 1). En effet, certains mutants ont une charge virale identique à la souche UK1 sauvage et présentent des oligomères de HC-Pro mais sont moins transmis. Néanmoins, la présence d'oligomères de HC-Pro et la formation de ponts disulfures semblent nécessaires pour la transmission du virus. En effet, lorsque la signalisation calcique est bloquée avec du lanthanum(III) chloride (LaCl_3), les oligomères de HC-Pro sont inhibés et il n'y a presque plus de transmission (article 1). Plus directement, lorsque la formation de ponts disulfures est bloquée par l'ajout de N-éthylmaléimide (NEM), il y a une forte diminution de la transmission du virus (article 1).

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer les résultats obtenus :

- (i) Tous les mutants cystéines n'ont pas pu être testés puisque certains d'entre eux ne sont plus infectieux. La plupart de ces mutants non infectieux présente la substitution d'une cystéine conservée dans toutes les séquences des HC-Pro alignées. La conservation de ces cystéines en fait de bons candidats, et nous privilégions l'hypothèse que la ou les cystéines importantes que nous recherchons font parties de ces positions non testables parce qu'elles sont létales pour le TuMV. Parmi les positions de cystéines que nous n'avons ainsi pas pu tester, on compte la cystéine en position 55 contenue dans le motif KITC, très conservé et intervenant dans la liaison de HC-Pro au stylet du puceron (Blanc *et al.*, 1998). La cystéine en position 344 est également potentiellement importante car elle est au cœur du site actif de la fonction protéase de HC-Pro (Guo *et al.*, 2011).
- (ii) Comme déjà discuté plus haut, plusieurs cystéines pourraient être impliquées dans la formation des oligomères de HC-Pro. Cette possibilité pourrait expliquer la présence des oligomères pour tous les mutants. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait substituer

plusieurs cystéines sur le même mutant, ce qui représentera une quantité de travail considérable.

(iii) Les variations des taux de transmission, apparemment indépendantes de la formation d'oligomères de HC-Pro chez de nombreux mutants, pourraient être expliquées par l'une des propriétés bien connues des ponts disulfures. Cette propriété est de pouvoir modifier la structure d'une protéine (Rees et Lipscomb, 1982). Ainsi, la substitution générée n'empêcherait pas forcément la formation des oligomères de HC-Pro mais pourrait modifier leur conformation. Si la structure de HC-Pro est impliquée dans son interaction avec la CP ou le puceron et qu'elle est modifiée par la substitution alors il pourrait y avoir des variations de taux de transmission. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait évaluer/quantifier les interactions CP/HC-Pro et HC-Pro/puceron pour chacun des mutants.

(iv) Un ou plusieurs ponts disulfures intra-HC-Pro sont peut-être formés après l'ajout de H_2O_2 mais leur présence ne peut pas être observée en western blot. Si ces ponts intra-HC-Pro se forment, il est possible qu'ils entraînent des changements sur la structure de HC-Pro. De ce fait, si une cystéine à l'origine d'une liaison intra-HC-Pro est mutée, elle pourrait amener la perte de la structure de HC-Pro. Une fois encore, si la structure de HC-Pro est importante pour son interaction avec la CP et qu'elle ne se forme pas, alors la transmission du virus ne pourra pas se faire. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait là aussi évaluer les interactions CP/HC-Pro.

Le cas particulier que présente le mutant 197, non transmis par les pucerons mais qui forme des oligomères de HC-Pro après l'ajout de H_2O_2 , peut être expliqué par plusieurs hypothèses. Tout d'abord, le mutant 197 correspond au mutant le moins accumulé dans les plantes infectées. De ce fait, peut-être que son accumulation était en-dessous du seuil requis pour être transmis par les pucerons. De plus, les parties N-terminale et C-terminale sont riches en cystéines tandis que la partie centrale de la séquence de HC-Pro ne contient qu'une seule cystéine, celle en position 197 (figure 6). De par sa position isolée et centrale dans la séquence de HC-Pro, la cystéine 197 ne semble pas impliquée directement dans les interactions CP/HC-Pro et HC-Pro/puceron mais pourrait l'être dans l'interaction HC-Pro/HC-Pro. Enfin, il est possible que cette cystéine contribue à la structure de HC-Pro, ce qui engendrerait un changement de la conformation de HC-Pro lorsqu'elle est mutée et empêcherait l'interaction de HC-Pro avec la CP ou le puceron.

HC-Pro est une protéine multifonctionnelle impliquée non seulement dans la transmission des pucerons, mais aussi dans la pathogénicité, le mouvement viral et la suppression du silencing des ARN végétaux. L'existence de plusieurs formes de HC-Pro pourrait aider à coordonner ces fonctions multiples. Ainsi, l'induction de la forme de HC-Pro spécifique à l'AT du TuMV, qui permet la formation des complexes transmissibles HC-Pro/CP, se ferait uniquement lorsque la transmission est possible, c'est-à-dire lorsque les pucerons sont présents. Malheureusement, nous n'avons pas pu établir de lien direct entre la mise en place de l'AT du TuMV et la présence du puceron. Contrairement au CaMV, où l'AT était directement visible par observation qualitative en immunofluorescence dans les cellules en contact avec les gaines salivaires de pucerons, l'AT du TuMV ne peut être révélée par ce type d'analyse. L'approche quantitative par la technique Duolink® utilisée pour démontrer les interactions TuMV HC-Pro/CP dans les protoplastes nécessitait un nombre énorme de cellules pour l'analyse et la validation statistique. Identifier un nombre comparable de cellules dans les tissus en contact avec les stylets des pucerons est difficilement réalisable. Suite à ces difficultés techniques, il est compliqué de mettre en évidence le fait que les pucerons déclenchent directement l'AT du TuMV. Le seul moyen d'y parvenir serait d'identifier l'éliciteur de l'AT du TuMV, un programme qui a été initié et sera décrit dans le troisième chapitre de ma thèse.

L'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre met donc en évidence que le TuMV passe d'un état non transmissible à un état transmissible, tout comme le CaMV. Cependant, l'établissement de la forme transmissible du TuMV se caractérise par la formation d'oligomères par ponts disulfures de HC-Pro favorisant son interaction avec la CP tandis que la forme transmissible du CaMV se caractérise par la relocalisation des protéines virales impliquées dans la transmission. Ces deux virus sont donc capables d'activer leur transmission mais utilisent des stratégies différentes. L'activation de leur transmission s'articule autour de réponses de la plante générées suite à l'arrivée du vecteur. Quels sont ces réponses ? Y a-t-il des mécanismes communs pour activer la transmission de ces deux virus ou les mécanismes impliqués sont-ils propres à chaque virus ? La réponse à ces questions sera présentée dans le deuxième chapitre de ma thèse.

CHAPITRE 2 : Comparaison de l'activation de la transmission entre le CaMV et le TuMV

1. Contexte et objectif

L'AT a été identifiée pour deux virus : le CaMV et le TuMV. Ces deux virus ne sont pas apparentés mais sont tous les deux transmis de manière non circulante via la stratégie « facteur assistant de la transmission ». L'AT du CaMV se traduit par une relocalisation de son facteur assistant P2 et des virions tandis que l'AT du TuMV se traduit par une modification post-traductionnelle de son facteur assistant suivie par la formation de complexes transmissibles. Ces deux virus ont donc développé un mécanisme d'AT pour leur transmission mais chacun avec ses moyens moléculaires propres. Une question intéressante est : La mise en place de ces deux AT est elle déclenchée par des voies de signalisations de la plante communes ou spécifiques à chacune ?

Afin de répondre à cette question, des tests de transmission par le puceron *M. persicae* à partir de plantes entières infectées par le CaMV ou le TuMV ont été réalisés. Différents stress induisant, mimant, ou inhibant des voies de signalisation et de défense de la plante ont été appliqués sur les feuilles sources avant les tests de transmission. L'objectif principal de ces expériences est de déterminer si les traitements utilisés augmentent ou diminuent la transmission du TuMV et du CaMV et si les variations de transmission observées sont identiques ou différentes pour les deux virus. Les résultats de ces expériences et leur interprétation sont décrits dans l'article ci-dessous, soumis au journal Scientific Reports.

2. ARTICLE 2: Pharmacological analysis of transmission activation of two aphid-vectored plant viruses, *Turnip mosaic virus* and *Cauliflower mosaic virus*

1 Pharmacological analysis of transmission activation of two aphid-vectored plant viruses,
2 turnip mosaic virus and cauliflower mosaic virus

3 **Edwige Berthelot**^{1,2,3}, **Jean-Luc Macia**¹, **Alexandre Martinière**^{1,4}, **Alexandre Morisset**¹,
4 **Romain Gallet**¹, **Stéphane Blanc**^{1,6}, **Mounia Khelifa**^{2,3,6}, **Martin Drucker**^{1,5,6}

5

6 ¹ BGPI, INRA Centre Occitanie, SupAgro, CIRAD, Université de Montpellier, Campus
7 International de Baillarguet, 34398 Montpellier Cedex 5, France

8 ² Semences Innovation Protection Recherche et Environnement, rue des Champs Potez,
9 62217 Achicourt, France

10 ³ Fédération Nationale des Producteurs de Plants de Pommes de Terre, 43-45 rue de
11 Naples, 75008 Paris, France

12 ⁴ Present address: BPMP, CNRS, INRA, SupAgro, Université de Montpellier, 2 place Viala,
13 34060 Montpellier Cedex 2, France

14 ⁵ SVQV, INRA Centre Grand Est, Université de Strasbourg, 28 rue de Herrlisheim, 68000
15 Colmar, France

16 ⁶ Corresponding authors

17

18 **Author contributions**

19 Edwige Berthelot: Conceptualization; Validation; Investigation; Visualization; Methodology;
20 Writing—original draft

21 Jean-Luc Macia: Validation; Investigation; Methodology

22 Alexandre Martinière: Conceptualization; Validation; Investigation

23 Alexandre Morisset: Validation; Investigation; Methodology

24 Romain Gallet: Formal analysis, validation

25 Stéphane Blanc: Conceptualization; Supervision; Writing—original draft

26 Mounia Khelifa: Conceptualization; Supervision; Funding acquisition; Investigation;
27 Methodology; Writing—original draft

28 Martin Drucker: Conceptualization; Supervision; Funding acquisition; Validation;
29 Investigation; Visualization; Writing—original draft

30

31 **Abstract**

32 Turnip mosaic virus (TuMV, family *Potyviridae*) and cauliflower mosaic virus (CaMV, family
33 *Caulimoviridae*) are transmitted by aphid vectors. They are the only viruses shown so far to
34 undergo transmission activation (TA) immediately preceding plant-to-plant propagation. TA is
35 a recently described phenomenon where viruses respond to the presence of vectors on the
36 host by rapidly and transiently forming transmissible complexes that are acquired efficiently
37 and subsequently transmitted. Very little is known about the mechanisms of TA and on
38 whether such mechanisms are alike or distinct in different viral species. We use here a
39 pharmacological approach to initiate the comparison of TA of TuMV and CaMV. Our results
40 show that both viruses rely on calcium signaling and reactive oxygen species (ROS) for TA.
41 However, whereas application of the thiol-reactive compound N-ethylmaleimide (NEM)
42 inhibited, as previously shown, TuMV transmission but it did not alter CaMV transmission. On
43 the other hand, sodium azide, which boosts CaMV transmission, strongly inhibited TuMV
44 transmission. Taken together, the results suggest that transmission activation of TuMV and
45 CaMV depend both on initial calcium and ROS signaling that are generated during the plant's
46 immediate responses to aphid manifestation. Interestingly, downstream events in TA of each
47 virus appear to diverge, as shown by the differential effects of NEM and azide on TuMV and
48 CaMV transmission, suggesting that these two viruses have evolved analogous TA
49 mechanisms.

50

51 **Introduction**

52 Viruses are obligate intracellular parasites and therefore depend completely on the
53 machinery and metabolism of a host cell to accomplish the different steps of their infection
54 cycle. Among these, the host-to-host transmission step is crucial in allowing maintenance
55 and spread of the virus in the environment. Many viruses of animals and most viruses of
56 plants rely on vectors for host-to-host transmission. The most important vector groups are
57 piercing-sucking arthropods such as blood-feeding mosquitoes, ticks and other flies for
58 animal viruses, and sap-feeding hemipteran insects for plant viruses, all acting as “flying
59 syringes” and so suited ideally to uptake, transport and inoculate viruses and other
60 pathogens (Gray and Banerjee, 1999; Kuno and Chang, 2005). Aphids are the major vectors
61 for plant viruses and responsible for the dissemination of 70 % of all plant virus species
62 (Institute of Medicine (US) Forum on Microbial Threats, 2008; Bragard et al., 2013). Plant
63 viruses are usually acquired with the food when vectors feed on plants.

64 Depending on the virus-vector interaction, two transmission modes are distinguished. In the
65 circulative mode, viruses traverse the intestine and cycle through the body of the vector to
66 invade the salivary glands. Then they are inoculated together with saliva into a new host. In
67 the non-circulative mode, viruses do not need to cycle through the vector, but are retained in
68 and released from the vector mouthparts (reviewed by (Dáder et al., 2017)). Many non-
69 circulative plant viruses use the capsid strategy for vector interaction meaning that the
70 transmitted virus particles (virions) bind directly to the vector mouthparts. Others use the
71 helper strategy, meaning that a viral non-structural protein, the helper component (HC),
72 mediates the link between the virions and the vector mouthparts (Pirone and Blanc, 1996). In
73 the helper strategy, the formation of transmissible complexes composed of HC and virions is
74 mandatory for transmission.

75 Recent studies on two aphid-transmitted viruses using the helper strategy, cauliflower
76 mosaic virus (CaMV, family *Caulimoviridae*) and turnip mosaic virus (TuMV, family
77 *Potyviridae*), showed that formation of transmissible complexes in infected plant cells is
78 induced within seconds by vector feeding activity (Martinière et al., 2013; Bak et al., 2013)
79 and accompanying manuscript). This suggests that these two viruses switch transiently from
80 a replication/accumulation mode to a transmission mode, a phenomenon named
81 transmission activation (TA, (Drucker and Then, 2015)). The transmissible complexes of
82 TuMV and CaMV are functional, but not biochemical or structural analogues (Figure 1). The
83 TuMV transmissible complex is composed of the filamentous virus particle and the helper
84 component HC-Pro. HC-Pro is a ~50 kD multifunctional protein involved not only in vector-
85 transmission, but also in suppression of gene silencing and other plant defense reactions, in
86 viral movement and in the processing of the viral polyprotein (Revers and García, 2015;
87 Hasiów-Jaroszewska et al., 2013). The CaMV transmissible complex is composed of the

88 icosahedral virus particle coated by the viral protein P3 and the helper component P2. P2 is
89 an 18 kD protein whose only function is aphid transmission (Leh et al., 1999; Hohn, 2013).
90 CaMV P2 and TuMV HC-Pro are totally different proteins that do not share any homology.
91 For a virus to respond to aphid feeding activity by forming transmissible complexes, it must
92 somehow 'sense' the presence of the aphid. This is only possible via highjacking the plant
93 sensory system and associated signaling cascades. Since aphid activity on plants induces
94 plant defense responses (review (Jaouannet et al., 2014)), it is likely that TuMV and CaMV
95 make use of plant defense reactions to trigger the formation of transmissible complexes.
96 Because TA happens within seconds, viruses might interfere with early signaling steps. The
97 earliest event in establishment of plant defenses is recognition by the plant of various
98 stresses. This is generally achieved by specific plant pathogen recognition receptors (PRR)
99 that recognize conserved pathogen associated molecular patterns (PAMP). Though this
100 general scheme applies likely also to plant-aphid interactions, it should be noted that both
101 PRR and PAMP are yet unidentified in this specific case. Transduction of the recognition
102 signal is then mediated by rapid calcium waves (Blume et al., 2000). Recently, it has been
103 shown that also aphid punctures elicit calcium waves (Vincent et al., 2017). Reactive oxygen
104 species (ROS) also play a significant role in early plant defense reactions and calcium and
105 ROS signals most likely interweave (Jeworutzki et al., 2010; Ranf et al., 2011). The initial
106 calcium and/or ROS fluctuations trigger downstream reactions that ultimately establish
107 PAMP-triggered immunity (PTI, (Jones and Dangl, 2006)).
108 Since calcium and ROS elevations are the earliest plant responses to pathogen presence,
109 we hypothesized that plant viruses might eavesdrop them for TA. Consistently, we very
110 recently showed that transmission of TuMV is inhibited by the calcium channel blocker LaCl_3
111 and activated by the ROS H_2O_2 (see accompanying manuscript). Whether TA of CaMV is
112 also dependent on calcium and ROS or on totally distinct pathways is unknown. Therefore,
113 we used here a pharmacological approach to compare TA of these viruses. Our results
114 suggest that TA of the two viruses have initial steps in common, but then rely on different
115 downstream mechanisms.

116

117 **Result and discussion**

118 We have recently shown (see accompanying manuscript) that ROS and calcium signaling
119 are involved in TuMV TA, possibly by interfering with the recognition of aphids by plants. The
120 previous experiments have been conducted using protoplasts extracted from infected plants
121 as virus sources, which were provided to aphids through parafilm membranes. This is a
122 useful but simplified biological system where the cells are individualized and not in their
123 natural symplasmic context in a tissue. Hence, prior to compare further the effect of various
124 compounds on the TA of both TuMV and CaMV, we sought to validate the previous results

125 by using leaves on intact infected plants as virus source. We applied H₂O₂ or LaCl₃ to leaves
126 by spraying treatment (Peng and Walker, 2018) and used these plants for aphid transmission
127 assays. To rule out any interference, only one leaf of the same developmental stage was
128 sprayed on each plant and different plants were used for each condition. Figure 2A shows
129 that H₂O₂ treatment increased significantly and LaCl₃ treatment decreased significantly plant-
130 to-plant transmission rates of TuMV. This confirmed our previous results obtained with
131 protoplasts (see accompanying manuscript) and showed that TuMV TA is similarly observed
132 in intact plants. Compared to protoplast experiments, higher H₂O₂ and LaCl₃ concentrations
133 were required to observe significant effects, and this is probably due to a dilution of these
134 substances during leaf penetration. We then repeated the same experiments using CaMV-
135 infected plants. Just as for TuMV, H₂O₂ increased and LaCl₃ decreased significantly plant-to-
136 plant transmission of CaMV (Figure 2B). These results suggest that the two viruses share
137 ROS and calcium dependency of TA.

138 We have shown previously that wounding stress induces the typical TA response of CaMV,
139 i.e. formation of P2 networks that were restricted to the wounding sites (Martinière et al.,
140 2013). However, we did not assess transmission in the previous experiment. Therefore, we
141 repeated the experiment to record CaMV transmission and extended the experiment to
142 TuMV transmission. For this, TuMV and CaMV infected leaves on intact plants were
143 wounded by superficial scratching with a razor blade before being employed in aphid
144 transmission tests. Wounding stress increased transmission of TuMV significantly but
145 decreased CaMV significantly (Figure 2C).). The results indicate that stress response
146 pathways might be involved in TA but affect transmission of TuMV and CaMV differently

147 We showed in previous work that N-ethylmaleimide (NEM) inhibited transmission of TuMV
148 (see accompanying manuscript) and that sodium azide activated transmission of CaMV,
149 (Martinière et al., 2013), but the effect of these substances on the transmission of the
150 respective other virus was not tested. Consequently, we tested the effect of NEM on CaMV
151 transmission and that of azide on TuMV transmission. Because of the toxicity of the
152 substances, we resorted to the protoplast system where exposure of aphids (and the
153 experimenter) to the substances was minimized by confining them in the protoplast medium.
154 This time differing effects were observed. Unlike TuMV transmission, NEM did not change
155 CaMV transmission significantly (Figure 2D). This suggests that oxidation by formation of
156 intermolecular or intramolecular cysteine bridges that are essential for TuMV transmission
157 (see accompanying manuscript) are not important for CaMV transmission. Indeed, TuMV TA
158 depends on cysteine-mediated oligomerization of the helper component HC-Pro that is
159 thought to be the HC-Pro conformation able to interact with TuMV particles for formation of
160 transmissible complexes (see accompanying manuscript). The CaMV helper component P2,
161 on the other hand, does not contain any cysteine residues, ruling out a similar mechanism.

162 However, CaMV virion-associated P3 and the capsid protein contain cysteines, and the
163 conformation of P3 has been suggested earlier to be controlled by an intermolecular cysteine
164 ring (Hoh et al., 2010). Although it cannot be ruled out, our results do not indicate a role of
165 this in CaMV transmission.

166 Azide treatment that boosts CaMV transmission (Martinière et al., 2013) had the opposite
167 effect on TuMV transmission, which it strongly inhibited (Figure 2E). The mode of action of
168 azide on transmission is difficult to assess since it has pleiotropic effects on cells. It inhibits v-
169 type ATPases (Bowman et al., 1978), catalases, peroxidases and cytochrome oxidase, and
170 thereby the generation of ATP and thus depletes cells of energy (reviewed in (Gruszka et al.,
171 2012)). It can also complex with and inhibit other heavy metal containing enzymes, react with
172 amines and many other diverse effects of azide are reported in the literature (Behrooz and
173 Ismail-Beigi, 1998; Chen et al., 1998; Schoeffter et al., 1987). Therefore, we do not propose
174 a mechanistic explanation of the effect of azide on TA of the two viruses. However, due to its
175 opposing effects on TuMV and CaMV transmission, we conclude that this compound affects
176 different steps in TA of the two viruses.

177 Taken together, our analysis presents evidence that calcium and ROS are involved in TA of
178 TuMV and CaMV. This indicates that TA might be triggered by the early steps of PAMP-
179 triggered immunity, when plant PRR receptors recognize PAMP and induce calcium
180 signaling and ROS production that itself can also act as a signal. It is reasonable to assume
181 that yet unidentified aphid-associated molecular patterns are recognized by likewise
182 unknown PRR and induce calcium and ROS signals that are somehow 'eavesdropped' by
183 TuMV and CaMV. Vincent and coworkers (Vincent et al., 2017) described calcium waves
184 triggered by aphid punctures and presented evidence that the receptor kinase BAK1, one of
185 the hubs linking various PRR with downstream events (Yasuda et al., 2017), is involved in
186 this process. Interestingly, BAK1 had been identified before as being involved in aphid plant
187 interactions (Prince et al., 2014). Thus, there is strong evidence for the existence of a PTI-
188 like aphid-triggered immunity (ATI). While we can speculate that it could be hijacked by some
189 viruses to initiate TA, we cannot elaborate further, at this point, on how TuMV and CaMV
190 intercept with it. They could use the same or different PRR (assuming there is more than one
191 aphid elicitor) and downstream pathways, just as the highly conserved bacterial effectors
192 flagellin and elongation factor Tu do. They could use the same or different PRR (assuming
193 there is more than one aphid elicitor) and downstream pathways, just as the highly
194 conserved bacterial effectors flagellin and elongation factor Tu do (Zipfel et al., 2006). It will
195 be a challenge for the future to dissect ATI further and determine whether and how plant
196 viruses interfere with it.

197 Interestingly, wounding stress triggered TA of TuMV and inhibited TA of CaMV. This might
198 indicate that the two viruses use different eliciting molecules for TA (with TuMV possibly not

199 hijacking an aphid-derived molecule but a plant-derived wound-induced damage-associated
200 molecular pattern (DAMP). Alternatively, TuMV and CaMV TA diverge after the initial
201 recognition event. Evidence for this might come from the fact that CaMV TA stays local
202 (Martinière et al., 2013) whereas TuMV TA might propagate through the tissue, like
203 wounding that provokes tissue-wide spread of signals and responses (Furch et al., 2010;
204 Toyota et al., 2018). Interestingly, another TuMV protein, Nla-Pro, responds to aphid feeding
205 not only at the feeding sites but also far away of them, indicative of signal propagation being
206 intercepted by TuMV (Bak et al., 2017). While propagation of TA would explain increased
207 TuMV transmission in wounded leaves, it does not explain decreased transmission from
208 wounded CaMV-infected leaves, where no TA propagation takes place. One would rather
209 expect no effect of wounding on CaMV TA. The simplest explanation is that volatiles emitted
210 from the wounded tissue (Ameye et al., 2017) deterred aphids in both cases, but the
211 subsequent drop in transmission was more than compensated by propagating TA of TuMV.
212 Clearly, more research is needed to resolve these issues.

213 NEM and azide treatments had different effects on TuMV and CaMV transmission. The most
214 forward explanation is that the mechanisms of TA divert after the initial signaling event with
215 each virus following its own pathway to TA. This is reasonable to assume because the
216 phenology of TA is very different for the two viruses. HC-Pro of TuMV forms oxidized
217 oligomers and subsequently interacts with virions, and CaMV helper component is released
218 from transmission bodies to form P2-virion complexes on microtubules. As mentioned above,
219 NEM could interfere with TuMV TA directly by inhibiting oxidation of HC-Pro, and CaMV TA
220 might not depend on oxidation of components of the CaMV transmissible complex. The
221 opposing effect of azide might indicate that TuMV TA is energy dependent, whereas energy
222 depletion triggers TA of CaMV. It might be possible for CaMV, that maintaining P2 in
223 transmission bodies and virions in virus factories during the “standby” state (see Figure 3)
224 requires energy and energy depletion might result in dissolution of transmission bodies and
225 escape of virions from virus factories. However, as mentioned above, azide has many effects
226 and further research is needed to dissect TA of the two viruses. With the current data, a
227 hypothetical model for TA of CaMV and TuMV is presented in Figure 3.

228 Taken together, our data show that CaMV and TuMV TA share calcium and ROS signaling.
229 An obvious question is whether other viruses use TA for their transmission and if yes
230 whether TA of these viruses also depends on calcium and ROS. Another question is whether
231 TA of CaMV and TuMV and of potential other viruses is triggered by the same aphid and/or
232 plant derived molecules. The answer to these questions might show the way to new
233 strategies to control both aphids and the viruses they transmit.

234

235 **Materials and methods**

236 Plants, viruses and inoculation

237 Turnip plants (*Brassica rapa* cv. Just Right) grown in a greenhouse at 24/15 °C day/night
238 with a 14/10 h day/night photoperiod were used as virus hosts. Two-week-old plants were
239 mechanically inoculated with wild-type TuMV strain UK1 (Jenner and Walsh, 1996) and with
240 wild-type CaMV strain Cabb B-JI (Delseny and Hull, 1983), and later used for experiments at
241 14 days post inoculation (dpi).

242

243 Protoplast preparation

244 Protoplasts from infected turnip leaves were obtained as described (Martinière et al., 2009).
245 Briefly, infected leaves were soaked in 2.5 % diluted Domestos solution
246 (<http://www.unilever.com>) for 3 min and washed with water. Then the leaves were incubated
247 with cellulase R10 and 0.05 % macerozyme R10 (<http://www.duchefa-biochemie.com>)
248 overnight, in the dark at 25 °C. The next day, protoplasts were filtered over one layer of
249 Miracloth (<http://www.merckmillipore.com>) and washed 3 times with protoplast medium by
250 centrifugation at 80 g in a swing-out rotor for 5 min. Protoplasts were resuspended in
251 protoplast medium and transferred to 2 ml Eppendorf reaction tubes. Before the experiments,
252 protoplasts were incubated at room temperature with 5 rpm agitation for 1 h to allow recovery
253 from the protoplast preparation procedure, as reported (Martinière et al., 2013; Bak et al.,
254 2013).

255

256 Drug and stress treatments

257 Leaves on intact plants were wounded by inflicting cuts with a razor blade and immediately
258 used for transmission tests. 10 mM H₂O₂ and LaCl₃ in water was applied by spraying turnip
259 leaves and waiting for 30 min until the leaves were dry. The negative control was spraying
260 with water alone. For NEM treatment, 3 mM final NEM concentration was added from a 100
261 mM stock solution to 500 µl of protoplasts suspension and the protoplasts were incubated for
262 20 min before the experiments. NaN₃ treatment was for 40 min with 0.02 % final NaN₃
263 concentration, added from a 10 % stock solution. Protoplasts were incubated at room
264 temperature with slow agitation (5 rpm). After treatment, protoplast viability was determined
265 as previously described (Widholm, 1972).

266

267 Aphid transmission assays

268 A non-viruliferous clonal *Myzus persicae* population was reared under controlled conditions
269 (22/18 °C day/night with a photoperiod of 14/10 h day/night) on eggplant. The transmission
270 tests using protoplasts and plants as virus source were performed essentially as described
271 (Martinière et al., 2013). Briefly, apterous adult aphids were collected and starved for 1 h in
272 metal cylinders sealed with stretched Parafilm M membranes (<http://www.parafilm.com>). For

273 transmission tests using protoplasts, the cylinders were placed under a light source to attract
274 the aphids to the membrane. Then 500 µl protoplast suspension were deposited on the
275 membrane and covered with a cover glass and aphids were allowed an acquisition access
276 period of 15 min. For plant-to-plant transmission tests, aphids were transferred to a leaf on
277 an infected turnip source plant for an acquisition access period of 2 min. Then 10 aphids
278 (protoplast experiment) or 1 aphid (plant-to-plant assays) were transferred to each healthy
279 turnip test plant (cotyledon stage with the first true leaves appearing) for a 4 h inoculation
280 period. After that, aphids were killed by application of Pirimor G aphicide
281 (<http://www.certiseurope.fr>). Infected plants were identified by visual inspection for symptoms
282 3 weeks after inoculation. For one transmission test comprising 6 repetitions, 6 times 20
283 plants were inoculated per condition from aphids having had acquisition access on six
284 different cylinders (protoplast experiments) or three different source plants. Each test was
285 repeated 3 times, with a total sum of 360 plants per condition.

286

287 Statistical analysis

288 Transmission rates were analyzed with generalized linear models (GLM). Quasi-binomial
289 distributions were used in order to take overdispersion into account. For experiments
290 involving various chemical treatments, the factors “treatment”, “date” and “manipulator” were
291 used as explanatory variables. Statistical results are represented in the figures as box plots.
292 The box plots were made with R 3.4.0 software.

293

294 **Acknowledgments**

295 Takii Europe provided gracefully turnip seeds. We acknowledge funding by INRA SPE
296 department, Agence Nationale de la Recherche (ANR) grant 12-BSV7-005-01, awarded to
297 Martin Drucker, and grant RGP0013/2015 from Human Frontier Science Program (HFSP),
298 awarded to Martin Drucker. Edwige Berthelot is supported by CIFRE PhD fellowship N°
299 2015/1115, financed by Association Nationale Recherche Technologie (anrt), Semences
300 Innovation Protection Recherche et Environnement (SIPRE) and Fédération Nationale des
301 Producteurs de Plantes de Pomme de Terre (FN3PT). We thank Albin Teulet for help with the
302 box plots and Sophie Le Blaye for plant care.

303 **Data availability**

304 The raw data of the transmission tests and of protoplast viability are available in the
305 Supplementary source files.

306 **Conflict of interests**

307 All authors declare that there is no conflict of interest.

308 **References**

- 309 Ameye, M., Allmann, S., Verwaeren, J., Smagghe, G., Haesaert, G., Schuurink, R.C., and
310 Audenaert, K. (2017). Green leaf volatile production by plants: a meta-analysis. *New*
311 *Phytol.*
- 312 Bak, A., Cheung, A.L., Yang, C., Whitham, S.A., and Casteel, C.L. (2017). A viral protease
313 relocalizes in the presence of the vector to promote vector performance. *Nat*
314 *Commun* 8: 14493.
- 315 Bak, A., Gargani, D., Macia, J.-L., Malouvet, E., Vernerey, M.-S., Blanc, S., and Drucker, M.
316 (2013). Virus factories of Cauliflower mosaic virus are virion reservoirs that engage
317 actively in vector-transmission. *J. Virol.*
- 318 Behrooz, A. and Ismail-Beigi, F. (1998). Induction of GLUT1 mRNA in response to azide and
319 inhibition of protein synthesis. *Mol. Cell. Biochem.* 187: 33–40.
- 320 Blanc, S., Drucker, M., and Uzest, M. (2014). Localizing viruses in their insect vectors. *Annu*
321 *Rev Phytopathol* 52: 403–425.
- 322 Blume, B., Nürnberger, T., Nass, N., and Scheel, D. (2000). Receptor-mediated increase in
323 cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant*
324 *Cell* 12: 1425–1440.
- 325 Bowman, B.J., Mainzer, S.E., Allen, K.E., and Slayman, C.W. (1978). Effects of inhibitors on
326 the plasma membrane and mitochondrial adenosine triphosphatases of *Neurospora*
327 *crassa*. *Biochim. Biophys. Acta* 512: 13–28.
- 328 Bragard, C., Caciagli, P., Lemaire, O., Lopez-Moya, J.J., MacFarlane, S., Peters, D., Susi,
329 P., and Torrance, L. (2013). Status and prospects of plant virus control through
330 interference with vector transmission. *Annu Rev Phytopathol* 51: 177–201.
- 331 Chen, S.J., Bradley, M.E., and Lee, T.C. (1998). Chemical hypoxia triggers apoptosis of
332 cultured neonatal rat cardiac myocytes: modulation by calcium-regulated proteases
333 and protein kinases. *Mol. Cell. Biochem.* 178: 141–149.
- 334 Dáder, B., Then, C., Berthelot, E., Ducouso, M., Ng, J.C.K., and Drucker, M. (2017). Insect
335 transmission of plant viruses: Multilayered interactions optimize viral propagation.
336 *Insect Sci.* 24: 929–946.
- 337 Delseny, M. and Hull, R. (1983). Isolation and characterization of faithful and altered clones
338 of the genomes of cauliflower mosaic virus isolates Cabb B-JI, CM4-184, and Bari I.
339 *Plasmid* 9: 31–41.
- 340 Drucker, M. and Then, C. (2015). Transmission activation in non-circulative virus
341 transmission: a general concept? *Curr Opin Virol* 15: 63–68.
- 342 Furch, A.C.U., Zimmermann, M.R., Will, T., Hafke, J.B., and van Bel, A.J.E. (2010). Remote-
343 controlled stop of phloem mass flow by biphasic occlusion in *Cucurbita maxima*. *J.*
344 *Exp. Bot.* 61: 3697–3708.
- 345 Gray, S.M. and Banerjee, N. (1999). Mechanisms of Arthropod Transmission of Plant and
346 Animal Viruses. *Microbiol Mol Biol Rev* 63: 128–148.

- 347 Gruszka, D., Szarejko, I., and Maluszynski, M. (2012). 13: Sodium Azide as a Mutagen. In
348 Plant Mutation Breeding and Biotechnology (CABI International: Wallingford, UK), pp.
349 159–166.
- 350 Hasiów-Jaroszewska, B., Fares, M.A., and Elena, S.F. (2013). Molecular Evolution of Viral
351 Multifunctional Proteins: The Case of Potyvirus HC-Pro. *J Mol Evol* 78: 75–86.
- 352 Hoh, F., Uzest, M., Drucker, M., Plisson-Chastang, C., Bron, P., Blanc, S., and Dumas, C.
353 (2010). Structural insights into the molecular mechanisms of cauliflower mosaic virus
354 transmission by its insect vector. *J. Virol.* 84: 4706–4713.
- 355 Hohn, T. (2013). Plant pararetroviruses: interactions of cauliflower mosaic virus with plants
356 and insects. *Current Opinion in Virology* 3: 629–638.
- 357 Institute of Medicine (US) Forum on Microbial Threats (2008). Ecology of emerging vector-
358 borne plant diseases. In *Vector-Borne Diseases: Understanding the Environmental,*
359 *Human Health, and Ecological Connections, Workshop Summary, The National*
360 *Academies Collection: Reports funded by National Institutes of Health.* (National
361 Academies Press (US): Washington (DC)), pp. 70–77.
- 362 Jaouannet, M., Rodriguez, P.A., Thorpe, P., Lenoir, C.J.G., MacLeod, R., Escudero-
363 Martinez, C., and Bos, J.I.B. (2014). Plant immunity in plant–aphid interactions. *Front.*
364 *Plant Sci.* 5.
- 365 Jenner, C.E. and Walsh, J.A. (1996). Pathotypic variation in turnip mosaic virus with special
366 reference to European isolates. *Plant Pathology* 45: 848–856.
- 367 Jeworutzki, E., Roelfsema, M.R.G., Anschutz, U., Krol, E., Elzenga, J.T.M., Felix, G., Boller,
368 T., Hedrich, R., and Becker, D. (2010). Early signaling through the Arabidopsis
369 pattern recognition receptors FLS2 and EFR involves Ca-associated opening of
370 plasma membrane anion channels. *Plant J.* 62: 367–378.
- 371 Jones, J.D.G. and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444: 323–329.
- 372 Kuno, G. and Chang, G.-J.J. (2005). Biological transmission of arboviruses: reexamination of
373 and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their
374 evolutionary trends. *Clin. Microbiol. Rev* 18: 608–637.
- 375 Leh, V., Jacquot, E., Geldreich, A., Hermann, T., Leclerc, D., Cerutti, M., Yot, P., Keller, M.,
376 and Blanc, S. (1999). Aphid transmission of cauliflower mosaic virus requires the viral
377 PIII protein. *EMBO J.* 18: 7077–7085.
- 378 Martinière, A., Bak, A., Macia, J.-L., Lautredou, N., Gargani, D., Doumayrou, J., Garzo, E.,
379 Moreno, A., Fereres, A., Blanc, S., and Drucker, M. (2013). A virus responds instantly
380 to the presence of the vector on the host and forms transmission morphs. *eLife* 2:
381 e00183.
- 382 Martinière, A., Gargani, D., Uzest, M., Lautredou, N., Blanc, S., and Drucker, M. (2009). A
383 role for plant microtubules in the formation of transmission-specific inclusion bodies of
384 Cauliflower mosaic virus. *Plant J.* 58: 135–146.
- 385 Peng, H.-C. and Walker, G.P. (2018). Sieve element occlusion provides resistance against
386 *Aphis gossypii* in TGR-1551 melons. *Insect Sci.*
- 387 Pirone, T.P. and Blanc, S. (1996). Helper-Dependent Vector Transmission of Plant Viruses.
388 *Annual Review of Phytopathology* 34: 227–247.

389 Prince, D.C., Drurey, C., Zipfel, C., and Hogenhout, S.A. (2014). The leucine-rich repeat
 390 receptor-like kinase BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1-ASSOCIATED KINASE1
 391 and the cytochrome P450 PHYTOALEXIN DEFICIENT3 contribute to innate immunity
 392 to aphids in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 164: 2207–2219.

393 Ranf, S., Eschen-Lippold, L., Pecher, P., Lee, J., and Scheel, D. (2011). Interplay between
 394 calcium signalling and early signalling elements during defence responses to
 395 microbe- or damage-associated molecular patterns. *Plant J.* 68: 100–113.

396 Revers, F. and García, J.A. (2015). Molecular biology of potyviruses. *Adv. Virus Res.* 92:
 397 101–199.

398 Schoeffter, P., Lugnier, C., Demesy-Waeldele, F., and Stoclet, J.C. (1987). Role of cyclic
 399 AMP- and cyclic GMP-phosphodiesterases in the control of cyclic nucleotide levels
 400 and smooth muscle tone in rat isolated aorta. A study with selective inhibitors.
 401 *Biochem. Pharmacol.* 36: 3965–3972.

402 Toyota, M., Spencer, D., Sawai-Toyota, S., Jiaqi, W., Zhang, T., Koo, A.J., Howe, G.A., and
 403 Gilroy, S. (2018). Glutamate triggers long-distance, calcium-based plant defense
 404 signaling. *Science* 361: 1112–1115.

405 Vincent, T.R., Avramova, M., Canham, J., Higgins, P., Bilkey, N., Mugford, S.T., Pitino, M.,
 406 Toyota, M., Gilroy, S., Miller, A.J., Hogenhout, S.A., and Sanders, D. (2017). Interplay
 407 of Plasma Membrane and Vacuolar Ion Channels, Together with BAK1, Elicits Rapid
 408 Cytosolic Calcium Elevations in Arabidopsis during Aphid Feeding. *Plant Cell* 29:
 409 1460–1479.

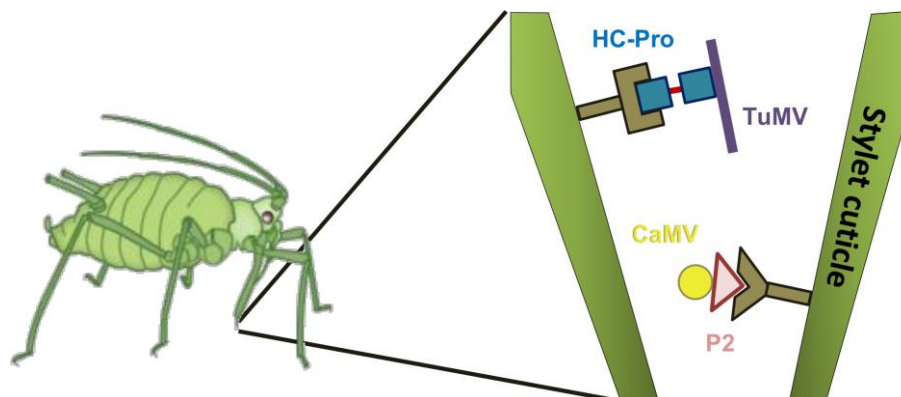
410 Widholm, J.M. (1972). The use of fluorescein diacetate and phenosafranine for determining
 411 viability of cultured plant cells. *Stain Technol* 47: 189–194.

412 Yasuda, S., Okada, K., and Saijo, Y. (2017). A look at plant immunity through the window of
 413 the multitasking coreceptor BAK1. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38: 10–18.

414 Zipfel, C., Kunze, G., Chinchilla, D., Caniard, A., Jones, J.D., Boller, T., and Felix, G. (2006).
 415 Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-
 416 mediated transformation. *Cell* 125: 749–60.

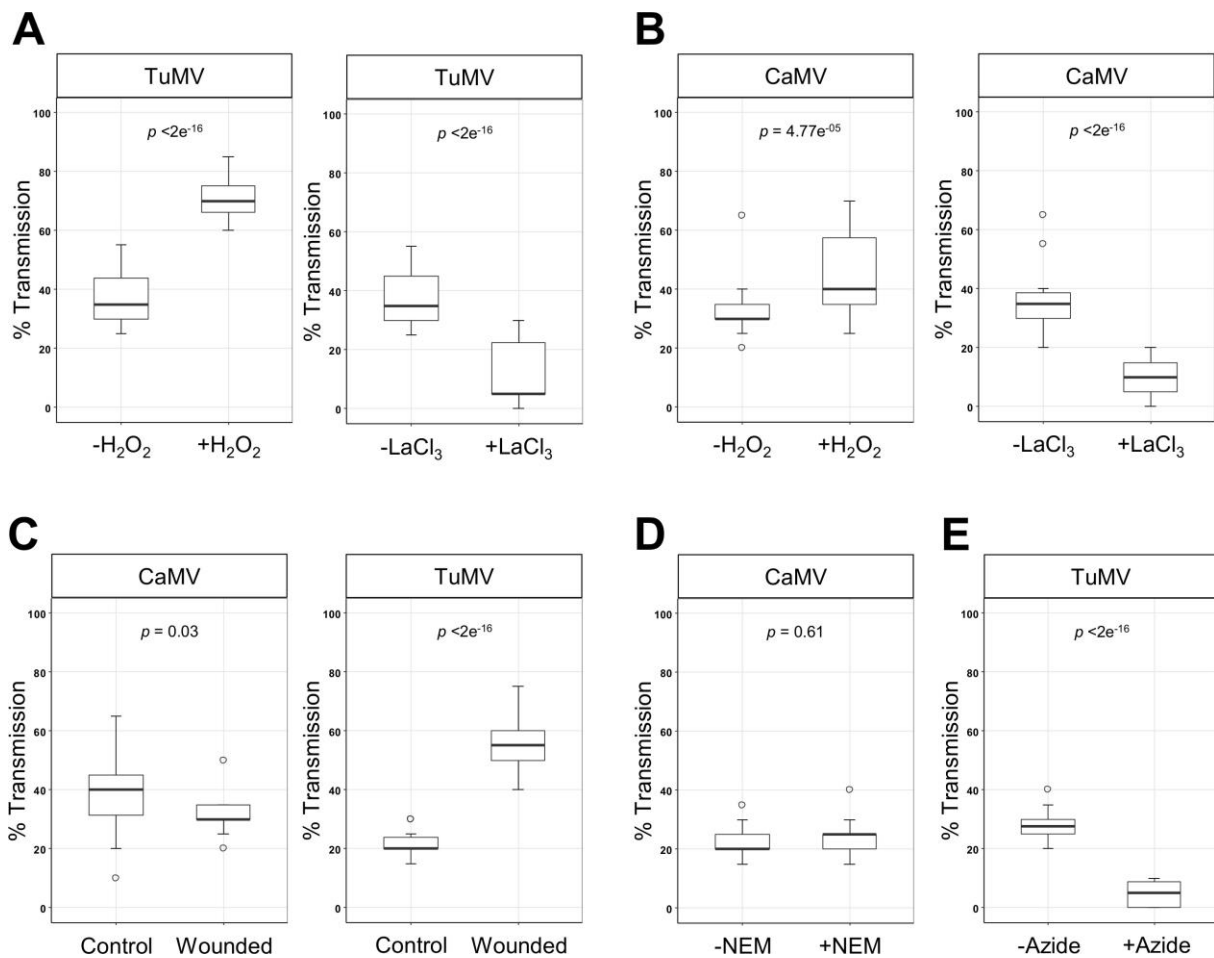
417

418 **Figure legends**



419

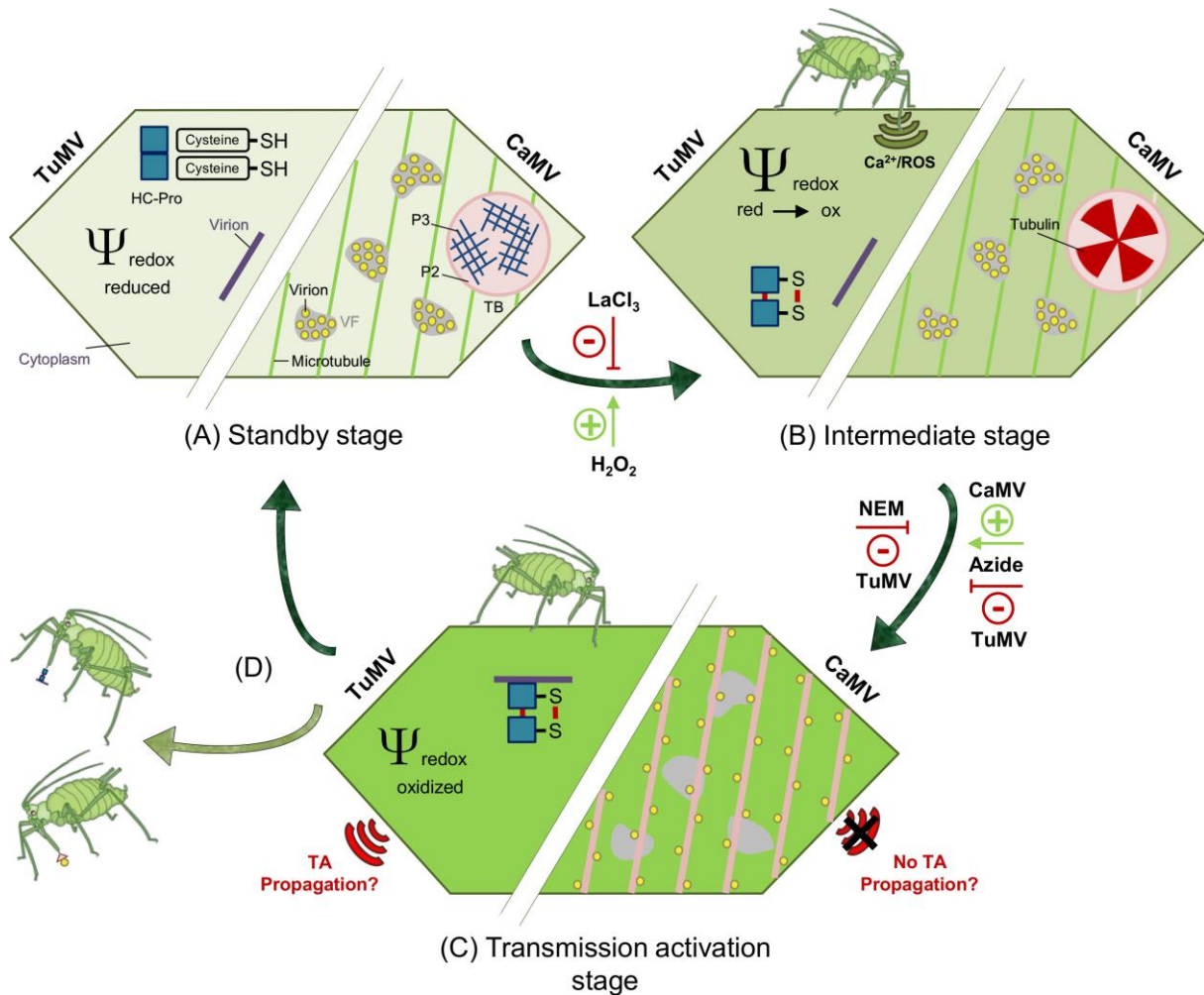
420 **Figure 1: Schemata of the transmissible complexes of TuMV and CaMV in the aphid**
 421 **vector.** The TuMV transmissible complex is composed of the filamentous TuMV particle and
 422 the helper component HC-Pro (left), and the CaMV transmissible complex is composed of
 423 the icosahedric CaMV particle and the helper component P2. Both helper components
 424 contain a virion binding domain that interacts with the viral capsid and a vector binding
 425 domain that interacts with yet unidentified receptors on the cuticle lining the interior of the
 426 stylets, the proboscis-like mouthparts of aphids (shown to the left). The aphid is adapted from
 427 (Blanc et al., 2014).
 428



429
 430 **Figure 2: Effect of different treatments on aphid transmission of CaMV and TuMV.** (A
 431 and B) Effect of the ROS H₂O₂ and the calcium channel blocker LaCl₃ on plant-to-plant
 432 transmission of TuMV (A) and CaMV (B). Turnip leaves were sprayed with 10 mM H₂O₂ or
 433 LaCl₃ solutions or water and incubated for 30 min before transmission tests. (C) Effect of
 434 wounding on plant-to-plant transmission of TuMV and CaMV. Turnip leaves were wounded
 435 by inflicting cuts with a razor blade and immediately used for transmission. (D) Effect of the
 436 thiol reducing agent NEM on protoplast-to-plant transmission of CaMV. Protoplasts were
 437 incubated with 3 mM NEM for 20 min before the transmission tests. (E) Effect of NaN₃ on

438 protoplast-to-plant transmission of TuMV. Protoplasts were incubated with 0.02% NaN₃ for
 439 40 min and then employed in transmission assays. For all transmission tests, means of
 440 infected test plants are calculated from a pool of three independent experiments in which a
 441 total of 360 tests plants were used per condition. Each condition was tested three times in
 442 independent experiments, using 6 repetitions for each condition and 20 tests plants per
 443 repetition. *p* designates p-values obtained in generalized linear models (see material and
 444 methods). Each graph shows medians and quartiles. The whiskers represent sample ranges.
 445 The open circles show the outlier samples. We verified that NEM and azide treatment of
 446 protoplasts did not change protoplast viability (Supplementary source file 1). The raw data of
 447 the transmission tests are presented in Supplementary source file 2).

448



449

450 **Figure 3. Comparison of CaMV and TuMV transmission activation.** The left part of the
 451 schematized cell presents a TuMV-infected and the right part a CaMV-infected cell (adapted
 452 from (Martinière et al., 2013; Blanc et al., 2014)). (A) Before aphid arrival, infected cells are in
 453 an unstressed standby stage and the cytoplasmic redox potential has normal reducing

454 values (light green color of the cytoplasm). TuMV virions and HC-Pro are distributed evenly
455 throughout the cytoplasm but cannot interact because HC-Pro is in its reduced conformation.
456 CaMV virions are contained in virus factories and P2, together with P3, in transmission
457 bodies. Thus, no or only few transmissible complexes are present. (B) Alighting aphids test
458 plants by brief stylet punctures in leaf cells and inject saliva into the cytoplasm before
459 aspirating some cell contents. Presumably, a saliva component or a DAMP bind to
460 corresponding PRR(s) and trigger calcium and ROS signaling. Downstream events will
461 eventually install plant defenses in a classical PTI reaction. The initial calcium waves and the
462 accompanying ROS change the redox potential of the cytoplasm to increasingly oxidized
463 values (green cytoplasm). HC-Pro becomes oxidized and forms oligomers via intermolecular
464 sulfur bridges. For CaMV, the calcium signal and the redox change induce entry of tubulin in
465 transmission bodies. The calcium channel blocker LaCl_3 inhibits calcium signaling, and
466 applying H_2O_2 mimics ROS generation, thus explaining their effects on TA. (C) When the
467 cytoplasm is maximally oxidized (dark green cytoplasm) HC-Pro oligomers bind to TuMV
468 virions to form TuMV transmissible complexes. The inhibitory action of NEM on TuMV
469 transmission could be by inhibiting HC-Pro oligomerization. For CaMV, the oxidizing
470 conditions induce dissociation of the transmission bodies. Free P2 binds to microtubules and
471 virions, dispatched from the virus factories, join P2 and form CaMV transmissible complexes.
472 Now TuMV and CaMV infected cells are in the transmission-activated stage and vectors
473 acquire and transmit virus efficiently. How azide inhibits TuMV and boosts CaMV
474 transmission, is unclear. TA of TuMV but not of CaMV might propagate in the tissue. (D)
475 After aphid departure, the cytoplasmic redox potential returns to reducing values, TuMV and
476 CaMV transmissible complexes dissociate and the cells return to the standby stage.

3. Conclusion et perspectives

Les travaux présentés dans cet article nous ont permis d'identifier des voies communes intervenant dans la transmission du CaMV et du TuMV ainsi que d'autres voies, spécifiques pour chacun des deux virus. Cinq traitements ont été expérimentés en tests de transmission : H_2O_2 , $LaCl_3$, blessures des feuilles, NEM et NaN_3 . La présence de H_2O_2 dans les feuilles des plantes infectées par le CaMV et le TuMV a augmenté la transmission des deux virus. En revanche, en bloquant la signalisation calcique avec du $LaCl_3$, la transmission a diminué. Ces deux réactifs ont donc le même effet sur la transmission du CaMV et du TuMV suggérant que leur transmission dépend des voies communes de signalisation ROS et calcique. Nos résultats indiquent également que certains processus de la transmission de ces deux virus sont différents puisque les blessures, le NEM et le NaN_3 n'induisent pas les mêmes effets. Ainsi, il existe des étapes communes dans la transmission du CaMV et du TuMV, certainement suivies par des étapes spécifiques à chacun des deux virus. Les voies de signalisation communes précoces ouvrent la possibilité que l'éliciteur de l'AT du CaMV et du TuMV soit le même. Ceci apparaîtrait logique puisque ces deux virus sont transmis par les mêmes pucerons vecteurs. La question de l'éliciteur est clef car cela démontrerait de manière directe que c'est bien le puceron qui déclenche l'AT du CaMV et du TuMV. Ce travail a été initié et sera détaillé le troisième chapitre de cette thèse.

CHAPITRE 3 : Recherche d'éliciteurs de l'activation de la transmission du TuMV

1. Contexte et objectifs

Le CaMV et le TuMV sont capables d'activer leur transmission. L'existence de ce phénomène indique que le virus peut se trouver sous une forme non transmissible ou sous une forme transmissible. Il existe un bénéfice très probable pour le virus de ne se trouver sous sa forme transmissible qu'en présence de son vecteur. En effet, les formes transmissibles ne sont pas nécessairement compatibles avec la réplication et le mouvement de cellule à cellule et longue distance. Le meilleur exemple en est certainement le CaMV où la protéine P3 qui décore la particule virale (Plisson *et al.*, 2005) peut interagir avec P2 pour la transmission (Leh *et al.*, 1999) et avec P1 pour le mouvement intraplante (Stavolone *et al.*, 2005). L'interaction de P3 avec P2 et P1 se produit exactement sur le même domaine peptidique de P3, ce qui illustre bien l'incompatibilité entre formes transmissibles et formes « colonisatrices » de la plante. Chez le TuMV, le HC-Pro est multifonctionnel (Maia *et al.*, 1996) et il est aussi aisé de concevoir que sa forme liée à la particule virale pour la transmission n'est certainement pas la forme qui assure toutes les autres fonctions intraplante. Par exemple, la suppression de l'ARN interférence par HC-Pro est indépendante de la présence de la protéine de capsid et de la particule virale (Ivanov *et al.*, 2016).

Le switch entre formes non-transmissible et transmissible, s'il s'opère précisément quand le vecteur est présent, doit être extrêmement rapide dans le cas des virus non-circulants. Ceci implique qu'il y ait un événement éliciteur induisant ce changement. Il serait intéressant d'identifier cet élément déclencheur qui peut être associé directement au vecteur ou indirectement à l'action de ce dernier sur la plante. Dans le cas du CaMV, le switch vers l'état transmissible pourrait être directement associé au vecteur. En effet, l'AT a été observée près des gaines salivaires de puceron (Martinière *et al.*, 2013). La gaine salivaire est susceptible de contenir des protéines pouvant être perçues par la plante comme des éliciteurs (Cherqui et Tjallingii, 2000). Cette reconnaissance pourrait alerter la plante qui mettrait en place des mécanismes de défense et cette cascade serait captée par le virus pour induire l'AT. Dans le cas du TuMV, l'état transmissible n'a pu être corrélé directement à la présence du vecteur et l'identification d'un éliciteur serait la seule manière pour y parvenir. En effet, l'activation de sa transmission a été associée à la signalisation calcique et à la production de ROS et ces deux processus sont observés suite aux piqûres de pucerons (Zebelo et Maffei, 2015).

En fait, un certain nombre d'évènements s'enchaînent suite à l'insertion des stylets du puceron dans la plante, et de nombreux facteurs sont des éliciteurs potentiels. Ces facteurs peuvent être issus de la plante (DAMPs), comme les composés libérés suite à l'altération de la paroi pectocellulosique. La dégradation de la paroi a lieu au moment où le puceron génère une forte pression mécanique en insérant ses stylets (Howe et Jander, 2008). L'éliciteur peut aussi être un composant de la salive gélifiante ou aqueuse du puceron (Cherqui et Tjallingii, 2000). L'élicitation peut également être associée à des stress mécanique (mouvement des stylets) au niveau de la membrane plasmique, qui se manifesterait par son hyperpolarisation ou dépolarisation (Shimmen, 2005).

Dans le cas du TuMV, quelle que soit la nature du ou des éliciteurs associés à l'alimentation du puceron, leur reconnaissance devrait générer la production des défenses de la plante puis induire l'AT du virus. Afin d'identifier l'éliciteur de l'AT du TuMV, nous avons testé l'effet de molécules candidates sur l'oligomérisation de HC-Pro en western blot, dont la mise en œuvre est beaucoup moins lourde que les tests de transmission.

2. Stress de piqûre

2.1. L'hypothèse de l'élicitation par la blessure

Au moment où le puceron introduit ses pièces buccales dans les cellules d'une plante pour s'alimenter, il occasionne de légères blessures. Celles-ci peuvent activer des processus de défense de la plante (Howe et Jander, 2008). Des expériences ont donc été menées afin de déterminer si les blessures causées par les pucerons peuvent éliciter l'AT du TuMV.

Dans un premier temps, une solution contenant des protoplastes de navets infectés par le TuMV a été mise en contact avec des pucerons. Lors de ce contact, les pucerons se sont nourris sur ces protoplastes et ont donc inséré leurs stylets, provoquant un stress mécanique (piqûre) et chimique (injection de salive). Après 5 à 20 min d'exposition aux pucerons, les protoplastes ont été récupérés afin d'évaluer en western blot si leur contact avec les pucerons avait induit la formation des oligomères de HC-Pro. Les résultats de cette expérience n'ont pas été concluants. Le monomère de la protéine est bien visible sur la membrane et l'est de plus en plus lorsque le contact avec les pucerons se prolonge (figure

10). Aux temps tardifs, on observe davantage de marquage au niveau de la taille où se forment les oligomères de HC-Pro. Comparé au traitement H_2O_2 , les cinétiques de l'apparition des oligomères de HC-Pro sont tardives et leur ampleur plus faible. Une explication pourrait être que le nombre des piqûres dans les protoplastes est trop faible pour pouvoir détecter leur effet. Un artefact possible est aussi à noter : chaque échantillon a été prélevé à différents points de temps à partir de la même solution de protoplastes. Ce choix a été privilégié afin de limiter les biais expérimentaux pouvant être liés à l'utilisation de différentes préparations de protoplastes. Il pourrait y avoir eu un stress artefactuel des protoplastes lié aux prélèvements successifs : (i) soulever la lamelle de verre pour avoir accès à la solution de protoplastes, (ii) aspirer la solution de protoplastes, et (iii) replacer la lamelle de verre. Ces manipulations pourraient provoquer à elles seules une faible formation d'oligomères de HC-Pro. En résumé, cette expérience ne nous a pas permis de conclure que le contact de cellules infectées par le TuMV avec les pucerons pouvait générer les formes oligomériques de HC-Pro. Cependant, les résultats présentés dans l'article 2 du chapitre 2 de la thèse montrent que les blessures infligées aux feuilles de navet infectées par le TuMV augmentent fortement la transmission du virus par les pucerons. Cette réponse suggère que des éléments liés à la blessure sont susceptibles d'être des éliciteurs et d'activer la transmission du TuMV.

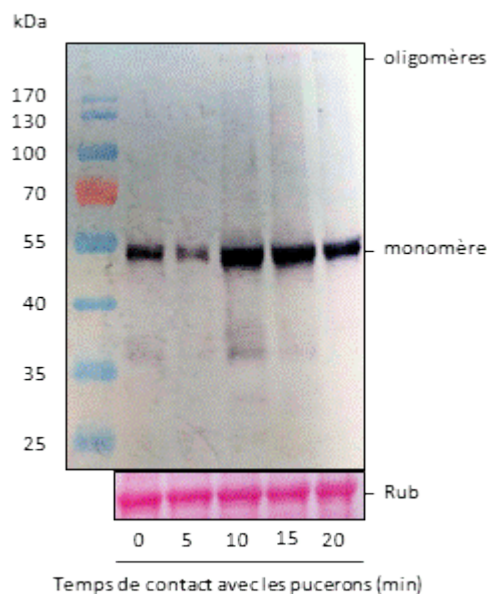


Figure 10 : Effet de la durée de contact des pucerons avec une solution de protoplastes sur l'oligomérisation de HC-Pro. Des protoplastes infectés par le TuMV ont été traités comme indiqué, puis analysés par Western blot après SDS-PAGE. Les échantillons ont été lysés dans un tampon ne contenant pas d'agents réducteurs afin

de conserver les ponts disulfures. Les différents temps de contact des protoplastes avec des pucerons n'ont pas montré l'induction suffisante d'oligomères de HC-Pro. La coloration de la RuBisCO (Rub) au rouge de Ponceau montre que la même quantité d'échantillon a été déposée dans tous les puits. Le marqueur de taille et les masses moléculaires en kDa figurent à gauche de la membrane.

2.2. L'hypothèse de l'élicitation par les acides galacturoniques

Les résultats présentés dans la partie précédente ne permettent pas de détecter des modifications de l'état d'oligomérisation de HC-Pro lorsque les pucerons se nourrissent sur des protoplastes infectés. Mais il s'agit là de cellules végétales dépourvues de parois. Or, lorsque le puceron insère ses stylets dans une plante, il génère une cassure au niveau de la paroi. Cette dernière est composée de fibres de cellulose et de molécules de pectine. La structure des pectines est formée par un squelette d'acides galacturoniques qui peuvent être perçus par la cellule végétale (Jin et West, 1984 ; Vorhölter *et al.*, 2012). Des études ont pu mettre en évidence que leur reconnaissance activait les voies de signalisation calcique (Navazio *et al.*, 2002) ainsi que la production de ROS (Bellincampi *et al.*, 2000). L'AT du TuMV est associée à la signalisation calcique ainsi qu'à la présence de ROS dans les cellules, et les acides galacturoniques sont donc de bons candidats en tant qu'éliciteurs.

Deux types d'acides galacturoniques ont été testés sur des protoplastes de navets infectés par le TuMV : le polygalacturonic acid et le D-(+)-galacturonic acid monohydrate. Ces deux molécules ont été testées à différentes concentrations et à différents temps d'incubation. Ensuite, l'effet de ces deux traitements sur la formation des oligomères de HC-Pro a été analysé par western blot. Les résultats ont montré que le D-(+)-galacturonic acid monohydrate n'induisait pas la formation d'oligomères de HC-Pro quelle que soit la concentration et le temps d'incubation (figure 11A). En revanche, l'oligomérisation de HC-Pro est visible après l'ajout de polygalacturonic acid. Le degré de l'oligomérisation dépendait du temps d'incubation et de la concentration qui était maximale à 5 min et 100 µg/mL (figure 11B). Ces données indiquent que la reconnaissance des acides polygalacturoniques par la plante pourrait déclencher la TA du TuMV. Néanmoins, cette hypothèse reste à confirmer avec des expériences complémentaires. Des tests de transmission permettraient de vérifier si l'ajout d'acides polygalacturoniques augmente la transmission et des tests d'interaction protéine-protéine permettraient de vérifier si les interactions CP/HC-Pro seraient également favorisées.

Ce type d'élicitation n'est cependant pas spécifique du vecteur puisqu'il est engendré suite à la dégradation de la paroi. Celle-ci peut être endommagée lors de piqûres du vecteur mais également lors d'attaques par d'autres agents pathogènes et lors de stress abiotiques. Hormis des candidats éliciteurs issus de la détérioration de la paroi végétale, d'autres candidats éliciteurs, plus spécifiques du vecteur, pourraient être identifiés dans les sécrétions buccales des vecteurs.

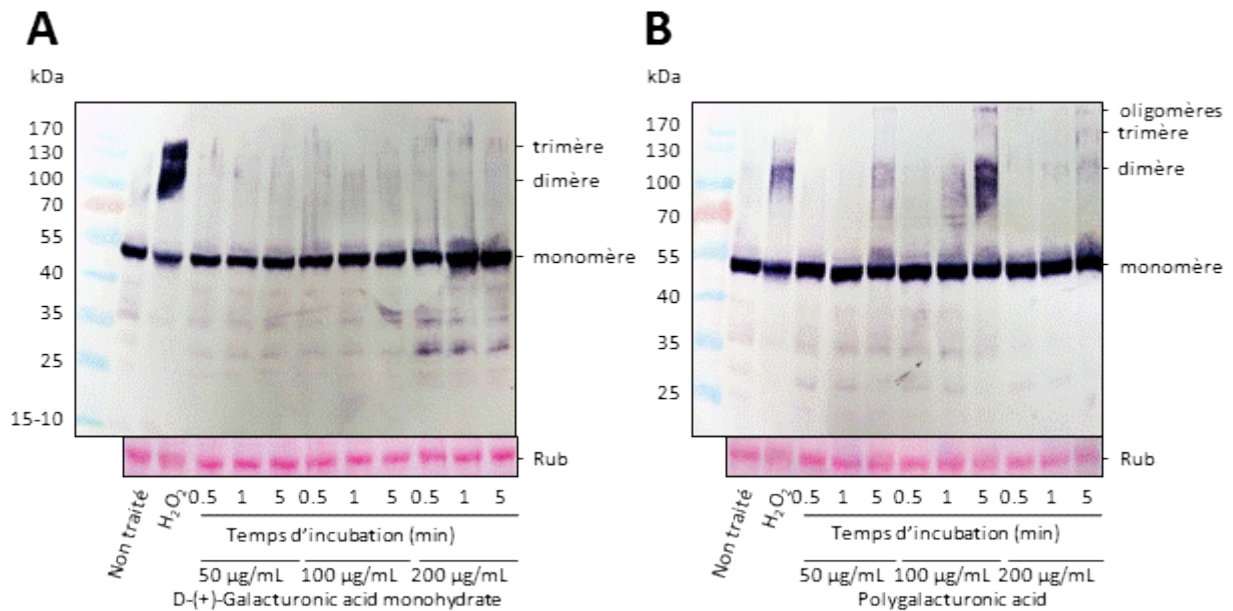


Figure 11 : Effet des acides galacturoniques sur l'oligomérisation de HC-Pro. Des protoplastes infectés par le TuMV ont été traités comme indiqué, puis analysés par Western blot après SDS-PAGE. Les échantillons ont été lysés dans un tampon ne contenant pas d'agents réducteurs afin de conserver les ponts disulfures. (A) L'incubation des protoplastes avec le D-(+)-Galacturonic acid monohydrate n'a pas montré la génération des oligomères de HC-Pro, quel que soit le temps d'incubation et la concentration du réactif. (B) L'incubation des protoplastes avec le Polygalacturonic acid a montré l'induction des oligomères de HC-Pro après 5 min d'incubation pour les concentrations 50 et 100 µg/mL. H₂O₂, traitement avec 2 mM H₂O₂ pendant 5 min. La coloration de la RuBisCO (Rub) au rouge de Ponceau montre que la même quantité d'échantillon a été déposée dans tous les puits. Le marqueur de taille et les masses moléculaires en kDa figurent à gauche de chaque membrane.

3. Stress lié à la salive du puceron

Lorsqu'un puceron pique les parties aériennes d'une plante pour se nourrir, il y introduit ses stylets et sécrète de la salive. Les pucerons produisent deux types de salives : la salive aqueuse et la salive gélifiante. La salive aqueuse est injectée lors des ponctions du puceron et joue une part importante dans le contournement des premières lignes de défense de la cellule végétale. La salive gélifiante polymérise immédiatement après son éjection et forme une gaine protectrice autour des stylets. Cette gaine salivaire limite le contact direct des stylets avec la plante et facilite leur progression vers les tissus profonds. Chaque salive contient des protéines telles que des enzymes digestives, enzymes de dégradation de la paroi, protéases, peroxydases (Cherqui et Tjallingii, 2000 ; Miles, 1999 ; Walling, 2009 ; Will *et al.*, 2007). Remarquablement, la salive contient aussi des pectinases qui aident à la dégradation de la paroi végétale et donc à la libération d'acides galacturoniques qui peuvent être reconnus et éliciter les défenses de la plante de manière indirecte. Dans le cas du CaMV, Martinière *et al.* (2013) ont relevé la présence des formes virales transmissibles au contact direct des gaines salivaires des pucerons. Cet exemple conforte la forte probabilité qu'un éliciteur se trouve dans les salives du puceron.

En vue de confirmer cette hypothèse, de la salive liquide et de la salive gélifiante ont été récupérées à partir de pucerons *M. persicae*. Pour cela, les pucerons ont été placés dans un anneau sur lequel étaient placées deux couches de parafilm® contenant une solution nutritive (voir la composition en annexe 2). Pour s'alimenter, les pucerons insèrent leurs stylets à travers la première couche de parafilm® et sécrètent leur salive liquide dans le milieu nutritif tandis que leur salive gélifiante reste piégée dans la première couche de parafilm®. Une fois récupérées et concentrées selon les protocoles décrits par Cherqui and Tjallingii (2000) et Harmel *et al.*, (2008), les deux types de salives ont été ajoutés séparément, ou ensemble, dans une solution de protoplastes de navets infectés par le TuMV. Afin d'identifier si leurs présences généraient la formation des oligomères de HC-Pro, les échantillons ont été analysés en western blot. Les résultats de cette expérience n'ont pas montrés l'induction des oligomères de HC-Pro après incubation des différents types de salives (figure 12). Ces données n'indiquent pas que la salive ne contient pas de protéines élicitrices des formes oligomériques de HC-Pro. Peut-être que les échantillons de salive n'ont pas été suffisamment concentrés, ou que leur extraction et/ou leur concentration a

partiellement dégradé les protéines qu'ils contenaient. En effet, nous avons pu noter une coloration brunâtre des extraits salivaires après leur concentration, signe d'une probable oxydation.

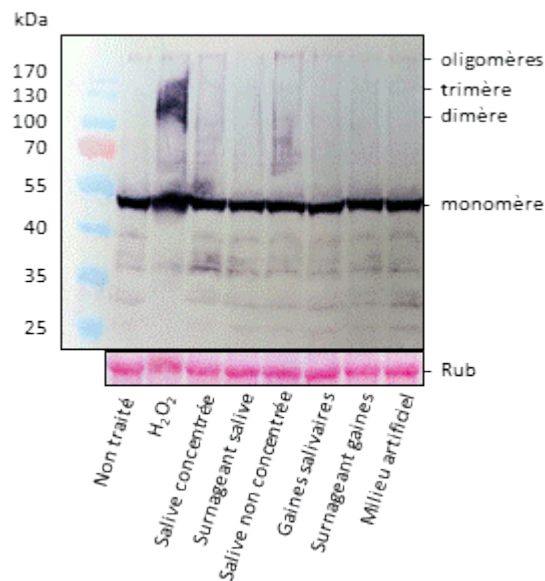


Figure 12 : Effet de la salive liquide et des gaines salivaires sur l'oligomérisation de HC-Pro. Des protoplastes infectés par le TuMV ont été traités comme indiqué, puis analysés par Western blot après SDS-PAGE. Les échantillons ont été lysés dans un tampon ne contenant pas d'agents réducteurs afin de conserver les ponts disulfures. La présence de salive liquide et de gaines salivaires de pucerons dans les protoplastes infectés par le TuMV n'a pas induit la formation des oligomères de HC-Pro. H₂O₂, traitement avec 2 mM H₂O₂ pendant 5 min ; Salive concentrée, traitement avec 10 µL de salive concentrée entre 2 et 3 µg/µL pendant 5 minutes ; Surnageant salive, traitement avec 10 µL de surnageant issu de la concentration de salive pendant 5 minutes ; Salive non concentrée, traitement avec 10 µL de salive non concentrée pendant 5 minutes ; Gaines salivaires, traitement avec 10 µL de tampon mannitol contenant les gaines salivaires après centrifugation pendant 5 minutes ; Surnageant gaines, traitement avec 10 µL de surnageant issu de la concentration des gaines pendant 5 minutes ; Milieu artificiel, traitement avec 10 µL de milieu artificiel pour pucerons pendant 5 minutes. La coloration de la RuBisCO (Rub) au rouge de Ponceau montre que la même quantité d'échantillon a été déposée dans tous les puits. Le marqueur de taille et les masses moléculaires en kDa figurent à gauche de la membrane. Le protocole de préparation des différentes salives est décrit dans la section Matériel et Méthodes.

En complément de cette expérience, des extraits totaux de pucerons ont également été préparés à partir de pucerons *M. persicae*. Ces extraits ont été filtrés afin de purifier et concentrer les molécules qu'ils contiennent. Deux fractions de molécules ont ainsi été obtenues : des molécules < 10kDa et des molécules > 10kDa. Ces deux fractions ont ensuite

été ajoutées à des protoplastes de navets infectés par le TuMV et testés en western blot pour vérifier le profil d'oligomères de HC-Pro. Aucune des deux fractions n'a induit la formation des oligomères de HC-Pro (figure 13). Tout comme l'expérience précédemment énoncée, ces données ne signifient pas qu'il n'y a pas d'éliciteurs des formes oligomériques de HC-Pro dans les extraits de pucerons. Le mode de préparation de ces extraits n'a peut-être pas permis de conserver les molécules dans un état fonctionnel, en quantités suffisantes, ou alors les fractions contenaient des inhibiteurs.

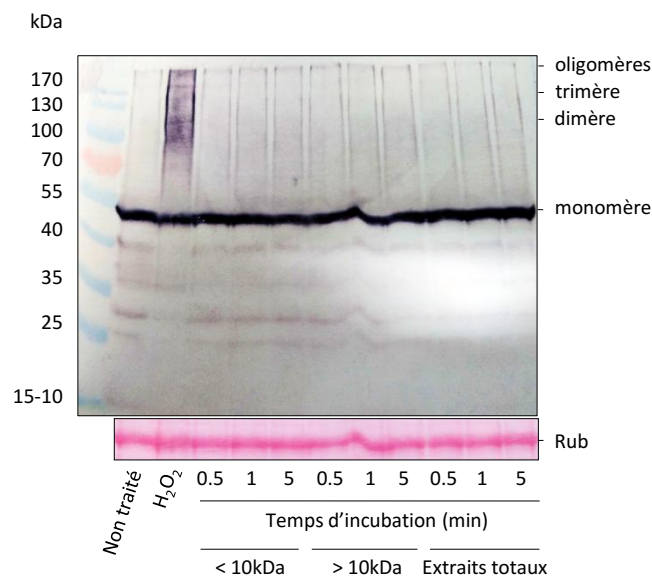


Figure 13 : Effet d'extraits totaux de pucerons sur l'oligomérisation de HC-Pro. Des protoplastes infectés par le TuMV ont été traités comme indiqué, puis analysés par Western blot après SDS-PAGE. Les échantillons ont été lysés dans un tampon ne contenant pas d'agents réducteurs afin de conserver les ponts disulfures. La présence de fractions de pucerons dans les protoplastes infectés par le TuMV n'a pas induit la formation des oligomères de HC-Pro. H₂O₂, traitement avec 2 mM H₂O₂ pendant 5 min ; < 10kDa, traitement avec 10 µL de broyat-filtrat de pucerons inférieur à 10kDa ; > 10kDa, traitement avec 10 µL de broyat-filtrat de pucerons supérieur à 10kDa ; Extraits totaux, traitement avec 10 µL d'extraits totaux de pucerons. La coloration de la RuBisCO (Rub) au rouge de Ponceau montre que la même quantité d'échantillon a été déposée dans tous les puits. Le marqueur de taille et les masses moléculaires en kDa figurent à gauche de la membrane.

Une expérience « avec a priori » a été réalisée pour tenter de relier directement la formation des oligomères de HC-Pro au vecteur. Des plantes transgéniques d'*A. thaliana* exprimant soit la protéine *Myzus persicae 1* (Mp1), soit la protéine *Myzus persicae 2* (Mp2) de *M. persicae* ont été utilisées pour tester leur impact sur l'induction des oligomères de HC-

Pro. Pour y parvenir, des extraits de ces plantes ont été ajoutés à des protoplastes de navets infectés par le TuMV et la caractérisation des oligomères de HC-Pro a été réalisée par western blot. Bien que nous ayons observé la formation d'oligomères en présence des mutants, le même résultat est observable en présence du clone sauvage Col0 n'exprimant pas les deux protéines Mp1 et Mp2 (figure 14). Dans ces conditions expérimentales, les protéines Mp1 et Mp2 ne sont pas des éliciteurs des formes oligomériques de HC-Pro et donc de l'AT du TuMV.

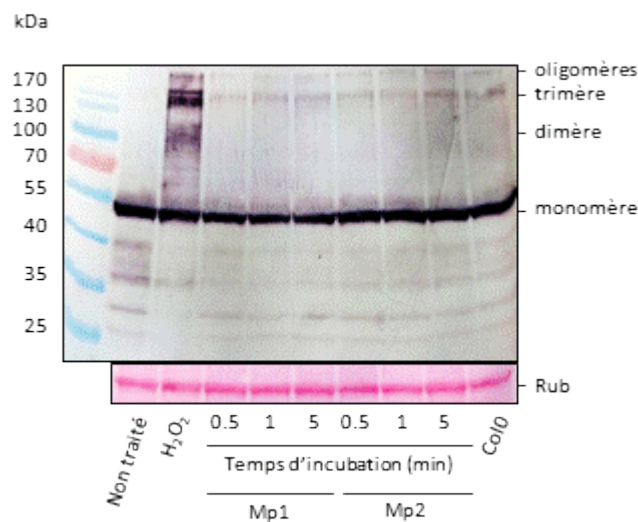


Figure 14 : Effet de Mp1 et Mp2 sur l'oligomérisation de HC-Pro. Des protoplastes infectés par le TuMV ont été traités comme indiqué, puis analysés par Western blot après SDS-PAGE. Les échantillons ont été lysés dans un tampon ne contenant pas d'agents réducteurs afin de conserver les ponts disulfures. La présence d'extraits d'*A. thaliana* exprimant les protéines Mp1 et Mp2 dans les protoplastes infectés par le TuMV n'induit pas la formation des oligomères de HC-Pro. H₂O₂, traitement avec 2 mM H₂O₂ pendant 5 min ; Mp1, traitement avec 10 µL d'extraits d'*A. thaliana* exprimant la protéine *Myzus persicae 1* ; Mp2, traitement avec 10 µL d'extraits d'*A. thaliana* exprimant la protéine *Myzus persicae 2* ; Col0, traitement avec 10 µL d'extraits d'*A. thaliana* sauvage pendant 5 min. La coloration de la RuBisCO (Rub) au rouge de Ponceau montre que la même quantité d'échantillon a été déposée dans tous les puits. Le marqueur de taille et les masses moléculaires en kDa figurent à gauche de la membrane.

4. Stress de la membrane plasmique

De nombreux travaux de recherche ont relié l'identification d'éliciteurs de réponses des plantes à des modifications de la membrane plasmique des cellules végétales. En effet,

le premier événement dans l'élicitation est souvent un changement du potentiel électrique de cette membrane. Ces modifications peuvent survenir suite à la libération d'ions K^+ que la plante pourrait percevoir lorsqu'elle est blessée (Shimmen, 2005). La membrane plasmique peut ainsi se retrouver dépolarisée, hyperpolarisée ou encore subir un choc osmotique. La dépolarisation de la membrane plasmique est liée à l'entrée d'ions positifs dans la cellule végétale. L'hyperpolarisation de la membrane plasmique correspond à l'entrée d'ions négatifs dans la cellule végétale. Le choc osmotique équivaut à une dérégulation des pressions des deux côtés de la membrane et conduit souvent à sa rupture. Ces différences de potentiel entre l'extérieur d'une cellule et le milieu intracellulaire sont issues d'échanges d'ions de part et d'autre de la membrane. Parmi ces ions, on retrouve les Ca^{2+} . Beaucoup d'études ont pu établir un lien entre la signalisation calcique, la production de ROS et la dépolarisation (Martos *et al.*, 2015 ; Mithöfer *et al.*, 2005 ; Pugin *et al.*, 1997), l'hyperpolarisation (Klüsener *et al.*, 2002 ; Rossard *et al.*, 2006) et le choc osmotique (Kopp *et al.*, 1983). L'AT du TuMV étant liée à la signalisation calcique et à la production de ROS, ces différents types de modification de la membrane cellulaire en font de bons candidats pouvant être impliqués dans l'élicitation de l'AT du TuMV.

Afin de mimer des modifications de la membrane plasmique, différentes concentrations de chlorure de potassium (KCl), rapportées dans la littérature mentionnée ci-dessus, dépolarisant, hyperpolarisant ou générant un choc osmotique ont été ajoutées à des protoplastes de navets infectés par le TuMV. Ensuite, nous avons testé si ces stress pouvaient générer les oligomères de HC-Pro en réalisant des western blot. Les résultats de ces analyses ont montré que les différentes concentrations de KCl testées à des temps d'incubation différents ne généraient pas la formation des oligomères de HC-Pro, contrairement au témoin positif incubé avec du H_2O_2 (figure 15). Ces données suggèrent que l'induction d'un stress de la membrane plasmique ne permettrait pas de générer les oligomères de HC-Pro et donc d'activer la transmission du TuMV dans les conditions testées. Cependant, il se pourrait que d'autres ions participant aux échanges à travers la membrane plasmique n'aient pas le même effet que K^+ .

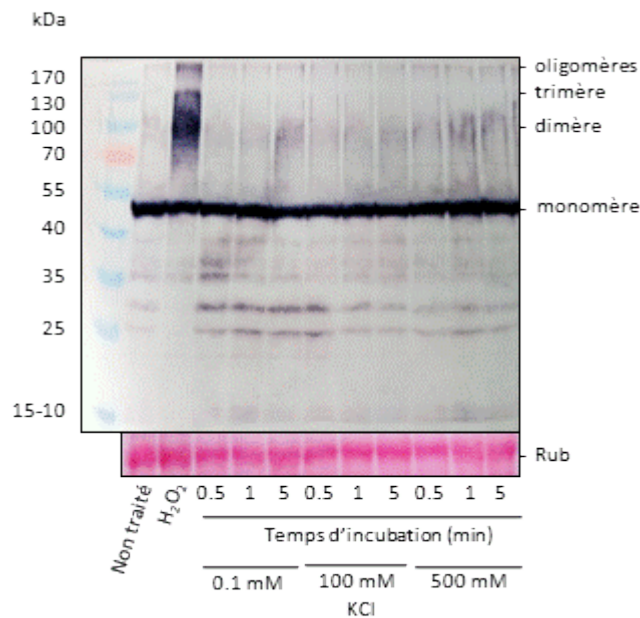


Figure 15 : Effet de modifications de la membrane plasmique sur l'oligomérisation de HC-Pro. Des protoplastes infectés par le TuMV ont été traités comme indiqué, puis analysés par Western blot après SDS-PAGE. Les échantillons ont été lysés dans un tampon ne contenant pas d'agents réducteurs afin de conserver les ponts disulfures. Les variations de polarisation des membranes plasmiques sur les protoplastes infectés par le TuMV ne montrent pas la formation des oligomères de HC-Pro. H₂O₂, traitement avec 2 mM H₂O₂ pendant 5 min ; 0.1 mM de KCl, dépolarisation de la membrane plasmique ; 100 mM de KCl, hyperpolarisation de la membrane plasmique ; 500 mM de KCl, choc osmotique. La coloration de la RuBisCO (Rub) au rouge de Ponceau montre que la même quantité d'échantillon a été déposée dans tous les puits. Le marqueur de taille et les masses moléculaires en kDa figurent à gauche de chaque membrane.

5. Conclusion et perspectives

Les différentes conditions qui ont été testées n'ont pas permis d'associer directement la présence du puceron à la formation des oligomères de HC-Pro. L'extraction des protéines de pucerons est difficile à mettre au point du fait de la fragilité des protéines extraites pouvant être oxydées ou dégradées. Malgré nos résultats négatifs, il reste donc possible que des protéines du puceron puissent être reconnues par la plante et déclenchent les voies de signalisation et de défense qui activent la transmission du TuMV. De nombreuses études ont mis en évidence le fait que des protéines du puceron engendrent des mécanismes de signalisation et de défense (Cherqui et Tjallingii, 2000 ; Miles, 1999 ; Walling, 2009 ; Will *et al.*, 2007). De même, la présence de formes transmissibles du CaMV a été observée près de

gaines salivaires de puceron (Martinière *et al.*, 2013), ce qui suggère qu'une ou plusieurs protéines issues de la gaine ont pu éliciter l'AT du CaMV.

Même si aucun lien direct n'a pu être établi entre la présence du puceron et la mise en place de l'AT du TuMV, certains résultats suggèrent un lien indirect entre eux. Nos résultats ont montré qu'il y a une forte augmentation de la transmission du TuMV lorsque la plante était blessée et que la formation d'oligomères de HC-Pro est induite en présence d'acides polygalacturoniques. Ces observations sont compatibles avec l'hypothèse qu'à la suite d'une blessure infligée par le puceron, des acides polygalacturoniques sont libérés et reconnus par la plante, générant des mécanismes de défense dans la cellule qui pourraient induire l'AT du TuMV. Cependant, d'autres preuves restent à fournir pour confirmer cette hypothèse, comme la réalisation de tests de transmission par vecteurs ou encore la détection des interactions CP/HC-Pro en présence d'acides polygalacturoniques.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Le principal objectif de ma thèse était d'acquérir de nouvelles connaissances sur le déroulement du processus de transmission des potyvirus par les pucerons. Pour atteindre ce but, je me suis appuyée sur les travaux de thèse d'Alexandre Martinière (2008) et d'Aurélié Bak (2013) qui portaient sur la transmission du CaMV. Leurs recherches ont mis en évidence la capacité du CaMV de passer d'une forme non transmissible à une forme transmissible en présence du puceron. Ainsi, jusqu'à cette découverte, l'acquisition des virus non circulants (comme le CaMV et le TuMV, étudié ici) par leur vecteur était souvent considérée comme ne nécessitant aucuns préalables particuliers, comme résultant du prélèvement du virus par le vecteur lors de l'ingestion du contenu cellulaire des plantes infectées, un « comportement passif » de la part du virus. A présent, nous savons qu'au moins un virus non circulant, le CaMV, est capable de produire des formes transmissibles spécifiques précisément au moment et au lieu où le puceron s'alimente sur la plante hôte. L'acquisition de ce virus n'est donc pas « passive » mais résulte de mécanismes cellulaires et moléculaires qui représentent une adaptation virale très sophistiquée qui maximise les chances de transmission. Ce phénomène a été dénommé « activation de la transmission » (Drucker et Then, 2015). A partir de ces données, nous avons émis l'hypothèse que d'autres, sinon tous les virus, étaient susceptibles eux aussi d'utiliser cette stratégie pour leur acquisition et transmission par le puceron, une hypothèse que nous avons choisi de vérifier chez le potyvirus.

Dans le premier chapitre de ma thèse, j'ai mis en évidence que le potyvirus TuMV génère lui aussi des formes transmissibles après application de certains stress et que ceci corrèle avec une transmission accrue. En effet, j'ai identifié deux réponses de la plante impliquées dans la signalisation et la défense contre les agents pathogènes qui induisaient les formes transmissibles du TuMV. Il s'agit de la production de ROS et de la signalisation calcique. En présence de ROS, la transmission du TuMV par les pucerons augmente fortement et à l'inverse, lorsque la signalisation calcique est bloquée, sa transmission est fortement réduite. Ces résultats sont corrélés avec la présence/absence d'oligomères par ponts disulfures du facteur assistant HC-Pro et de son association ou non avec la CP. De ce fait, les formes transmissibles du TuMV et sa transmission coïncident avec la présence de ROS dans l'environnement cellulaire au moment de l'acquisition par le puceron. Les ROS sont connues pour modifier le potentiel d'oxydoréduction conduisant à la réduction des groupements thiols des cystéines, ce qui est probablement la cause de l'apparition des

oligomères par création de ponts disulfures. Ce nouveau résultat et ces informations ont soulevé la question suivante : quelles sont les cystéines impliquées dans la formation des oligomères par ponts disulfures de HC-Pro ? Afin de répondre à cette nouvelle question, les quinze cystéines présentes dans la protéine HC-Pro du TuMV étudié ont été mutées et testées. Compte tenu des nombreux rôles qu'occupe cette protéine dans le cycle viral, la moitié des mutations engendrées ont rendu le virus non infectieux et n'ont donc pas pu être testées. En plus de la multifonctionnalité de HC-Pro, la possibilité que plusieurs cystéines soient impliquées dans la formation des oligomères de HC-Pro font qu'aucune cystéine n'a pu être identifiée avec certitude comme étant directement impliquée dans la formation de ces oligomères et donc dans l'AT.

Le deuxième chapitre de ma thèse reprend les connaissances acquises sur l'AT du CaMV et du TuMV afin de les comparer. Celles-ci montrent que le CaMV et le TuMV utilisent des stratégies similaires pour aider à leur acquisition par le vecteur. Dans les deux cas, l'AT est caractérisée par la formation de complexes transmissibles dans les cellules infectées, facilitant l'acquisition du virus par le puceron. En revanche, le mode de formation de ces complexes transmissibles varie énormément. Alors que la formation des complexes transmissibles du TuMV semble régulée par la formation d'oligomères par ponts disulfures de HC-Pro, rendant HC-Pro capable d'interagir avec la CP dans le cytosol, la formation des complexes transmissibles du CaMV est initiée par la relocalisation de P2 et des virions sur les microtubules où ils vont interagir grâce à leur proximité et possiblement grâce à l'accessibilité des sites d'interaction lorsque P2 n'est plus stockée dans le corps à transmission et que les virions sont libérés des usines virales. Donc, dans le cas du TuMV, il semble exister seulement une séparation « structurale » qui empêche la formation des complexes transmissibles dans les cellules non stressées, lorsque HC-Pro n'a pas de ponts disulfures intermoléculaires, et dans le cas du CaMV, on a une séparation spatiale des composants du complexe transmissible. A partir de ces informations, j'ai testé différents réactifs affectant des processus cellulaires et moléculaires rencontrés dans la mise en place de réponses de défense de la plante sur la transmission de ces deux virus. Les résultats de ces expériences ont montré que la transmission du CaMV et du TuMV dépend de la production de ROS, qui augmente la transmission par pucerons des deux virus, et de la signalisation calcique qui, lorsqu'elle est bloquée, diminue la transmission des deux virus. Mes résultats ont également mis en évidence que certaines étapes de leur transmission

étaient différentes car certains réactifs ont des effets opposés sur la transmission des deux virus. Grâce à ces nouvelles données, on pourrait imaginer qu'une première étape de signalisation médiée par les ROS et le calcium est commune pour l'AT du CaMV et du TuMV. En revanche, la ou les étape(s) suivante(s) de l'AT seraient différentes entre les deux virus. Cette seconde partie du processus d'AT pourrait certainement être spécifique pour chaque virus.

J'ai tenté d'identifier un ou plusieurs éliciteur(s) de l'AT du TuMV dans le troisième chapitre de ma thèse. Les différentes expériences que j'ai réalisées, ainsi que les recherches bibliographiques, ne m'ont pas permis d'identifier avec certitude un éliciteur de l'AT du TuMV mais m'ont permis d'avoir une idée de la nature des éliciteurs pouvant y être impliqués. Les pistes les plus prometteuses étaient les résultats obtenus avec la blessure des feuilles qui a fortement augmenté la transmission et l'incubation des protoplastes avec l'acide polygalacturonique, un constituant de la paroi cellulaire et éliciteur des réponses contre d'autres agents pathogènes (Bellincampi *et al.*, 2000 ; Navazio *et al.*, 2002) qui a induit des oligomères de HC-Pro. Ces résultats suggèreraient qu'un DAMP serait à l'origine de l'AT du TuMV. Cependant, ces résultats restent à confirmer avec des expériences complémentaires telles que des tests de transmission ainsi que des tests d'interaction HC-Pro/CP en présence d'acide polygalacturonique. Ces expériences permettraient de vérifier si la présence de ces oligomères est corrélée avec une augmentation de la transmission par pucerons et avec l'augmentation des interactions HC-Pro/CP. Tous les autres candidats éliciteurs testés n'ont eu aucun effet sur l'oligomérisation de HC-Pro, ce qui n'exclue pas pour autant qu'un composant du puceron ne soit pas éliciteur de l'AT du TuMV mais que des contraintes techniques nous aient empêchées de les identifier.

Pour conclure, les ROS et la signalisation calcique sont importants dans la perception précoce des parasites, y compris les insectes (Zebelo et Maffei, 2015) et plus récemment, des études ont mis en évidence que les piqûres de pucerons induisaient une élévation rapide du calcium autour des sites d'alimentation (Vincent *et al.*, 2017). Étant donné que les ROS et la signalisation calcique sont souvent interconnectés (Lachaud *et al.*, 2011), l'AT du TuMV détourne probablement au moins une de ces voies de signalisation précoces. L'événement initial de déclenchement de ce processus reste inconnu, comme pour le CaMV. Il pourrait s'agir d'un effet direct des ROS contenus dans la salive du puceron ou de peroxydases

productrices de ROS (Miles, 1999) qui sont injectées dans les cellules au cours de l'activité d'alimentation.

Certains microorganismes pathogènes se préparent à leur acquisition par un vecteur en optimisant la production de formes transmissibles spécialisées. Celle-ci est induite suite aux signaux environnementaux, provenant de l'hôte et/ou du vecteur lui-même, qui indiquent la présence du vecteur. Ce processus est déjà connu et caractérisé pour quelques microorganismes pathogènes, comme certaines bactéries parasitaires et certains métazoaires, qui utilisent des formes spécifiques pour leur transmission (Matthews, 2011). Ainsi, les microorganismes pathogènes n'évitent pas simplement l'immunité de l'hôte jusqu'à ce qu'un vecteur les détecte, mais utilisent des mécanismes de détection de l'environnement et de régulation du développement extrêmement sensibles pour assurer leur transmission.

Ces formes de développement spécialisées pour la transmission n'ont été envisagées et étudiées que plus tard pour les virus. Le cas des baculovirus, famille de virus spécifique aux arthropodes, met en évidence une forme non transmissible du virus, des particules virales qui assurent la dissémination au sein de l'organisme infecté, ainsi qu'une forme transmissible, les virions, occlus dans des polyèdres qui assurent la dissémination horizontale du baculovirus au sein des populations d'insectes (Braunagel and Summers, 2007 ; Harrison et Hoover, 2012 ; Rohrmann, 2013). Dans la forme transmissible, le rôle des polyèdres est de protéger les particules virales dans une matrice cristalline robuste au sein des cellules infectées après leur libération dans l'environnement. Lorsque les polyèdres sont ingérés par un nouvel hôte, les cristaux se dissolvent rapidement et libèrent ainsi les particules infectieuses à l'origine d'un nouveau cycle viral. Un autre exemple, celui du virus de la fièvre catarrhale du mouton, Bluetongue virus (BTV), montre également le passage d'une forme non transmissible à une forme transmissible en présence de son vecteur. En effet, ce virus est transmis par des culicoïdes, un genre de mouche, qui ne survit pas à faibles températures et est donc incapable de propager le virus en période hivernale. Cependant, la maladie générée par ce virus est à nouveau observée après les périodes hivernales, suggérant une capacité du virus à « hiverner ». Lorsque les culicoïdes réapparaissent et se nourrissent à nouveau sur leur hôte, l'inflammation qu'elles produisent aux sites d'alimentation recrute des lymphocytes qui interagissent avec les fibroblastes ce qui

convertit l'infection latente du virus en une forme lytique. Cela se traduit par une augmentation de la réplication du BTV qui est ensuite modifiée par des protéases inflammatoires, puis génère le virus infectieux et augmente ainsi la probabilité d'être acquis par les mouches vectrices (Takamatsu *et al.*, 2004).

Ces deux exemples s'apparentent au phénomène d'AT décrit pour le CaMV (Bak *et al.*, 2013 ; Martinière *et al.*, 2013) et à l'AT du TuMV décrit dans cette thèse. L'ensemble de ces données illustrent la capacité de certains virus à réagir de manière adaptée au stress de leur hôte suite à l'alimentation des vecteurs. Ces avancées ouvrent de nouveaux défis pour l'avenir comme l'identification des signaux et des voies de signalisation exploités par ces virus pour activer leur transmission. De plus, elles soulèvent de nouvelles interrogations comme : l'AT peut-elle être généralisée à d'autres virus ? Si tel est le cas, quel serait la diversité des moyens moléculaires et cellulaires que les virus pourraient utiliser en fonction du type de relation qu'ils entretiennent avec leurs vecteurs et leurs hôtes ? Par exemple, pour les virus de plante, on pourrait imaginer que ceux infectant tous les tissus de l'hôte, facilement accessibles aux insectes vecteurs et généralement acquis lors des premières étapes d'alimentation, utiliseraient des processus rapides pour activer leur transmission. C'est le cas des virus non-circulants, comme le CaMV et le TuMV, qui nécessitent des mécanismes rapides comme la production de ROS et la signalisation calcique, pour activer leur transmission. En revanche, les virus qui infectent des tissus végétaux spécifiques, moins accessibles aux insectes vecteurs et généralement plus longs à être acquis, utiliseraient des processus plus longs pour activer leur transmission. Cela pourrait être le cas pour les virus circulants qui génèreraient leur forme transmissible suite à la mise en place de voies de signalisation plus lentes comme la signalisation via les phytohormones. Tous les processus qui seront découverts à l'avenir seront essentiels pour le développement de nouvelles stratégies de contrôle des virus, en ciblant les voies de l'hôte jusqu'à présent insoupçonnées et ainsi avoir un impact sur la transmission virale.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Réalisation des mutants cystéines

1.1. QuickChange® et Q5®

Les substitutions des cystéines en sérines dans HC-Pro ont été générées dans le plasmide infectieux pCambia-Tunos codant pour la souche UK1 du TuMV (Cotton *et al.*, 2009). Les substitutions ont été réalisées en utilisant le kit de mutagenèse dirigée QuickChange® (agilent.com) et le kit de mutagenèse dirigée Q5® (neb.com) avec les amorces listées dans le tableau 3, en suivant les instructions du fabricant.

Nom du mutant	Position	Amorces	Kit
C14S	acide aminé 14	Fw : 5'-ATGCGAGAAAGCTTCTGTCTCGAAGCCTTCCAGAAGT-3' Rev : 5'-ACTTCTGGAAAGGCTTCGACAGAAGCTTCTCGCAT-3'	QuickChange®
C27S	acide aminé 27	Fw : 5'-GAGCATACATCATATTCAGGGCTAGATG-3' Rev : 5'-GCGATTGTCACTACGGTATG-3'	Q5®
C36S	acide aminé 36	Fw : 5'-GCCACCTCGCCGCTCTCAGTGACATCT-3' Rev : 5'-AGATGTCACTGAGAGCGGCGAGGTGGC-3'	QuickChange®
C44S	acide aminé 44	Fw : 5'-GGGAACATAGCCAAACTCATCAGTGCTGCCACC-3' Rev : 5'-GGTGGCAGCACTGATGAGTTGGCTATGTTCCC-3'	QuickChange®
C50S	acide aminé 50	Fw : 5'-TATGTTCCCATCCGGAAAGATAAC-3' Rev : 5'-GCCAAACACATCAGTGCTG-3'	Q5®
C55S	acide aminé 55	Fw : 5'-AAAGATAACCTCCCCTGACTGTGTAAC-3' Rev : 5'-CCGCATGGGAACATAGCC-3'	Q5®
C58S	acide aminé 58	Fw : 5'-CTGCCCTGACTCTGTAACAGATAG-3' Rev : 5'-GTTATCTTTCCGCATGGG-3'	Q5®
C197S	acide aminé 197	Fw : 5'-CACATCAACCCAACACTAATGAGTGACAACCAGCTCGATAG-3' Rev : 5'-CTATCGAGCTGGTTGCTCACTCATTAGTGTGGGTTGATGTG-3'	QuickChange®
C280S	acide aminé 280	Fw : 5'-CATACCCAGTAACAGTCGAGAGTGTGAGCAAGTTACAGGGTG-3' Rev : 5'-CACCTGTAACTTGCTCACACTCTCGACTGTTACTGGGTATG-3'	QuickChange®
C292S	acide aminé 292	Fw : 5'-CGTCCATGCATCTTGTGTGTCAC-3' Rev : 5'-AAGTCACCCTGTAACCTG-3'	Q5®
C293S	acide aminé 293	Fw : 5'-CCATGCATGTTCTTGTGTGTCACAAC-3' Rev : 5'-ACGAAGTCACCCTGTAAC-3'	Q5®
C294S	acide aminé 294	Fw : 5'-TGCATGTTGTTCTGTGTCACAACAGAATC-3' Rev : 5'-TGGACGAAGTCACCCTGT-3'	Q5®
C344S	acide aminé 344	Fw : 5'-AGAAGGTTATTCTTACATCAATATCTTCC-3' Rev : 5'-TTCGCTATGTACATTTTATTCTC-3'	Q5®

C389S	acide aminé 389	Fw : 5'-AGCAACCGCTTCTTATTTCTGAAAG-3' Rev : 5'-ACATCTAACAGAGTGGGC-3'	Q5 [®]
C446S	acide aminé 446	Fw : 5'-ATTCACGAGATCTAATTTGGAGTCAAG-3' Rev : 5'-TTGATGAGTTGTTCCACAG-3'	Q5 [®]

Tableau 3. Liste des oligonucléotides utilisés pour obtenir les mutants cystéine sur la protéine HC-Pro de la souche UK1 du TuMV. Chaque mutant correspond à la substitution d'une cystéine en sérine aux positions indiquées nommées CpositionS. Les amorces listées correspondent à celles utilisées pour obtenir les substitutions. Fw : amorce forward ; Rev : amorce reverse.

Les différents mutants ont ensuite été introduits par thermotransformation dans des cellules d'*Escherichia coli* compétentes DH5 α . 5 μ L des produits de ligation de chaque construction ont été ajoutés à 50 μ L de cellules compétentes. Le mélange a été placé 30 minutes dans la glace, puis 30 secondes au bain-marie à 42°C avant d'être à nouveau placé dans la glace pendant 5 minutes. Ensuite, 1 mL de milieu LB a été ajouté et le mélange a été incubé sous agitation à 37°C pendant une heure. La transformation a été étalée sur milieu LB agar, contenant l'antibiotique kanamycine à 50 mg/mL, et incubée à 37°C toute une nuit avant l'obtention de colonies contenant les plasmides.

1.2. Purification des plasmides

Chaque mutant a été purifié en partant d'une préculture liquide de 5 mL à 37°C sur une nuit. A partir de ces précultures, des cultures liquides de 100 mL à 37°C ont été lancées sur une nuit. Ces cultures ont été utilisées pour purifier les mutants à partir du kit de Promega PureYield™ Plasmid Maxiprep System en suivant les instructions du fabricant.

1.3. Biolistique

L'inoculation par biolistique est une technique de transfection de cellules par projection de microbilles d'or recouvertes d'ADN exogène à la cellule. Cette méthode permet d'initier une infection virale dans une plante hôte à partir d'un clone infectieux et dans le cas présent, de déclencher l'infection virale des mutants cystéines sur des plants de navets.

Le protocole de biolistique présenté a été mis au point et rédigé par Agnès Delaunay (UMR BGPI). 25 mg de microbilles d'or de diamètre 1 μ m sont pesées, puis 100 μ L de

spermidine à 0,05 M y sont ajoutés. Ensuite, le mélange est soniqué à 50-60 Hz sur l'amplitude 40 pendant 3 secondes. 50 µL de solution plasmidique à 100 µg sont ajoutés au mélange, suivi de 100 µL de CaCl₂ 1 M froid au goutte à goutte. La solution est incubée pendant 10 min à température ambiante puis centrifugée pendant 5 à 10 sec à 12 000 rpm. Après ces étapes, le culot de billes est lavé avec trois rinçages successifs d'1 mL d'éthanol absolu froid puis la solution est centrifugée 5 sec à 12 000 rpm et le dernier rinçage est éliminé. Une fois que le plasmide a bien été précipité sur les billes d'or, celles-ci sont resuspendues progressivement dans une solution de 3 mL d'éthanol absolu froid avec 7,5 µL de PVP à 20 mg/mL, par fraction de 200µL. La solution est conservée dans la glace le temps de préparer les cartouches. Pour ce faire, les tubes Tetzl sont rincés trois fois avec de l'éthanol absolu avant de prélever à l'aide d'une seringue la solution de billes contenant le plasmide. Le tube est ensuite placé sur la station puis les billes sont laissées 2 min avant de retirer délicatement la solution par aspiration. Pour que les billes se répartissent sur toute l'épaisseur du tube, une rotation du tube à 180° est réalisée pendant 10 sec puis la rotation continue est enclenchée pendant 30 secondes. En suivant, un flux d'azote est déclenché pendant 5 minutes aux paramètres 3 au détenteur et entre 3 et 4 sur l'entrée de la station. Les cartouches recouvertes de billes et de plasmide peuvent être découpées en fragments de longueur définie sur le tube. Les cartouches sont ensuite insérées dans un barillet et l'ensemble est assemblé sur l'appareil (Helios Gene Gun System) raccordé à un flux d'hélium. Les plantes utilisées pour la biolistique sont de jeunes navets au stade cotylédons âgés de 5 à 7 jours. Ces derniers sont placés sous le canon du pistolet d'inoculation et l'hélium dégagé propulse les billes d'or dans les cellules pour initier l'infection. Les symptômes des différents mutants sont visibles 5 à 10 jours plus tard. La conservation des mutations sur les plantes infectées après biolistique a été contrôlée par séquençage.

1.4. Extraction d'ARN, RT-PCR et qPCR

Les ARN totaux ont été extraits à partir d'échantillons de trois disques de feuilles collectés pour chaque plante infectée par la souche UK1 du TuMV et les différents mutants. Le kit RNeasy (qiagen.com) a été utilisé pour les extractions d'ARN en suivant les instructions du fabricant avant la synthèse de l'ADNc.

Pour la synthèse d'ADNc simple brin, 1 µg d'ARN total précédemment extrait a été utilisé avec 0,4 µL d'une amorce reverse spécifique du gène d'intérêt TuMV à 25 µM

(Tu8907-R : 5'-TTCCCTCTTCTTGCAACATCC-3'), 0,4 μ L d'une amorce reverse spécifique du gène de ménage Actine à 25 μ M (R-ActBra : 5'-GATCTCTTGCTCATACGGTCTG-3') et la reverse transcriptase Avian Myeloblastosis Virus (AMV) (kit Promega) conformément aux instructions du fabricant. En suivant, le produit de RT a été dilué au 1/10 avant l'analyse par qPCR.

Les quantifications d'ADN ont été effectuées en duplicat par PCR quantitative en temps réel (qPCR) dans des plaques de 384 puits en utilisant le kit LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (lifescience.roche.com) dans un thermocycleur LightCycler 480 (lifescience.roche.com), en suivant les instructions du fabricant. Des amorces spécifiques pour l'amplification du TuMV : Tu8767-F : 5'-AACGCTTGATGCAGGTTTGAC-3' et Tu8907-R ont été utilisés à une concentration finale de 0,3 μ M. Toutes les réactions de qPCR ont été réalisées avec 40 cycles (95°C pendant 15 sec, 62°C pendant 15 sec et 72°C pendant 15 sec) après une étape initiale à 95°C pendant 10 min. Les données de qPCR ont été analysées avec le programme PCR LinReg pour prendre en compte l'efficacité de chaque réaction de PCR. La concentration virale initiale absolue est exprimée en unités de fluorescence arbitraire : N_0 TuMV. Celle-ci a été divisée par la concentration du gène Actine de la plante hôte obtenu avec les amorces R-ActBra et F-Act2 : 5'-GACYBTAYGGTAACATTGTGCTC-3', afin de normaliser la quantité de matériel végétal analysée dans tous les échantillons.

1.5. Analyses statistiques

Les résultats de qPCR (N_0) ont été analysés comme suit. Premièrement, les valeurs de N_0 correspondant à la quantification des amplifications des gènes viraux ont été normalisées par le N_0 d'un gène de ménage. Ces rapports N_0 virus / N_0 gène de ménage ont été transformés en log afin de linéariser les données. Ensuite, celles-ci ont été analysées avec des modèles linéaires en utilisant les facteurs catégoriels mutants et date comme variables explicatives.

2. Pucerons

2.1. Synchronisation des pucerons

Les pucerons *M. persicae* ont été synchronisés sur la face abaxiale de feuilles de navets immobilisées dans de la gélose 1%. Puis, 100 à 200 pucerons adultes ont été ajoutés dans la boîte puis celle-ci a été placée à une température de 22°C jour avec une photopériode de 14 heures de jour et 10 heures de nuit pendant 24 heures. Après ce délai, les pucerons adultes ont été retirés de l'élevage pour ne conserver que les jeunes pucerons. Ces derniers vont être utilisés pour la récolte de la salive entre 3 et 5 jours.

2.2. Récolte de la salive liquide et des gaines de pucerons

Environ 7000 pucerons ont été collectés et placés dans des anneaux en PVC recouverts d'un Parafilm® nettoyé à l'alcool 70% et bien étiré. Ensuite, 15 à 20 µL de milieu artificiel (annexe 2) ont été déposés à la surface du Parafilm® puis un deuxième Parafilm® a été ajouté afin de répandre le liquide (figure 16A). Les anneaux contenant les pucerons ont été placés dans les mêmes conditions que celles de l'élevage, pour une période de 24 heures, avant de collecter la salive et les gaines. La salive liquide a été récupérée en pipetant le milieu artificiel contenu entre les deux couches de parafilm® et les gaines salivaires ont été récupérées en grattant la première couche de Parafilm® à l'aide d'un cône de pipette et d'une solution de mannitol (figure 16B). Plus précisément, la récolte de la salive liquide et des gaines de pucerons s'est faite selon la procédure indiquée par Cherqui et Tjallingii, 2000.

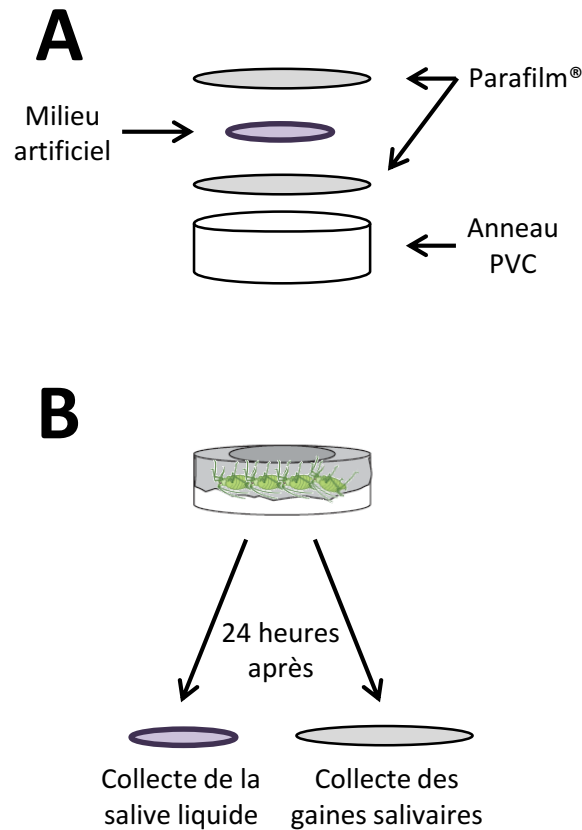


Figure 16. Récolte de la salive des pucerons. (A) Le dispositif de montage pour récupérer la salive liquide et les gaines de pucerons est constitué d'un anneau de PVC avec deux couches de parafilm contenant le milieu artificiel. (B) Les pucerons sont ensuite placés à l'intérieur de l'anneau et laissés à saliver pendant 24 heures avant de récupérer séparément la salive liquide et les gaines salivaires.

2.3. Concentration de la salive liquide des pucerons

La salive liquide des pucerons obtenue a été concentrée à l'aide d'une colonne Amicon® Ultra 4 Millipore de 50 mL qui retient les protéines de 3 kDa et plus (merckmillipore.com) (De Vos et Jander, 2009 ; Prince *et al.*, 2014). 15 mL de milieu artificiel contenant la salive liquide ont été placés dans la colonne et centrifugés à 4000 g à 4°C pendant 4h30. Au cours de la centrifugation, le milieu artificiel contenant la salive a pu être filtré au travers du filtre contenu dans la colonne et un volume de 750 µL a pu être récupéré. 2 mL de tampon MES 1 M ont été ajoutés au volume récupéré afin de ne pas affecter la viabilité des protoplastes. Le mélange milieu artificiel avec salive + tampon MES a été centrifugé à 4000 g à 4°C pendant 2h15 et un volume de 250 µL a pu être récupéré. La quantité de protéines contenues dans l'échantillon final a été mesurée au NanoDrop™

(A280) et une valeur de 3,7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a été obtenue. Celle-ci a également été dosée par la méthode de Bradford et une valeur de 2,3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ a été obtenue. La salive liquide concentrée ainsi obtenue a été utilisée pour le traitement des protoplastes en l'ajoutant directement à la solution de protoplastes.

2.4. Préparation des protéines et extraits totaux de pucerons

Pour extraire les protéines de pucerons, 10 mg de pucerons *M. persicae* (tous stades confondus sauf le stade ailé) ont été pesés. Les pucerons ont été placés dans un tube de 2 mL avec deux billes, puis dans l'azote liquide, avant d'être broyés. Ensuite, 1,2 mL d'eau et 300 μL de tampon à 0,2 M de phosphate de potassium pH 6,8 ont été ajoutés dans le tube et vortexés avec les pucerons broyés. 200 μL ont été prélevés et utilisés comme traitement extraits totaux de pucerons sur les protoplastes. Le tube a été centrifugé à 12 000 g à 4°C pendant 15 minutes et le surnageant a été récupéré. 500 μL de surnageant ont été placés dans une colonne Amicon® Ultra 0,5 mL qui retient les protéines de 10 kDa et plus (merckmillipore.com) puis centrifugés à 12 000 g à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant issu de la centrifugation contenant les protéines des pucerons ayant un poids inférieur à 10 kDa a été conservé et utilisé comme traitement en l'ajoutant directement aux protoplastes. La colonne a ensuite été retournée afin de récupérer les protéines des pucerons de poids supérieur à 10 kDa. L'échantillon a été centrifugé à 12 000 g à 4°C pendant 2 minutes puis 300 μL de tampon phosphate de potassium pH 6,8 ont été ajoutés. La fraction obtenue a été utilisée comme traitement en l'ajoutant directement aux protoplastes.

Un échantillon de 10 μL des trois solutions obtenus (extraits totaux, protéines < 10 kDa et protéines > 10 kDa de pucerons) a été chargé sur gel SDS-PAGE puis, après migration des protéines, le gel a été coloré au bleu de Coomassie afin de visualiser les protéines contenues dans les échantillons (figure 17). Pour ce faire, le gel a été incubé dans le bleu de Coomassie (45% méthanol, 10% acide acétique, 2,5 g/L de Bleu de Coomassie R250) pendant une heure sous agitation. Ensuite, le gel a été décoloré avec deux rinçages dans une solution de décoloration (45% méthanol, 10% acide acétique).

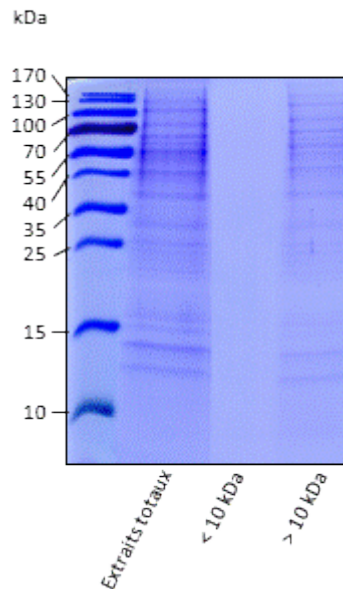


Figure 17. Protéines contenues dans les extraits de pucerons. Les protéines du gel ont été colorées avec du bleu de Coomassie. De nombreuses protéines de tailles variant entre 10 et 170 kDa sont observées dans l'échantillon d'extraits totaux de pucerons. Aucune protéine n'est observée dans le puit contenant les protéines de taille inférieure à 10 kDa et les mêmes protéines que celles trouvées dans l'échantillon d'extraits totaux, mais en quantités moins importantes, sont observées dans le puit contenant les protéines de taille supérieure à 10 kDa. Extraits totaux, extraits totaux de pucerons *M. persicae* ; < 10 kDa, protéines de pucerons *M. persicae* de taille inférieure à 10 kDa ; > 10 kDa, protéines de pucerons *M. persicae* de taille supérieure à 10 kDa.

3. Traitement des protoplastes

3.1. Stress de piqûre

Le stress mécanique de contact avec les pucerons a été réalisé sur des protoplastes de feuilles de navets infectés par la souche UK1 du TuMV. 300 µL de protoplastes ont été placés entre une couche de Parafilm® et une lamelle de verre sur un anneau de cuivre contenant plusieurs dizaines de pucerons. Ces derniers insèrent leurs stylets à travers la membrane de Parafilm® pour atteindre et piquer les protoplastes, ce qui génère le stress de piqûre. Les protoplastes sont ensuite récupérés à l'aide d'une pipette en soulevant la lamelle de verre.

La ponction de la membrane plasmique suite à l'introduction des stylets de pucerons dans les cellules végétales (stress de piqûre) libère des protéines pouvant éliciter les mécanismes de signalisation et de défenses de la plante. Parmi ces protéines, on retrouve

les acides galacturoniques. L'action de ces derniers a été testée sur des protoplastes de feuilles de navets infectés par la souche UK1 du TuMV. Deux types d'acides galacturoniques ont été ajoutés à 500 µL de protoplastes : le Polygalacturonic acid et le D-(+)-Galacturonic acid monohydrate (sigmaaldrich.com). Ces deux acides galacturoniques ont été ajoutés aux concentrations de 50 µg/mL, 100 µg/mL et 200 µg/mL (Denoux *et al.*, 2008) et incubés dans les protoplastes pendant 30 secondes, une minute et cinq minutes sous faible agitation (5 tr/min).

3.2. Stress de puceron

Les stress de puceron qui ont été appliqués ont eu comme objectif de déclencher les réactions de signalisation et de défense de la plante suite à la reconnaissance d'une ou plusieurs protéine(s) du puceron. Ces expériences ont tout d'abord été effectuées à partir de la salive liquide et des gaines salivaires du puceron *M. persicae* récupérées comme décrit dans les parties 2.2. et 2.3. du matériel et méthode. 10 µL de salive liquide et/ou de gaines salivaires ont été ajoutés à 500 µL de protoplastes de feuilles de navets infectés par le TuMV et l'incubation était de cinq minutes sous faible agitation (5 tr/min). Le stress de puceron a également été testé à partir de protéines et d'extraits totaux du puceron *M. persicae* comme décrit dans la partie 2.4. du matériel et méthodes. 10 µL de protéines ou d'extraits totaux ont été ajoutés à 500 µL de protoplastes et les traitements ont été incubés pendant 30 secondes, une minute et cinq minutes sous faible agitation (5 tr/min). Enfin, un dernier stress de puceron a été testé, il s'agit de l'incubation des protéines Mp1 et Mp2 du puceron *M. persicae*. Mp1 et Mp2 ont été récupérées à partir de plantes *A. thaliana* qui expriment ces deux protéines. Trois plantules âgées d'un mois ont été broyées dans de l'azote liquide puis resuspendues dans 300 µL de tampon de protoplastation (0,5 M de mannitol, 10 mM de MES pH 5,6 et 1 mM de CaCl₂). Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 16 000 g pendant 10 minutes puis les surnageants ont été récupérés et utilisés pour les stress chimiques. 10 µL du surnageant des extraits d'*A. thaliana* Mp1 ou d'*A. thaliana* Mp2 ont été ajoutés à 500 µL de protoplastes et incubés pendant 30 secondes, une minute et cinq minutes sous faible agitation (5 tr/min).

3.3. Stress de la membrane plasmique

Les stress appliqués sur la membrane plasmique ont été réalisés avec du KCl à différentes concentrations. Pour générer un stress de dépolarisation de la membrane plasmique, une concentration finale de 0,1 mM de KCl a été ajoutée aux protoplastes de navets infectés par le TuMV. Pour obtenir un stress d'hyperpolarisation de la membrane plasmique, une concentration finale de 100 mM de KCl a été ajoutée aux protoplastes. Pour produire un choc osmotique de la membrane plasmique, une concentration finale de 500 mM de KCl a été ajoutée aux protoplastes. Tous les traitements ont été incubés dans les protoplastes pendant 30 secondes, une minute et cinq minutes sous faible agitation (5 tr/min).

4. Protéomique SDS/PAGE et western blot

4.1. SDS-PAGE

Les échantillons ont été préparés à partir de protoplastes de navets infectés par la souche UK1 du TuMV ou des différents mutants. Après la durée de leur traitement, 20 µL de protoplastes sont prélevés et le traitement est arrêté par l'ajout de 20 µL de tampon Laemmli sans β-mercaptoéthanol (4% de SDS, 100 mM de Tris pH 6,8, 50% de glycérol et 0,02% de bleu de bromophénol). Les différents échantillons sont ensuite chargés sur des gels SDS-PAGE (polyacrylamide dodécylsulfate de sodium) à 10% d'acrylamide pour le gel de séparation et 6% pour le gel de tassement (Laemmli, 1970). L'électrophorèse s'effectue dans un tampon de migration (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% SDS) et avec un courant électrique de 25 mA par gel. Après leur migration, les protéines sont transférées du gel sur une membrane de nitrocellulose dans un appareil de transfert semi-sec EBU 4000 (C.B.S. Scientific) avec du tampon de transfert (25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% méthanol). L'ampérage est de 400 mA. L'efficacité du transfert est vérifiée par coloration des protéines sur la membrane avec du rouge de Ponceau S (5% d'acide acétique, 1% rouge Ponceau S). Celle-ci permet également d'avoir un témoin de charge pour chacun des échantillons. La coloration se fait en moins d'une minute et la décoloration est réalisée par un bain dans du tampon TS (20 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7,4).

4.2. Western blot

Après transfert des protéines sur la membrane de nitrocellulose, celle-ci est incubée sous agitation pendant une heure dans du TS-lait (tampon TS avec 5% de lait écrémé en poudre) pour éviter les interactions non spécifiques entre la membrane et les anticorps. Une fois saturée, la membrane est incubée en présence de l'anticorps primaire anti HC-Pro lapin, ou anti CP lapin, dilué au millième dans du TS-lait pendant une heure à 37°C ou sur la nuit à 4°C. Ensuite, la membrane est rincée trois fois avec du TS et est incubée en présence de l'anticorps secondaire couplé à la phosphatase alcaline dilué au deux-millième dans du TS-lait pendant une heure à 37°C ou sur la nuit à 4°C. La membrane est à nouveau rincée trois fois avec du TS. La révélation des protéines se fait par réaction enzymatique avec un tampon de révélation (100 mM Tris, 50 mM MgCl₂, 100 mM NaCl, pH 9,5), du NBT (Nitro-Blue Tetrazolium chloride) et du BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyl phosphate P-toluidine salt). Les bandes sont révélées en quelques minutes puis la réaction est stoppée avec de l'eau.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Adams, M., Zerbini, F., French, R., Rabenstein, F., Stenger, D., and Valkonen, J. (2011). Family Potyviridae. In *Virus taxonomy, 9th report of the international committee for taxonomy of viruses* (San Diego, USA: Elsevier Academic Press).

Adams, M.J., Antoniw, J.F., and Fauquet, C.M. (2005). Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Arch. Virol.* *150*, 459–479.

Adio, A.M., Casteel, C.L., De Vos, M., Kim, J.H., Joshi, V., Li, B., Juéry, C., Daron, J., Kliebenstein, D.J., and Jander, G. (2011). Biosynthesis and defensive function of N δ -acetylornithine, a jasmonate-induced Arabidopsis metabolite. *Plant Cell* *23*, 3303–3318.

Ahuja, I., Kissen, R., and Bones, A.M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci.* *17*, 73–90.

Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H., and Vance, V.B. (1998). A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 13079–13084.

Anandalakshmi, R., Marathe, R., Ge, X., Herr, J.M., Mau, C., Mallory, A., Pruss, G., Bowman, L., and Vance, V.B. (2000). A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* *290*, 142–144.

Andersen, K., and Johansen, I.E. (1998). A single conserved amino acid in the coat protein gene of pea seed-borne mosaic potyvirus modulates the ability of the virus to move systemically in *Chenopodium quinoa*. *Virology* *241*, 304–311.

Anstead, J., Samuel, P., Song, N., Wu, C., Thompson, G.A., and Goggin, F. (2010). Activation of ethylene-related genes in response to aphid feeding on resistant and susceptible melon and tomato plants. *Entomol. Exp. Appl.* *134*, 170–181.

Argandoña, V.H., Chaman, M., Cardemil, L., Muñoz, O., Zúñiga, G.E., and Corcuera, L.J. (2001). Ethylene production and peroxidase activity in aphid-infested barley. *J. Chem. Ecol.* *27*, 53–68.

Arimura, G.-I., and Maffei, M.E. (2010). Calcium and secondary CPK signaling in plants in response to herbivore attack. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *400*, 455–460.

Arimura, G.-I., Ozawa, R., and Maffei, M.E. (2011). Recent advances in plant early signaling in response to herbivory. *Int. J. Mol. Sci.* *12*, 3723–3739.

Atsumi, G., Suzuki, H., Miyashita, Y., Choi, S.H., Hisa, Y., Rihei, S., Shimada, R., Jeon, E.J., Abe, J., Nakahara, K.S., *et al.* (2016). P3N-PIPO, a Frameshift Product from the P3 Gene, Pleiotropically Determines the Virulence of Clover Yellow Vein Virus in both Resistant and Susceptible Peas. *J. Virol.* *90*, 7388–7404.

Bak, A. (2013). Etude des mécanismes cellulaires de la transmission du Cauliflower Mosaic Virus.

- Bak, A., Gargani, D., Macia, J.-L., Malouvet, E., Vernerey, M.-S., Blanc, S., and Drucker, M. (2013). Virus factories of cauliflower mosaic virus are virion reservoirs that engage actively in vector transmission. *J. Virol.* *87*, 12207–12215.
- Bak, A., Cheung, A.L., Yang, C., Whitham, S.A., and Casteel, C.L. (2017). A viral protease relocalizes in the presence of the vector to promote vector performance. *Nat. Commun.* *8*, 14493.
- Bari, R., and Jones, J.D.G. (2009). Role of plant hormones in plant defence responses. *Plant Mol. Biol.* *69*, 473–488.
- Beauchemin, C., Boutet, N., and Laliberté, J.-F. (2007). Visualization of the interaction between the precursors of VPg, the viral protein linked to the genome of turnip mosaic virus, and the translation eukaryotic initiation factor iso 4E in *Planta*. *J. Virol.* *81*, 775–782.
- van Bel, A.J.E., and Will, T. (2016). Functional Evaluation of Proteins in Watery and Gel Saliva of Aphids. *Front. Plant Sci.* *7*, 1840.
- Bellincampi, D., Dipierro, N., Salvi, G., Cervone, F., and De Lorenzo, G. (2000). Extracellular H₂O₂ induced by oligogalacturonides is not involved in the inhibition of the auxin-regulated rolB gene expression in tobacco leaf explants. *Plant Physiol.* *122*, 1379–1385.
- Blanc, S., López-Moya, J.J., Wang, R., García-Lampasona, S., Thornbury, D.W., and Pirone, T.P. (1997). A specific interaction between coat protein and helper component correlates with aphid transmission of a potyvirus. *Virology* *231*, 141–147.
- Blanc, S., Ammar, E.D., Garcia-Lampasona, S., Dolja, V.V., Llave, C., Baker, J., and Pirone, T.P. (1998). Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *J. Gen. Virol.* *79*, 3119–3122.
- Blanc, S., Drucker, M., and Uzest, M. (2014). Localizing viruses in their insect vectors. *Annu. Rev. Phytopathol.* *52*, 403–425.
- Bos, J.I.B., Prince, D., Pitino, M., Maffei, M.E., Win, J., and Hogenhout, S.A. (2010). A functional genomics approach identifies candidate effectors from the aphid species *Myzus persicae* (green peach aphid). *PLoS Genet.* *6*, e1001216.
- Boudsocq, M., Willmann, M.R., McCormack, M., Lee, H., Shan, L., He, P., Bush, J., Cheng, S.-H., and Sheen, J. (2010). Differential innate immune signalling via Ca²⁺ sensor protein kinases. *Nature* *464*, 418–422.
- Bradley, D.J., Kjellbom, P., and Lamb, C.J. (1992). Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. *Cell* *70*, 21–30.
- Braunagel, S.C., and Summers, M.D. (2007). Molecular biology of the baculovirus occlusion-derived virus envelope. *Curr. Drug Targets* *8*, 1084–1095.

Bricault, C.A., and Perry, K.L. (2013). Alteration of intersubunit acid-base pair interactions at the quasi-threefold axis of symmetry of Cucumber mosaic virus disrupts aphid vector transmission. *Virology* 440, 160–170.

Bricchi, I., Berteza, C.M., Occhipinti, A., Paponov, I.A., and Maffei, M.E. (2012). Dynamics of membrane potential variation and gene expression induced by *Spodoptera littoralis*, *Myzus persicae*, and *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *PLoS One* 7, e46673.

ten Broeke, C.J.M., Dicke, M., and van Loon, J.J.A. (2013). Performance and feeding behaviour of two biotypes of the black currant-lettuce aphid, *Nasonovia ribisnigri*, on resistant and susceptible *Lactuca sativa* near-isogenic lines. *Bull. Entomol. Res.* 103, 511–521.

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

Carbonell, A., Maliogka, V.I., Pérez, J. de J., Salvador, B., León, D.S., García, J.A., and Simón-Mateo, C. (2013). Diverse amino acid changes at specific positions in the N-terminal region of the coat protein allow Plum pox virus to adapt to new hosts. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 26, 1211–1224.

Carmo-Sousa, M., Moreno, A., Plaza, M., Garzo, E., and Fereres, A. (2016). Cucurbit aphid-borne yellows virus (CABYV) modifies the alighting, settling and probing behaviour of its vector *Aphis gossypii* favouring its own spread. *Ann. Appl. Biol.* 169, 284–297.

Carr, J.P., Lewsey, M.G., and Palukaitis, P. (2010). Signaling in induced resistance. *Adv. Virus Res.* 76, 57–121.

Carrington, J.C., and Dougherty, W.G. (1987). Small nuclear inclusion protein encoded by a plant potyvirus genome is a protease. *J. Virol.* 61, 2540–2548.

Carrington, J.C., Freed, D.D., and Sanders, T.C. (1989). Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and in vitro. *J. Virol.* 63, 4459–4463.

Casteel, C.L., Yang, C., Nanduri, A.C., De Jong, H.N., Whitham, S.A., and Jander, G. (2014). The Nla-Pro protein of Turnip mosaic virus improves growth and reproduction of the aphid vector, *Myzus persicae* (green peach aphid). *Plant J. Cell Mol. Biol.* 77, 653–663.

Casteel, C.L., De Alwis, M., Bak, A., Dong, H., Whitham, S.A., and Jander, G. (2015). Disruption of Ethylene Responses by Turnip mosaic virus Mediates Suppression of Plant Defense against the Green Peach Aphid Vector. *Plant Physiol.* 169, 209–218.

Chaudhary, R., Atamian, H.S., Shen, Z., Briggs, S.P., and Kaloshian, I. (2014). GroEL from the endosymbiont *Buchnera aphidicola* betrays the aphid by triggering plant defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 8919–8924.

Cheng, X., and Wang, A. (2017). The Potyvirus Silencing Suppressor Protein VPg Mediates Degradation of SGS3 via Ubiquitination and Autophagy Pathways. *J. Virol.* 91(1), e01478-16.

Cheng, X., Xiong, R., Li, Y., Li, F., Zhou, X., and Wang, A. (2017). Sumoylation of Turnip mosaic virus RNA Polymerase Promotes Viral Infection by Counteracting the Host NPR1-Mediated Immune Response. *Plant Cell* 29, 508–525.

Cherqui, and Tjallingii (2000). Salivary proteins of aphids, a pilot study on identification, separation and immunolocalisation. *J. Insect Physiol.* 46, 1177–1186.

Choi, I.R., Stenger, D.C., and French, R. (2000). Multiple interactions among proteins encoded by the mite-transmitted wheat streak mosaic tritivirus. *Virology* 267, 185–198.

Choi, W.-G., Toyota, M., Kim, S.-H., Hilleary, R., and Gilroy, S. (2014). Salt stress-induced Ca²⁺ waves are associated with rapid, long-distance root-to-shoot signaling in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 6497–6502.

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

Cui, H., and Wang, A. (2016). Plum Pox Virus 6K1 Protein Is Required for Viral Replication and Targets the Viral Replication Complex at the Early Stage of Infection. *J. Virol.* 90, 5119–5131.

Cui, X., Wei, T., Chowda-Reddy, R.V., Sun, G., and Wang, A. (2010). The Tobacco etch virus P3 protein forms mobile inclusions via the early secretory pathway and traffics along actin microfilaments. *Virology* 397, 56–63.

Czerniewicz, P., Sytykiewicz, H., Durak, R., Borowiak-Sobkowiak, B., and Chrzanowski, G. (2017). Role of phenolic compounds during antioxidative responses of winter triticale to aphid and beetle attack. *Plant Physiol. Biochem. PPB* 118, 529–540.

Dangl, J.L., Horvath, D.M., and Staskawicz, B.J. (2013). Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* 341, 746–751.

Daròs, J.A., and Carrington, J.C. (1997). RNA binding activity of NIa proteinase of tobacco etch potyvirus. *Virology* 237, 327–336.

Daròs, J.A., Schaad, M.C., and Carrington, J.C. (1999). Functional analysis of the interaction between VPg-proteinase (NIa) and RNA polymerase (NIb) of tobacco etch potyvirus, using conditional and suppressor mutants. *J. Virol.* 73, 8732–8740.

De Vos, M., and Jander, G. (2009). *Myzus persicae* (green peach aphid) salivary components induce defence responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* 32, 1548–1560.

Denoux, C., Galletti, R., Mammarella, N., Gopalan, S., Werck, D., De Lorenzo, G., Ferrari, S., Ausubel, F.M., and Dewdney, J. (2008). Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in *Arabidopsis* seedlings. *Mol. Plant* 1, 423–445.

Dodd, A.N., Kudla, J., and Sanders, D. (2010). The language of calcium signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61, 593–620.

Dolja, V.V., Boyko, V.P., Agranovsky, A.A., and Koonin, E.V. (1991). Phylogeny of capsid proteins of rod-shaped and filamentous RNA plant viruses: two families with distinct patterns of sequence and probably structure conservation. *Virology* 184, 79–86.

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

Donze-Reiner, T., Palmer, N.A., Scully, E.D., Prochaska, T.J., Koch, K.G., Heng-Moss, T., Bradshaw, J.D., Twigg, P., Amundsen, K., Sattler, S.E., *et al.* (2017). Transcriptional analysis of defense mechanisms in upland tetraploid switchgrass to greenbugs. *BMC Plant Biol.* 17, 46.

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

Dufresne, P.J., Thivierge, K., Cotton, S., Beauchemin, C., Ide, C., Ubalijoro, E., Laliberté, J.-F., and Fortin, M.G. (2008). Heat shock 70 protein interaction with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase within virus-induced membrane vesicles. *Virology* 374, 217–227.

Eagles, R.M., Balmori-Melián, E., Beck, D.L., Gardner, R.C., and Forster, R.L. (1994). Characterization of NTPase, RNA-binding and RNA-helicase activities of the cytoplasmic inclusion protein of tamarillo mosaic potyvirus. *Eur. J. Biochem.* 224, 677–684.

Edwardson, J., and Christie, R. (1996). *Cylindrical inclusions* (Gainesville, FL, USA:University of Florida: Agricultural Experiment Station).

Ellis, C., Karafyllidis, I., and Turner, J.G. (2002). Constitutive activation of jasmonate signaling in an *Arabidopsis* mutant correlates with enhanced resistance to *Erysiphe cichoracearum*, *Pseudomonas syringae*, and *Myzus persicae*. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* 15, 1025–1030.

Endres, M.W., Gregory, B.D., Gao, Z., Foreman, A.W., Mlotshwa, S., Ge, X., Pruss, G.J., Ecker, J.R., Bowman, L.H., and Vance, V. (2010). Two plant viral suppressors of silencing require the ethylene-inducible host transcription factor RAV2 to block RNA silencing. *PLoS Pathog.* 6, e1000729.

Eskelin, K., Hafrén, A., Rantalainen, K.I., and Mäkinen, K. (2011). Potyviral VPg enhances viral RNA Translation and inhibits reporter mRNA translation in planta. *J. Virol.* 85, 9210–9221.

Fellers, J., Wan, J., Hong, Y., Collins, G.B., and Hunt, A.G. (1998). In vitro interactions between a potyvirus-encoded, genome-linked protein and RNA-dependent RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* 79, 2043–2049.

Fernández, A., Guo, H.S., Sáenz, P., Simón-Buela, L., Gómez de Cedrón, M., and García, J.A. (1997). The motif V of plum pox potyvirus CI RNA helicase is involved in NTP hydrolysis and is essential for virus RNA replication. *Nucleic Acids Res.* 25, 4474–4480.

Foyer, C.H., Verrall, S.R., and Hancock, R.D. (2015). Systematic analysis of phloem-feeding insect-induced transcriptional reprogramming in *Arabidopsis* highlights common features and reveals distinct responses to specialist and generalist insects. *J. Exp. Bot.* *66*, 495–512.

Fu, M., Xu, M., Zhou, T., Wang, D., Tian, S., Han, L., Dong, H., and Zhang, C. (2014). Transgenic expression of a functional fragment of harpin protein Hpa1 in wheat induces the phloem-based defence against English grain aphid. *J. Exp. Bot.* *65*, 1439–1453.

Furch, A.C.U., van Bel, A.J.E., Fricker, M.D., Felle, H.H., Fuchs, M., and Hafke, J.B. (2009). Sieve element Ca²⁺ channels as relay stations between remote stimuli and sieve tube occlusion in *Vicia faba*. *Plant Cell* *21*, 2118–2132.

Gabrenaite-Verkhovskaya, R., Andreev, I.A., Kalinina, N.O., Torrance, L., Taliansky, M.E., and Mäkinen, K. (2008). Cylindrical inclusion protein of potato virus A is associated with a subpopulation of particles isolated from infected plants. *J. Gen. Virol.* *89*, 829–838.

Geng, C., Yan, Z.-Y., Cheng, D.-J., Liu, J., Tian, Y.-P., Zhu, C.-X., Wang, H.-Y., and Li, X.-D. (2017). Tobacco vein banding mosaic virus 6K2 Protein Hijacks NbPsbO1 for Virus Replication. *Sci. Rep.* *7*, 43455.

Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* *43*, 205–227.

Govier, D.A., Kassanis, B., and Pirone, T.P. (1977). Partial purification and characterization of the potato virus Y helper component. *Virology* *78*, 306–314.

Grangeon, R., Jiang, J., and Laliberté, J.-F. (2012). Host endomembrane recruitment for plant RNA virus replication. *Curr. Opin. Virol.* *2*, 683–690.

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

Granier, F., Durand-Tardif, M., Casse-Delbart, F., Lecoq, H., and Robaglia, C. (1993). Mutations in zucchini yellow mosaic virus helper component protein associated with loss of aphid transmissibility. *J. Gen. Virol.* *74*, 2737–2742.

Guo, B., Lin, J., and Ye, K. (2011). Structure of the autocatalytic cysteine protease domain of potyvirus helper-component proteinase. *J. Biol. Chem.* *286*, 21937–21943.

Guo, D., Rajamäki, M.L., Saarma, M., and Valkonen, J.P. (2001). Towards a protein interaction map of potyviruses: protein interaction matrixes of two potyviruses based on the yeast two-hybrid system. *J. Gen. Virol.* *82*, 935–939.

Guo, D., Spetz, C., Saarma, M., and Valkonen, J.P.T. (2003). Two potato proteins, including a novel RING finger protein (HIP1), interact with the potyviral multifunctional protein HCpro. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* *16*, 405–410.

Haikonen, T., Rajamäki, M.-L., Tian, Y.-P., and Valkonen, J.P.T. (2013). Mutation of a Short Variable Region in HCpro Protein of Potato virus A Affects Interactions with a Microtubule-Associated Protein and Induces Necrotic Responses in Tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.* *MPMI* *26*, 721–733.

Harmel, N., Létocart, E., Cherqui, A., Giordanengo, P., Mazzucchelli, G., Guillonneau, F., De Pauw, E., Haubruge, E., and Francis, F. (2008). Identification of aphid salivary proteins: a proteomic investigation of *Myzus persicae*. *Insect Mol. Biol.* *17*, 165–174.

Harrison, R., and Hoover, K. (2012). Chapter 4: Baculoviruses and other occluded insect viruses. In: Vega, F. E., Kaya, H. K, editors. *Insect Pathology*. 2nd edition. London, England: Academic Press. p. 73-131.

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

Hogenhout, S.A., and Bos, J.I.B. (2011). Effector proteins that modulate plant–insect interactions. *Curr. Opin. Plant Biol.* *14*, 422–428.

Hong, Y., and Hunt, A.G. (1996). RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* *226*, 146–151.

Hong, X.-Y., Chen, J., Shi, Y.-H., and Chen, J.-P. (2007). The “6K1” protein of a strain of Soybean mosaic virus localizes to the cell periphery. *Arch. Virol.* *152*, 1547–1551.

Howe, G.A., and Jander, G. (2008). Plant immunity to insect herbivores. *Annu. Rev. Plant Biol.* *59*, 41–66.

Huet, H., Gal-On, A., Meir, E., Lecoq, H., and Raccah, B. (1994). Mutations in the helper component protease gene of zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility. *J. Gen. Virol.* *75*, 1407–1414.

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

Ingwell, L.L., Eigenbrode, S.D., and Bosque-Pérez, N.A. (2012). Plant viruses alter insect behavior to enhance their spread. *Sci. Rep.* *2*, 578.

Ivanov, K.I., Puustinen, P., Gabrenaite, R., Vihinen, H., Rönstrand, L., Valmu, L., Kalkkinen, N., and Mäkinen, K. (2003). Phosphorylation of the potyvirus capsid protein by protein kinase CK2 and its relevance for virus infection. *Plant Cell* *15*, 2124–2139.

Ivanov, K.I., Eskelin, K., Bašić, M., De, S., Lõhmus, A., Varjosalo, M., and Mäkinen, K. (2016). Molecular insights into the function of the viral RNA silencing suppressor HCPro. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *85*, 30–45.

Jander, G., and Howe, G. (2008). Plant interactions with arthropod herbivores: state of the field. *Plant Physiol.* *146*, 801–803.

Jin, D.F., and West, C.A. (1984). Characteristics of galacturonic Acid oligomers as elicitors of chitinase activity in castor bean seedlings. *Plant Physiol.* *74*, 989–992.

Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* *444*, 323–329.

Kadota, Y., Sklenar, J., Derbyshire, P., Strassfeld, L., Asai, S., Ntoukakis, V., Jones, J.D., Shirasu, K., Menke, F., Jones, A., *et al.* (2014). Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR-associated kinase BIK1 during plant immunity. *Mol. Cell* *54*, 43–55.

Kadota, Y., Shirasu, K., and Zipfel, C. (2015). Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD During Plant Immunity. *Plant Cell Physiol.* *56*, 1472–1480.

Kafle, D., Hänel, A., Lortzing, T., Steppuhn, A., and Wurst, S. (2017). Sequential above- and belowground herbivory modifies plant responses depending on herbivore identity. *BMC Ecol.* *17*, 5.

Kaloshian, I., and Walling, L.L. (2016). Hemipteran and dipteran pests: Effectors and plant host immune regulators. *J. Integr. Plant Biol.* *58*, 350–361.

Kanvil, S., Powell, G., and Turnbull, C. (2014). Pea aphid biotype performance on diverse *Medicago* host genotypes indicates highly specific virulence and resistance functions. *Bull. Entomol. Res.* *104*, 689–701.

Kassanis, B. (1939). Intranuclear Inclusions in Virus Infected Plants. *Ann. Appl. Biol.* *26*, 705–709.

Kasschau, K.D., and Carrington, J.C. (1998). A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* *95*, 461–470.

Kasschau, K.D., Cronin, S., and Carrington, J.C. (1997). Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology* *228*, 251–262.

Kauss, H., Köhle, H., and Jeblick, W. (1983). Proteolytic activation and stimulation by Ca²⁺ of glucan synthase from soybean cells - ScienceDirect. *158*(1), 84–88.

Kennedy, J.S., Day, M.F., and Eastop, V.F. (1962). A conspectus of aphids as vectors of plant viruses. London, Commonw. Inst. Ent.

Kerchev, P.I., Fenton, B., Foyer, C.H., and Hancock, R.D. (2012). Infestation of potato (*Solanum tuberosum* L.) by the peach-potato aphid (*Myzus persicae* Sulzer) alters cellular redox status and is influenced by ascorbate. *Plant Cell Environ.* *35*, 430–440.

Kim, Y.-C., Udeshi, N.D., Balsbaugh, J.L., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., and Olszewski, N.E. (2011). O-GlcNAcylation of the Plum pox virus capsid protein catalyzed by SECRET AGENT:

characterization of O-GlcNAc sites by electron transfer dissociation mass spectrometry. *Amino Acids* 40, 869–876.

Klein, P.G., Klein, R.R., Rodríguez-Cerezo, E., Hunt, A.G., and Shaw, J.G. (1994). Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. *Virology* 204, 759–769.

Klüsener, B., Young, J.J., Murata, Y., Allen, G.J., Mori, I.C., Hugouvieux, V., and Schroeder, J.I. (2002). Convergence of calcium signaling pathways of pathogenic elicitors and abscisic acid in *Arabidopsis* guard cells. *Plant Physiol.* 130, 2152–2163.

Kopp, M., Geoffroy, P., and Fritig, B. (1983). Plant disease and the regulation of enzymes involved in lignification : Effects of osmotic pressure on phenylpropanoid enzymes and on the hypersensitive response of tobacco to tobacco mosaic virus. *Planta* 157, 180–189.

Kudla, J., Batistic, O., and Hashimoto, K. (2010). Calcium signals: the lead currency of plant information processing. *Plant Cell* 22, 541–563.

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

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.

Laín, S., Riechmann, J.L., and García, J.A. (1990). RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic Acids Res.* 18, 7003–7006.

Lamb, C., and Dixon, R.A. (1997). THE OXIDATIVE BURST IN PLANT DISEASE RESISTANCE. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 251–275.

Langenberg, W.G., and Zhang, L. (1997). Immunocytology shows the presence of tobacco etch virus P3 protein in nuclear inclusions. *J. Struct. Biol.* 118, 243–247.

Leh, V., Jacquot, E., Geldreich, A., Hermann, T., Leclerc, D., Cerutti, M., Yot, P., Keller, M., and Blanc, S. (1999). Aphid transmission of cauliflower mosaic virus requires the viral PIII protein. *EMBO J.* 18, 7077–7085.

Li, D., Wei, T., Abbott, C.M., and Harrich, D. (2013). The unexpected roles of eukaryotic translation elongation factors in RNA virus replication and pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 77, 253–266.

Li, L., Li, M., Yu, L., Zhou, Z., Liang, X., Liu, Z., Cai, G., Gao, L., Zhang, X., Wang, Y., *et al.* (2014). The FLS2-associated kinase BIK1 directly phosphorylates the NADPH oxidase RbohD to control plant immunity. *Cell Host Microbe* 15, 329–338.

Liu, R., Lü, B., Wang, X., Zhang, C., Zhang, S., Qian, J., Chen, L., Shi, H., and Dong, H. (2010). Thirty-seven transcription factor genes differentially respond to a harpin protein and affect resistance to the green peach aphid in *Arabidopsis*. *J. Biosci.* 35, 435–450.

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

Louis, J., and Shah, J. (2013). *Arabidopsis thaliana*-*Myzus persicae* interaction: shaping the understanding of plant defense against phloem-feeding aphids. *Front. Plant Sci.* *4*, 213.

Ma, W., and Berkowitz, G.A. (2007). The grateful dead: calcium and cell death in plant innate immunity. *Cell. Microbiol.* *9*, 2571–2585.

Ma, W., Qi, Z., Smigel, A., Walker, R.K., Verma, R., and Berkowitz, G.A. (2009). Ca²⁺, cAMP, and transduction of non-self perception during plant immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *106*, 20995–21000.

Macho, A.P., Boutrot, F., Rathjen, J.P., and Zipfel, C. (2012). Aspartate oxidase plays an important role in *Arabidopsis* stomatal immunity. *Plant Physiol.* *159*, 1845–1856.

Mahajan, S.K., Chisholm, S.T., Whitham, S.A., and Carrington, J.C. (1998). Identification and characterization of a locus (RTM1) that restricts long-distance movement of tobacco etch virus in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *14*, 177–186.

Maia, I.G., Haenni, A., and Bernardi, F. (1996). Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. *J. Gen. Virol.* *77*, 1335–1341.

Mantelin, S., Bhattarai, K.K., and Kaloshian, I. (2009). Ethylene contributes to potato aphid susceptibility in a compatible tomato host. *New Phytol.* *183*, 444–456.

Martinière, A. (2008). Signalisation précoce des cellules végétales en réponse au stress osmotique.

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

Martos, G.G., Terán, M.D.M., and Díaz Ricci, J.C. (2015). The defence elicitor AsES causes a rapid and transient membrane depolarization, a triphasic oxidative burst and the accumulation of nitric oxide. *Plant Physiol. Biochem. PPB* *97*, 443–450.

Matthews, K.R. (2011). Controlling and coordinating development in vector-transmitted parasites. *Science* *331*, 1149–1153.

Medina-Ortega, K.J., Bosque-Pérez, N.A., Ngumbi, E., Jiménez-Martínez, E.S., and Eigenbrode, S.D. (2009). *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) responses to volatile cues from Barley yellow dwarf virus-infected wheat. *Environ. Entomol.* *38*, 836–845.

Mengual-Chuliá, B., Bedhomme, S., Lafforgue, G., Elena, S.F., and Bravo, I.G. (2016). Assessing parallel gene histories in viral genomes. *BMC Evol. Biol.* *16*, 32.

Merits, A., Guo, D., Järvekülg, L., and Saarma, M. (1999). Biochemical and genetic evidence for interactions between potato A potyvirus-encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex. *Virology* 263, 15–22.

Merits, A., Rajamäki, M.-L., Lindholm, P., Runeberg-Roos, P., Kekarainen, T., Puustinen, P., Mäkeläinen, K., Valkonen, J.P.T., and Saarma, M. (2002). Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells. *J. Gen. Virol.* 83, 1211–1221.

Mewis, I., Khan, M.A.M., Glawischnig, E., Schreiner, M., and Ulrichs, C. (2012). Water stress and aphid feeding differentially influence metabolite composition in *Arabidopsis thaliana* (L.). *PloS One* 7, e48661.

Miles, P.W. (1999). Aphid saliva. *Biol. Rev.* 74, 41–85.

Miller, G., Schlauch, K., Tam, R., Cortes, D., Torres, M.A., Shulaev, V., Dangl, J.L., and Mittler, R. (2009). The plant NADPH oxidase RBOHD mediates rapid systemic signaling in response to diverse stimuli. *Sci. Signal.* 2(84), ra45.

Mithöfer, A., Ebel, J., and Felle, H.H. (2005). Cation fluxes cause plasma membrane depolarization involved in beta-glucan elicitor-signaling in soybean roots. *Mol. Plant-Microbe Interact.* MPMI 18, 983–990.

Nakahara, K.S., Masuta, C., Yamada, S., Shimura, H., Kashihara, Y., Wada, T.S., Meguro, A., Goto, K., Tadamura, K., Sueda, K., *et al.* (2012). Tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNA silencing suppressors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 10113–10118.

Návarová, H., Bernsdorff, F., Döring, A.-C., and Zeier, J. (2012). Pipecolic acid, an endogenous mediator of defense amplification and priming, is a critical regulator of inducible plant immunity. *Plant Cell* 24, 5123–5141.

Navazio, L., Moscatiello, R., Bellincampi, D., Baldan, B., Meggio, F., Brini, M., Bowler, C., and Mariani, P. (2002). The role of calcium in oligogalacturonide-activated signalling in soybean cells. *Planta* 215, 596–605.

Ngumbi, E., Eigenbrode, S.D., Bosque-Pérez, N.A., Ding, H., and Rodriguez, A. (2007). *Myzus persicae* is arrested more by blends than by individual compounds elevated in headspace of PLRV-infected potato. *J. Chem. Ecol.* 33, 1733–1747.

Ogasawara, Y., Kaya, H., Hiraoka, G., Yumoto, F., Kimura, S., Kadota, Y., Hishinuma, H., Senzaki, E., Yamagoe, S., Nagata, K., *et al.* (2008). Synergistic activation of the *Arabidopsis* NADPH oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 283, 8885–8892.

Pasin, F., Simón-Mateo, C., and García, J.A. (2014). The Hypervariable Amino-Terminus of P1 Protease Modulates Potyviral Replication and Host Defense Responses. *PLOS Pathog.* 10, e1003985.

Peng, Y.H., Kadoury, D., Gal-On, A., Huet, H., Wang, Y., and Raccah, B. (1998). Mutations in the HC-Pro gene of zucchini yellow mosaic potyvirus: effects on aphid transmission and binding to purified virions. *J. Gen. Virol.* 79, 897–904.

Pérez, J. de J., Udeshi, N.D., Shabanowitz, J., Ciordia, S., Juárez, S., Scott, C.L., Olszewski, N.E., Hunt, D.F., and García, J.A. (2013). O-GlcNAc modification of the coat protein of the potyvirus Plum pox virus enhances viral infection. *Virology* 442, 122–131.

Perry, K.L., Zhang, L., and Palukaitis, P. (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, 204–210.

Pieterse, C.M.J., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., and Van Wees, S.C.M. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 28, 489–521.

Pirone, T.P., and Blanc, S. (1996). Helper-dependent vector transmission of plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 227–247.

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

Plisson, C., Uzest, M., Drucker, M., Froissart, R., Dumas, C., Conway, J., Thomas, D., Blanc, S., and Bron, P. (2005). Structure of the mature P3-virus particle complex of cauliflower mosaic virus revealed by cryo-electron microscopy. *J. Mol. Biol.* 346, 267–277.

Prince, D.C., Drurey, C., Zipfel, C., and Hogenhout, S.A. (2014). The leucine-rich repeat receptor-like kinase BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1-ASSOCIATED KINASE1 and the cytochrome P450 PHYTOALEXIN DEFICIENT3 contribute to innate immunity to aphids in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 164, 2207–2219.

Pugin, A., Frachisse, J.M., Tavernier, E., Bligny, R., Gout, E., Douce, R., and Guern, J. (1997). Early Events Induced by the Elicitor Cryptogein in Tobacco Cells: Involvement of a Plasma Membrane NADPH Oxidase and Activation of Glycolysis and the Pentose Phosphate Pathway. *Plant Cell* 9, 2077–2091.

Puustinen, P., and Mäkinen, K. (2004). Uridylylation of the potyvirus VPg by viral replicase NIb correlates with the nucleotide binding capacity of VPg. *J. Biol. Chem.* 279, 38103–38110.

Rajabaskar, D., Bosque-Pérez, N.A., and Eigenbrode, S.D. (2014). Preference by a virus vector for infected plants is reversed after virus acquisition. *Virus Res.* 186, 32–37.

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

Rajamäki, M.-L., and Valkonen, J.P.T. (2003). Localization of a potyvirus and the viral genome-linked protein in wild potato leaves at an early stage of systemic infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* MPMI 16, 25–34.

- Rees, D.C., and Lipscomb, W.N. (1982). Refined crystal structure of the potato inhibitor complex of carboxypeptidase A at 2.5 Å resolution. *J. Mol. Biol.* *160*, 475–498.
- Ren, G., Wang, X., Chen, D., Wang, X., and Liu, X. (2014). Effects of aphids *Myzus persicae* on the changes of Ca²⁺ and H₂O₂ flux and enzyme activities in tobacco. *J. Plant Interact.* *9*, 883–888.
- Revers, F., and García, J.A. (2015). Molecular biology of potyviruses. *Adv. Virus Res.* *92*, 101–199.
- Riechmann, J.L., Cervera, M.T., and García, J.A. (1995). Processing of the plum pox virus polyprotein at the P3-6K1 junction is not required for virus viability. *J. Gen. Virol.* *76*, 951–956.
- Robaglia, C., Durand-Tardif, M., Tronchet, M., Boudazin, G., Astier-Manifacier, S., and Casse-Delbart, F. (1989). Nucleotide sequence of potato virus Y (N Strain) genomic RNA. *J. Gen. Virol.* *70*, 935–947.
- Roberts, I.M., Wang, D., Findlay, K., and Maule, A.J. (1998). Ultrastructural and Temporal Observations of the Potyvirus Cylindrical Inclusions (CIs) Show That the CI Protein Acts Transiently in Aiding Virus Movement. *Virology* *245*, 173–181.
- Rodamilans, B., Valli, A., and García, J.A. (2013). Mechanistic divergence between P1 proteases of the family Potyviridae. *J. Gen. Virol.* *94*, 1407–1414.
- Rodriguez, P.A., Stam, R., Warbroek, T., and Bos, J.I.B. (2014). Mp10 and Mp42 from the aphid species *Myzus persicae* trigger plant defenses in *Nicotiana benthamiana* through different activities. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* *27*, 30–39.
- Rodríguez-Cerezo, E., Ammar, E.D., Pirone, T.P., and Shaw, J.G. (1993). Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *J. Gen. Virol.* *74*, 1945–1949.
- Rohrmann, G.F. (2013). *Baculovirus Molecular Biology* (Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US)).
- Rojas, M.R., Zerbini, F.M., Allison, R.F., Gilbertson, R.L., and Lucas, W.J. (1997). Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* *237*, 283–295.
- Rossard, S., Luini, E., Pérault, J.-M., Bonmort, J., and Roblin, G. (2006). Early changes in membrane permeability, production of oxidative burst and modification of PAL activity induced by ergosterol in cotyledons of *Mimosa pudica*. *J. Exp. Bot.* *57*, 1245–1252.
- Ruiz-Ferrer, V., Boskovic, J., Alfonso, C., Rivas, G., Llorca, O., López-Abella, D., and López-Moya, J.J. (2005). Structural analysis of tobacco etch potyvirus HC-pro oligomers involved in aphid transmission. *J. Virol.* *79*, 3758–3765.

- Sardaru, P., Sinausía, L., López-González, S., Zindovic, J., Sánchez, F., and Ponz, F. (2018). The apparent non-host resistance of Ethiopian mustard to a radish-infecting strain of Turnip mosaic virus is largely determined by the C-terminal region of the P3 viral protein. *Mol. Plant Pathol.* *19*(8), 1984–1994
- Schaad, M.C., Haldeman-Cahill, R., Cronin, S., and Carrington, J.C. (1996). Analysis of the VPg-proteinase (NIa) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *J. Virol.* *70*, 7039–7048.
- Schaad, M.C., Lellis, A.D., and Carrington, J.C. (1997). VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *J. Virol.* *71*, 8624–8631.
- Segonzac, C., Feike, D., Gimenez-Ibanez, S., Hann, D.R., Zipfel, C., and Rathjen, J.P. (2011). Hierarchy and roles of pathogen-associated molecular pattern-induced responses in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiol.* *156*, 687–699.
- Seo, J.-K., Kang, S.-H., Seo, B.Y., Jung, J.K., and Kim, K.-H. (2010). Mutational analysis of interaction between coat protein and helper component-proteinase of Soybean mosaic virus involved in aphid transmission. *Mol. Plant Pathol.* *11*, 265–276.
- Shimmen, T. (2005). Electrical perception of the “death message” in *Chara*: analysis of K⁺-sensitive depolarization. *Plant Cell Physiol.* *46*, 1839–1847.
- Shukla, D., Ward, C., and Brunt, A. (1994). *The Potyviridae* (Wallingford UK: CAB International).
- Smith, C.M., Liu, X., Wang, L.J., Liu, X., Chen, M.-S., Starkey, S., and Bai, J. (2010). Aphid feeding activates expression of a transcriptome of oxylipin-based defense signals in wheat involved in resistance to herbivory. *J. Chem. Ecol.* *36*, 260–276.
- Stavolone, L., Villani, M.E., Leclerc, D., and Hohn, T. (2005). A coiled-coil interaction mediates cauliflower mosaic virus cell-to-cell movement. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 6219–6224.
- Subr, Z.W., Kamencayová, M., Nováková, S., Nagyová, A., Nosek, J., and Glasa, M. (2010). A single amino acid mutation alters the capsid protein electrophoretic double-band phenotype of the Plum pox virus strain PPV-Rec. *Arch. Virol.* *155*, 1151–1155.
- Suehiro, N., Natsuaki, T., Watanabe, T., and Okuda, S. (2004). An important determinant of the ability of Turnip mosaic virus to infect *Brassica* spp. and/or *Raphanus sativus* is in its P3 protein. *J. Gen. Virol.* *85*, 2087–2098.
- Sumimoto, H. (2008). Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J.* *275*, 3249–3277.
- Suzuki, N., Miller, G., Morales, J., Shulaev, V., Torres, M.A., and Mittler, R. (2011). Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* *14*, 691–699.

Takamatsu, H.-H., Mellor, P.S., and Mertens, P.P.C. (2004). A potential overwintering mechanism for bluetongue virus--recent findings. *Vet. Ital.* *40*, 456–461.

Tatineni, S., and French, R. (2014). The C-terminus of Wheat streak mosaic virus coat protein is involved in differential infection of wheat and maize through host-specific long-distance transport. *Mol. Plant-Microbe Interact.* *MPMI 27*, 150–162.

Thivierge, K., Cotton, S., Dufresne, P.J., Mathieu, I., Beauchemin, C., Ide, C., Fortin, M.G., and Laliberté, J.-F. (2008). Eukaryotic elongation factor 1A interacts with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase and VPg-Pro in virus-induced vesicles. *Virology* *377*, 216–225.

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

Torres, M.A., and Dangl, J.L. (2005). Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr. Opin. Plant Biol.* *8*, 397–403.

Valli, A., Dujovny, G., and García, J.A. (2008). Protease activity, self interaction, and small interfering RNA binding of the silencing suppressor p1b from cucumber vein yellowing ipomovirus. *J. Virol.* *82*, 974–986.

Verchot, J., and Carrington, J.C. (1995). Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. *J. Virol.* *69*, 3668–3674.

Verchot, J., Koonin, E.V., and Carrington, J.C. (1991). The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology* *185*, 527–535.

Verret, F., Wheeler, G., Taylor, A.R., Farnham, G., and Brownlee, C. (2010). Calcium channels in photosynthetic eukaryotes: implications for evolution of calcium-based signalling. *New Phytol.* *187*, 23–43.

Vijayapalani, P., Maeshima, M., Nagasaki-Takekuchi, N., and Miller, W.A. (2012). Interaction of the trans-frame potyvirus protein P3N-PIPO with host protein PCaP1 facilitates potyvirus movement. *PLoS Pathog.* *8*, e1002639.

Vincent, T.R., Avramova, M., Canham, J., Higgins, P., Bilkey, N., Mugford, S.T., Pitino, M., Toyota, M., Gilroy, S., Miller, A.J., *et al.* (2017). Interplay of Plasma Membrane and Vacuolar Ion Channels, Together with BAK1, Elicits Rapid Cytosolic Calcium Elevations in Arabidopsis during Aphid Feeding. *Plant Cell* *29*, 1460–1479.

Vorhölter, F.-J., Wiggerich, H.-G., Scheidle, H., Sidhu, V.K., Mrozek, K., Küster, H., Pühler, A., and Niehaus, K. (2012). Involvement of bacterial TonB-dependent signaling in the generation of an oligogalacturonide damage-associated molecular pattern from plant cell walls exposed to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pectate lyases. *BMC Microbiol.* *12*, 239.

Walling, L.L. (2009). Chapter 13 Adaptive Defense Responses to Pathogens and Insects - ScienceDirect.

Wei, T., Zhang, C., Hong, J., Xiong, R., Kasschau, K.D., Zhou, X., Carrington, J.C., and Wang, A. (2010a). Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathog.* *6*, e1000962.

Wei, T., Huang, T.-S., McNeil, J., Laliberté, J.-F., Hong, J., Nelson, R.S., and Wang, A. (2010b). Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant potyvirus replication. *J. Virol.* *84*, 799–809.

Whitfield, A.E., Falk, B.W., and Rotenberg, D. (2015). Insect vector-mediated transmission of plant viruses. *Virology* *479–480*, 278–289.

Will, T., Tjallingii, W.F., Thönnessen, A., and van Bel, A.J.E. (2007). Molecular sabotage of plant defense by aphid saliva. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 10536–10541.

Wu, J., and Baldwin, I.T. (2010). New insights into plant responses to the attack from insect herbivores. *Annu. Rev. Genet.* *44*, 1–24.

Xiong, R., and Wang, A. (2013). SCE1, the SUMO-conjugating enzyme in plants that interacts with NIb, the RNA-dependent RNA polymerase of Turnip mosaic virus, is required for viral infection. *J. Virol.* *87*, 4704–4715.

Yoshida, N., Shimura, H., Yamashita, K., Suzuki, M., and Masuta, C. (2012). Variability in the P1 gene helps to refine phylogenetic relationships among leek yellow stripe virus isolates from garlic. *Arch. Virol.* *157*, 147–153.

Zebelo, S.A., and Maffei, M.E. (2015). Role of early signalling events in plant-insect interactions. *J. Exp. Bot.* *66*, 435–448.

Zhang, X., Du, P., Lu, L., Xiao, Q., Wang, W., Cao, X., Ren, B., Wei, C., and Li, Y. (2008). Contrasting effects of HC-Pro and 2b viral suppressors from Sugarcane mosaic virus and Tomato aspermy cucumovirus on the accumulation of siRNAs. *Virology* *374*, 351–360.

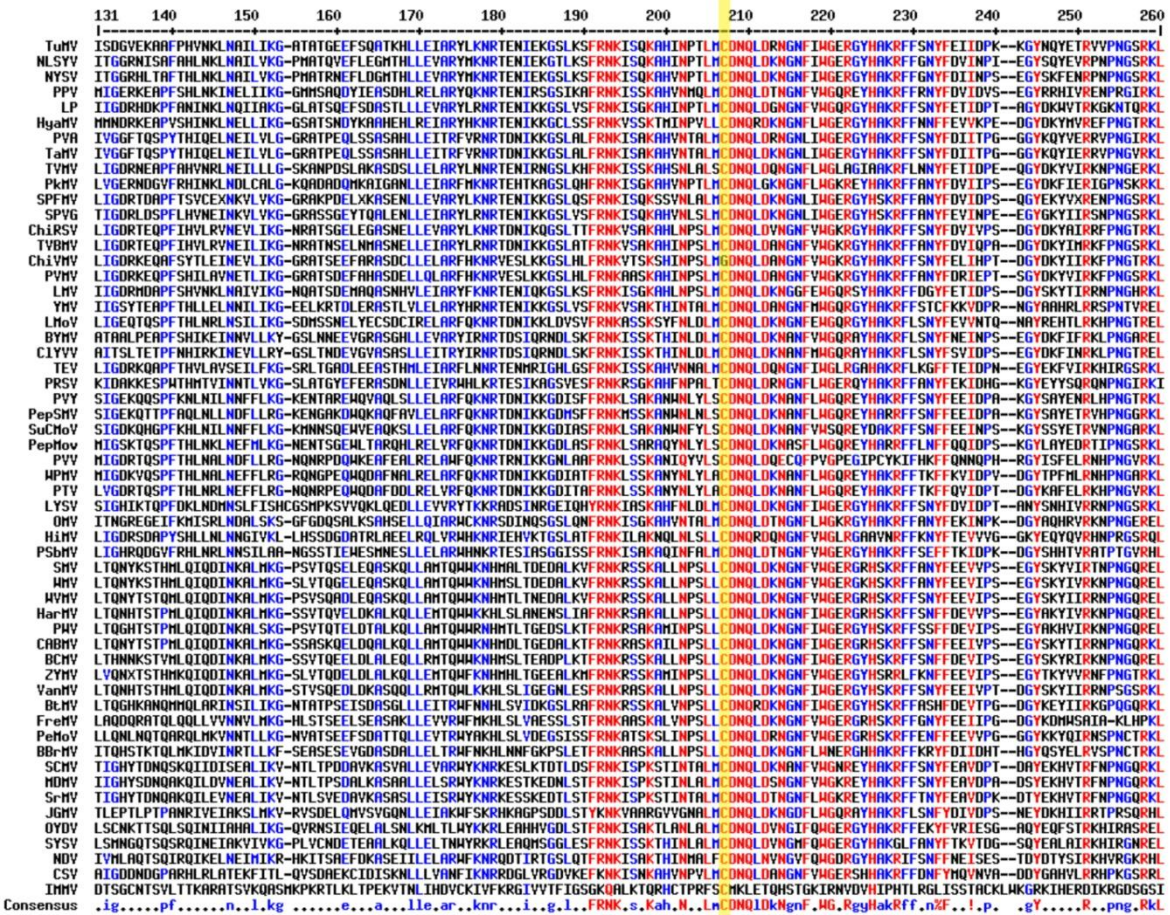
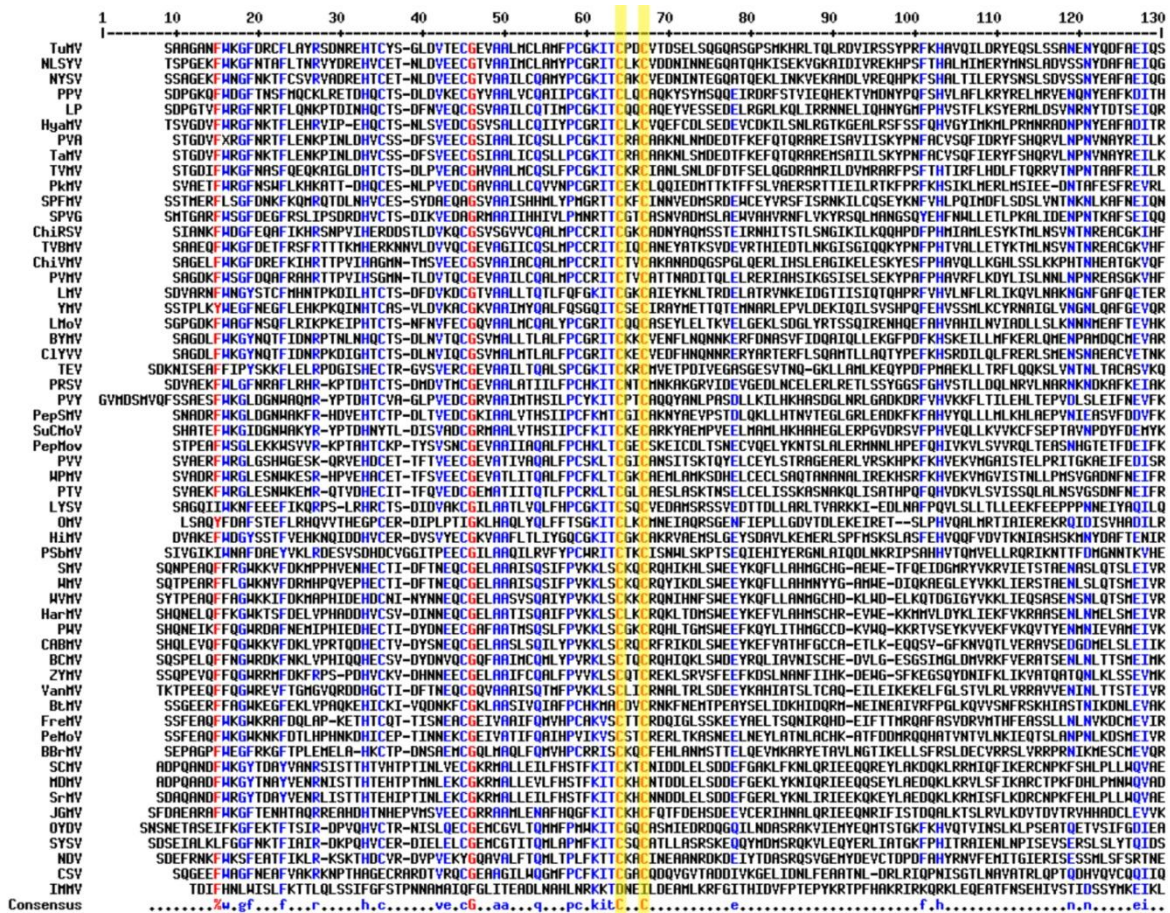
Zhao, H., Sun, X., Xue, M., Zhang, X., and Li, Q. (2016). Antioxidant Enzyme Responses Induced by Whiteflies in Tobacco Plants in Defense against Aphids: Catalase May Play a Dominant Role. *PloS One* *11*, e0165454.

Zhou, N., Tootle, T.L., and Glazebrook, J. (1999). Arabidopsis PAD3, a gene required for camalexin biosynthesis, encodes a putative cytochrome P450 monooxygenase. *Plant Cell* *11*, 2419–2428.

Ziebell, H., Murphy, A.M., Groen, S.C., Tungadi, T., Westwood, J.H., Lewsey, M.G., Moulin, M., Kleczkowski, A., Smith, A.G., Stevens, M., *et al.* (2011). Cucumber mosaic virus and its 2b RNA silencing suppressor modify plant-aphid interactions in tobacco. *Sci. Rep.* *1*, 187.

Zilian, E., and Maiss, E. (2011). Detection of plum pox potyviral protein-protein interactions in planta using an optimized mRFP-based bimolecular fluorescence complementation system. *J. Gen. Virol.* 92, 2711–2723.

ANNEXES



Annexe 1. Alignement de 56 séquences de HC-Pro. L'alignement met en évidence la conservation de sept cystéines dans l'ensemble de ces séquences : en positions 55, 58, 197, 280, 292, 294 et 344 sur la séquence du TuMV. L'alignement a été réalisé sur <http://multalin.toulouse.inra.fr/>.

Vitamine et autres	mg
Acide aminobenzoïque	100
Acide ascorbique	1000
Biotine	1
Choline chlorure	500
Acide folique	10
Myo-inositol	420
Acide nicotinique	100
Pyroxidine	25
Thiamine	25
CaCl ₂	50

Acides aminés	mg
Alanine	178.7
D-β alanine	6.2
Arginine	245
Asparagine	298.5
Acide aspartique	88
Cystéine	29.6
Acide glutamique	149.3
Glutamine	445.6
Glycine	166.5
Histidine	136
Isoleucine	164.7
Leucine	231.5
Lysine	351
Méthionine	72.4
Ornithine	9.4
Phénylalanine	293
Proline	129.3
Serine	124.2
Thréonine	127.1
Tryptophane	42.75
Tyrosine	38.6
Valine	190.8

Métaux et autres	mg
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.47
FeCl ₃ , 6H ₂ O	4.45
MnCl ₂ , 4H ₂ O	0.65
NaCl	2.54
ZnCl ₂	0.83
CaCl ₂	3
Acide citrique	5.8
Cholestérol benzoate	2.5
MgSO ₄ , 7H ₂ O	2.42

Annexe 2. Préparation du milieu artificiel pour pucerons. Chacune des vitamines listées dans le tableau est pesée, puis 300 mL d'eau et 5 mg de Riboflavine y sont ajoutés. Ensuite, les acides aminés, 20 g de saccharose et les métaux sont pesés, puis 40 mL d'eau ainsi que 20 mL du mélange de vitamines y sont ajoutés. La dissolution de l'ensemble des composants avec un agitateur magnétique prend au moins 3 heures. Le pH est

ensuite ajusté à 7 avec du KOH, puis 250 mg de KH_2PO_4 sont ajoutés et le pH est à nouveau ajusté avec du KOH ou du NaOH pour atteindre 7,5. Le milieu artificiel peut ensuite être stocké à -20°C jusqu'à plusieurs mois avant utilisation. Le protocole de préparation de ce milieu artificiel a été fourni par Anas Cherqui (Université de Picardie Jules Verne).

Abstract

Many plant viruses are transmitted in non-circulative manner by hemipteran vectors, often aphids. This transmission mode spreads viruses very quickly from one host to another and thereby causes countless damage on many crops of agronomic interest. Currently, the lack of knowledge about their transmission process is a hindrance to the development of effective control methods. Recently, results have shown that the model virus, *Cauliflower mosaic virus* (CaMV, genus *Caulimovirus*), responds to the arrival of aphid vectors by forming, at this time and reversibly, virus transmissible complexes, obligatory for the acquisition by the aphid. This extraordinary phenomenon called "transmission activation (TA)" controls the virus acquisition and thus its transmission. It's a major discovery in non-circulative transmission and opens many research perspectives including expanding this phenomenon to other viruses to see if TA is a widespread phenomenon in the viruses propagation.

Having this in mind, we are interested to study a virus unrelated to CaMV, *Turnip mosaic virus* (TuMV), a *Potyvirus*, also transmitted by aphids. The TuMV transmission depends on the direct interaction of the virus particle and the viral helper component protease (HC-Pro). Indeed, HC-Pro must form with the virus particle a transmissible complex, the only form of virus that can be acquired by the vector. Our results show that TuMV uses TA and that its TA depends on the presence of reactive oxygen species (ROS) and on calcium signaling. TuMV TA is correlated with the formation of HC-Pro disulfide bond mediated oligomers and the formation of HC-Pro transmissible complexes HC-Pro/viral particle in plant cells. Our pharmacological analysis showed that CaMV TA also depends on the presence of ROS and calcium signaling. These two signaling pathways are therefore involved presumably in the early stages of CaMV and TuMV TA. Experiments with other compounds have shown that the following steps of TA are different for the two viruses. A search for elicitors of the TA has been initiated but has not been successful yet.

These results provide evidence of the existence of TA for a second genus of non-circulative virus, suggesting that this might be a general transmission mode. These new data open, from an applied point of view, new perspectives for control strategies, aimed at specifically interrupting the TA process.

Keywords : non-circulative virus, transmission activation, helper component, aphid

Résumé

Beaucoup de virus de plante sont transmis selon le mode non-circulant par vecteurs hémiptères, souvent des pucerons. Ce mode de propagation répand les virus très rapidement d'un hôte à l'autre, ce qui cause d'innombrables dégâts sur de nombreuses cultures d'intérêt agronomique. Actuellement, le manque de connaissances sur leur processus de transmission constitue un frein pour le développement de méthodes de lutte efficaces. Récemment, des résultats ont montré qu'un virus modèle, le *Cauliflower mosaic virus* (CaMV, genre *Caulimovirus*), répond à l'arrivée de son vecteur puceron en formant, à ce moment précis et de manière réversible, des complexes transmissibles du virus, obligatoire pour son acquisition par le puceron. Ce phénomène extraordinaire nommé « activation de la transmission (AT) » contrôle l'acquisition du virus et donc sa transmission. Il constitue une découverte majeure pour la transmission non-circulante et ouvre de nombreuses perspectives de recherche dont celle d'élargir ce phénomène à d'autres virus pour savoir si l'AT est un phénomène généralisé dans la propagation des virus.

Dans cette optique, nous nous sommes intéressés à un virus non apparenté au CaMV, le *Turnip mosaic virus* (TuMV), un *Potyvirus*, également transmis par pucerons. La transmission du TuMV dépend de l'interaction directe de la particule virale et de la protéine virale facteur assistant de la transmission (HC-Pro). En effet, HC-Pro doit former avec la particule un complexe transmissible, seule forme du virus pouvant être acquis par le vecteur. Nos résultats montrent que le TuMV utilise l'AT et qu'elle est dépendante de la présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et de la signalisation calcique. L'AT du TuMV est corrélée avec la formation d'oligomères par ponts disulfures de HC-Pro et avec la formation des complexes transmissibles HC-Pro/particules virales dans les cellules végétales. Notre analyse pharmacologique a montré que l'AT du CaMV dépendait également de la présence des ROS et de la signalisation calcique. Ces deux voies de signalisation sont donc impliquées dans les étapes présumées précoces de l'AT du CaMV et du TuMV. Des expériences avec d'autres composés ont mis en évidence que les étapes suivantes de l'AT sont différentes pour les deux virus. Une recherche d'éliciteurs de l'AT a été initiée mais n'a pour l'instant pas permis d'en identifier un.

Ces résultats ont mis en évidence l'existence de l'AT pour un deuxième genre de virus non-circulant, suggérant qu'il pourrait s'agir d'un mode de transmission général. Ces nouvelles données ouvrent, d'un point de vu appliqué, de nouvelles perspectives pour les stratégies de lutte, visant à interrompre spécifiquement le processus de l'AT.

Mots clés : virus non-circulant, activation de la transmission, facteur assistant, puceron