



HAL
open science

Adaptation des plantes à la sécheresse et épidémiologie d'un virus non circulant, le Cauliflower mosaic virus

Sandy Berges

► **To cite this version:**

Sandy Berges. Adaptation des plantes à la sécheresse et épidémiologie d'un virus non circulant, le Cauliflower mosaic virus. Biologie végétale. 2016. hal-02794880

HAL Id: hal-02794880

<https://hal.inrae.fr/hal-02794880>

Submitted on 5 Jun 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.

**Master Biologie des Plantes et des Micro-organismes,
Biotechnologies, Bioprocédés**

Parcours : Biologie Fonctionnelle des Plantes

Année Universitaire 2015-2016

**Adaptation des plantes à la sécheresse et épidémiologie d'un virus
non circulant, le *Cauliflower mosaic virus***

Sandy BERGES

LEPSE / BGPI

Denis VILE / Manuella van MUNSTER

Soutenu le 13 Juin 2016

La production agricole et le fonctionnement des écosystèmes sont fréquemment contraints par des épisodes de sécheresse dont la fréquence et la durée devraient augmenter sous l'influence des changements climatiques. L'étude des interactions entre les plantes, leurs cortèges de pathogènes, de vecteurs et l'environnement abiotique est encore trop peu intégrée aux problématiques de limitation en eau. A ce jour, 900 phytovirus ont été décrits, infectant environ 70% des plantes et générant des pertes majeures de productivité. Cependant, plusieurs indices soutiennent l'idée que diverses combinaisons de stress abiotiques et d'infections virales peuvent être bénéfiques pour les plantes. Afin d'améliorer la compréhension des interactions entre les plantes et les virus en condition de déficit hydrique édaphique nous avons évalué les effets délétères ou bénéfiques d'un virus non-circulant, le Cauliflower mosaic virus (CaMV), et d'autres paramètres épidémiologiques tels que l'efficacité de transmission et la charge virale chez neuf accessions naturelles d'*Arabidopsis thaliana* cultivées dans un automate de phénotypage. Nos résultats montrent que l'infection virale n'a pas amplifié les effets délétères du stress hydrique et a même amélioré la croissance chez deux accessions. En condition de bonne disponibilité en eau, le taux de transmission tendait à augmenter avec la charge virale. Par contre, le taux de transmission était augmenté ou diminué en contexte de déficit hydrique et en fonction de la tolérance de l'accession au CaMV alors que la charge virale était diminuée pour quasiment toutes les accessions. La modification du taux de transmission en contexte de déficit hydrique n'était donc pas liée aux changements de charge virale. Ces résultats pourraient être en lien avec la grande réactivité des phytovirus à percevoir un changement de l'environnement de leur hôte et à réagir en conséquence en termes d'efficacité de transmission et de virulence.

Mots clefs : Ecophysiologie, épidémiologie, interactions plante-virus-vecteur, stress environnementaux, déficit hydrique, transmission virale.

Agricultural production and ecosystem functioning are frequently constrained by drought and the frequency and duration drought periods should increase under the influence of climate change. Water limitation has been insufficiently integrated into the study of the interactions between plants and their pathogens, vectors and the abiotic environment. To date, 900 plant viruses have been described, infecting approximately 70% of the plants and generating major losses of productivity. However, several cues support the idea that various combinations of abiotic stresses and virus infections may be beneficial to plants in relation with the intrinsic capacity of viruses to react to environmental changes. To improve our understanding of the interactions between plant responses to a severe water deficit and virus infections, we assessed the deleterious or beneficial effects of a non-circulating virus, CaMV, and other epidemiological parameters such as the transmission efficiency and the viral load in nine natural accessions of *Arabidopsis thaliana* grown in an automated phenotyping platform. Our results show that the viral infection did not amplify the deleterious effects of water deficit and has even improved growth in two accessions. In condition of good water availability, transmission rate tended to increase with viral load. However, the transmission rate was either increased or decreased under water deficit in relation with accession tolerance to CaMV while viral load was reduced for almost all accessions. The changes in the rate of transmission under water deficit were therefore not related to changes in viral load. These results could be related to the high reactivity of plant viruses to perceive a change in the environment of their host and to react accordingly in terms of efficiency of transmission and virulence.

Keywords: Ecophysiologie, environmental stresses, epidemiology, plant-virus-vector interaction, viral transmission, water deficit.

Remerciements:

Je tiens tout d'abord à remercier mes encadrants de stage, Denis et Manuella pour m'avoir fait confiance tout au long du stage et de m'avoir appris une quantité d'infos sur l'écologie, les statistiques, l'épidémiologie, le CaMV, la fitness d'*Arabidopsis thaliana*... Je termine ce stage avec un bond en avant !!! Mais aussi pour leur bonne humeur, leur pédagogie, leur aide et leur JEUNESSE haha. Merci à Denis, pour m'avoir poussé à refaire du foot salle (bon... au début... parce qu'à la fin... j'étais plus trop là ;)) mais aussi pour toutes les DISCUTES haha. Je suis vraiment très contente de peut-être commencer une thèse avec deux encadrants au TOP !

Je tiens aussi à remercier Myriam pour son aide sur PHENOPSIS et pour toutes ses astuces pour faire marcher ce petit robot récalcitrant. Merci à Michel et Sophie pour avoir suivi l'évolution de mes plantes et puceron au labo BGPI, d'avoir été là pour les semis et inoculation, pour le transfert des plantes du LEPSE à BGPI et surtout pour lutter contre un fléau nommé MOUCHE DU TERREAU !!! Merci à Gaëlle, Alex, Thomas, Cecilia pour leur coup de main tout au long de l'expérimentation et surtout lors du semis !!!

Merci à Gabriel, Anaïs et Lucila pour leur aide tout au long de l'expérimentation, que ce soit pour l'inoc, pour le suivi phéno, pour l'analyse d'image et tout le reste !!! Vous avez vraiment été au top et vous avez super bien bossé !!! Désolée à Anaïs pour le petit accident de tête et d'oreille dans Phenopsis... mais au moins tu vas te souvenir longtemps du LEPSE ! J'espère que je ne vous ai pas trop tyrannisé ...

Je tiens aussi à remercier ma collègue de bouffe, de bouffe, de bouffe, et bon aussi de boulot, de jeux, de blabla, de pétage de câble, de critique, de rigolade et tout ça tout ça !!!! Eh oui, maintenant presque 3 ans (ou 4 ans, je ne sais plus haha) que je te connais petite poilue portugaise. En tout cas merci pour ton soutien et tes conseils !!!!! J'espère qu'on va pouvoir continuer à travailler ensemble.... Et pas se buter la tête haha. Toi aussi tu as trouvé que tu as maigri en te touchant ?

Merci aussi à Anello, eh oui toi aussi ça commence à faire un bout que je te fais chier mais bon je sais que tu aimes ça :D et c'est bien pour ça que t'es encore là !!!!

Merci à Romain, Maeva, Margaux et Agathe pour leur rigolade, les parties de tarots du midi, les séminaires (hein Agathe hahaha) et leur soutien !!! Vous m'avez permis de libérer mon cerveau chaque midi !!!

Merci à la fourmilière, Hassan, Hadi, Hector, Maxime, Mélanie, Mont-glou, Déborah et encore Diane (elle est partout celle-là) pour leur bonne humeur, leur respect, leur discut, et tout ça tout ça. Ça a été très agréable de cohabiter avec vous pendant 6 mois même si on a quand même eu un peu chaud et que ça puait le fauve (parfois ^^). J'espère que je ne suis pas considérée comme une sorte d'HITLER de fourmilière.

Je tiens aussi à remercier ma copine Anne Cécile pour son soutien à toute épreuve et surtout pendant la rédaction.... Merci pour tes relectures, pour tes conseils, pour ton écoute et pour ton amour que tu me donnes chaque jour.... Et ta confiance.... Si tu n'avais pas été là, je n'aurais pas pu fournir autant d'efforts... Merci à ma famille et surtout ma mère (même si tu ne comprends pas grand-chose et que tu ne comprends pas l'histoire des financements de thèse), tu as toujours été à l'écoute et tu as toujours eu confiance en moi !!!!

Je tiens enfin à remercier les pucerons... qui n'ont pas été dans mes cheveux.... et qui ont laissé vivre mes BB plantes personnelles.

Table des matières

Introduction.....	1
Réponse des plantes à des stress abiotiques et/ou biotiques	2
1) Stress biotique : virus et paramètres épidémiologiques.....	2
2) Stress hydrique et réponses de la plante	4
3) Interactions entre épidémiologie virale chez les plantes et conditions édapho-climatiques.	5
Résultats.....	6
1) Réussite d'inoculation sur les neuf géotypes d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
2) Impact du géotype et du stress hydrique sur la systémie.....	7
3) Effet du CaMV et d'un stress hydrique sévère sur la croissance des plantes	7
a) Matière sèche des parties aériennes	7
b) Croissance des feuilles de la rosette des plantes	8
4) Effet du géotype des plantes tests sur la transmission du CaMV	8
5) Effet du stress hydrique sur l'épidémiologie du CaMV.....	9
a) Effet sur la transmission	9
b) Effet sur la charge virale	9
c) Corrélation entre les paramètres épidémiologiques	10
Discussion	10
Impact négatif du SWD sur le délai et la vitesse de mise en place de la systémie	11
Effet de l'infection et du double stress sur la croissance des plantes :.....	11
Effet du SWD sur l'épidémiologie du CaMV.....	12
Bénéfice pour le virus ou pour l'hôte ?	13
Matériel et méthode	14
A) Phénotypage par la plateforme PHENOPSIS	14
B) Matériel végétal, conditions de culture et traitements d'irrigation	15
a) Matériel végétal et condition de culture.....	15
b) Contrôle de la teneur en eau du sol	15
C) Suivi non destructif du développement des plantes.....	16
D) Purification partielle et inoculation mécanique du virus CaMV	16
a) Purification partielle du CaMV	16
b) Vérification de la purification partielle du CaMV et détermination de la concentration virale	

c) Inoculation mécanique du virus CaMV	17
E) Etude de la transmission du virus, de l'accumulation virale et de la virulence	17
a) Test de transmission.....	17
b) Charge virale des plantes sources	18
c) Lecture de symptômes des plantes tests	19
F) Caractérisation de la croissance	19
a) Analyse de croissance des plantes	19
b) Mesures de la masse sèche des parties aériennes.....	20
G) Tests statistiques	20
Bibliographie	21

Introduction

Au cours de leur vie, les plantes subissent une exposition continue à divers stress édapho-climatiques et biotiques qui peuvent avoir un impact négatif sur leur performance, et *in fine* sur la dynamique, l'écologie et la productivité des populations végétales (Kröel-Dulay et al., 2015; Parmesan and Hanley, 2015). La baisse de disponibilité en eau dans le sol, ou déficit hydrique édaphique, est l'une des principales contraintes qui impacte la croissance des plantes et la productivité agricole dans le monde. Différentes stratégies végétales ont été façonnées par la sélection naturelle pour faire face au déficit hydrique, parmi lesquelles les mécanismes qui permettent d'éviter la sécheresse (p. ex. limiter les pertes d'eau par la fermeture des stomates ou la réduction de la surface foliaire) ou de la tolérer (p.ex. diminuer la sensibilité des cellules à la déshydratation par osmorégulation, maintenir les fonctions physiologiques et la croissance) (Mittler, 2006; Vile et al., 2012; Suzuki et al., 2014).

Les plantes sont également soumises à de multiples stress biotiques (herbivores, pathogènes...). Parmi les pathogènes majeurs, les virus entraînent des pertes significatives de productivité sur la plupart des cultures d'intérêt agronomique quelle que soit leur répartition géographique. Par exemple, le colza a vu ses rendements diminués de plus de 30% suite à l'infection par le *Turnip yellows virus* (TuYV) au cours des dernières années (Juergens et al., 2010). Cependant, les relations virus-plante hôte semblent plus complexes que jusqu'alors décrites. L'essor de la métagénomique a permis de constater que la majorité des plantes cultivées ou sauvages (70% des plantes dans les écosystèmes naturels) étaient infectées par des phytovirus sans pour autant présenter de symptôme d'infection (Malmstrom et al., 2011; Roossinck, 2012). De plus, certains phytovirus sont manifestement bénéfiques pour leur hôte. En effet, il a été montré que certains d'entre eux améliorent la survie des plantes dans des conditions environnementales extrêmes (Xu et al., 2008; Hily et al., 2016).

A ce jour, les conditions environnementales et les mécanismes écophysologiques qui permettent le mutualisme ou au contraire l'augmentation de la pathogénicité des phytovirus sont peu étudiés. Les quelques études combinant divers stress (abiotiques et biotiques) sont récentes (Prasch and Sonnewald, 2013; Suzuki et al., 2014; Ramegowda and Senthil-Kumar, 2015; Fraile and García-Arenal, 2016) et démontrent tout leur intérêt dans le contexte de changement climatique où les plantes seront soumises de plus en plus fréquemment à des stress abiotiques.

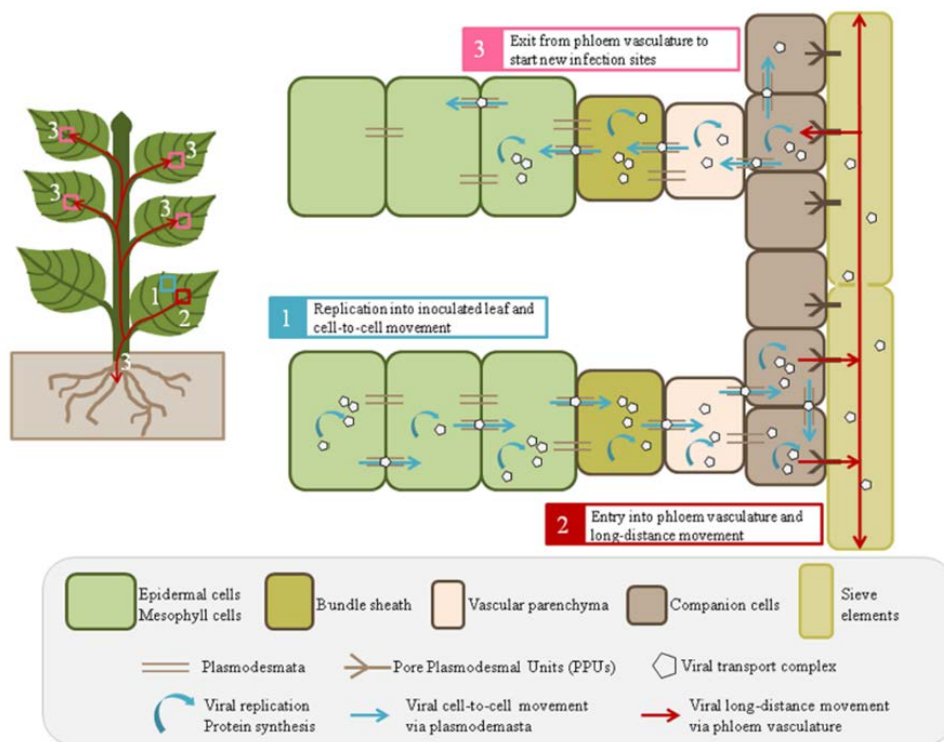


Figure 1 : Illustration générale représentant le mouvement des particules virales de cellule à cellule ou à longue distance dans les tissus de plante. Après inoculation, les virions sont désassemblés dans les cellules de l'épiderme ou du mésophylle pour permettre la réplication et la traduction du génome viral. Les protéines virales, parfois associées à des facteurs cellulaires, interagissent avec le génome viral pour former des complexes de transport (virions ou des complexes RNP) permettant un mouvement du virus de cellule à cellule par l'intermédiaire des plasmodesmes (1). La réplication virale et le mouvement de cellule à cellule continuent dans et entre les cellules du phloème à savoir la gaine vasculaire, les cellules compagnes et le parenchyme vasculaire. Ensuite, les complexes de transport sont chargés dans la sève pour permettre le transport à longue distance (2), avant d'être finalement libérés dans les tissus systémiques pour commencer un nouveau site d'infection (3). L'ensemble du processus nécessite un passage efficace entre les différents types de cellule pour conduire à une infection systémique de la plante (D'après Hipper et al, 2013).

Réponse des plantes à des stress abiotiques et/ou biotiques

1) Stress biotique : virus et paramètres épidémiologiques

Un virus est un parasite intracellulaire obligatoire. Il est composé d'une ou plusieurs molécules d'acide nucléique (d'ADN ou d'ARN, simple ou double brin), entourées d'une coque de protéines appelée capside. Il ne possède en général aucune enzyme pouvant produire de l'énergie. Il a donc besoin de manipuler efficacement son hôte à différents niveaux d'organisation pour réussir l'infection. Au niveau cellulaire, le virus doit détourner la machinerie de traduction pour la production de protéines virales. Le virus utilise également les organes de l'hôte pour accomplir son cycle viral. Ainsi, pour une infection efficace, le virus doit diffuser rapidement dans l'hôte de cellule à cellule et sur de longues distances entre des organes ou des tissus éloignés (Leisner and Howell, 1993; Carrington et al., 1996; Hipper et al., 2013). Chez les végétaux, la propagation intra-hôte ou systémique, est favorisée par le transport via le système vasculaire (phloème) et plus particulièrement les plasmodesmes (Figure 1).

Pour caractériser la biologie d'un virus, trois paramètres peuvent être utilisés : la virulence (ou agressivité), la transmission et l'accumulation virale.

1- **La virulence** d'une souche virale dépend de la susceptibilité/résistance du cultivar ou de l'écotype de plante étudiée. Elle peut être estimée à l'aide d'analyse de croissance de la plante (surface foliaire, masse sèche, production de graines) et de la gravité/quantité de symptômes. L'infection virale peut induire uniquement une réduction de croissance et de productivité ou conduire à la mort de la plante dans les cas extrêmes (Alizon et al., 2009; Froissart et al., 2010). Comme présenté ci-dessus, il existe de nombreux cas de plantes infectées et cependant asymptomatiques traduisant la mise en place d'une résistance vis à vis du pathogène viral. Cette mise en place de la résistance s'effectue via des mécanismes de défense classiques de la plante (activation hormonale, espèces réactives de l'oxygène (ROS), du calcium,...) (Fujita et al., 2006). Il existe également un système de défense antiviral spécifique et extrêmement efficace (ARN interférence ; RNAi) capable de cibler et d'inhiber l'expression d'une espèce virale donnée (Qu, 2010).

2- Pour assurer leur **transmission**, étape clé du cycle du virus qui permet sa persistance dans l'écosystème, la grande majorité des phytovirus utilisent des vecteurs spécifiques (nématodes, champignons du sol, insectes...) (Hébrard et al., 1999). Mais, la majorité des virus de plantes sont transmis par les insectes. Les pucerons (Classe *Insecta*, ordre des *Hemiptera*) à eux-seuls transmettant 50% des virus de plantes transmis par cette classe (Bragard et al., 2013). Il existe trois modes de transmission défini sur des critères de

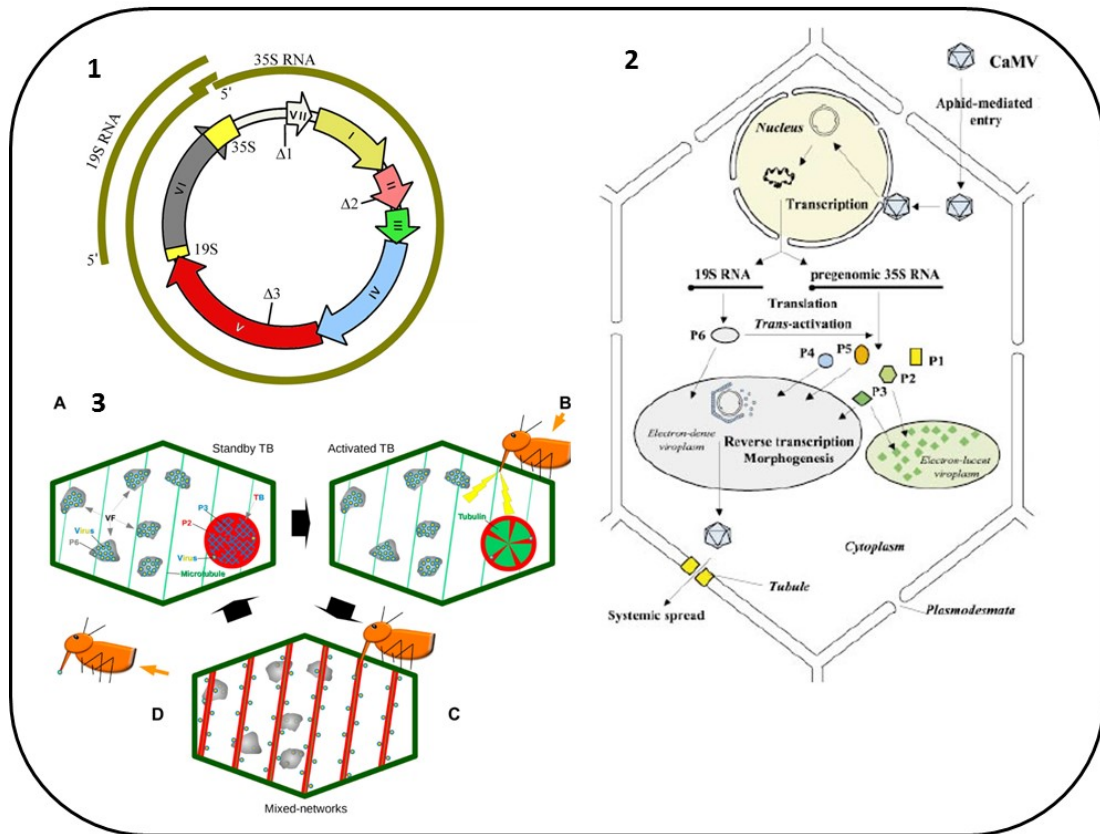


Figure 2 : Information concernant le génome du CaMV, sa multiplication et sa transmission. Le virus de la mosaïque du chou-fleur (CaMV pour *Cauliflower Mosaic Virus*) appartient à la famille des *Caulimoviridae*. Le CaMV infecte principalement les plantes appartenant à la famille des *Brassicaceae* telles que *Brassica rapa* ou *Arabidopsis thaliana* et quelques Solanacées. Ce virus provoque des maladies qui se manifestent par des symptômes du type « mosaïque ». 1) *Génome de CaMV*. Les sept grandes ORFs sont représentées par un code couleur et des flèches. Lors de son entrée dans la cellule hôte, l'ARN polymérase II cellulaire synthétise deux transcrits majeurs (35S et 19S). L'ARNm 19S est traduit en protéine P6, et est indispensable dans la traduction du brin d'ARNm 35S (Haas et al., 2002) qui va produire toutes les autres protéines virales. Chaque protéine a un rôle important pour le virus, P1 (40 kDa) est la protéine de mouvement intervenant dans le déplacement de cellule à cellule et interagit avec les plasmodesmes (Schoelz et al., 2015), P2 (18 kDa) interagit avec les microtubules (Blanc et al., 1996), et joue un rôle dans la transmission du virus par les pucerons, elle sert de lien entre le complexe viral transmissible (i.e. associée à la protéine P3 (Martinière et al., 2009) et les stylets du puceron (Drucker et al., 2002; Uzest et al., 2007) ; P3 (15 kDa) participe au complexe transmissible avec P2. P4 est un précurseur des protéines de capsid, la protéine P5 est une protéine multifonctionnelle de 78 kDa indispensable à la réplication de virus et la protéine P6 est multifonctionnelle et la plus abondante dans les cellules infectées 2) *Cycle de multiplication du CaMV*. Les principales étapes du cycle viral sont: (i) l'entrée du virus dans la cellule hôte médiée par le puceron, (ii) transport des particules virales vers le noyau, (iii) l'importation de l'ADN viral dans le noyau et formation d'un minichromosome, (v) la transcription de l'ADN viral par l'ARN polymérase II et traduction de l'ARN 19S et de l'ARN 35S (vii) la réplication du génome et de la morphogénèse des particules virales dans les usines virales, et (viii) le mouvement de cellule à cellule des particules virales par le biais des tubules. (Haas et al, 2002). 3) *Modèle d'acquisition du CaMV*. (A) Dans une cellule infectée dans l'état "attente", il y a de nombreuses usines virales (VF) contenant la plupart des particules virales (cercles jaunes bleu), dans une matrice de protéines P6 (gris). Chaque cellule infectée possède un corps à transmission unique (TB), composé d'une matrice contenant la totalité des P2 (rouge), co-agrégé avec P3 (bleu) et des particules virales. (B) La piqûre du puceron vecteur dans une cellule infectée va provoquer une contrainte mécanique (mouvement des stylets) et / ou une contrainte chimique (par exemple, provoquée par des composants de la salive). Ce stress, symbolisé par les éclairs jaunes, est immédiatement perçu par la plante et peut induire des réponses ultérieures de la défense de celle-ci. Le signal initial de reconnaissance du puceron est caractérisé par un afflux de tubuline (vert) dans le TB. (C) Dans une deuxième étape, le TB se désintègre rapidement, et toute la P2 ainsi que des particules virales vont se relocaliser sur les microtubules corticaux. Les complexes P2-virus transmissibles sont ainsi répartis de façon homogène sur toute la périphérie de la cellule, ce qui augmente considérablement les chances de succès de liaison de P2 et de virus aux stylets de l'insecte vecteur et donc augmente les chances de transmission du CaMV. (D) Après le départ du puceron vecteur (chargé de P2 et virus), un nouveau TB se reforme et la cellule infectée revient dans l'état « initial d'attente » (Martinière et al, 2013).

localisation du virus dans son insecte vecteur et le temps de latence nécessaire à l'infection d'une nouvelle plante par un insecte virulifère : la transmission non circulante qui concerne la plupart des phytovirus (comme le *Cauliflower Mosaic Virus* (CaMV), utilisé dans notre étude, Figure 2), la transmission circulante propagatrice et la transmission circulante non propagatrice (Blanc et al., 2014) (Figure 3). Dans le cas de la transmission non-circulante, les virus acquis lors de piqûres dans le tissu végétal, s'accrochent aux stylets (les pièces buccales) du vecteur (insectes piqueurs-suceurs), d'où ils sont ultérieurement libérés dans un nouvel hôte (Uzest et al., 2007; Brault et al., 2010). Les étapes d'acquisition, de rétention et d'inoculation du virus prennent de quelques secondes à quelques minutes et ne nécessitent pas un passage à l'intérieur du corps du vecteur. Considérée d'abord comme « mécanique », il est maintenant bien établi que la transmission non circulante implique en réalité des interactions moléculaires virus-vecteur hautement spécifiques (Uzest et al., 2007; Blanc et al., 2014). En ce qui concerne les phytovirus transmis selon le mode circulant les périodes d'acquisition, de latence et d'inoculation sont beaucoup plus longues (plusieurs jours). Dans ce cas, le virus, après ingestion par son vecteur, opère un passage dans le système digestif, et la lymphe avant de rejoindre les glandes salivaires secondaires d'où il sera finalement excrété avec la salive dans une nouvelle plante. En fonction de la capacité du virus à se répliquer dans les cellules de l'insecte vecteur, les virus circulants peuvent être classés comme propagatifs (ou multipliant) ou non propagatifs.

3- **La charge virale** correspond au nombre de copies du génome viral présent dans l'hôte. Elle peut être estimée par des techniques permettant la détection d'acides nucléiques viraux (par exemple, la qPCR (Froissart et al., 2010)). Certaines études suggèrent une corrélation positive entre l'accumulation virale et/ou la virulence et le taux de transmission (Banik and Zitter, 1990; Wintermantel et al., 2008; Doumayrou et al., 2013). L'hypothèse proposée pour expliquer une corrélation positive entre transmission et virulence suppose que les deux traits sont positivement corrélés à l'accumulation du parasite intra-hôte et à son effet délétère sur le fonctionnement de l'hôte (Frank, 1996; Alizon et al., 2009). Cependant, ces résultats restent controversés et semblent dépendre du pathosystème étudié (Froissart et al., 2010). Dans l'ensemble, les données disponibles ne nous permettent pas de confirmer ou d'infirmer l'existence d'une corrélation systématique entre ces trois paramètres épidémiologiques (Alizon et al., 2009; Froissart et al., 2010).

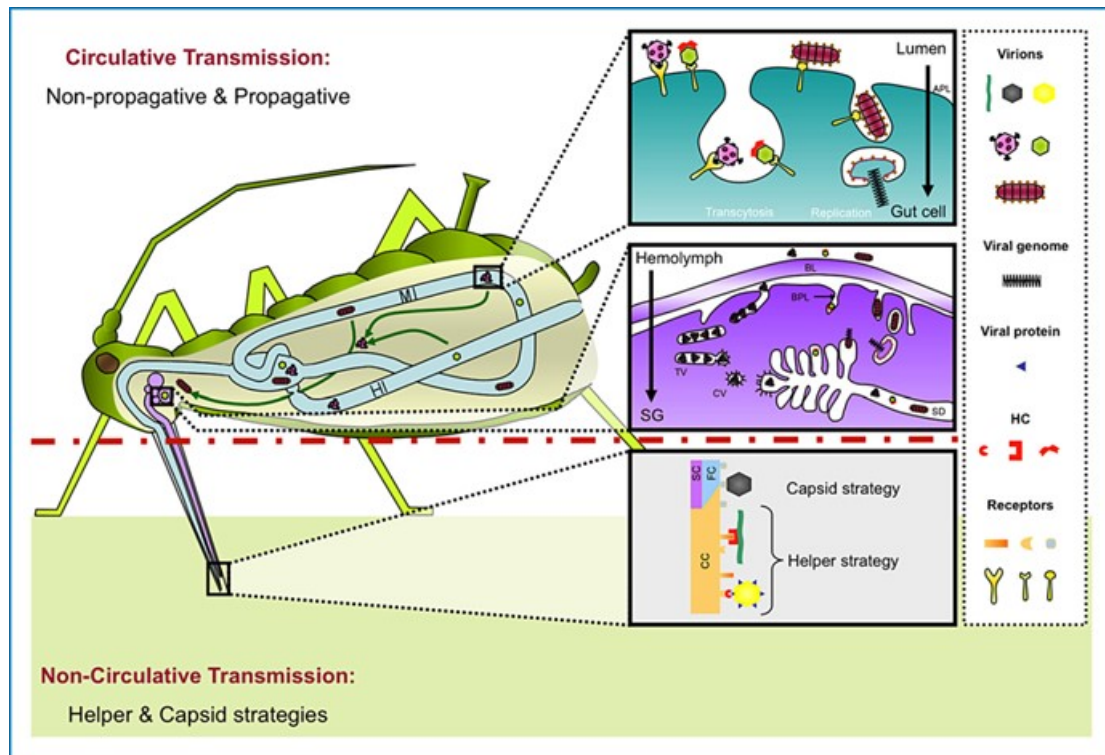


Figure 3 : Modes de transmission des phytovirus. Le schéma illustre deux modes de transmission (circulante et non circulante) utilisés par les phytovirus transmis par les pucerons. Dans le cas de la transmission circulante, l'internalisation est médiée par l'attachement des virions sur des récepteurs localisés au niveau des membranes apicales (APL) de l'intestin moyen (MI) ou postérieur (HI) du puceron. L'internalisation des Rhabdovirus (particules rouges) dans des vésicules est suivie par une fusion des membranes, de relargage du génome viral dans le cytoplasme et de réplication dans les cellules de l'intestin (propagatif). Dans le cas des Luteovirus (particules roses) ou des nanovirus (particules vertes), l'internalisation des virus est suivi d'une transcytose d'un pôle de la cellule à l'autre sans multiplication (non-propagatif). Le relargage des virions dans l'hémolymphe est suivi par une internalisation dans les glandes salivaires (SG) qui, pour les Nanovirus semble être relié à un HC (helper component). Les virions doivent d'abord franchir la lame basale (BL) entourant les glandes, puis le plasmalemme basal (BPL), avant d'être finalement relargué dans le conduit salivaire (SD). Le transport des Luteovirus dans les glandes salivaires est médiée par des vésicules tubulaires (TV) et des vésicules enrichi en clathrine (CV) et des vésicules. Dans la transmission non circulante, les particules virales se fixent directement sur les récepteurs des stylets de puceron selon la stratégie de capsid (cas des Cucumovirus représenté par une particule noire sur le schéma) ou par l'intermédiaire d'un composé viral supplémentaire dénommé « helper component (HC) » (cas des Potyvirus (particule verte) ou des Caulimovirus (particule jaune)). (D'après Brault et al, 2010).

2) Stress hydrique et réponses de la plante

A court terme, une diminution de l'approvisionnement en eau provoque la fermeture des stomates pour maintenir un statut hydrique favorable dans la plante. Ce mécanisme favorise un déséquilibre entre l'activité photochimique du PSII et les électrons requis pour la fixation carbonée (Hsiao, 1973) qui peut entraîner des dommages importants au niveau des réactions centrales du PSII (Krause, 1988). La fermeture des stomates induit une réduction des flux de transpiration et entraîne une augmentation de la température des feuilles (Jones, 1999). De plus, il a été montré que sous déficit hydrique, la concentration en carbone dans les organes de plante augmente, ce qui suggère que le carbone n'est pas un facteur limitant majeur dans ces conditions (Muller et al., 2011). Cependant, l'hétérogénéité photosynthétique des plantes est un élément important pour leur survie dans le cadre d'un stress hydrique sévère (Bresson et al., 2015). Le stress hydrique impacte également la croissance des organes et plus particulièrement des racines, ce qui tend à augmenter la sensibilité des plantes au déficit hydrique (Kuroyanagi and Paulsen, 1988). La diminution de l'expansion surfacique des feuilles réduit quant à elle la surface d'échange et donc les pertes en eau, améliorant ainsi l'évitement de la déshydratation. La contrainte hydrique du sol entraîne une cascade de signalisations importantes. L'acide abscissique (ABA) est étroitement lié à des signaux hydrauliques, car il est généré en réponse à des diminutions locales de potentiel hydrique (Ψ_w) et il assure la médiation des réponses physiologiques adaptatives, à la fois locales et systémiques (Wilkinson and Davies, 2002). Le calcium est également impliqué dans les réponses adaptatives très rapides face à la contrainte hydrique (Kiegle et al., 2000).

La réponse transitoire du calcium peut aussi activer la NADPH oxydase RBOH C générant ainsi un signal lié aux dérivés actifs de l'oxygène (ROS) (Monshausen et al., 2009). De ce fait, les ROS font aussi partie de la réponse à un déficit hydrique sévère (Joshi-Saha et al., 2011). Ces trois composants semblent importants pour la mise en place des stratégies d'acclimatation à la contrainte hydrique. Cependant, l'intensité et la durée du stress sont des facteurs de variation des réponses observées non négligeables. Avec l'augmentation de la gravité ou de la durée de la contrainte hydrique, la privation de carbone et la défaillance hydraulique conduisent à une sénescence partielle voire totale et une abscission des feuilles plus précoce (McDowell, 2011). Même si la sénescence des feuilles peut être létale pour la plante, il semble que sacrifier quelques feuilles pourrait être une bonne stratégie pour assurer la survie sous stress hydrique sévère (Munné-Bosch and Alegre, 2004). La reprise de croissance suite à un stress hydrique sévère est alors associée au rétablissement (partiel) des

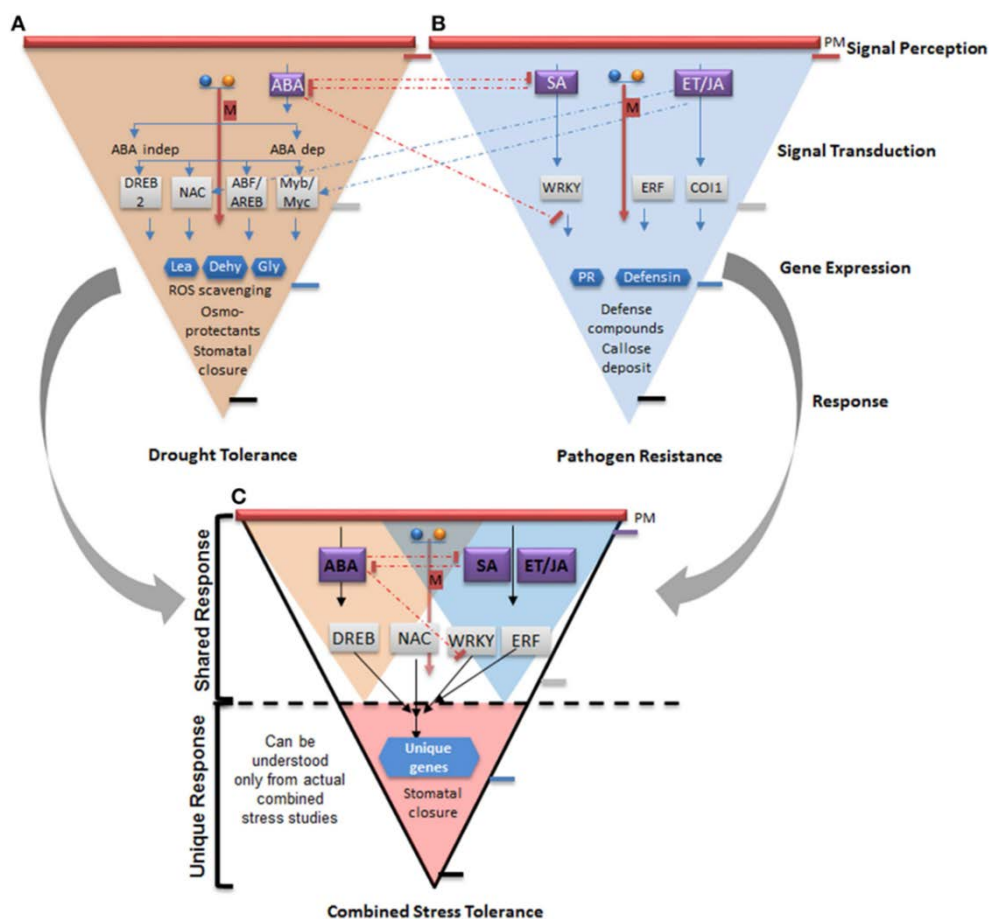


Figure 4 : Modèle représentant les interactions existantes entre un stress hydrique et un stress par un pathogène. Les deux triangles inversés dans le panneau supérieur représentent la voie de signalisation induit par un stress hydrique (A) ou un stress biotique (B) constitué de la perception du signal, la transduction du signal, l'expression des gènes et les étapes de génération de réponse avec les produits de gènes représentatifs. La forme inversée du triangle représente la réponse générale (grand côté supérieur) allant du stade de la perception du stress et de la transduction du signal à une réponse spécifique (pointe du triangle) qui contribue à la tolérance ou à la résistance. La réponse des plantes à la sécheresse et le stress par un agent pathogène combinée se composent de deux réponses communes et une réponse unique tel que représenté par le triangle (C). La réponse globale des plantes au stress combinés est régie par les acteurs clés impliquant des ROS, Ca^{2+} , MAPK, les différents facteurs de transcription ainsi que certains gènes uniques régissant les réponses spécifiques à un stress. Le petit triangle de couleur jaune représente les réponses partagées entre la sécheresse et le stress combiné alors que le triangle bleu représente les réponses partagées entre les agents pathogènes et le stress combiné. La zone de chevauchement entre les deux petits triangles représente les réponses partagées par le stress de la sécheresse et de l'agent pathogène. Le triangle de couleur rouge à la pointe du triangle représente la réponse unique sous la contrainte combinée. Les sphères de couleurs bleues et jaunes représentent le calcium et les molécules ROS. La couleur flèche rouge représente la voie MAPK. Les flèches en pointillées de couleur rouge représentent la suppression et les flèches bleu en pointillées représentent l'activation des gènes sensibles au stress respectif. PM, membrane plasmique; ABA, acide abscissique; SA, acide salicylique; JA, acide jasmonique; ET, éthylène; M, voie MAPK; ABA dep, ABA voie dépendante; ABA indep, ABA voie indépendante; DREB, contraignant déshydratation élément sensible; NAC, NAM-ATAF et CUC facteur 6 de la transcription; ABF, facteur de liaison ABA; AREB, ABA liaison élément sensible; Myb, myéloblastose; Myc, myélocytomatose; ERF, éthylène facteur sensible; WRKY représente les quatre premiers acides aminés (tryptophane [W], l'arginine [R], lysine [K], et la tyrosine [Y] de la WRKYGQK heptapeptide; COI1, coronatine insensible 1; LEA, à la fin de l'embryogenèse, Gly, glyoxylase; dehyd, déhydrine; PR, la pathogénèse liée; ROS, les espèces réactives de l'oxygène (Prachi Pandey et al, 2015)

capacités photosynthétiques des feuilles sénescentes et/ou au développement de nouvelles feuilles ayant des performances photosynthétiques optimales (Hensel et al., 1993).

3) Interactions entre épidémiologie virale chez les plantes et conditions édapho-climatiques

L'interaction entre les facteurs biotiques et abiotiques chez les plantes a souvent été analysée par extrapolation de l'information acquise à partir des réponses à des stress isolés. Récemment, des travaux ont montré que l'occurrence simultanée de stress biotiques et abiotiques peut provoquer un effet négatif (sensibilité) ou positif (tolérance) sur la performance des plantes en fonction de la contrainte et de l'agent pathogène étudié (Ramegowda and Senthil-Kumar, 2015).

La variation de la sensibilité des plantes peut dépendre de plusieurs facteurs en lien avec le virus, la plante ou les facteurs environnementaux (Leisner and Howell, 1993; Soosaar et al., 2005; Mandadi and Scholthof, 2013). Par conséquent, tout facteur environnemental capable de changer le développement, la phénologie et la physiologie de la plante hôte sera également capable d'interagir avec la propagation systémique d'un virus dans la plante et avoir un impact sur la performance de la plante. A l'inverse, les réponses immunitaires mises en place par la plante lors d'une infection virale peuvent interagir avec d'autres réponses que la plante met en œuvre pour répondre aux changements environnementaux. Par exemple, des phytohormones telles que l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA), l'éthylène (ET), ou l'acide abscissique (ABA) sont des molécules endogènes importantes pour permettre aux plantes de répondre aux stress biotiques et abiotiques via des actions synergiques et antagonistes (Figure 4; Bostock, 2005; Mauch-Mani and Mauch, 2005).

Il a également été montré que les virus phytopathogènes réagissent à différents stress abiotiques imposés à la plante hôte, notamment en terme d'accumulation virale (Suntio and Mäkinen, 2012; Alazem and Lin, 2015). Par exemple, l'accumulation virale est augmentée en condition de stress salin chez le potato virus A (Suntio and Mäkinen, 2012).

A ce jour, l'effet des contraintes environnementales sur la transmission des phytovirus est peu décrit. La quasi-totalité des études sur ce sujet s'attachent à étudier, soit l'impact des changements climatiques sur l'écologie et la biologie du vecteur (temps de développement, longévité, fécondité et migration) (Xie et al., 1994; Nancarrow et al., 2014), soit les effets sur l'accumulation virale et l'impact des symptômes *in planta* (Cronin et al., 2010; Trębicki et al., 2015). Mais jusqu'à très récemment aucune donnée sur l'effet direct d'un stress abiotique sur la transmission n'était disponible. Dader et al. 2016 ont montré une réduction du taux de transmission d'un virus non-circulant, le *Cucumber mosaic virus*, lorsque les plantes étaient

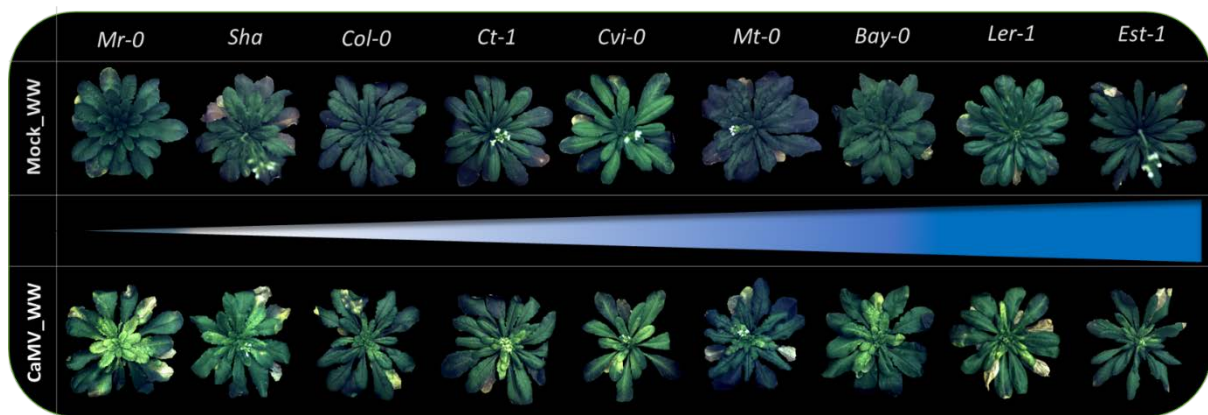


Figure 5 : Photographie des accessions étudiées dans l'étude en condition témoin (bien irrigué, faussement inoculé ; mock_WW) ou en condition inoculée, bien irriguée (CaMV_WW).

Les accessions sont ordonnées suivant leur tolérance au stress hydrique sévère, du moins tolérant (*Mr-0* ; bleu clair) au plus tolérant (*Est-1* ; bleu foncé). Toutes les photos ont été prises 24 jours après l'inoculation, un jour avant le test de transmission.

exposées à des taux élevés de CO₂ ambiant. Récemment dans le laboratoire BGPI, des expériences de transmission ont été réalisées sur la plante *Brassica rapa* infectée par le CaMV et soumises à un stress hydrique sévère. Les résultats obtenus montrent que, dans ces conditions, la transmission est augmentée de manière significative (van Munster et al., soumis).

L'objectif général de notre étude est d'améliorer la compréhension des interactions entre les plantes et les virus en conditions de déficit hydrique édaphique. L'état actuel des connaissances montre que des combinaisons de stress hydrique et d'infections virales peuvent être préjudiciables ou bénéfiques pour les plantes, avec des conséquences peu décrites pour l'épidémiologie des virus. Plus précisément, il s'agit d'évaluer les paramètres épidémiologiques tels que la charge virale, les effets délétères ou bénéfiques du virus CaMV sur la performance des plantes (évitement, tolérance/virulence) et l'efficacité de transmission, et pour neuf accessions naturelles d'*A. thaliana* infectées en réponse à un déficit hydrique sévère. Ces accessions ont été sélectionnées pour leur tolérance contrastée au déficit hydrique (Vile et al. 2012 ; Rymaszewski et al. en préparation). Cette analyse a pour but de répondre à deux questions :

1) L'infection virale améliore-t-elle la tolérance des plantes à un déficit hydrique sévère ?

2) Quelles sont les conséquences d'un déficit hydrique sévère sur l'épidémiologie virale ?

Résultats

1) Réussite d'inoculation sur les neufs géotypes d'*Arabidopsis thaliana*

La souche CaMV B-JI a été inoculée mécaniquement chez neuf accessions d'*Arabidopsis thaliana*, qui ont des morphologies et phénologies contrastées dans les conditions expérimentées. Par exemple, la date de montaison varie de 38 jours après germination pour les accessions les plus précoces (Sha et Cvi-0) à 57 jours après germination pour l'accession la plus tardive (Mr-0). Toutes les accessions ont développé des symptômes caractéristiques du CaMV (décoloration des nervures) avec systémie, c'est-à-dire une observation des symptômes sur l'intégralité de la rosette (Figure 5). De plus, l'utilisation de l'inoculum enrichi en particules virales (voir Matériel et Méthodes) a permis d'obtenir des taux d'infection variant entre 98-100 % de réussite quels que soient le géotype et la condition (Figure S1 en annexe).

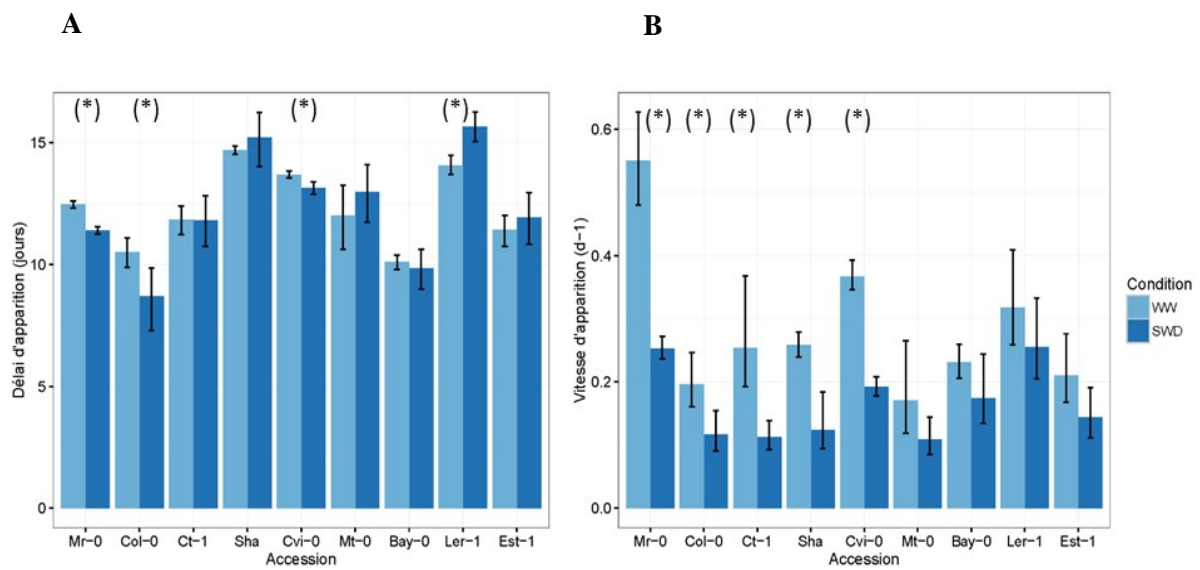


Figure 6 : Paramètres de la dynamique d'apparition des symptômes chez neuf accessions d'*A. thaliana*.

A) Délai d'apparition des symptômes après inoculation en condition bien irriguée (WW ; bleu clair) et en condition de stress hydrique sévère (SWD ; bleu foncé). B) Vitesse de progression des symptômes en condition bien irriguée (WW ; bleu clair) et en condition de stress hydrique sévère (SWD ; bleu foncé).

Les paramètres ont été estimés par ajustement logistique ($n = 20$ individus par accession et par traitement). Les barres d'erreurs représentent les intervalles de confiance à 95%. Les accessions sont ordonnées suivant leur tolérance au déficit hydrique sévère.

2) Impact du géotype et du stress hydrique sur la systémie

La dynamique d'apparition de la systémie a été analysée pour chaque accession en condition de sol maintenu à un niveau non limitant pour la croissance ($1.6 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ sol sec}$) et lors d'un arrêt de l'irrigation (6 jours après l'inoculation) menant à une forte diminution de la teneur en eau du sol ($0.52 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ sol sec}$). Les ajustements d'une courbe logistique ont permis de calculer trois paramètres : le délai et la vitesse d'apparition des symptômes, et la proportion maximale de plantes infectées (asymptote). La dynamique d'apparition de la systémie a été ainsi ajustée pour chaque accession et pour chaque condition (voir Figure S3). En condition bien irriguée, le délai moyen ($\pm \text{IC}_{95\%}$) d'apparition de la systémie est de $12.3 (\pm 1.9)$ jours et varie significativement entre les accessions (Bay-0 : 10.1 ± 0.3 jours ; Sha : 14.7 ± 0.2 jours) (Figure 6A). Dans nos conditions d'application, le stress hydrique sévère (SWD) n'a pas fortement impacté le délai moyen nécessaire pour observer la systémie au sein d'une population (< 3 jours). Dans certains cas, ce stress a réduit le délai d'apparition de la systémie chez Mr-0, Col-0 et Cvi-0, alors qu'il l'a augmenté pour l'accession Ler-1. En condition bien irriguée, la vitesse d'apparition de la systémie varie significativement entre les accessions de 0.55 j^{-1} ($\text{IC}_{95\%} = 0.48\text{-}0.63$) pour l'accession la plus rapide (Mr-0) à 0.17 j^{-1} ($\text{IC}_{95\%} = 0.11\text{-}0.26$) pour l'accession la plus lente (Mt-0) (Figure 6B). De plus, la vitesse d'apparition de la systémie est diminuée par le SWD chez toutes les accessions (significativement chez Mr-0, Col-0, Ct-1, Sha et Cvi-0, ($P < 0.05$)). En résumé, dans nos conditions d'application, le stress hydrique sévère semble affecter la vitesse d'apparition des symptômes mais ne semble pas fortement impacter le temps moyen nécessaire pour avoir une systémie totale au sein d'une population. L'identité génétique de l'accession semble aussi influencer ces deux paramètres.

3) Effet du CaMV et d'un stress hydrique sévère sur la croissance des plantes

a) Matière sèche des parties aériennes

Vingt-cinq jours après inoculation, la masse sèche de la rosette moyenne (\pm écart-type) variait de $192 \pm 16 \text{ mg}$ (Ler-1) à $463 \pm 43 \text{ mg}$ (Mr-0) en condition témoin (bien irrigué (WW) et « Mock » inoculé) (Figure 7A). De manière générale, le stress hydrique sévère appliqué (arrêt de l'irrigation 19 jours après inoculation (SWD) et « Mock » inoculé) a significativement réduit la production de biomasse aérienne par rapport aux conditions témoins (Figure 7A). Cette réduction est significative ($P < 0.05$) dans le cas des accessions Mr-0, Col-0, Ct-1 et Sha, identifiées dans des études précédentes pour leur susceptibilité au stress hydrique (Vile et al., 2012), alors qu'elle est marginalement (Mt-0, Cvi-0 et Bay-0) ou non significative (Ler-1 et Est-1) chez les autres accessions connues pour leur tolérance au stress hydrique (Vile et al., 2012).

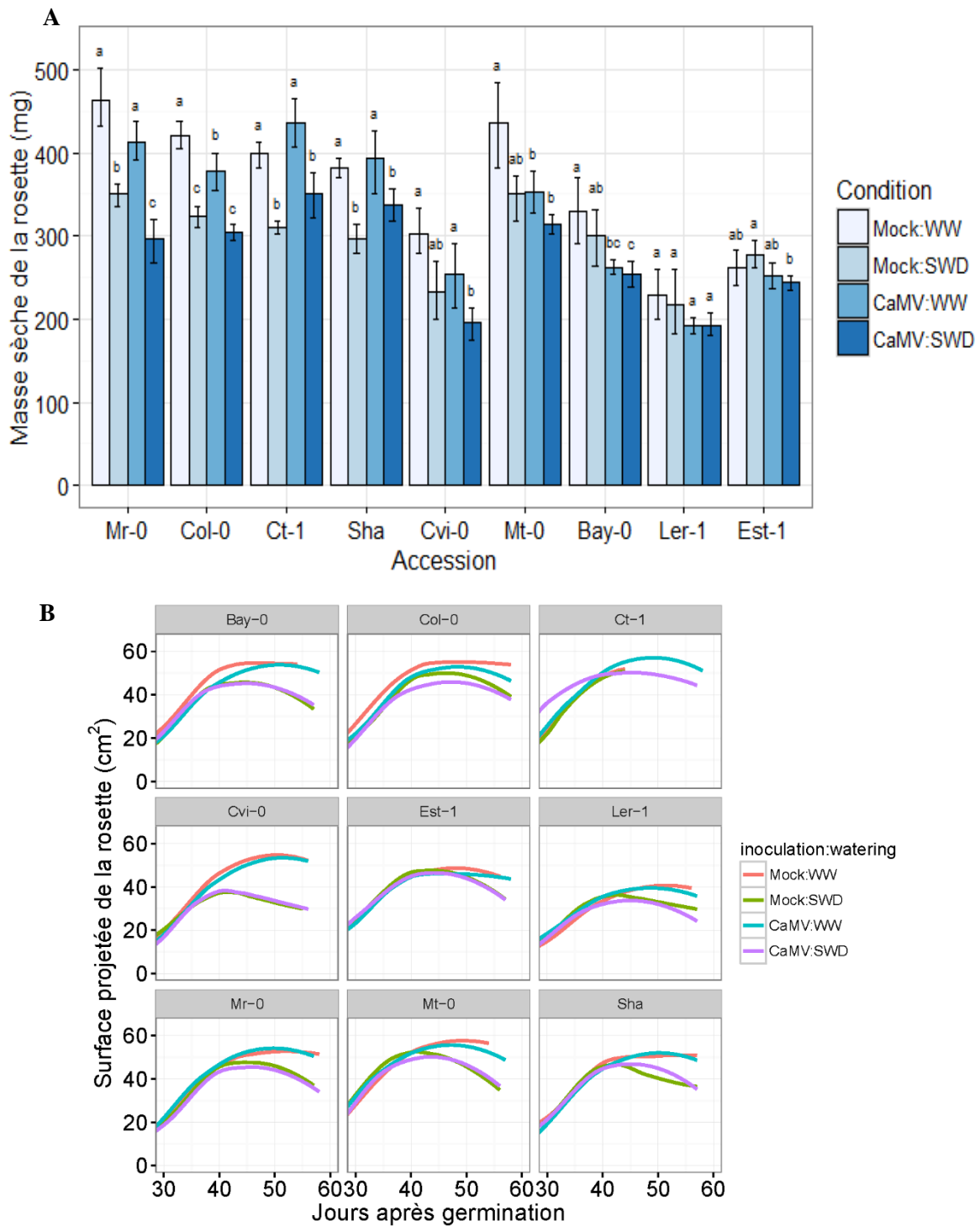


Figure 7 : Impact du CaMV et du déficit hydrique sévère (SWD) sur la croissance de neuf accessions d'*A. thaliana*. A) Impact de l'infection et du déficit hydrique sur la masse sèche des rosettes de chaque accession et condition. Les lettres représentent la significativité des résultats au sein d'un génotype à une $P < 0.05$ et a été testée par des tests non paramétriques de Kruskal-Wallis. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95% mais n'ont pas servi à interpréter les résultats. Les accessions sont ordonnées suivant leur tolérance au SWD. Chaque pesée a été réalisée le jour de la transmission soit 24 jours après l'inoculation et 19 jours après le stress hydrique. Pour chaque génotype, $n = 4$ individus ont été pesés pour les conditions Mock_SWD et Mock_WW et $n = 10$ individus pour les conditions CaMV_SWD et CaMV_WW. B) Evolution moyenne de la surface foliaire projetée (cm²) de chaque génotype et condition en fonction du temps.

De la même manière, l'infection par le CaMV a aussi été néfaste pour la production de biomasse dans la majorité des accessions sauf pour Ct-1, Sha et Est-1. En particulier, la réduction de biomasse des plantes infectées par le CaMV est significative ($P < 0.05$) chez les génotypes Bay-0, Col-0 et Mt-0 (Figure 7A).

La combinaison du stress hydrique et de l'infection virale tend à être plus délétère que chacun des deux stress isolés mais on observe des réponses différentes selon les accessions. Par exemple, la surimposition d'un stress hydrique et de l'infection par le CaMV n'a pas eu d'effet significatif sur la production de biomasse de Est-1 et Ler-1, alors qu'elle a eu un effet très significatif ($P < 0.01$) chez d'autres accessions comme Mr-0, Col-0, Cvi-0, Mt-0 et Bay-0 (réduction de 13 à 40% , Figure 7A). De plus, pour la plupart des accessions, la réduction de biomasse liée à la combinaison de stress n'est pas significativement différente de l'effet du déficit hydrique simple sauf pour Mr-0 (15% de réduction, $P < 0.01$). Dans certains cas, la combinaison des deux stress est moins forte que l'effet du stress hydrique sévère seul (Sha et Ct-1 ; Figure 7A) pour lesquelles l'infection par le CaMV tendrait donc à augmenter la tolérance au stress hydrique. Dans certains cas, aucun effet significatif du double stress par rapport au déficit hydrique seul sur la biomasse des rosettes n'a été observé, alors que dans d'autres cas, l'infection tend à améliorer la tolérance au déficit hydrique.

b) Croissance des feuilles de la rosette des plantes

La surface projetée de la rosette (cm^2) a été déterminée par analyse d'image sur plusieurs dates pré- et post-stress. La surface de la rosette varie de 40 cm^2 (Ler-1) à 58 cm^2 (Mt-0) en condition témoin (bien irrigué (WW) et « Mock » inoculé) (Figure 7B). Globalement, chez toutes les accessions, l'infection par le CaMV a moins impacté la surface projetée de la rosette que le déficit hydrique seul. La combinaison des stress hydrique et viral, tend à être plus néfaste que le stress par l'infection du CaMV (Figure 7B). Il semblerait que l'effet de cette combinaison de stress sur la surface de la rosette soit quasiment comparable au déficit hydrique seul. De manière intéressante, il semblerait même que pour certaines accessions, l'effet double stress soit moins néfaste que l'effet du stress hydrique simple (Sha et Ct-1 ; Figure 7B). Ces résultats sont en adéquation avec les observations réalisées sur les masses sèches de rosette (Figure 7A).

4) Effet du génotype des plantes tests sur la transmission du CaMV

Des expériences de transmission préalables à l'expérimentation principale visant à étudier l'effet du stress hydrique sur la transmission du CaMV ont été réalisées. Ces expériences préliminaires visaient à comparer le taux de transmission des divers génotypes (plante source) selon que les plantes test appartiennent soit à l'accession Col-0 (classiquement utilisée car

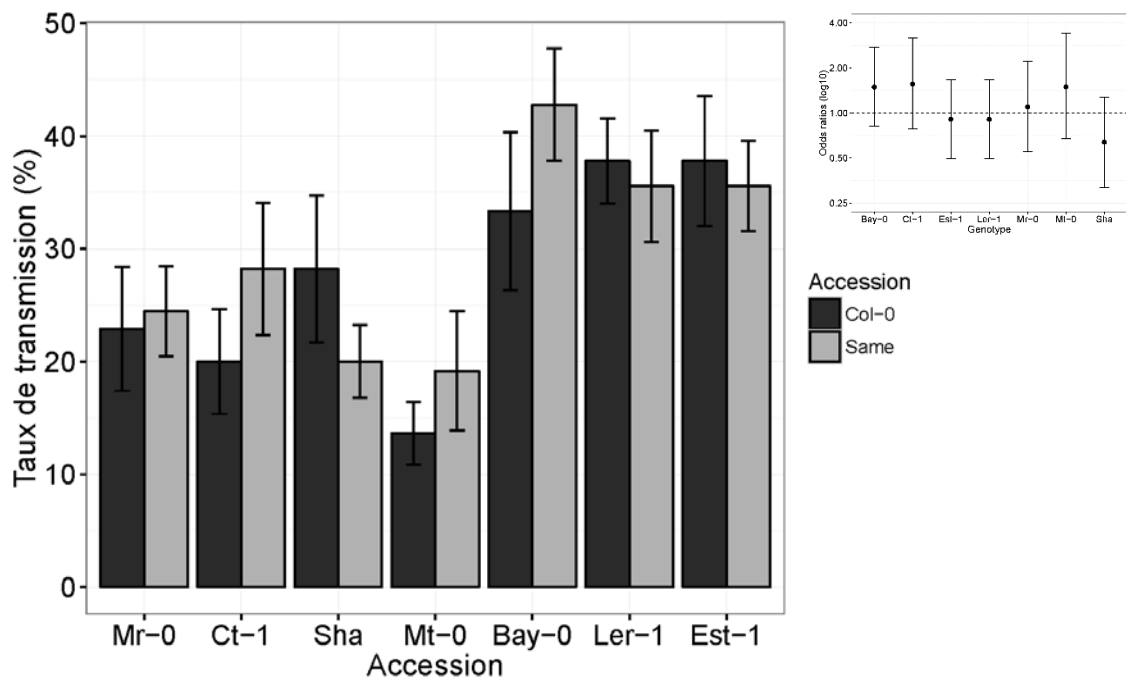


Figure 8 : Effet du génotype des plantes tests sur la transmission du CaMV. Pourcentage de réussite de transmission pour chaque accession suivant le génotype des plantes tests (soit les plantes tests appartiennent à la même accession que la plante source « Same », soit elles appartiennent à l'accession Col-0). Les rapports de côte (\pm IC_{95%} ; illustration en haut à droite du graphique) montrent que l'identité génétique n'a eu aucun effet sur le taux de transmission. Les accessions sont ordonnées par tolérance au déficit hydrique.

répondant bien à l'infection par le CaMV), soit au génotype de la plante source utilisée. Un test de transmission pour chaque génotype hormis Cvi-0 a été réalisé en condition bien irriguée de la manière suivante : 10 plantes par génotype infectées par le CaMV ont servi de plantes sources pour 20 pucerons. Après la phase d'acquisition de 2 min ceux-ci ont été répartis individuellement sur 10 plantes Col-0 et 10 plantes du génotype donné. Les résultats de ces tests montrent que le taux de transmission ne varie pas significativement selon l'identité de l'accession des plantes sources/test et que l'on peut donc utiliser uniquement l'accession Col-0 comme plantes test dans les tests de transmission ultérieurs (Figure 8).

5) Effet du stress hydrique sur l'épidémiologie du CaMV

a) Effet sur la transmission

Le taux de transmission du CaMV a été estimé pour toutes les accessions cultivées en condition bien irriguée et soumises au SWD. Quelles que soient les conditions et les génotypes, le pourcentage de réussite de transmission varie entre 30 et 50% ce qui représente des valeurs proches de celles obtenues en routine au laboratoire (M. van Munster, communication personnelle) (Figure 9A). L'effet du SWD sur le taux de transmission est variable selon les génotypes testés (Figure 9A). Alors que la condition d'irrigation ne semble pas avoir affecté le taux de transmission chez les accessions Bay-0, Col-0 et Cvi-0, ce taux de transmission est marginalement réduit en condition SWD chez Ler-1 (réduction du taux de transmission de 55% à 38% ; $P < 0.10$) ou tend à diminuer chez Mt-0 (Figure 9A). En revanche, le taux de transmission est quasiment doublé lorsque les plantes sources ont subi le SWD par rapport aux plantes bien irriguées pour les accessions Sha et Mr-0 (augmentation de 30%, augmentation de 35 à 55% ; $P < 0.05$), et il tend également à augmenter chez Ct-1 et Est-1 (augmentation de 5%, de 40 à 50% et de 35% à 40%, respectivement) (Figure 9A). Le stress hydrique a donc modifié significativement le taux de transmission de trois génotypes et tend à le modifier pour les autres.

b) Effet sur la charge virale

Le rapport relatif de la concentration initiale du CaMV ($N_{0-CaMV} / N_{0-UBC21}$) a été estimé dans toutes les plantes sources de chaque accessions cultivées en condition bien irriguée et soumises au SWD et ayant servi aux tests de transmission. Le rapport relatif représentant la charge virale semble significativement diminuer lorsque les plantes ont subi le SWD par rapport aux plantes bien irriguées pour les accessions Mr-0, Ct-1, Sha (réduction de 10 à 25%, $P < 0.05$), et il tend également à diminuer chez Col-0, Cvi-0, Mt-0 et Ler-1 (Figure 9B). La condition d'irrigation tend à augmenter ce ratio chez les autres accessions (augmentation de

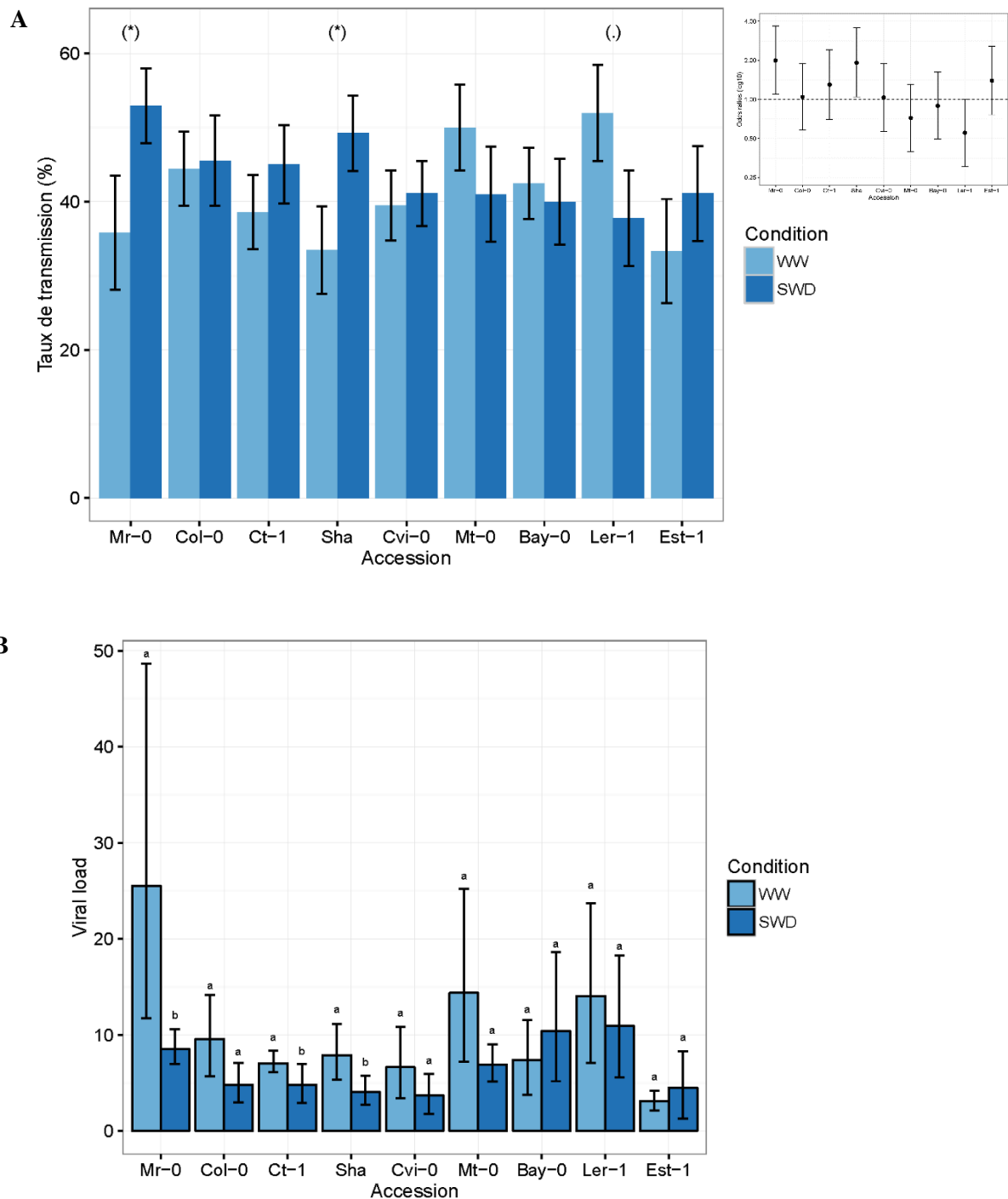


Figure 9 : Effet du déficit hydrique sévère (SWD) sur l'épidémiologie du CaMV. La transmission et l'extraction d'ADN ont été réalisées 24 jours après l'inoculation et 19 jours après le stress hydrique. A) Effet du SWD sur la transmission de chaque accession et condition. La significativité des résultats est représentée par (*) ($P < 0.05$) ou (.) ($P < 0.1$) et a été calculée à l'aide des intervalles de confiance à 95% des rapports de côte (illustration en haut à droite du graphique). Les barres d'erreurs sur les histogrammes représentent les intervalles de confiance à 95% mais ne sont pas utilisées pour tester les différences.. Pour chaque accession et condition, $n = 10$ individus sources sont passés en transmission et $n = 9$ plantes tests sont utilisées par plante source.

B) Effet du SWD sur la charge virale de chaque accession et condition. La significativité des résultats a été analysée par un test non paramétrique de Kruskal -Wallis et est représentée par des lettres différentes. Les barres d'erreurs sur les histogrammes représentent les intervalles de confiance à 95% mais ne sont pas utilisées pour tester les différences. Pour chaque accession et condition, $n = 10$ feuilles d'individus sources ont été prélevées. Les accessions sont ordonnées suivant leur tolérance au SWD

5%, Est-1 et Bay-0 ; Figure 9B). Par conséquent, le déficit hydrique affecte négativement et significativement la charge virale chez trois accessions et tend à la réduire chez la plupart des autres accessions.

c) Corrélations entre les paramètres épidémiologiques

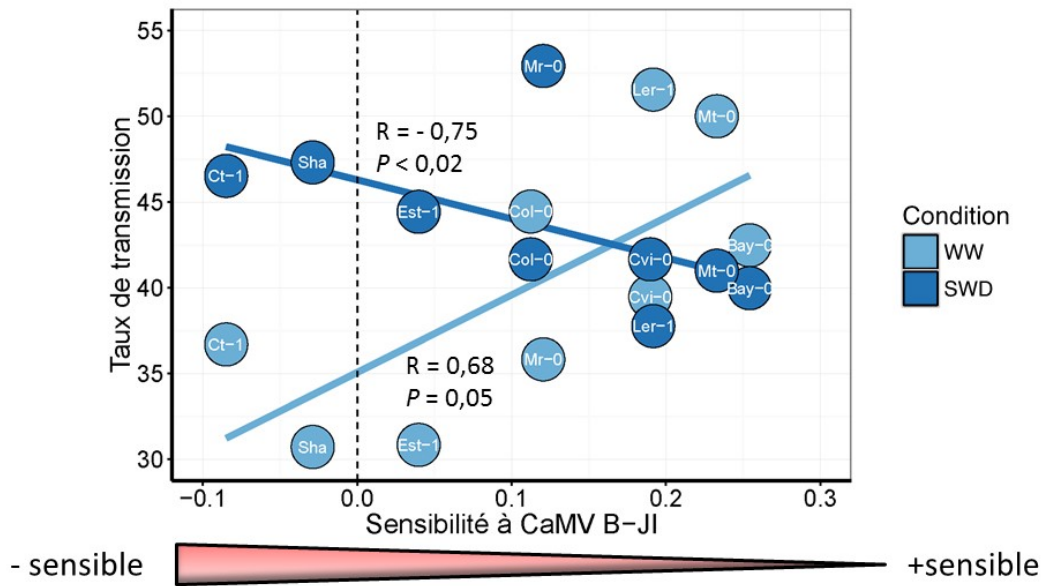
Des analyses de corrélation ont été effectuées pour chaque paramètre épidémiologique. Une corrélation significativement positive entre la sensibilité au CaMV et le taux de transmission a été mise en évidence en condition bien irriguée ($r = 0.68$; $P < 0.05$). Lorsqu'un déficit hydrique est appliqué, les accessions plus sensibles au CaMV ont tendance à diminuer leur transmission alors que les plus tolérantes ont tendance à l'augmenter. Ces observations conduisent à observer une corrélation significativement négative en condition de déficit hydrique sévère ($r = -0.75$; $P < 0.02$; Figure 10A). La charge virale et le taux de transmission tendent à être positivement corrélés en condition bien irriguée ($r = 0.4$; $P = 0.29$), et inversement lors d'un déficit hydrique ($r = -0.50$; $P = 0.17$). Ces tendances sont significatives si l'accession Mr-0 est retirée (WW : $r = 0.71$; $P < 0.06$; SWD : $r = -0.79$; $P < 0.02$). Enfin, une tendance à une corrélation positive entre la charge virale et la virulence a été mise en évidence en condition bien irriguée ($r = 0.35$; $P = 0.35$) et une corrélation marginalement significative ($r = 0.6$; $P < 0.10$; Figure 10B) en condition de déficit hydrique.

Discussion

L'objectif principal de cette étude était de répondre à deux questions : 1) l'infection virale améliore-t-elle la tolérance des plantes à un déficit hydrique sévère ? 2) Quelles sont les conséquences d'un déficit hydrique sévère sur les paramètres épidémiologiques du CaMV, un virus non circulant ? Neuf accessions d'*Arabidopsis thaliana* ont été sélectionnées pour leurs réponses contrastées au déficit hydrique modéré (Vile et al. 2012) et sévère (Rymaszewski et al. en préparation) et soumises à un stress hydrique sévère par arrêt d'irrigation post-inoculation, à une infection par le CaMV B-JI et à une combinaison des deux stress (SWDxCaMV). Avant cette étude, l'inoculation de cette souche virale avait été testée seulement sur l'accession Col-0. Les accessions ont toutes été inoculées en même temps. Il y avait donc une forte variabilité phénologique au sein de la population lors de l'inoculation et par conséquent lors des tests de transmission.

Les réponses au déficit hydrique des différentes accessions de l'étude sont en adéquation avec les réponses trouvées dans deux précédentes études qui ont servi à sélectionner les accessions (Vile et al., 2012, Rymaszewski et al, en préparation). Et pourtant le niveau de stress appliqué dans ces études était inférieur à celui appliqué dans notre étude et

A



B

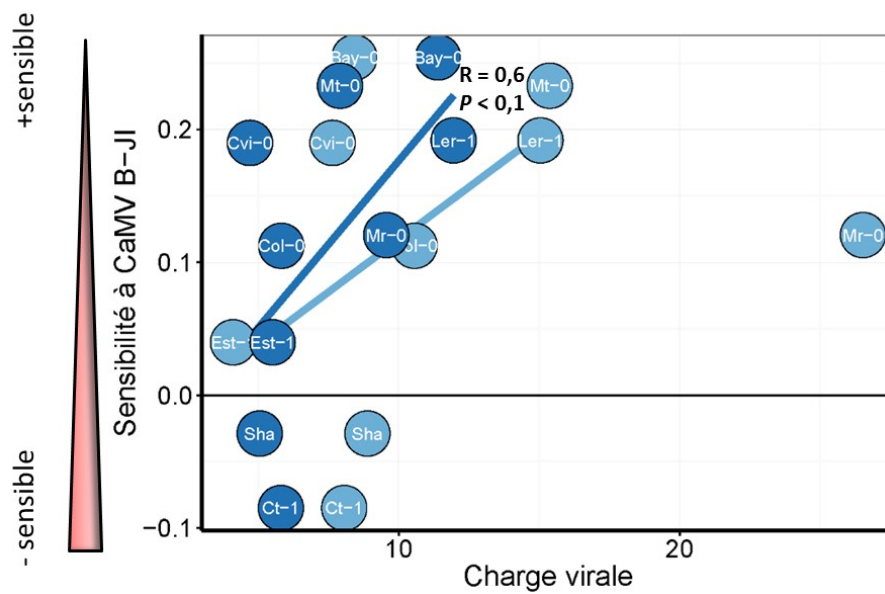


Figure 10: Relations entre sensibilité au CaMV (virulence), transmission et charge virale. A) Relation entre la virulence et le taux de transmission. Les droites de régression prennent en compte l'intégralité des accessions dans les deux conditions d'irrigation B) Corrélation entre la virulence et la charge virale. Les droites de régression ne prennent pas en compte Mr-0. La corrélation a été testée dans chacune des deux conditions d'irrigation en utilisant un test de corrélation de rang de Spearman.

les conditions de photopériode étaient différentes. De plus, le stress a été appliqué à un stade de croissance très précoce alors que le stress appliqué dans cette étude a été appliqué tardivement.

Impact négatif du SWD sur le délai et la vitesse de mise en place de la systémie

Des études précédentes ont mis en évidence les effets des différences de développement, en particulier de phénologie de la floraison, et de croissance entre les accessions, sur les paramètres d'apparition des symptômes viraux (Leisner et al., 1993). Ici, en accord avec les effets négatifs du stress hydrique sur la croissance des parties aériennes (Hsiao, 1973; Muller et al., 2011), nous avons observé une réduction significative de la vitesse d'apparition de la systémie chez les accessions les plus sensibles au SWD. Par ailleurs, si les flux phloémiens sont réduits suite à la diminution de la transpiration provoquée par la fermeture des stomates en réponse à la faible disponibilité en eau (Rosenthal et al., 1987), on peut supposer que le transport des particules virales à partir des tissus infectés vers tissus non infectés soit également diminué, conduisant à ralentissement dans la mise en place de la systémie (Leisner et al., 1993; Leisner and Howell, 1993).

Le délai d'apparition de la systémie est moins impacté que la vitesse d'apparition de la systémie par le SWD. Le déficit hydrique a été appliqué une semaine après l'inoculation. Par conséquent, la période de stress hydrique pour les premières plantes systémiques d'une accession était inférieure à 3 jours. La réduction de croissance induite par le SWD était relativement faible. Seules les accessions les plus sensibles au déficit hydrique ont eu un délai d'apparition de la systémie plus long, ce qui conforte l'idée d'une forte interaction croissance-phénologie-système. Ces observations sont confirmées par la corrélation négative entre le délai ou la vitesse d'apparition de la systémie et la date de montaison des accessions (non présentée).

Effet de l'infection et du double stress sur la croissance des plantes

L'infection par le CaMV a un effet généralement moins fort sur la croissance que le SWD. La virulence de la souche virale sur la croissance végétative n'est pas forte pour certains génotypes. Et pourtant, il y a systémie chez toutes les accessions. La variabilité de susceptibilité observée chez les différents cultivars ou écotypes de plantes est connue depuis longtemps (Fraser and Loon, 1986 ; Leisner, 1992). Cette variabilité est dépendante du génotype ainsi que des réponses mises en place par ce génotype face à l'infection.

L'effet de l'infection associée à un déficit hydrique (CaMV x SWD) est dans tous les cas plus néfaste pour la croissance des plantes par rapport à la condition témoin et à la condition d'infection simple. Par contre, l'effet de ce double stress sur la croissance est

quasiment équivalent à un déficit hydrique simple. Par conséquent, lors d'un déficit hydrique, peu importe que la plante soit infectée ou non par un virus, la réduction de croissance végétative est la même. De manière intéressante, il semblerait que certaines accessions présentent une tendance à une croissance améliorée lors d'un traitement CaMV x SWD. Il semblerait donc que dans un contexte de déficit hydrique, dans certains cas, l'infection surimposée par un déficit hydrique n'a pas eu d'effet sur la croissance végétative et dans d'autres cas, l'infection ait été bénéfique à la plante. Ces résultats sont en adéquation avec des papiers montrant que l'infection peut améliorer la tolérance au déficit hydrique (Xu et al., 2008; Hily et al., 2016). Ce bénéfice peut être en lien avec les réponses similaires engendrées lors d'une infection par un virus et un déficit hydrique. En effet, la présence du vecteur est perçue par la plante comme un stress qui va entraîner potentiellement l'induction d'une/plusieurs voies de signalisation/défense et permettre la mise en place de réponses adéquates (Alazem and Lin, 2015; Collum and Culver, 2016). Nombre de ces voies possiblement activées lors des stress biotiques (dépolérisation membranaire, fluctuation calciques, ROS, cascade de kinases, facteurs de transcription, signalisation hormonale etc...), sont partiellement ou totalement redondantes avec celles activées dans le cas de stress abiotiques tels qu'un déficit hydrique (Wilkinson and Davies, 2002 ; Knight et al., 1997). Par conséquent, il est possible que la plante ait déjà mis en place des réponses primaires dues à l'infection et que lors d'un déficit hydrique, son état physiologique lui permette d'être plus tolérante à ce déficit hydrique.

Effet du SWD sur l'épidémiologie du CaMV

Le stress hydrique sévère subit par la plante a impacté significativement le taux de transmission pour trois accessions. Les accessions les plus sensibles au déficit hydrique ont une augmentation de transmission en condition de déficit hydrique (Mr-0 et Sha).

Ces résultats sont en adéquation avec des travaux récemment soumis sur le navet et le CaMV en condition de déficit hydrique (van Munster et al, soumis) mais aussi avec des travaux récents sur l'impact de la teneur en CO₂ atmosphérique (Martinière et al., 2013; Dáder et al., 2016). De plus, pour ces deux accessions, la charge virale est significativement diminuée en condition de déficit hydrique. Le déficit hydrique modifie non seulement la transmission mais aussi la charge virale, ce qui a déjà été montré sur le potato virus A (Suntio and Mäkinen, 2012). Cependant, l'augmentation de la transmission en déficit hydrique ne peut pas être expliquée par une augmentation de la charge virale puisqu'il y a une corrélation négative en déficit hydrique. Il semblerait donc que les virus soient capables d'intercepter les signaux de

stress de la plante et de les utiliser à leur propre avantage. Ces résultats pourraient être en lien avec la grande réactivité des phytovirus à percevoir un changement environnemental et à réagir en conséquence en termes d'efficacité de transmission et de virulence. En effet, les particules virales du CaMV importantes pour sa transmission (P2 et P3) vont se relocaliser dans la cellule à l'aide du contenu cellulaire de la plante et plus particulièrement les microtubules pour améliorer sa transmission (Martinière et al., 2009; Martinière et al., 2013). Les microtubules sont importants pour l'organisation cellulaire mais aussi pour la réponse à certains stress abiotiques comme le stress salin (Lü et al., 2007). De plus, lors d'un stage précédent, nous avons mis en évidence que l'application d'un stress salin sur les racines de plantules d'*A. thaliana* (accession Col-0) conduisait à une désorganisation et un mouvement plus rapide des microtubules. Il se pourrait alors que le déficit hydrique ait un impact semblable à celui du stress salin sur l'organisation des microtubules. Par conséquent, la désorganisation des microtubules par le SWD pourrait rendre les protéines P2 et P3 encore plus accessible pour le vecteur. Cette meilleure accessibilité conduirait à une augmentation de la transmission du virus.

Le déficit hydrique a impacté négativement la transmission chez un génotype (Ler-1). Sa charge virale n'est pourtant pas significativement diminuée. Cette accession est la seule à avoir une morphologie radicalement différente des autres accessions. Il se pourrait alors que lorsque cette accession subit un déficit hydrique, la réponse morphologique et physiologique impacte la manière dont le puceron va piquer les tissus de la plante. Par contre, ce potentiel changement de comportement ne semble pas en lien avec le nombre de trichomes (données provenant d'une autre expérience), ce qui est en adéquation avec la littérature (Louis et al., 2012).

Bénéfice pour le virus ou pour l'hôte ?

L'infection par un virus et le déficit hydrique appliqués simultanément a conduit à améliorer la croissance chez deux génotypes. Cependant, la taille de la hampe florale ainsi que la viabilité des fleurs a été impacté négativement par l'infection (résultats non présentés), impactant en conséquence la valeur sélective de la plante. Quel est l'intérêt pour une plante d'être plus tolérante à un stress environnemental si sa reproduction est réduite ? Dans notre étude, nous avons observé une corrélation positive entre la virulence et le taux de transmission en condition bien irriguée (Figure 10A). Lorsque la plante est en condition de croissance optimale, plus le virus est virulent plus le potentiel de transmission est élevé. En condition de déficit hydrique, les génotypes les plus tolérants à l'infection augmentent leur

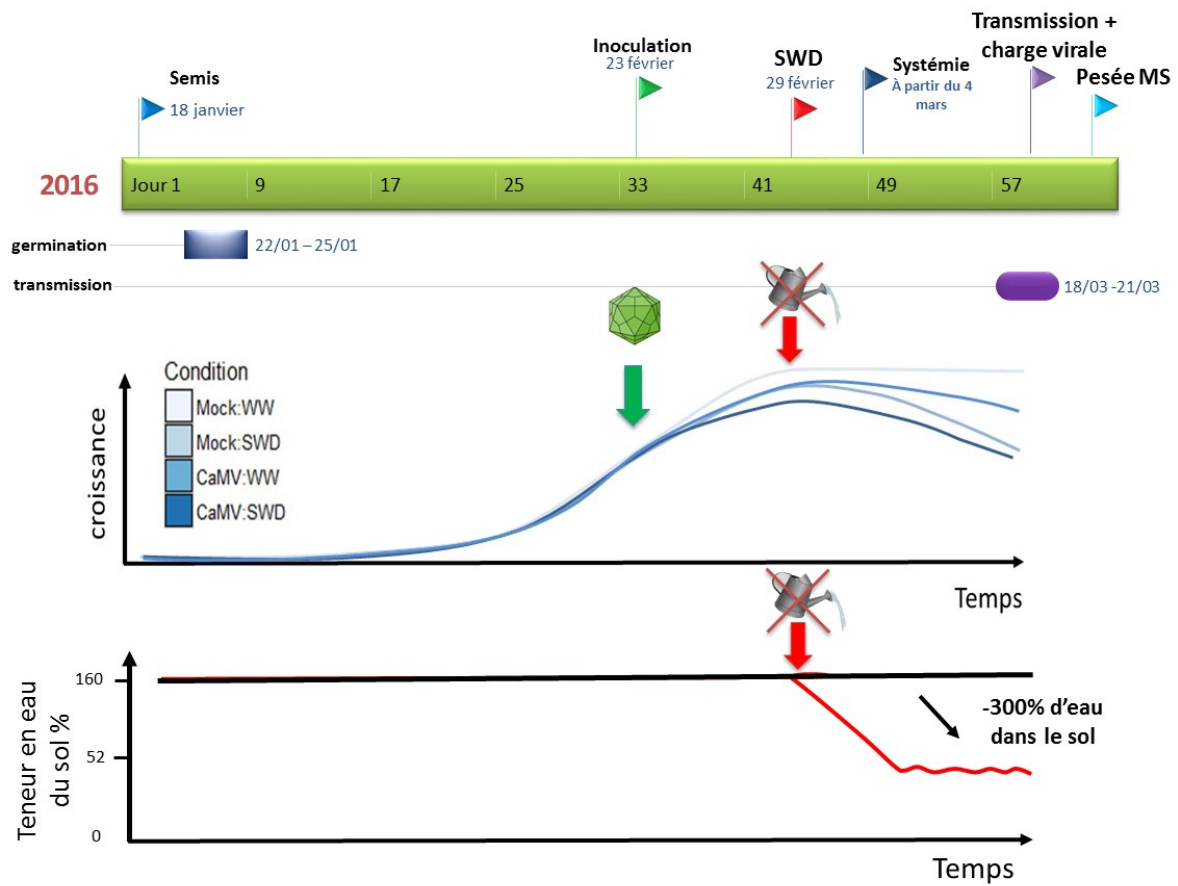


Figure 11 : Illustration schématique du protocole expérimental réalisé dans l'expérience. SWD = déficit hydrique sévère ; MS= masse sèche des parties aériennes ; Mock :: WW = bien irrigué, faussement inoculé ; Mock :: SWD = stress hydrique sévère, faussement inoculé ; CaMV :: WW = condition inoculée, bien irriguée ; CaMV :: SWD = condition inoculée, stress hydrique sévère.

taux de transmission alors que les plus sensibles le diminuent. Le virus peut ressentir des signaux de stress de la plante et mettre en place des réponses qui conduisent à une augmentation de ses chances de survie dans la population. Si la plante est soumise un déficit hydrique, ses chances de survie ainsi que celle du virus soit réduites. Le virus pourrait alors modérer son effet néfaste sur la croissance de son hôte pour augmenter ses chances de se transmettre à un nouvel hôte. Il module sa virulence pour augmenter sa transmission. Cette possibilité pour le virus de moduler sa virulence, son niveau d'accumulation et surtout sa transmissibilité selon les conditions environnementales est un concept nouveau qui pourrait compléter l'hypothèse du compromis transmission-virulence selon laquelle l'interaction entre un virus donné et un hôte donné tendrait vers une virulence optimale unique intégrant les bénéfices de la transmission et le coût de la virulence en fonction de l'environnement et du statut physiologique de l'hôte (Alizon et al., 2009; Doumayrou et al., 2013).

De la même façon, l'abondance du virus peut être intuitivement liée à la probabilité de transmission par un vecteur passif. Cependant, il est admis que le comportement des insectes, même dans le cas de la transmission non-circulante, peut jouer un rôle significatif dans le taux de transmission. Il est donc indispensable de regarder le comportement du puceron car il est tout aussi important que l'hôte et le virus. Il est connu depuis longtemps que les pucerons sont fortement attirés par le jaune (Döring et al., 2009) et que certains virus de plantes induisent des symptômes tels que la chlorose, des mosaïques ou d'autres modifications qui conduisent à un jaunissement des feuilles. Sachant que le SWD induit aussi de la sénescence conduisant à un jaunissement des tissus (Bresson et al., 2015), il est possible que le puceron soit plus attiré par les plantes en double stress et que ça influence sa manière de piquer. Il faudra vérifier à court terme si la sénescence est globalement plus forte en double stress (avec les données de fluorescence acquises mais non analysées) et vérifier si cela influence la piqure du puceron (avec des analyses EPG, Electrical Penetration Graph, Fereres et al, 2015).

Matériel et méthode

Un schéma est présenté en figure 11 pour décrire la chronologie expérimentale.

A) Phénotypage par la plateforme PHENOPSIS

PHENOPSIS est un automate de culture et de mesure des plantes (Granier et al., 2006) installé dans une chambre de culture où les conditions environnementales sont strictement contrôlées. Une illustration de la chronologie de l'expérience est présentée en figure 12.

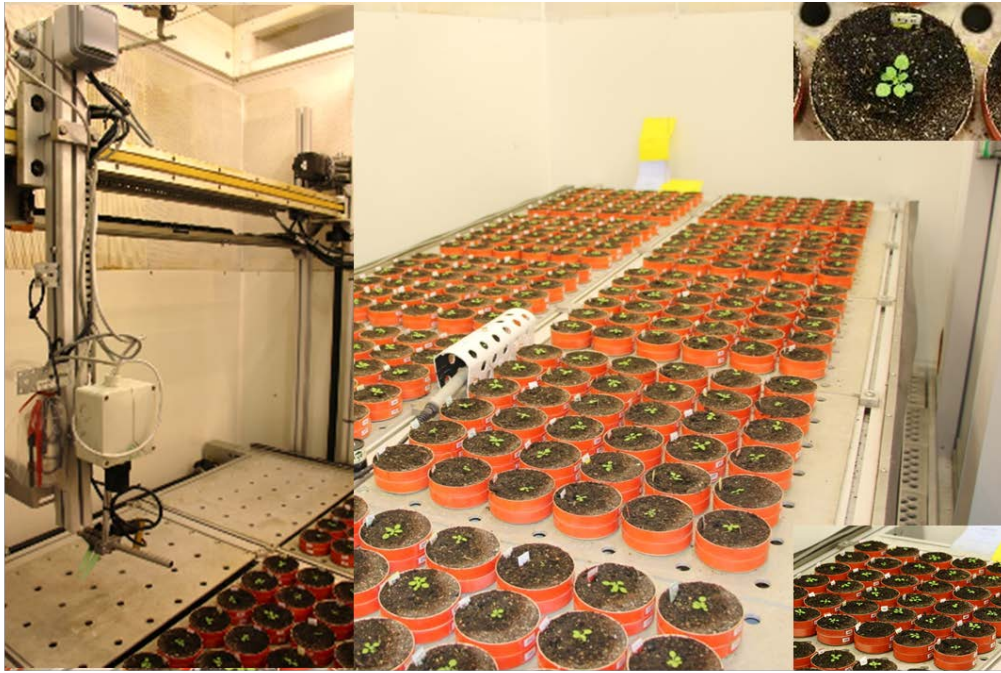


Figure 12 : Illustration photographique représentant l'automate PHENOPSIS. PHENOPSIS est un automate mis en place dans une chambre de culture où les conditions environnementales sont strictement contrôlées (Granier et al., 2006). Il est équipé d'un bras amovible qui se déplace pot à pot avec une station d'irrigation (A1645-6; finition Electro), une station de pesée (XB620C; Precisa) et une station d'imagerie permettant d'acquérir des données phénotypiques non destructives (caméra CCD et fluo). Il permet grâce à un système de pesée, d'irriguer précisément chaque pot (ajustés au poids cible contrôle ou stress) plusieurs fois par jour si nécessaire. La lumière est fournie par une série de tubes fluorescents blanc (36 W T8 Grolux, 120 cm, Sylvania) et des lampes aux halogénures métalliques de quartz (HPI-T Plus 400 W 645 E40; Philips). L'intensité lumineuse est mesurée en permanence à hauteur de la plante, en utilisant un capteur de lumière sur la bande de fréquences de 400-700 nm (SKP215; Campbell Scientific). La température et l'humidité relative de l'air sont mesurées toutes les 20 secondes (HMP45C-L; Campbell Scientific). La régulation climatique de PHENOPSIS est contrôlé par un logiciel LoggerNet permettant le contrôle précis de l'environnement en utilisant un séchoir à air ou un pulvérisateur d'eau pour modifier l'humidité de l'air et un refroidisseur d'air ou un appareil de chauffage pour modifier la température de l'air.

B) Matériel végétal, conditions de culture et traitements d'irrigation

a) Matériel végétal et condition de culture

L'expérimentation a été menée sur neuf accessions naturelles d'*Arabidopsis thaliana*: Mr-0, Col-0, Ct-1, Sha, Cvi-0, Mt-0, Bay-0, Ler-1 et Est-1. Ces accessions ont été sélectionnées pour leurs réponses contrastées à la sécheresse (Vile et al., 2012; Rymaszewski et al., non publié). Plusieurs graines ($n = 3$ à 5) d'une même accession ont été semées à la surface du sol dans des pots cylindriques de 250 cm^3 (10 cm de haut, 7 cm de diamètre ; $n_{\text{génotype}} = 56$ plantes, $n_{\text{total}} = 504$), remplis au préalable avec un substrat (Substrat SP 15% KLASMANN). Lors du semis, chaque pot a été pesé vide puis rempli de substrat préalablement homogénéisé et repesé. Après semis, les pots ont été arrosés avec 10 mL de solution nutritive (Hoagland modifiée). Afin de permettre une bonne germination, de l'eau osmosée a été pulvérisée à la surface du sol de chaque pot trois fois par jour, jusqu'à l'apparition des deux premières feuilles (stade 1.02 d'après Boyes *et al.*, 2001). A ce stade, chaque pot a été éclairci pour ne laisser qu'une plante par pot, et l'irrigation automatisée a été initialisée. Les plantes ont été cultivées avec une photopériode de 8 h, à un PAR de $200 \mu\text{mol s}^{-1} \text{ m}^{-2}$, à une température de l'air de $18 \text{ }^\circ\text{C}$ la nuit et $21 \text{ }^\circ\text{C}$ le jour et un déficit de vapeur d'eau de 0.75 KPa.

b) Contrôle de la teneur en eau du sol

Pour déterminer la teneur en eau du substrat, plusieurs échantillons de substrat ont été prélevés lors du remplissage des pots (tous les dix pots) et pesés une première fois pour déterminer le poids frais du sol (MF_{sol}). Les échantillons ont ensuite été placés à l'étuve ($105 \text{ }^\circ\text{C}$ pendant 4 jours) afin de mesurer le poids sec (MS_{sol}) et déterminer la teneur initiale en eau du substrat. Ainsi, le poids cible de chaque pot a été déterminé afin d'atteindre l'humidité du sol voulue (contrôle : WW ou stress hydrique : SWD, voir ci-après): $\text{TER}_{\text{sol}} = (\text{MF}_{\text{sol}} - \text{MS}_{\text{sol}}) \times 100 \times \text{MS}_{\text{sol}}$. Pour chaque accession, la moitié des plantes a été cultivée à une teneur en eau du sol de $1.6 \text{ g d'H}_2\text{O g}^{-1}$ de substrat sec maintenue stable tout au long de l'expérimentation (WW). Cette teneur en eau a été préalablement déterminée comme ne limitant pas la croissance d'*A. thaliana* (Vile, communication personnelle). L'autre moitié des plantes a été cultivée avec la même teneur en eau du sol durant cinq semaines. Une semaine après inoculation avec le CaMV (voir description ci-dessous), l'irrigation a été suspendue pour appliquer un stress hydrique sévère (SWD ; teneur en eau du sol finale oscillant entre $0.52\text{-}0.6 \text{ g d'H}_2\text{O g}^{-1}$ de substrat sec). Une irrigation ponctuelle a été réalisée afin de maintenir une humidité relative du sol aux valeurs préétablies (voir Figure 11). Ce traitement (profil oscillatoire d'irrigation) a permis de maintenir les plantes en SWD tout en évitant qu'elles ne meurent.

C) Suivi non destructif du développement des plantes

Pendant toute la durée de l'expérimentation, le nombre de feuille des rosettes de chaque plante a été noté une fois par semaine. Les dates d'apparition des différents organes reproducteurs ont également été notées : apparition des boutons floraux, des fleurs et des siliques. En parallèle, l'apparition et le développement des symptômes sur les plantes inoculées par le CaMV a été noté à plusieurs dates (9, 12, 14, 15, 17, 19, 21, 23 et 26 dpi). Chaque jour, une photo de chaque plante a été prise dans le spectre visible par une caméra CCD placée sur le bras du robot.

D) Purification partielle et inoculation mécanique du virus CaMV

a) Purification partielle du CaMV

L'isolat viral CaMV B-JI (Delseny and Hull, 1983) a été utilisé au cours de cette étude. Le CaMV peut se transmettre de façon mécanique avec un taux d'infection variable selon la nature de l'inoculum (broyat de plantes infectées, solution virale purifiée, ADN plasmidique contenant le génome viral), la concentration en particules virales et de la plante hôte.

Afin d'optimiser le taux de réussite d'inoculation des différentes accessions d'*A. thaliana*, une purification partielle du CaMV, permettant d'enrichir l'inoculum en particules virales, a été réalisée. La purification a été réalisée à partir de plants de navets (*Brassica rapa*) infectés par CaMV B-JI car cela permet d'obtenir de grandes quantités de virus. Des feuilles dénervurées symptomatiques de navet (20 jours après inoculation (dpi)) ont été prélevées, pesées (110 g) et broyées à froid dans une solution de KH_2PO_4 (0.5 M, pH 7.2) et du Na_2SO_3 (75%) avant d'être filtrée sur gaze fine. Toutes les étapes suivantes se déroulent à 4 °C. Afin de dégrader les parois celluliques et membranaires des cellules, de l'urée à 1 M (6%) et 2.5% de triton X100 sont rajoutés au volume final obtenu et mis en agitation à 4 °C pendant 24 h. La solution a alors été clarifiée 15 min à 6000 tpm afin d'éliminer les plus gros débris. Finalement, un passage sur coussin de saccharose (30%) et une ultracentrifugation (30 000 tpm, 4 °C, 2 heures ; SWING rotor) du surnageant a permis de précipiter les particules virales. Les culots enrichis en virus ont été lavés délicatement avec 2 mL de solution Tris-HCl (100 mM, 2.5 mM MgCl_2 , pH = 7) et resuspendus dans 300 μL de cette même solution avant d'être stockés à -80 °C.

b) Vérification de la purification partielle du CaMV et détermination de la concentration virale

La purification partielle obtenue du CaMV a ensuite été analysée par microscopie électronique à transmission (Figure S2A), sur gel SDS-PAGE 12% et par spectrométrie

(NanoDrop 2000 spectrophotomètre) afin de vérifier la pureté et déterminer la concentration virale. Afin d'estimer la pureté, la concentration et la dégradation éventuelle des protéines virales 7.5 µl de la purification virale en milieu dénaturant (+ 2.5 µl de Laemmli x 4, 5 min à 100 °C) a été déposé sur gel SDS-PAGE 12% avec en parallèle un marqueur de poids moléculaire (Figure S5). Après migration (150 V, 1 h) dans un tampon de migration ; les protéines sont révélées en Bleu de Coomassie. Le gel présenté en annexe (Figure S2B) montre la présence de trois bandes majoritaires correspondant à la taille attendue (40-55 kDa) pour les différentes formes de la protéine de capsid P4 du CaMV. La concentration en particules virales de la suspension a été déterminée par mesures spectroscopiques à 230, 260 et 280 nm (NanoDrop 2000 spectrophotomètre) en utilisant la formule suivante et le coefficient d'extinction molaire du CaMV :

$$\mathcal{E}_{260} = 7 \rightarrow 1 \text{ mg / ml}$$

La concentration a été ainsi estimée à 0.63 mg ml⁻¹. Le rendement par rapport au poids frais de feuilles infectées utilisées pour la purification a été estimé à 43 mg de virus kg⁻¹ de feuilles.

c) **Inoculation mécanique du virus CaMV**

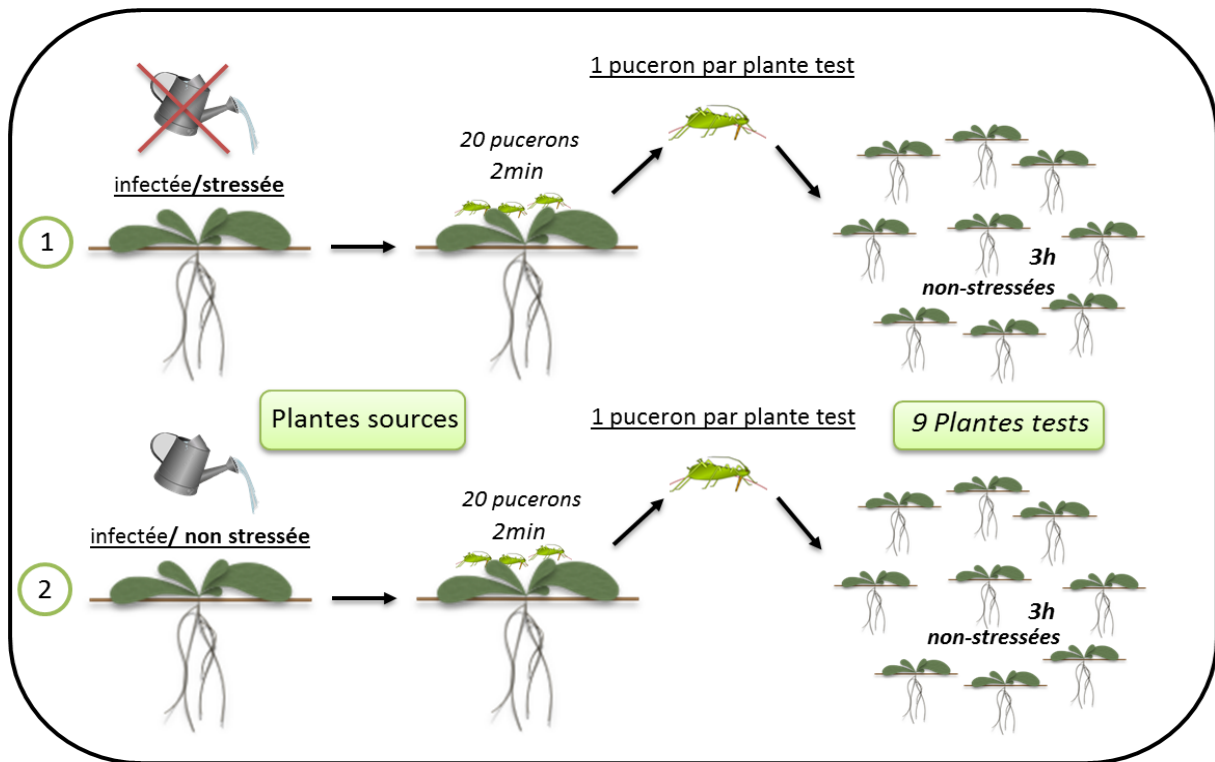
Le virus a été inoculé de manière mécanique le même jour chez toutes les accessions d'*A. thaliana* 1 mois après semis. Pour cela, 1 g de feuilles broyées de navets infectés par CaMV-BJI (20 dpi) ainsi que 1 mL de virus partiellement purifié ont été mélangés dans 2 ml d'eau distillée et d'un abrasif (carborundum). Pour chaque plante d'*A. thaliana*, trois feuilles de rang médian ont été frottées avec un petit pilon trempé dans la solution décrite précédemment. Un traitement dit « mock », mimant la blessure induite par l'inoculation mécanique a été appliqué à toutes les autres plantes, qui constituent le groupe témoin sain. Ces plantes sont mock-inoculées avec une solution contenant 1 g de feuilles saines de navet broyées, du carborundum, 1 mL de tampon Tris-HCl (tampon utilisé dans la purification partielle) et 2 mL d'eau distillée.

E) **Etude de la transmission du virus, de l'accumulation virale et de la virulence**

a) **Test de transmission**

Pour les expériences de transmission, des lots de 20 pucerons *M. persicae* (stades larvaires N2-N4) ont été mis à jeuner 1 h avant le début du test de transmission. Ils ont alors été mis en acquisition au cœur d'une plante source d'*A. thaliana* symptomatique (25 dpi). Deux minutes après stabilisation et immobilisation des pucerons sur la feuille (correspondant à la phase de piqûres d'essai par insertion des stylets) les pucerons potentiellement virulifères sont

A



B

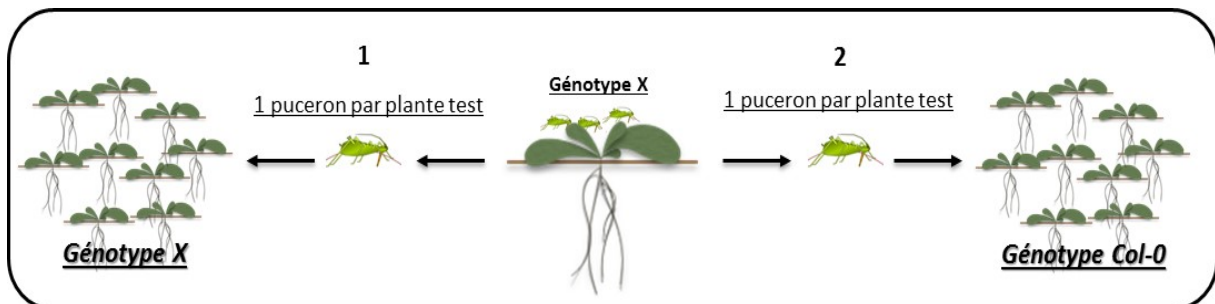


Figure 13 : Schéma expliquant le déroulement des tests de transmission réalisés dans l'étude : A) Les tests de transmission se sont déroulés en deux temps : dans un premier temps, une vingtaine de pucerons ont été placés soit sur le cœur d'une plante source symptomatique (25 dpi) et en stress hydrique sévère depuis 15 jours (1), soit sur une plante source symptomatique (25 dpi) et en condition bien irriguée (2). Les pucerons ont eu deux minutes après stabilisation pour acquérir le virus. Les pucerons ont ensuite été aspirés sur la plante source et déposés dans une boîte de Pétri. Sur chaque plante test non stressée (n=9 / plante source), un puceron a été déposé à l'aide d'un pinceau. Trois heures après, un insecticide a été pulvérisé sur l'intégralité des plantes tests. Les plantes tests ont ensuite été placées dans une chambre de culture avec les mêmes conditions d'humidité de l'air, de température et de lumière que les plantes sources. Dans un deuxième temps, trois semaines après les tests de transmission, une lecture de symptômes a été effectuée sur l'ensemble des plantes tests et cela a permis de calculer un pourcentage de taux de transmission pour chaque génotype et condition (n=10 plantes sources et n= 90 plantes tests par génotype et condition). B) Les mêmes tests de transmission ont été réalisés mais avec des plantes sources non stressées et des plantes tests appartenant soit au génotype X (1) soit au génotype Col-0 (2) (n=10 plantes sources et n= 90 plantes tests par génotype). Design des plantes par Denis Vile et puceron par Brault .

immédiatement recueillis dans une boîte de Pétri et transférés individuellement sur 9 plantes tests (appartenant au génotype Col-0, ou aux autres génotypes selon l'expérimentation concernée), pour une période d'inoculation de 3 h avant d'être éliminés par pulvérisation d'insecticide (0.2% Pirimor G). Les plantes tests ont ensuite été placées dans les mêmes conditions (température, lumière et VPD) que les plantes sources pendant une période de 3 semaines, temps nécessaire au développement des symptômes. Le nombre de plantes test positives (symptomatiques) / plante source et par génotype est alors compté. Deux tests de transmission ont été réalisés.

1- Effet du génotype utilisé en plante test. Au préalable, afin de vérifier qu'il n'existait pas un biais dans l'utilisation exclusive du génotype Col-0, des tests de transmission à partir d'une plante source d'une accession donnée vers des plantes tests de la même accession et vers des plantes de l'accession Col-0 ont été également réalisés, afin de pouvoir comparer les taux de transmission intra- et inter-génotypes. Dans ce cas-là, les plantes sources n'ont pas subi de stress hydrique (un puceron/plante test ; 9 plantes tests Col-0/plante source du génotype x ou 9 plantes tests génotype x/plante source du génotype x ; dix plantes sources par génotype x, voir Figure 13B).

2- Effet du stress hydrique. Pour tester l'effet du stress hydrique sévère sur la transmission des différents génotypes, les plantes tests de lecture appartenant à l'accession Col-0 (génotype utilisé en routine dans les expériences d'infection par le CaMV) ont été utilisés (un puceron/plante test ; 9 plantes tests Col-0/plante source du génotype x ; dix plantes sources par génotype x/traitement, voir Figure 13A). Ce test de transmission a été réalisé 25 dpi et 19 jours après la mise en place du stress hydrique.

b) Charge virale des plantes sources

1-Extraction de l'ADN

A la fin des tests de transmission, un échantillonnage de chaque plante source infectée afin de quantifier la charge virale a été réalisé selon un protocole mis au point dans le laboratoire BGPI (M. Yvon, com. pers.). Brièvement, une extraction par poinçonnage « pression » permet de transférer le contenu cellulaire sur un papier Whatman. L'ADN est alors extrait avec 100 µl d'un tampon Edwards modifié (Edwards et al., 1991) suivi d'une étape de précipitation à l'isopropanol et de lavage des culots avec de l'éthanol à 70%. L'ADN est finalement remis en suspension dans 50 µl d'eau distillée. La qualité et la quantité d'extraction de l'ADN viral ont été contrôlées par des mesures spectroscopiques à 230, 260 et 280 nm (NanoDrop 2000 spectrophotomètre) avant quantification par PCR quantitative (qPCR).

2- Quantification ADN par qPCR

La quantification de l'ADN dans chaque échantillon a été réalisée en duplicat par qPCR dans des plaques de 384 puits en utilisant le kit FastStart pour LightCycler DNA Master Plus SybrGreen I (Roche) dans un thermocycleur 480 LightCycler (Roche) selon les instructions du fabricant. Des amorces spécifiques conçues pour la quantification du CaMV ont été utilisées (Ca4443-F: 5'-GACCTAAAAGTCATCAAGCCCA-3' et Ca4557-R: 5'-TAGCTTTGTAGTTGACTACCATACG) ainsi qu'un gène de ménage de la plante UBC21 (ubiquitin-conjugating enzyme 21 ; UBC21_At_F : 5'-TGCAACCTCCTCAAGTTCGA et UBC21_At_R : GCAGGACTCCAAGCATTCTT) décrit pour rester stable lors d'un stress hydrique (Wang et al. 2014). L'ADN de chaque plante a été utilisé à une concentration finale de 0.3 μ M. Toutes les réactions de qPCR ont été effectuées avec 40 cycles (95 °C pendant 15 s, 62 °C pendant 15 s et 72 °C pendant 15 s) après une étape initiale à 95 °C pendant 10 min. Les données qPCR ont été analysées avec le programme LinReg PCR et la concentration initiale (N_0) de chaque cible (CaMV ou UBC21) estimée (Ruijter et al., 2009). Les valeurs sont alors normalisées en réalisant le ratio N_0_{CaMV}/N_0_{UBC21} . L'efficacité moyenne de PCR par génotype et par traitement a été calculée (voir Figure S4).

c) Lecture de symptômes des plantes tests

Trois semaines après le test de transmission, une lecture visuelle de symptômes a été réalisée sur l'ensemble des plantes tests. Pour chaque plante source, 9 plantes tests ont été visualisées et ont permis de calculer un pourcentage de réussite de transmission. L'ensemble des plantes tests ont été cultivées en conditions optimales et n'ont donc subi aucun stress hydrique.

F) Caractérisation de la croissance

a) Analyse de croissance des plantes

A l'aide des photographies prises par l'automate quotidiennement, il a été possible d'analyser la croissance de chaque plante. Pour cela, une dizaine de plantes par génotype et par condition ont été analysées à l'aide d'une procédure semi-automatique développée dans l'environnement d'analyse d'images Image J (Research Services National Institute of mental health, Bethesda, Maryland, USA). Cette procédure consiste à créer un masque de la plante pour estimer sa surface foliaire projetée. Sur la période où aucun stress n'a été appliqué, 10 plantes par génotype ont été analysées à 8 dates) pour estimer l'effort de mesure à réaliser sur les plantes restantes pour estimer l'ajustement des courbes de croissance. Sur la période où le stress a été appliqué et l'inoculation effectuée, 8 dates ont été analysées par plante et en moyenne, 7 plantes ont été analysées par génotype et par condition.

b) Mesures de la masse sèche des parties aériennes

Les rosettes de chaque génotype ont été récoltées dans les quatre conditions le jour de la transmission, soit 24 jours après l'inoculation et 18 jours après le stress hydrique. Pour chaque plante, les feuilles de la rosette et la hampe florale ont été séparées et placées à l'étuve à 60 °C pendant 5 jours puis pesées. Pour chaque génotype, 4 et 10 individus ont respectivement été analysés en conditions mock-inoculées (WW et SWD) et en conditions CaMV-inoculées (WW et SWD).

G) Tests statistiques

Toutes les analyses ont été réalisées dans l'environnement de programmation R (R Core Team 2016, <https://www.R-project.org/>). La dynamique d'apparition des symptômes au cours du temps (t , jours après inoculation) a été analysée par comptage quotidien des plantes symptomatiques et ajustement d'une courbe logistique à trois paramètres de forme (Figure S3) : $A / (1 + \exp((4*\mu/A)*(\lambda - t) + 2))$, où A est le taux maximum d'inoculation, λ est le délai et μ est la vitesse maximale d'apparition des symptômes. Les paramètres et leur intervalle de confiance (IC_{95%}) ont été estimés par l'algorithme « nl2sol » de la bibliothèque *Port* pour chaque génotype cultivé dans chacune des deux conditions (WW–CaMV-inoculé vs. SWD–CaMV-inoculé). Les intervalles de confiances sont utilisés pour estimer la significativité des différences entre les accessions et les conditions. Les différences entre la masse sèche des rosettes cultivées dans les quatre conditions ont été testées par un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis pour chaque génotype. La trajectoire de croissance au cours du temps a été analysée par ajustement local (fonction « loess ») des données du surface projetée des rosettes pour chaque accession et chaque condition. L'effet du traitement d'irrigation (WW–CaMV-inoculé vs. SWD–CaMV-inoculé) ou du génotype test (Col-0 vs. autre accession) sur le taux de transmission a été testé dans un modèle *glm* avec une fonction de lien binomiale. Le taux moyen (\pm erreur standard de la moyenne) de transmission ainsi que les rapports de côte (\pm IC_{95%}) sont présentés pour chaque accession et chaque condition. La charge virale a été estimée à partir des données de qPCR (voir ci-dessus) et l'effet de l'irrigation a été testé pour chaque génotype par un test de Kruskal-Wallis. La sensibilité de chaque génotype a été calculée selon le rapport des masses sèches des plantes CaMV-inoculées vs. *mock*-inoculées en condition bien irriguée. La significativité des corrélations entre les paramètres épidémiologiques a été testée dans chacune des deux conditions d'irrigation en utilisant le test de corrélation de rang de Spearman.

Bibliographie

- Alazem M, Lin N-S** (2015) Roles of plant hormones in the regulation of host–virus interactions. *Mol Plant Pathol* **16**: 529–540
- Alizon S, Hurford A, Mideo N, Van Baalen M** (2009) Virulence evolution and the trade-off hypothesis: history, current state of affairs and the future. *J Evol Biol* **22**: 245–259
- Banik MT, Zitter TA** (1990) Determination of cucumber mosaic virus titer in muskmelon by enzyme-linked immunosorbent assay and correlation with aphid transmission. *Plant Dis* **74**: 857–859
- Blanc S, Drucker M, Uzest M** (2014) Localizing Viruses in Their Insect Vectors. *Annu Rev Phytopathol* **52**: 403–425
- Bostock RM** (2005) Signal Crosstalk and Induced Resistance: Straddling the Line Between Cost and Benefit. *Annu Rev Phytopathol* **43**: 545–580
- Bragard C, Caciagli P, Lemaire O, Lopez-Moya JJ, MacFarlane S, Peters D, Susi P, Torrance L** (2013) Status and Prospects of Plant Virus Control Through Interference with Vector Transmission. *Annu Rev Phytopathol* **51**: 177–201
- Brault V, Uzest M, Monsion B, Jacquot E, Blanc S** (2010) Aphids as transport devices for plant viruses. *C R Biol* **333**: 524–538
- Bresson J, Vasseur F, Dauzat M, Koch G, Granier C, Vile D** (2015) Quantifying spatial heterogeneity of chlorophyll fluorescence during plant growth and in response to water stress. *Plant Methods* **11**: 23
- Carrington J, Kasschau K, Mahajan S, Schaad M** (1996) Cell-to-Cell and Long-Distance Transport of Viruses in Plants. *Plant Cell* **8**: 1669–1681
- Collum TD, Culver JN** (2016) The impact of phytohormones on virus infection and disease. *Curr Opin Virol* **17**: 25–31
- Cronin JP, Welsh ME, Dekkers MG, Abercrombie ST, Mitchell CE** (2010) Host physiological phenotype explains pathogen reservoir potential: Epidemiology and host physiology. *Ecol Lett* **13**: 1221–1232
- Dáder B, Fereres A, Moreno A, Trębicki P** (2016) Elevated CO₂ impacts bell pepper growth with consequences to *Myzus persicae* life history, feeding behaviour and virus transmission ability. *Sci Rep*. doi: 10.1038/srep19120
- Delseny M, Hull R** (1983) Isolation and characterization of faithful and altered clones of the genomes of cauliflower mosaic virus isolates Cabb B-JI, CM4-184, and Bari I. *Plasmid* **9**: 31–41
- Doumayrou J, Avellan A, Froissart R, Michalakakis Y** (2013) An Experimental Test of the Transmission-Virulence Trade-Off Hypothesis in a Plant Virus. *Evolution* **67**: 477–486

- Edwards K, Johnstone C, Thompson C** (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res* **19**: 1349
- Fraille A, García-Arenal F** (2016) Environment and evolution modulate plant virus pathogenesis. *Curr Opin Virol* **17**: 50–56
- Frank SA** (1996) Host Control of Symbiont Transmission: The Separation of Symbionts Into Germ and Soma. *Am Nat* **148**: 1113–1124
- Fraser RSS, Loon LCV** (1986) Genes for resistance to plant viruses. *Crit Rev Plant Sci* **3**: 257–294
- Froissart R, Doumayrou J, Vuillaume F, Alizon S, Michalakis Y** (2010) The virulence–transmission trade-off in vector-borne plant viruses: a review of (non-)existing studies. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**: 1907–1918
- Fujita M, Fujita Y, Noutoshi Y, Takahashi F, Narusaka Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2006) Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Curr Opin Plant Biol* **9**: 436–442
- Granier C, Aguirrezabal L, Chenu K, Cookson SJ, Dauzat M, Hamard P, Thioux J-J, Rolland G, Bouchier-Combaud S, Lebaudy A, et al** (2006) PHENOPSIS, an automated platform for reproducible phenotyping of plant responses to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana* permitted the identification of an accession with low sensitivity to soil water deficit. *New Phytol* **169**: 623–635
- Hébrard E, Froissart R, Louis C, Blanc S** (1999) Les modes de transmission des virus phytopathogènes par vecteurs. *Virologie* **3**: 35–48
- Hensel LL, Grbić V, Baumgarten DA, Bleecker AB** (1993) Developmental and age-related processes that influence the longevity and senescence of photosynthetic tissues in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **5**: 553–564
- Hily J-M, Poulicard N, Mora M-Á, Pagán I, García-Arenal F** (2016) Environment and host genotype determine the outcome of a plant–virus interaction: from antagonism to mutualism. *New Phytol* **209**: 812–822
- Hipper C, Brault V, Ziegler-Graff V, Revers F** (2013) Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. *Front Plant Sci* **4**: 1–24
- Hsiao TC** (1973) Plant Responses to Water Stress. *Annu Rev Plant Physiol* **24**: 519–570
- Jones HG** (1999) Use of thermography for quantitative studies of spatial and temporal variation of stomatal conductance over leaf surfaces. *Plant Cell Environ* **22**: 1043–1055
- Joshi-Saha A, Valon C, Leung J** (2011) A Brand New START: Abscisic Acid Perception and Transduction in the Guard Cell. *Sci Signal* **4**: re4-re4
- Juergens M, Paetsch C, Krämer I, Zahn M, Rabenstein F, Schondelmaier J, Schliephake E, Snowdon R, Friedt W, Ordon F** (2009) Genetic analyses of the host-pathogen

- system Turnip yellows virus (TuYV)—rapeseed (*Brassica napus* L.) and development of molecular markers for TuYV-resistance. *Theor Appl Genet* **120**: 735–744
- Kiegle E, Moore CA, Haseloff J, Tester MA, Knight MR** (2000) Cell-type-specific calcium responses to drought, salt and cold in the *Arabidopsis* root. *Plant J* **23**: 267–278
- Krause GH** (1988) Photoinhibition of photosynthesis. An evaluation of damaging and protective mechanisms. *Physiol Plant* **74**: 566–574
- Kröel-Dulay G, Ransijn J, Schmidt IK, Beier C, De Angelis P, de Dato G, Dukes JS, Emmett B, Estiarte M, Garadnai J, et al** (2015) Increased sensitivity to climate change in disturbed ecosystems. *Nat Commun* **6**: 6682
- Kuroyanagi T, Paulsen GM** (1988) Mediation of high-temperature injury by roots and shoots during reproductive growth of wheat. *Plant Cell Environ* **11**: 517–523
- Leisner SM, Howell SH** (1993) Long-distance movement of viruses in plants. *Trends Microbiol* **1**: 314–317
- Leisner SM, Turgeon R, Howell SH** (1993) Effects of host plant development and genetic determinants on the long-distance movement of cauliflower mosaic virus in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **5**: 191–202
- Louis J, Singh V, Shah J** (2012) *Arabidopsis thaliana*—Aphid Interaction. Arab Book e0159
- Lü B, Gong Z, Wang J, Zhang J, Liang J** (2007) Microtubule dynamics in relation to osmotic stress-induced ABA accumulation in *Zea mays* roots. *J Exp Bot* **58**: 2565–2572
- Malmstrom CM, Melcher U, Bosque-Pérez NA** (2011) The expanding field of plant virus ecology: Historical foundations, knowledge gaps, and research directions. *Virus Res* **159**: 84–94
- Mandadi KK, Scholthof K-BG** (2013) Plant Immune Responses Against Viruses: How Does a Virus Cause Disease? *Plant Cell* **25**: 1489–1505
- 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
- Martinière A, Gargani D, Uzest M, Lautredou N, Blanc S, Drucker M** (2009) A role for plant microtubules in the formation of transmission-specific inclusion bodies of Cauliflower mosaic virus. *Plant J* **58**: 135–146
- Mauch-Mani B, Mauch F** (2005) The role of abscisic acid in plant–pathogen interactions. *Curr Opin Plant Biol* **8**: 409–414
- McDowell NG** (2011) Mechanisms Linking Drought, Hydraulics, Carbon Metabolism, and Vegetation Mortality. *Plant Physiol* **155**: 1051–1059
- Mittler R** (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci* **11**: 15–19

- Monshausen GB, Bibikova TN, Weisenseel MH, Gilroy S** (2009) Ca²⁺ Regulates Reactive Oxygen Species Production and pH during Mechanosensing in Arabidopsis Roots. *Plant Cell* **21**: 2341–2356
- Muller B, Pantin F, Génard M, Turc O, Freixes S, Piques M, Gibon Y** (2011) Water deficits uncouple growth from photosynthesis, increase C content, and modify the relationships between C and growth in sink organs. *J Exp Bot* **erq438**
- Munné-Bosch S, Alegre L** (2004) Die and let live: leaf senescence contributes to plant survival under drought stress. *Funct Plant Biol* **31**: 203–216
- Nancarrow N, Constable FE, Finlay KJ, Freeman AJ, Rodoni BC, Trebicki P, Vassiliadis S, Yen AL, Luck JE** (2014) The effect of elevated temperature on Barley yellow dwarf virus-PAV in wheat. *Virus Res* **186**: 97–103
- Parmesan C, Hanley ME** (2015) Plants and climate change: complexities and surprises. *Ann Bot* **116**: 849–864
- Prasch CM, Sonnewald U** (2013) Simultaneous Application of Heat, Drought, and Virus to Arabidopsis Plants Reveals Significant Shifts in Signaling Networks. *Plant Physiol* **162**: 1849–1866
- Qu F** (2010) Antiviral Role of Plant-Encoded RNA-Dependent RNA Polymerases Revisited with Deep Sequencing of Small Interfering RNAs of Virus Origin. *Mol Plant Microbe Interact* **23**: 1248–1252
- Ramegowda V, Senthil-Kumar M** (2015) The interactive effects of simultaneous biotic and abiotic stresses on plants: Mechanistic understanding from drought and pathogen combination. *J Plant Physiol* **176**: 47–54
- Roossinck MJ** (2012) Plant Virus Metagenomics: Biodiversity and Ecology. *Annu Rev Genet* **46**: 359–369
- Rosenthal WD, Arkin GF, Shouse PJ, Jordan WR** (1987) Water Deficit Effects on Transpiration and Leaf Growth. *Agron J* **79**: 1019–1026
- Ruijter JM, Ramakers C, Hoogaars WMH, Karlen Y, Bakker O, Hoff MJB van den, Moorman AFM** (2009) Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of quantitative PCR data. *Nucleic Acids Res* **37**: e45–e45
- Soosaar JLM, Burch-Smith TM, Dinesh-Kumar SP** (2005) Mechanisms of plant resistance to viruses. *Nat Rev Microbiol* **3**: 789–798
- Suntio T, Mäkinen K** (2012) Abiotic stress responses promote Potato virus A infection in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Pathol* **13**: 775–784
- Suzuki N, Rivero RM, Shulaev V, Blumwald E, Mittler R** (2014) Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytol* **203**: 32–43
- Trebicki P, Nancarrow N, Cole E, Bosque-Pérez NA, Constable FE, Freeman AJ, Rodoni B, Yen AL, Luck JE, Fitzgerald GJ** (2015) Virus disease in wheat predicted to increase with a changing climate. *Glob Change Biol* **21**: 3511–3519

- Uzest M, Gargani D, Drucker M, Hébrard E, Garzo E, Candresse T, Fereres A, Blanc S** (2007) A protein key to plant virus transmission at the tip of the insect vector stylet. *Proc Natl Acad Sci* **104**: 17959–17964
- van Munster M, Yvon M, Vile D, Dader B, Fereres A and Blanc S.** Submitted. Water stress enhances the transmission of plant viruses by insect vectors. *Global Change Biology*
- Vile D, Pervent M, Belluau M, Vasseur F, Bresson J, Muller B, Granier C, Simonneau T** (2012) Arabidopsis growth under prolonged high temperature and water deficit: independent or interactive effects? *Plant Cell Environ* **35**: 702–718
- Wilkinson S, Davies WJ** (2002) ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ* **25**: 195–210
- Wintermantel WM, Cortez AA, Anchieta AG, Gulati-Sakhuja A, Hladky LL** (2008) Co-Infection by Two Criniviruses Alters Accumulation of Each Virus in a Host-Specific Manner and Influences Efficiency of Virus Transmission. *Phytopathology* **98**: 1340–1345
- Xie WS, Antoniw JF, White RF, Jolliffe TH** (1994) Effects of beet cryptic virus infection on sugar beet in field trials. *Ann Appl Biol* **124**: 451–459
- Xu P, Chen F, Mannas JP, Feldman T, Sumner LW, Roossinck MJ** (2008) Virus infection improves drought tolerance. *New Phytol* **180**: 911–921

Annexes :

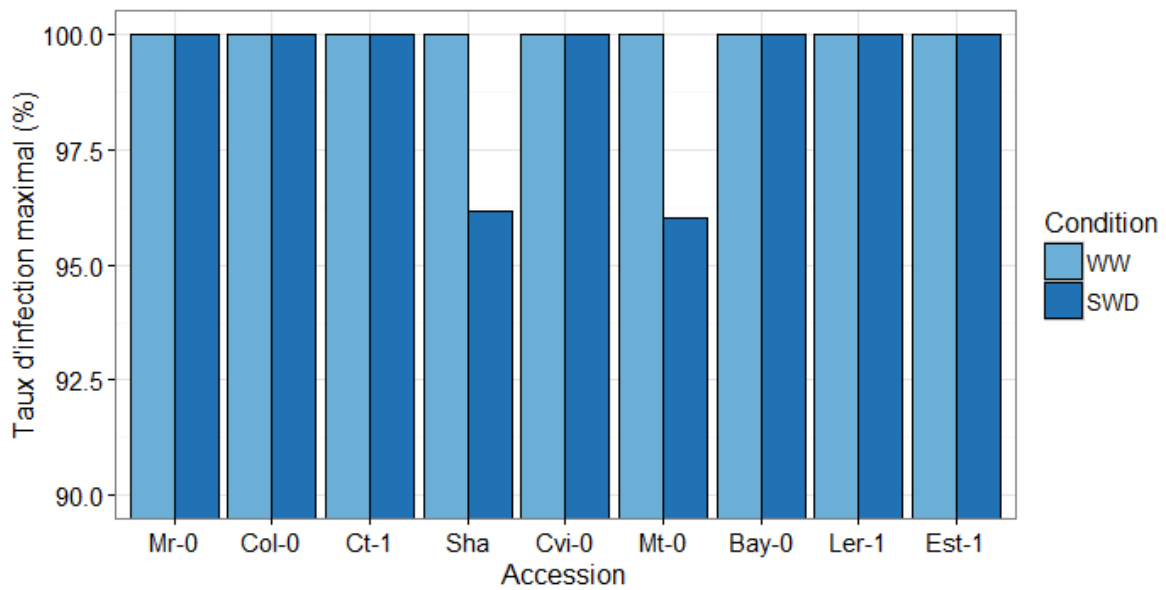


Figure S1 : Taux de pourcentage d'infection en condition bien irriguée (WW ; bleu clair) et en condition de stress hydrique sévère (SWD ; bleu foncé).

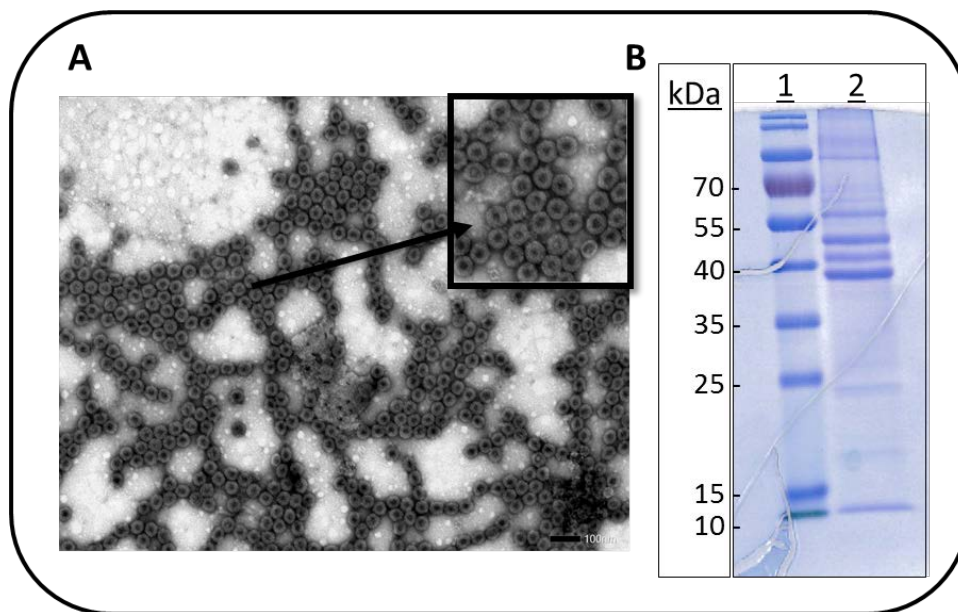


Figure S2 : Illustration photographique de la purification partielle réalisée sur le CaMV : A) Particules virales du CaMV colorées négativement et observées en microscopie électronique. La barre d'échelle représente 100 nm. B) 7.5µl de la purification (piste 2) a été chargé sur gel SDS-PAGE 12% puis coloré au Bleu de Coomassie après électrophorèse. Les poids moléculaires du marqueur (piste 1) sont indiqués à gauche du gel. On peut observer les 3 bandes caractéristiques (40-55kDa) correspondant à différentes formes de la protéine de capsid P4.

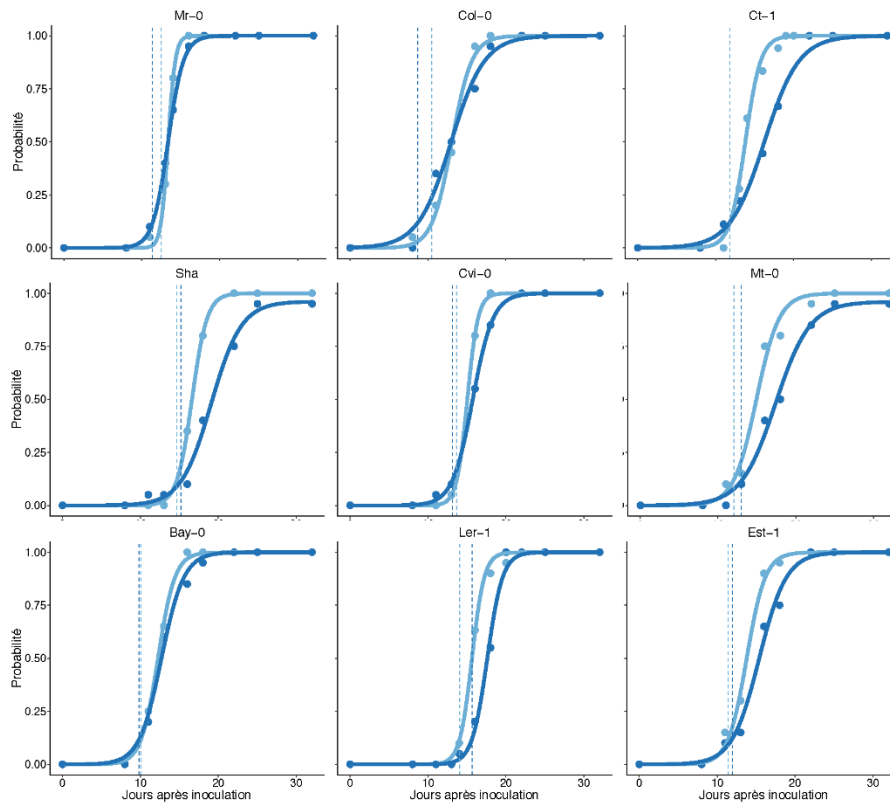


Figure S3 : Ajustement d'une courbe logistique à trois paramètres de forme : $A / (1 + \exp((4*\mu/A)*(\lambda - t) + 2))$, où A est le taux maximum d'inoculation, λ est le délai et μ est la vitesse maximale d'apparition des symptômes.

gène amplifié	CaMV		UBI		DIFFERENCE D'EFFICACITÉ	
	WW	SWD	WW	SWD	WW	SWD
Génotype					WW	SWD
Bay-0	1,84	1,85	1,88	1,87	-0,04	-0,02
Col-0	1,84	1,84	1,87	1,87	-0,03	-0,03
Ct-1	1,84	1,84	1,87	1,87	-0,03	-0,03
Cvi-0	1,84	1,83	1,89	1,87	-0,05	-0,04
Est-1	1,84	1,84	1,89	1,88	-0,05	-0,04
Ler-1	1,83	1,84	1,87	1,87	-0,04	-0,03
Mer-0	1,84	1,84	1,87	1,88	-0,03	-0,04
Mt-0	1,84	1,84	1,88	1,88	-0,04	-0,04
Sha	1,85	1,83	1,87	1,86	-0,02	-0,03

Figure S4 : Efficacité moyenne de PCR par génotype et par traitement. Cette efficacité a été évaluée à la fin des expériences de qPCR afin de vérifier la qualité des amorces et la robustesse de la PCR.

Tampon Tris-Glycine 10X

1.9M Glycine, 0.25M Tris-HCl, pH 8.8

Tampon de migration

Tris-Glycine 1X, SDS 0.1%

Tampon Laemmli 4XSDS 8%, β -mercaptoéthanol 8%, Glycérol 60%, Bleu de Bromophénol, 0.2M Tris-HCl, pH 6.8**Composition des gels de résolution de tassement pour SDS-PAGE**

	Gel de résolution 12 %				Gel de tassement		
	Conc. finale	Solution stock	5 ml		Conc. finale	Solution stock	5 ml
Acryl/bisacryl	12%	30%	1.5 ml		5.4%	30%	0.9
Tris pH 8.8	0.4M	2M	1ml		X	X	X
Tris pH 6.8	X	X	X		0.16M	2M	0.4ml
SDS	10%	0.1%	50 μ l		10%	0.1%	50 μ l
TEMED	0.1%	100%	5 μ l		0.1%	100%	5 μ l
APS	0.03mg/ml	1.5 mg/ml	100 μ l		0.03mg/ml	1.5 mg/ml	100 μ l
Eau Distillée			qsp. 5 ml				qsp. 5 ml

Figure S5 : Composition des gels pour l'électrophorèse