



HAL
open science

Existe-t-il une activation de la transmission pour le Virus de la mosaïque du concombre(CMV)?

Doâa Djerrab

► **To cite this version:**

Doâa Djerrab. Existe-t-il une activation de la transmission pour le Virus de la mosaïque du concombre(CMV)?. [Stage] 2015, 19 p. hal-02801431

HAL Id: hal-02801431

<https://hal.inrae.fr/hal-02801431v1>

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.

Master1

mention: Biologie des Plantes et des Micro-organismes,
Biotechnologies, Bioprocédés

specialité : interactions micro-organismes, hôtes et environnements

Année universitaire 2014-2015

Rapport de stage

Existe-t-il une activation de la transmission pour le Virus de la mosaïque du concombre(CMV)?

Doâa DJERRAB

Encadré par Martin DRUCKER, drucker@supagro.inra.fr

Période du stage : du 1er Mars au 30 Juin 2015

A l'INRA de Montpellier UMR BGPI



SOMMAIRE

INTRODUCTION	3
Les modes de transmission.....	3
Activation de la transmission	3
Le CMV	4
1. Biologie du CMV	4
2. Le cycle viral.....	5
3. Transmission et impact du CMV sur l'économie	5
Objectif.....	5
MATERIELS ET METHODES	6
Virus utilisé.....	6
Choix et Culture des plantes tests et sources.....	6
Pucerons et élevage.....	6
Inoculation mécanique ou par pucerons	6
Préparation de protoplastes.....	6
Tests de transmission.....	7
Test de la viabilité des protoplastes.....	7
Fixation et immunomarquage des protoplastes et d'échantillons de feuilles.....	8
Traitements des protoplastes et feuilles.....	8
SDS_Page et Western Blot	9
Dot Blot.....	9
Microscopie à épifluorescence et Microscopie confocal.....	9
RESULTATS	10
Répartition et localisation du CMV dans les tissus foliaires	10
1. Localisation intracellulaire du CMV dans les protoplastes.....	10
2. Localisation dans les feuilles.....	10
Test de transmission	11
1. Détermination de l'âge des plantes et du stade d'infection optimale pour isoler les protoplastes et faire des tests de transmission.....	11
2. Détermination du temps d'acquisition	11
3. Effet de différents traitements sur la transmission du CMV	12
Induction de stress sur les protoplastes.....	12
1. Effet de différents traitements sur la protéine de capsid par western blot.....	12
2. Effet des traitements sur la répartition du CMV par microscopie en immunofluorescence	13

CONCLUSION ET PERSPECTIVES	14
Localisation et répartition du CMV dans les protoplastes.....	14
Localisation et répartition du CMV dans les tissus foliaires au cours de l'infection	14
Optimisation des tests de transmission	14
1. Détermination de l'âge des plantes et du stade d'infection pour faire les tests de transmission..	14
2. Détermination du temps d'acquisition optimal.....	15
Effet de différents traitements sur la transmission du CMV	16
Induction de stress sur les protoplastes.....	16
1. Effet de différents traitements sur la protéine de capsid par western blot.....	16
2. Effet des traitements sur la répartition du CMV par microscopie en immunofluorescence	16
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	17
ANNEXE	19

INTRODUCTION

Les maladies provoquées par les phytovirus sont un problème majeur pour les agriculteurs. Il n'existe pas de lutte avec des virocides. Ainsi la destruction par l'arrachage ou le feu des champs concernés, l'emploi des variétés résistantes et la lutte de la transmission restent les seules solutions pour que l'infection ne se propage pas. De plus, la sélection ou la genèse de plantes résistantes est très complexe à mettre en œuvre.

Concernant la transmission, comme les plantes sont immobiles, la transmission de plante à plante se fait souvent par des vecteurs tels que les insectes (essentiellement des piqueurs suceurs comme les pucerons), les nématodes et même les champignons du sol. La méthode actuelle pour empêcher la transmission est l'emploi des insecticides nocifs pour l'environnement visant à détruire les vecteurs et qui ne marchent pas toujours à cause des résistances (Osta. 2012). Les études visant à comprendre les interactions hôte, parasite et vecteur sont alors essentielles pour permettre de développer de nouvelles méthodes de lutte contre les phytovirus, moins nocives pour l'environnement.

Lors de ce stage la transmission du virus de la mosaïque du concombre (CMV) a été étudiée et comparée avec celle du virus de la mosaïque du chou fleur (CaMV).

Les modes de transmission

Il existe deux types de transmission, la transmission verticale et la transmission horizontale. La transmission horizontale peut être abiotique (mécanique) ou par vecteur.

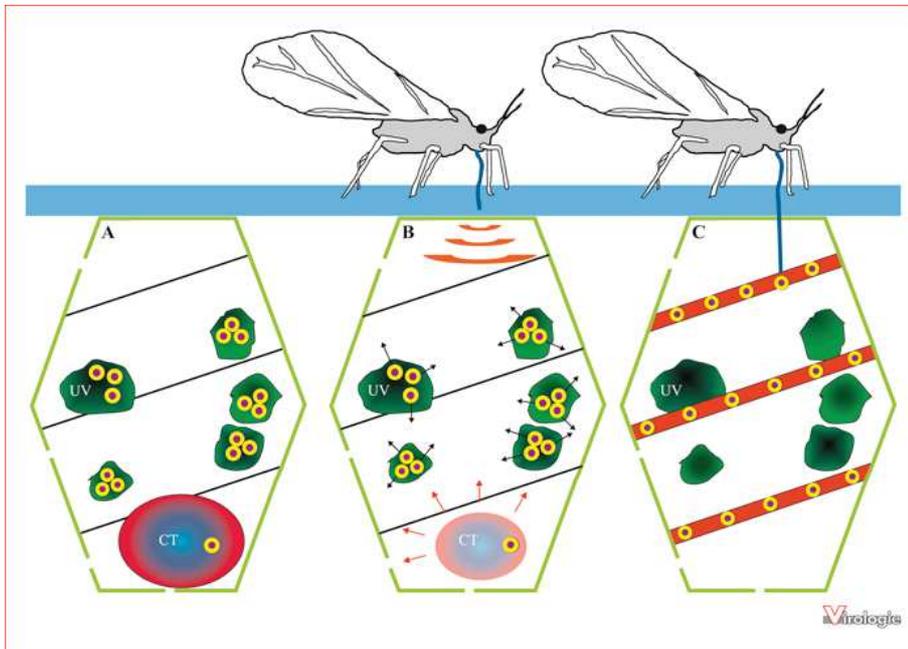
Il existe deux modes de transmission par vecteur (revu par Blanc et al .2014). Lors de la transmission circulante (persistante), le virus transverse la paroi intestinale, se retrouve dans l'hémolymphe puis est transporté jusqu'aux glandes salivaires où il sera stocké le temps qu'il soit injecté dans une plante via la salive.

Lors de la transmission non circulante (non persistante), le virus ne pénètre jamais le milieu intérieur. Il reste accroché aux pièces buccales du vecteur. La particule peut s'accrocher soit par la stratégie capsidale c'est-à-dire que le virus se fixe via sa capsidale sur un récepteur du stylet soit par stratégie helper via un facteur assistant qui lie la capsidale au récepteur (revue par Brault et al. 2010).

Activation de la transmission

L'étape d'acquisition lors de la transmission a toujours été considérée comme un événement plus au moins accidentel où le vecteur acquiert le virus simplement en ingérant de la nourriture. Des études avec le Cauliflower mosaic virus (CaMV), le virus modèle de l'équipe d'accueil, ont montré que ce n'est pas toujours le cas. Sa transmission pouvait être « activée ». Le CaMV est un virus à ADN double brin circulaire de 8 kpb encapsidé dans une particule virale à symétrie icosaédrique de 50 nm de diamètre et un virus à transmission non circulante et à stratégie helper (revu dans Bak et al. 2014). Le virus s'accroche à l'extrémité du stylet du puceron dans une zone appelée « acrostyle » (Uzest et al. 2010).

Le CaMV développe des corps d'inclusions dans les cellules formant des usines virales où a lieu la réplication du génome, l'assemblage des particules virales et qui sont aussi impliquées dans la transmission par les pucerons vecteurs (Bak et al. 2014).



Viralegis

Figure 1: Schéma montrant la participation des usines virales à la transmission du CaMV par puceron. **A)** Les cellules végétales infectées contiennent de nombreuses usines virales (UV, en vert) et un seul corps à transmission (CT, en rouge-bleu) contenant de la protéine virale P2 qui est nécessaire pour la transmission, sous une forme non activée. La majorité des virions (cercles jaunes-violettes) sont localisés dans les usines virales. **B)** Lorsqu'un puceron vecteur atterrit sur une plante et insère ses stylets (trait bleu foncé) dans les cellules végétales, la piqûre élicite (vagues oranges) une réaction de défense de la plante et, indépendamment ou pas, une réaction des usines virales et du corps à transmission : le corps à transmission se désintègre instantanément (flèches rouges et couleur plus clair du CT). Simultanément et avec la même cinétique, les usines virales libèrent des virions (flèches noires). **C)** Cela aboutit en quelques secondes dans la formation des réseaux mixtes sur les microtubules (traits fin noirs), dans toute la cellule. Ces réseaux (ou corps à transmission « activé ») sont composés de P2, (bandes rouges) et virions. Les complexes transmissibles (composés de P2 et virions) sont alors répartis dans toute la cellule et facilement accessibles pour le puceron. Le mécanisme présenté sur cette figure est réversible et, quelques minutes après le départ du puceron, la cellule infectée repasse de l'état « C » à l'état « A ». (d'après Bak et al. 2014)

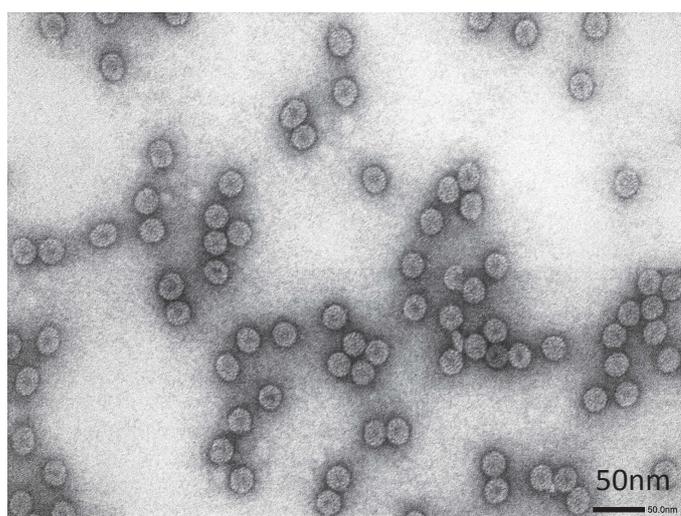


Figure 2: Observation d'une purification du CMV au microscope électronique à transmission (photo fournie par Daniel Gargani)

D'autres corps d'inclusions sont retrouvés, appelés « corps à transmission » ou *transmission bodies* (TB) contenant P2, une protéine virale dite « facteur assistant » qui permet la transmission du virus (Armour SL et al. 1983 in Martinière et al. 2009) ainsi que quelques particules virales. De plus, Il n'y a qu'un seul TB par cellule (Khelifa et al. 2007). Ces deux d'inclusions jouent un rôle dans l'activation et la transmission (figure 1). L'observation des cellules végétales a montré que lorsqu'un puceron pique dans une cellule, les usines virales libèrent des virions et les TB se désintègrent. Les particules virales et P2 se retrouvent alors réparties sur les microtubules, formant des complexes transmissibles facilitant ainsi l'acquisition par le puceron. Après le départ du puceron les TB se reforment et les virions rentrent dans les usines virales. Ce phénomène est schématisé dans la figure 1 (Martinière et al. 2013 in Bak et al. 2013). Lorsqu'on inhibe la formation des complexes transmissibles sur les microtubules, la transmission est inhibée aussi. Ceci montre qu'il s'agit d'un effet biologique et que le CaMV réagit à la présence de son vecteur pour initier la transmission, du jamais vu pour un virus.

Cette réaction est nommée « l'activation de la transmission » et au moins quatre questions nous viennent donc à l'esprit : Quels sont les éliciteurs responsables de cette activation de la transmission ? Comment est-ce que le signal initial est transmis ? Quels sont ses mécanismes cellulaires ? Et est ce que cette activation existe également chez d'autre virus ?

Pour cela des modulateurs perturbant plusieurs cascades signalétiques et autres substances ont été testées sur la transmission grâce à une méthode, le VAPA (Martinière et al. 2011b) décrite dans la partie Matériels et Méthodes. Ainsi il a été découvert que l'azoture (NaN_3) et le dioxyde de carbone (CO_2) sont des activateurs de la transmission du CaMV et le lanthane (LaCl_3) un inhibiteur.

Pour déterminer si d'autres virus ont une activation de la transmission, le TuMV (Turnip mosaic virus) qui utilise un helper comme le CaMV et qui est aussi transmis par les pucerons, est actuellement étudié par l'équipe. Les premières expériences montrent que sa transmission est aussi activée par l'arrivée du vecteur. Au cours de ce stage, on s'intéresse à l'étude du CMV (Cucumber mosaic virus) qui comme le CaMV et le TuMV est transmis de manière non-circulante par pucerons, mais suit la stratégie capsidique de la transmission.

Le CMV

1. Biologie du CMV

C'est un virus appartenant à la famille des *Bromoviridae* et au genre *Cucumovirus*. Il a un génome tripartite à ARN simple brin à sens positif (revu par Gallitelli 2000). Chaque brin d'ARN est encapsidé dans une capsidique icosaédrique d'un diamètre compris entre 28 et 30 nm (Kumari et al. 2013). L'inoculation des trois particules minimum est donc nécessaire pour déclencher une infection (Gallitelli 2000). L'ARN 1 et 2 codent pour les protéines 1a et 2a impliquées dans la réplication virale. L'ARN 2 code pour une petite protéine 2b qui est un suppresseur de l'ARN silencing (Pumplin et al. 2013 ; Wang et al. 2012 dans Krenz et al. 2015) et qui favorise le mouvement de cellule à cellule (Soard et al, 2002 dans Krenz et al. 2015). L'ARN 3 code pour la protéine de capsidique et une protéine appelé 3a, ces deux protéines jouent aussi un rôle dans le mouvement du virus dans la plante infectée (Suzuki et al.1991 in Perry et al. 1998). Certaines souches du CMV possèdent également un ARN satellite (Jacquemond. 1982).

2. Le cycle viral

Le cycle viral commence par la piquûre d'un puceron virulifère dans une cellule, le plus souvent une cellule de l'épiderme (référence Krenz). Les particules virales sont dégagées par la salive des stylets et déposées dans le cytoplasme. Puis les particules sont décapsidées et les ARN viraux sont libérés. Ils sont traduits par les ribosomes dans des protéines virales. La réplicase virale va assurer la production des ARN viraux, qui servent de matrice pour produire encore plus de protéines virales ou qui vont être encapsidées et former de nouvelles particules virales. Les autres protéines virales vont permettre les autres fonctions du virus citées ci-dessus. Au cours de l'infection le virus s'accumule et il passe sous forme des particules virales par les plasmodesmes dans les cellules voisines (Su et al. 2010). Après ce mouvement de cellule à cellule et l'infection locale, le virus entre sous forme de particule et par les plasmodesmes dans le phloème et il est transporté vers d'autres feuilles et organes de la plante, pour y installer une infection systémique. Le cycle se termine par la transmission du virus par pucerons vers une nouvelle plante hôte.

3. Transmission et impact du CMV sur l'économie

Le CMV est transmis par un mode non persistant et non circulant (Figure 1). Il peut être transmis par plus de 80 espèces de pucerons. Dans le sud de la France il est essentiellement transmis par *Aphis gossypii* et *Myzus persicae* et (Labonne et al. 1982)(Jacquemond. 1982). Il fait partie des virus capables d'être transmis par les graines (Yang et al. 1997).

C'est le virus avec la plus large gamme d'hôte. Il touche à la fois les monocotylédones et les dicotylédones dont des plantes adventices qui servent de plantes réservoirs pendant l'hiver. De plus la répartition du CMV est mondiale et lorsqu'il touche une culture il peut provoquer sa perte totale. Dans les champs il infecte essentiellement les Cucurbitacées (Quiot et al ., 1979b, 1979c. in Jacquemond. 1982). En Europe, plusieurs cultures de tomates et de melons ont été ravagées par le CMV (Gallitelli. 2000). Il est responsable de symptômes de mosaïque et peut provoquer des nécroses létales. Les symptômes de nécroses sont dus à la présence, dans les particules virales, de l'ARN-5 (ARN satellite) de type D (Kaper et al. 1977 ; Jacquemond et al. 1981 ; in Jacquemond. 1982)(Escriu et al. 2000). Le développement de mosaïque a lieu si le virus ne contient pas d'ARN satellite ou s'il contient un ARN-5 de type R (Jacquemond et al. 1981 in Jacquemond. 1982). Toutes ces caractéristiques font de lui l'un des virus les plus redoutés.

Objectif

L'objectif sera de mettre en évidence un éventuel phénomène d'activation de la transmission chez le CMV. Le CMV est, contrairement au CaMV et au TuMV pour lesquels une activation de la transmission a pu être démontrée, un virus non-circulant à stratégie capsidique. L'activation de la transmission du CaMV et du TuMV a été démontrée grâce aux tests de transmission avec des protoplastes infectés comme source virale, la méthode dite VAPA (Martinière et al. 2011a). Parce que le VAPA n'a jamais été testé pour le CMV, le premier objectif de ce stage est de mettre en place le VAPA pour le CMV, et le deuxième objectif est de tester l'effet des différents modulateurs qui modifient la transmission du CaMV et TuMV sur la transmission du CMV. En parallèle, l'effet de ces modulateurs sur le CMV au niveau cellulaire par microscopie à immunofluorescence et au niveau de protéines par Western blot est étudié pour détecter un phénotype éventuel pour l'activation de la transmission du CMV.

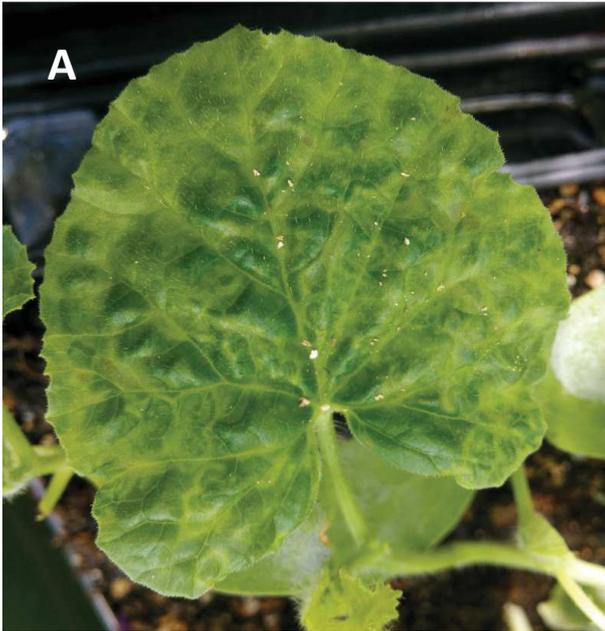


Figure 3: (A) Feuille de melon âgé de 1 mois et 23 jours après inoculation par le CMV, (B) feuille de melon saine du même âge.

MATERIELS ET METHODES

Virus utilisé

Nous avons utilisé la souche FNY du CMV qui infecte bien le navet et le melon, espèces de plantes compatibles avec le vecteur *Aphis gossypii*.

Choix et Culture des plantes tests et sources

Après quelques expérimentations nous avons choisi le melon (*Cucumis melo* L. subsp. *melo*) comme plante test car celle-ci présente des symptômes de mosaïque très tôt et bien visibles (Figure 3) et le navet (*Brassica rapa* L. subsp. *rapa*) a été utilisé comme plante source car il est plus facile à cultiver. Les plantes sources sont cultivées dans une serre avec un niveau de Confinement S2 et sont repiquées 8 jours après le semis. Elles sont élevées à 26°C le jour et 15°C la nuit avec une hydrométrie relative de 60%. Les plantes tests sont élevées dans une chambre de culture sous conditions contrôlées « jour long » avec 13 heures de jour à 23°C et 11 heures de nuit à 15°C. L'hydrométrie se situe entre 50% et 60%.

Pucerons et élevage

Nous avons utilisé le « puceron du melon et du cotonnier » *Aphis gossypii*. Nous l'avons élevé dans des cages sur des courgettes dans des cellules avec 16 heures de jour à 24° et 8 heures de nuit à 19°. Un déshumidificateur maintient d'humidité relative à environ 50%. Les pucerons sont transférés sur de nouvelles plantes (de 20 jours) toutes les semaines afin d'éviter la formation des aillés.

Inoculation mécanique ou par pucerons

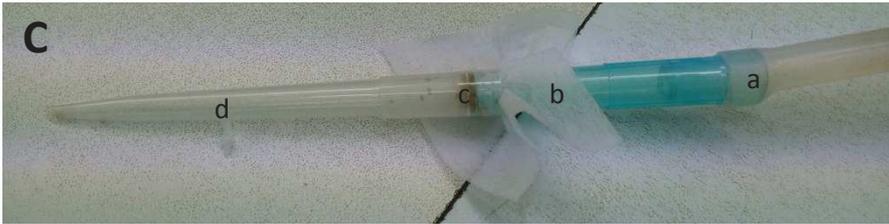
L'inoculation mécanique consiste à frotter un broyat de feuilles de navet infecté sur les deux premières feuilles de plantes saines. Pour obtenir le broyat, des feuilles ont été broyées dans un tampon phosphate (1M Na₂HPO₄/NaH₂PO₄), ajusté à pH 8 à raison de 1 ml de tampon par gramme de feuille. L'ajout d'un peu de carborundum dans le tampon a facilité le broyage et l'inoculation.

L'inoculation par pucerons consiste à déposer des pucerons (affamés pendant 1 h) pendant 5 minutes sur la feuille d'une plante infectée pour acquérir le CMV et puis les déposer, à l'aide d'un pinceau sur des plantes saines, âgées de 15 jours. Après 1 h d'inoculation, les pucerons sont tués avec un insecticide (Pyrimor) et les plantes sont cultivées comme décrits ci-dessus.

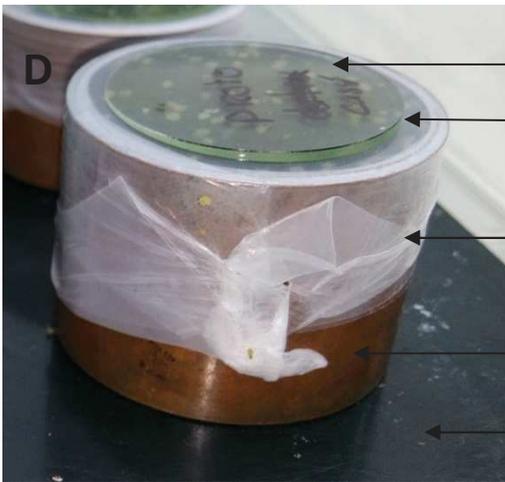
Préparation de protoplastes

Les tests de transmissions sont effectués sur des protoplastes. Ainsi nous pouvons contrôler l'état physiologique des protoplastes et tester des traitements susceptibles d'interférer avec la transmission. Comme les plantes sources de navet ne présentent pas de symptôme évident nous procédons avant chaque préparation de protoplastes à des dots blots sur des feuilles pour déterminer les plantes infectées.

Les protoplastes sont purifiés à partir de feuilles de plantes âgées d'environ 1 mois et inoculées avec le CMV une semaine après le semis, donc après environ 31 jours semaines dpi (Jours après inoculation). Tout d'abord, la cuticule est perméabilisée avec une solution de Domestos 4% pendant 1 minute. Puis la feuille est rincée à l'eau MilliQ, séchée avec un papier sopalin, puis découpée et posée face inférieure dans



- (a) Extrémité du tuyau relié à la pompe
- (b) Filtre miracloth
- (c) Pucerons ayant été aspirés
- (d) Cône pipette P1000 avec bout coupé



- Lamelle
- Protoplastes
- Parafilm
- Cylindre en laiton (pucerons à l'intérieur)
- Carrelage



Figure 4 : Le test de transmission à partir des protoplastes. (A) Récolte de pucerons sur feuille de courgettes ; (B) Pompe à vide pour récolter les pucerons ; (C) Montage pour aspirer les pucerons ; (D) dispositif d'acquisition ; (E) plantes tests dans un barquette de 24 pots.

une boîte de pétrie contenant 10ml de tampon de protoplastation. Ce tampon est un ensemble d'enzymes permettant la lyse de la paroi cellulaire. Les protoplastes de navet sont obtenus avec un tampon de protoplastation composé de mannitol 0,5M, CaCl₂ 1 mM, MES 10mM pH 5.6, 0.5% de Cellulase R10 et 0.05% de Macerozyme R10. La solution de protoplastation de Melon est composée de mannitol 0.4M, CaCl₂ 1 mM, MES 10mM pH 5.6, 0.5% de Cellulase R10 0.05% de Macerozyme R10, et de 0.06% de Driselase.

Nous incubons les protoplastes toute la nuit à 25° dans l'obscurité.

Les protoplastes sont ensuite filtrés avec un filtre Miracloth et dilués dans un tampon composé de mannitol 0.5M pour le navet ou 0.4M pour le melon ainsi que CaCl₂ 1 mM, MES 10mM pH 5.6. Ils sont ensuite rincés par centrifugation (630rpm, avec une accélération de 5 et un freinage de 1 à 25°c pendant 5 min) dans un rotor swing-out A-4-62 (Eppendorf). Nous avons effectué 2 rinçages avant de resuspendre les protoplastes dans du mannitol de façon à obtenir entre 3.0x10⁶ et 6.0x10⁶ protoplastes par ml, comme déterminé avec une chambre de comptage Malassez.

Tests de transmission

Les tests de transmissions sont effectués avec des pucerons *Aphis gossypii* non aillés. Les plantes test sont des melons âgés d'une semaine ayant encore que les cotylédons. Selon le test de transmission nous utilisons entre 8 et 20 plantes par condition (Figure 4).

Le principe de ce test est de déterminer la présence ou l'absence de transmission du CMV après acquisition à partir des protoplastes qui ont subi différentes conditions ou traitements. Pour cela nous récoltons des pucerons à l'aide d'une pompe à vide avec une dépression d'environ 20KPa (Figure 4.A et 4.B). Sur l'extrémité libre du tuyau relié à la pompe nous fixons un filtre Miracloth et un cône de pipette P1000 découpé qui sert comme réservoir pour les pucerons (Figure 4.3). Les pucerons sont ensuite transférés dans des cylindres en laiton que l'on recouvre de Parafilm bien étiré. Comme les pucerons sont attirés par la lumière nous mettons un éclairage (ampoule de 40W) à 30cm des cylindres pour guider les pucerons vers le Parafilm. On les affame au minimum une heure avant de déposer 300µl de protoplastes sur le Parafilm et une lamelle par-dessus (Figure 4.4). Les cylindres sont gardés dans une boîte humide pour éviter le dessèchement de la suspension de protoplastes pendant le temps d'acquisition.

Après 1 heure d'acquisition on dépose avec un pinceau environ 10 pucerons sur les cotylédons de plantes tests. Après 3 et 4 heures d'inoculation, les pucerons sont éliminés à l'insecticide Pyrimor et les plantes sont transférées dans une chambre à culture.

Les taux de transmission sont déterminés 1 mois plus tard par inspection visuelle des plantes. Si la plante est infectée on observe des mosaïques sur les feuilles (Figure 3).

Pour des tests de transmission de plante-à-plante, nous avons procédé comme pour une inoculation par puceron décrit ci-dessus.

Test de la viabilité des protoplastes

La viabilité des protoplastes a été déterminée par l'observation de protoplastes incubés avec 5µg/ml de FDA (fluorescéine diacétate) membrane-perméable et non-fluorescente qui, une fois diffusée dans une cellule, est métabolisée en fluorescéine qui fluoresce en vert, mais n'est retenue que dans les cellules



Figure 5: Dispositif du traitement de rondelles de feuilles de navet avec du CO₂: On dépose une rondelle de 24mm de diamètre au fond de la boîte entre deux béchers(flèche rouge) contenant de l'eau. De la carboglace est régulièrement ajoutée dans les béchers pour permettre la production constante de CO₂ qui se dépose au fond de la boîte . Une fois le temps d'exposition(15minutes) au CO₂ écoulé on dépose les pucerons sur les rondelles(face inférieure). Après 2 minutes d'acquisition on dépose 2 pucerons par plante test.

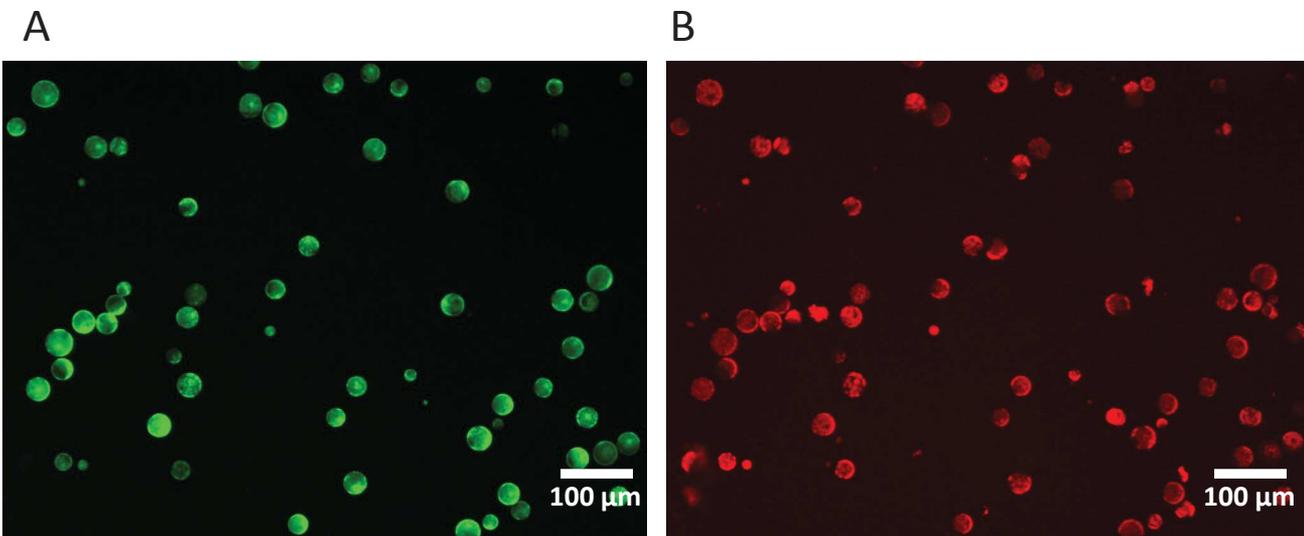


Figure 6: Test de viabilité avec FDA. Des protoplastes sont incubés avec du FDA, puis observés au microscope à épifluorescence à l'objectif 10x: (A) Les protoplastes viables fluorescent en vert grâce à la libération de fluorescéine ; (B) Les protoplastes totaux sont observés grâce à l'autofluorescence des chloroplastes.

Traitements	Concentration, puissance ou température	Temps d'incubation
Peroxyde d'hydrogène (H ₂ O ₂)	2mM	20 min
Chitine	0,2g/l	20min
Lanthane(LaCl ₃)	1 mM	40 minutes
Azoture(NaN ₃)	0.02%.	40 minutes
Latrunculine	10µM	30min
Acide salicylique	1mM	1 heure
Auxine	0.2mg/l	1 heure
Choc thermique	37°C	1 heure

Tableau 1: Concentration et temps d'incubation des différentes drogues testées

vivantes. On peut donc identifier les protoplastes vivants par microscopie à fluorescence (Figure 6). Les protoplastes totaux sont observés grâce à l'autofluorescence en rouge des chloroplastes. Le taux de viabilité a été déterminé par dénombrement des protoplastes vivants et totaux à l'aide de l'option « cell counter » du programme ImageJ.

Fixation et immunomarquage des protoplastes et d'échantillons de feuilles

La localisation du CMV a été observée par immunofluorescence sur des protoplastes ou des coupes de feuilles de melon ou navet. Pour cela les protoplastes ont été fixés avec 1 volume de glutaraldehyde 2% dans du mannitol 0.5M, HEPES 50mM pH 8. Après 3 rinçages au TS (Tris 50mM pH 7,4, NaCl 150mM), les protoplastes sont fixés sur lames polylysénées. Nous avons ensuite traité nos lames au NaBH₄ à 2g/l pendant 20min et saturées pendant 30 min ou plus avec du lait 5% dans TS. Pour marquer la protéine de capsid nous avons utilisé un anticorps primaire (polyclonal) produit dans le lapin dirigé contre la protéine de capsid (anti CP) et un anticorps secondaire anti-lapin couplé à un fluorochrome. Suivant le marquage nous avons utilisé le fluorochrome Alexa 488 ou Alexa 594. Pour le double marquage CP et tubuline α nous avons pris le même anti-CP et un anti-tubuline α monoclonal issu de souris et comme anticorps secondaire un anti-souris couplé à l'Alexa 488. Ces anticorps ont été utilisés à raison de 1 μ l pour 300 μ l de TS-lait et déposés sur lame pendant toute la nuit à 4°C ou minimum 2 heures à température ambiante. Le montage des lames pour la microscopie a été réalisé avec le Fluoromount ajouté de DAPI, un colorant des noyaux.

Pour déterminer la localisation du CMV dans les feuilles nous avons fixé des échantillons de feuilles de 1cm², pendant 1h dans 1% glutaraldehyde dans HEPES 50mM pH8. Nous avons recoupé les feuilles directement dans le fixateur. Après des rinçages au TS les morceaux sont inclus dans 5% agarose « low-melting » et nous avons fait des coupes transversales de feuilles de 55 μ m d'épaisseur avec un vibratome. Toutes les autres étapes du marquage étaient comme pour les protoplastes, sauf qu'on a utilisé du TS-BSA 3% à la place du TS-lait et que les temps d'incubations avec les anticorps étaient de minimum une nuit. Lors des derniers rinçages les parois ont été colorées au Calcofluor à 0.002%.

Les lames ont été observées au microscope confocal ou à épifluorescence et analysé avec les programmes ImageJ, ZEN ou Lsm Image Examiner.

Traitements des protoplastes et feuilles

1. Manipulations sur protoplastes

Chaque traitement a été effectué avec 500 μ l de protoplastes et une incubation à température ambiante et sous agitation lente. Les concentrations et les temps d'incubation des différentes drogues testé sont dans le tableau 1. Après écoulement du temps d'incubation, les réactions sont bloquées par l'ajout de Laemmli ou de fixateur. Les résultats sont donc observés par western blot ou par immunomarquage sur lame (Microscope confocal). Dans les cas où nous avons utilisé des protoplastes traités en test de transmission nous avons simplement attendu la fin du temps d'incubation et nous avons déposé 300 μ l sur le Parafilm (Figure 4.D).

2. Manipulations sur feuilles

Le test CO₂ est décrit dans la Figure 5.

SDS_Page et Western Blot

Après l'ajout du tampon de charge Laemmli dans les échantillons de protoplastes ou de feuille broyée, nous les avons chauffé à 105° pendant 5 minutes puis nous les avons chargé sur un gel de polyacrylamide 12% pour séparer les protéines par taille avec la méthode de SDS-PAGE. Suite à la migration des échantillons, nous avons transféré les protéines du gel sur membrane de nitrocellulose avec un appareil de transfert semi-sec. Après le transfert la membrane a été coloré par rouge de Ponceau pour vérifier le transfert des protéines, puis elle a été rincé 3 fois au TS avant d'être saturée avec du lait 5% dans du TS pendant 30 minutes. Nous avons ensuite procédé à la fixation de l'anticorps primaire (polyclonal) produit dans le lapin et dirigé contre la protéine de capsid (anti CP) et un anticorps secondaire anti-lapin couplé à la phosphatase alcaline. Nous avons utilisé l'anticorps primaire à raison de 1µl pour 1000 µl de TS-lait et l'anticorps secondaire à raison de 500 µl pour 1000 µl de TS-lait. Nous avons laissé incuber minimum une nuit l'anticorps primaire à 4°C et minimum 2 heures l'anticorps secondaire à température ambiante.

La révélation a été faite avec du NBT (Nitro Bleu Tetrazolium) et du BCIP (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphate) qui forme un précipité violet là où l'anticorps secondaire a s'accroché sur la membrane.

Dot Blot

Nous avons prélevé dans des tubes Eppendorf 2ml des rondelles de feuilles de 100mg auxquelles on a ajouté 2 billes de verre. Nous avons ensuite procédé à une congélation des échantillons par de l'azote liquide et à un broyage grâce à une broyeuse de marque Resch pendant 60s à 30Hz. Nous avons ensuite ajouté 400µl de tampon de solubilisation (0.5% SDS et 100mM TRIS, PH 6.8) et centrifugé (20°, 10 min, 13000 rpm). 2µl de surnageant ont ensuite été déposé sur une membrane de nitrocellulose et laissé sécher 10 minutes avant de procéder à la saturation de la membrane avec du lait et au marquage avec la même manière que pour le western blot.

Microscopie à épifluorescence et Microscopie confocal

Le microscope à épifluorescence (Olympus BX60) utilisé est équipé de filtres U-MNU2 pour la détection de la fluorescence bleu, U-MWB2 pour la détection du signal vert et Semrock TXRED-4040B pour la détection du signal en rouge.

Le microscope confocal est de marque Zeiss L580. Les Lasers d'excitation sont des laser LED. L'excitation du fluorochrome Alexa 488 est réalisée avec une raie d'excitation à 488nm et la bande d'émission récupérée de 490 à 530 nm. Pour le DAPI, la raie d'excitation placée à 405 nm et la bande d'émission récupérée de 405 à 465 nm. L'excitation du fluorochrome Alexa Fluor 594 est réalisée avec une raie d'excitation à 555 nm et la bande d'émission récupérée de 560 à 630 nm.

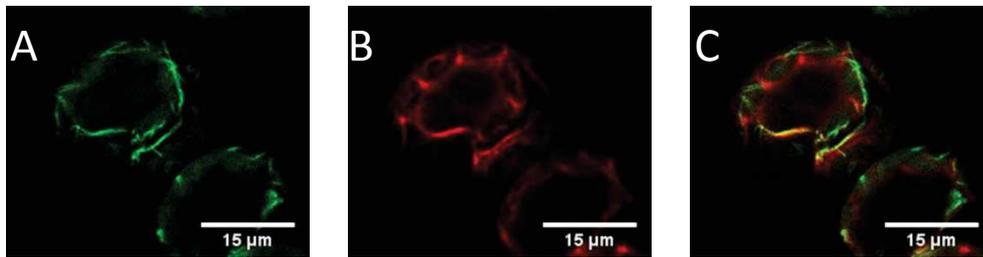


Figure 7 : Observation au microscope confocal d'un protoplaste de navet infecté par le CMV et double-marqué pour (A) des microtubules en vert; (B) de la protéine de capsid du CMV en rouge; (C) superposition des deux images. L'image présente un simple plan optique.acquis avec l'objectif 63x

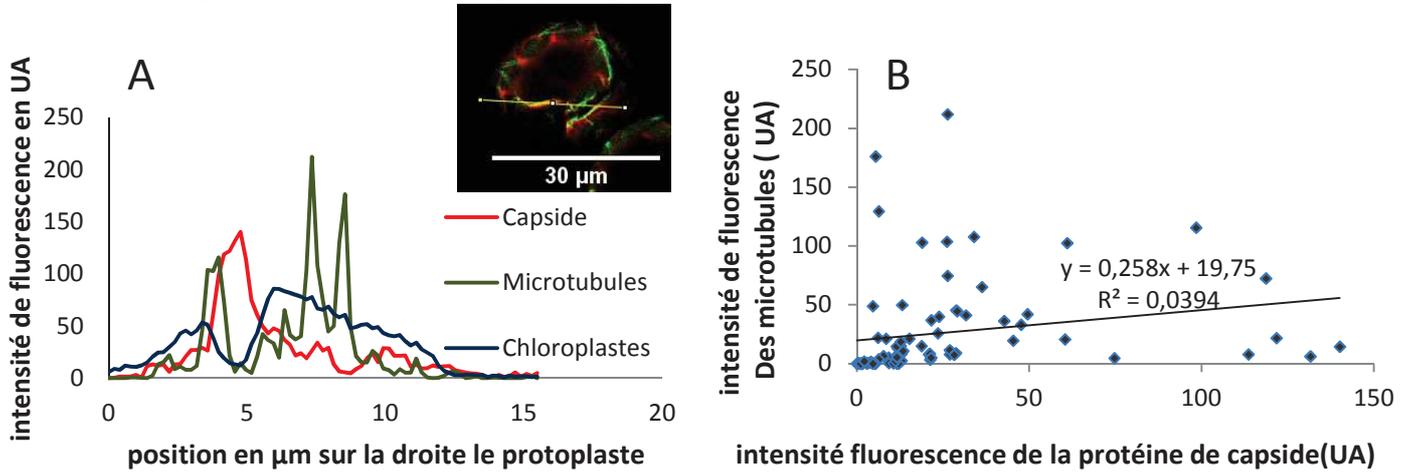


Figure 8: Profil d'intensité de fluorescence d'un protoplaste immunomarké. (A) Une ligne dans l'image d'un protoplaste immunomarké a été scannée pour déterminer l'intensité de fluorescence en fonction de la position sur une droite tracé dans ce protoplaste. Rouge = CP ; vert = tubuline ; bleu = autofluorescence des chloroplastes. (B) La corrélation entre l'intensité de la fluorescence des microtubules et de la CP sur cette même droite tracée dans le protoplaste montre que les deux marquages ne colocalisent pas

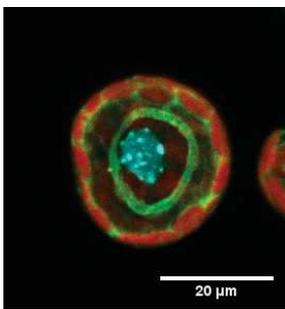


Figure 9: Distribution intracellulaire du CMV dans un protoplaste de navet, comme révélé par immunofluorescence contre la CP. L'image montre une projection confocal d'un protoplaste, acquise avec un objectif 63x, avec la CP en vert, le noyau en bleu et les chloroplastes en rouge.

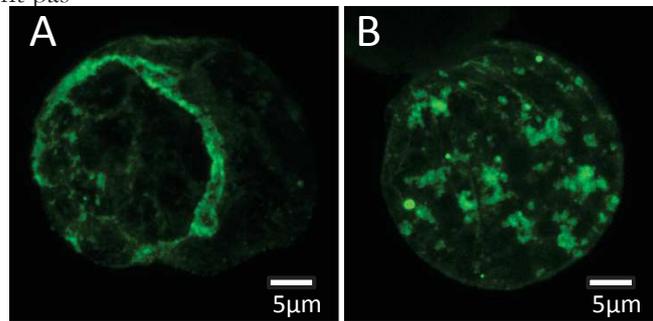


Figure 10: Répartition du CMV (vert) dans un protoplaste (A) issu d'une plante 20 jours après inoculation et (B) issu de la même plante 34 jours après inoculation. L'image présente une projection confocal acquise avec un objectif 63x.

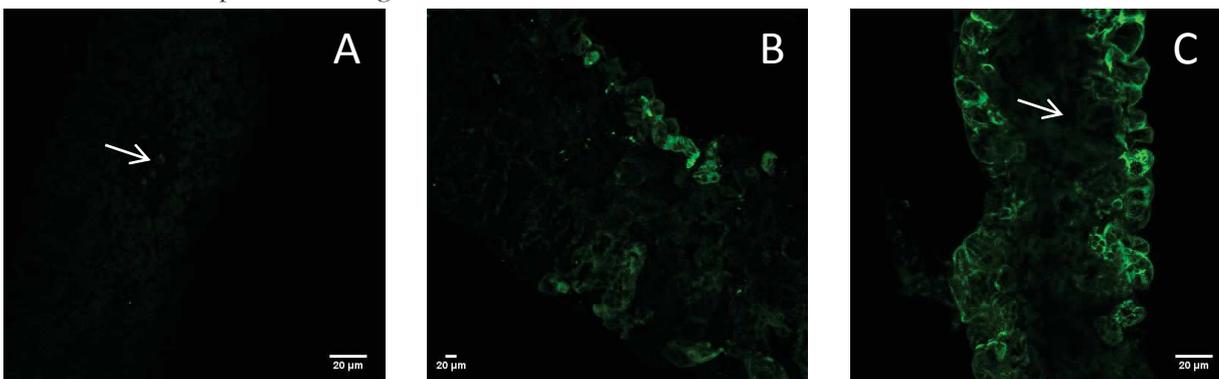


Figure 11: Accumulation du CMV (vert) dans des feuilles de melon (a) saine; (b) âgée de 27 jours et inoculée depuis 20 jours (c) âgée de 43 jours et inoculée depuis 36 jours. Les images présentent des projections confocales des coupes transversales acquises avec un objectif 63x. Les flèches montrent l'emplacement des nervures.

RESULTATS

Répartition et localisation du CMV dans les tissus foliaires

La connaissance de la répartition et de la localisation du CMV dans les tissus est importante pour pouvoir déduire l'âge des plantes et le stade d'infection optimale pour préparer des protoplastes aptes aux tests de transmission. Dans ce sens, nous avons déterminé la distribution du CMV dans des feuilles au cours de l'infection. En parallèle, nous avons purifié les protoplastes des mêmes feuilles.

1. Localisation intracellulaire du CMV dans les protoplastes

En immunofluorescence, l'observation des protoplastes de melon (Figure 10A) ou de navet (Figure 13) montre que le CMV est réparti de manière homogène dans le cytoplasme. Il est exclu des chloroplastes, de la vacuole et du noyau.

En revanche, lorsqu'on observe les protoplastes à des stades d'infection avancés, on observe une répartition granuleuse de l'infection chez le melon (Figure 10B) mais pas chez le navet (Figure 13). Pour le melon il y a probablement eu une progression vers des inclusions ou des structures granuleuses (Figure 10).

De plus on peut parfois observer un phénomène curieux, le CMV semble se concentrer près de la membrane plasmique et de l'enveloppe nucléaire et ceci donne aux protoplastes de navet des formes de « beignet » pour le marquage du CMV lorsque l'infection est bien visible (Figure 9).

Nous avons également marqué les microtubules parce qu'un autre virus, le CaMV, s'associe de manière transitoire aux microtubules pour la transmission. L'observation de protoplastes de navets montre que le CMV n'est pas localisé sur les microtubules sous aucune condition testée. En effet on observe rarement des colocalisations de marquage et quand il y en a cela semble être dû à des contraintes d'espace où le virus et les microtubules sont approchés. Ceci devient visible lorsqu'on trace (avec le programme ImageJ) sur les images des protoplastes des droites qui sont scannés pour établir des profils d'intensités de fluorescence (exemple de profil d'intensité figure 6A). Ainsi, on a pu observer que les profils d'intensité des microtubules et de la protéine de capsid ne se chevauchent pas, même s'ils sont identiques entre les chloroplastes, donc là où l'espace serré semble forcer une colocalisation entre CP et tubuline. On a quantifié la colocalisation entre microtubules et virus avec un graphique de corrélation et obtenu des coefficients proches de 0, dans notre exemple nous avons un coefficient de 0.19 (Figure 8B). Ceci confirme que le CMV ne colocalise pas avec les microtubules.

2. Localisation dans les feuilles

L'observation de coupes transversales de feuilles de melon et de navet (Figure 11, 12 et 15), immunomarquées pour la CP et les microtubules, montre une répartition non homogène du CMV dans les tissus quel que soit l'âge.

En effet, les cellules épithéliales et particulièrement celles qui sont proches des nervures sont infectées dès la première date d'observation (20 jours après inoculation pour le navet et 27 jours pour le melon) alors que les cellules du mésophylle sont infectées plus tardivement, 48 jours après inoculation (dpi) pour le

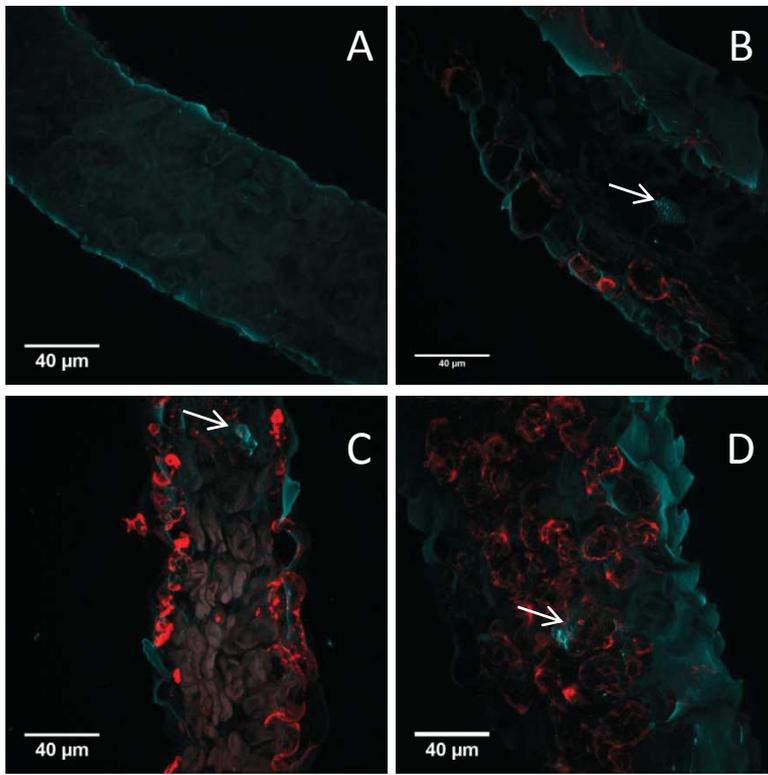


Figure 12: Accumulation du CMV (rouge) dans une feuille de navet (A) saine et âgée de 36 jours; (B) inoculée depuis 20 jours (C) inoculée depuis 34 jours et (D) inoculée depuis 48 jours. Les images présentent des projections confocales des coupes transversales acquises avec un objectif 63x. Les flèches montrent l'emplacement des nervures.

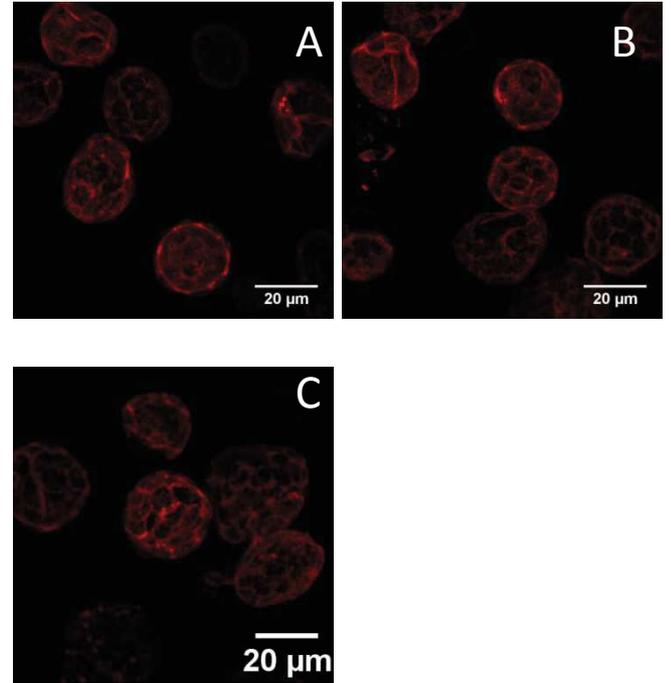


Figure 13: Accumulation du CMV(en rouge) dans des protoplastes de navet après (A)20 jours d'infection ; (B) 34 jours d'infection (C) 48 jours d'infection. Les images présentent des projections confocales acquises avec un objectif 63x.

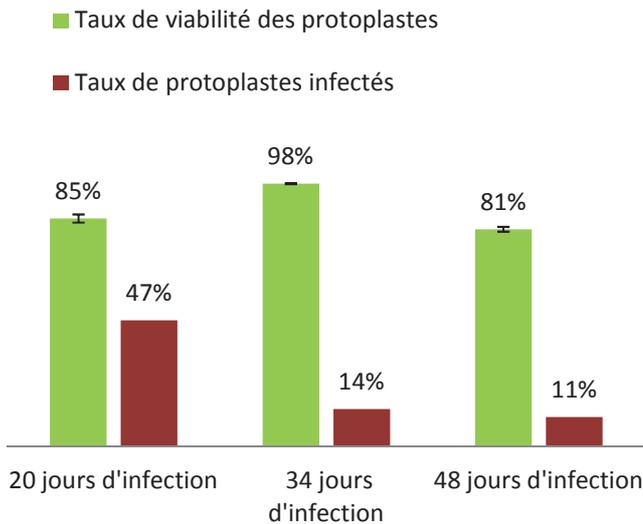


Figure 14: Taux de viabilité et taux de protoplastes infectés en fonction du stade d'infection. Il s'agit ici des protoplastes issus des mêmes feuilles qui ont été prises pour montrer l'accumulation virale dans les tissus (figure 12).

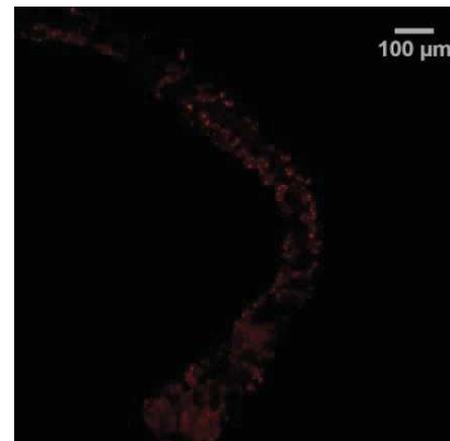


Figure 15: Accumulation du CMV (rouge) dans une feuille de navet inoculée depuis 34 jours. L' image présente une projection confocale d'une coupe transversale acquise avec un objectif 10x.

navet mais pour le melon on n'observe pas d'infection des cellules du mésophylle à 36 dpi. Dans le cas du melon, nous n'avons pas pu observer l'infection à 48 dpi, de l'oïdium se forme sur les plantes et nous empêche de garder les plantes plus longtemps.

A un stade précoce, on observe que le marquage du CMV est homogène dans le cytoplasme des cellules infectées alors qu'à un stade tardif il forme des agrégats.

Test de transmission

Parce qu'aucun protocole pour la transmission du CMV à partir des protoplastes n'était établi, on a d'abord testé des paramètres différents pour déterminer les bonnes conditions pour les tests de transmission.

1. Détermination de l'âge des plantes et du stade d'infection optimale pour isoler les protoplastes et faire des tests de transmission

L'efficacité de la protoplastation et la qualité des protoplastes obtenus peuvent varier énormément selon l'âge des plantes et le stade d'infection. Nous avons déterminé le bon moment pour préparer des protoplastes infectés. Pour cela nous avons immunomarcqué des feuilles de navet pour visualiser la distribution du virus à trois stades d'infection et avons préparé et immunomarcqué des protoplastes des mêmes feuilles et nous avons comparé les différents échantillons.

On observe que le taux de viabilité des protoplastes (Figure 14) reste constant au cours de l'infection. Cependant on observe que le taux de protoplastes infectés (Figure 14) baisse au cours de l'infection. Il chute de 33% entre 20 jours d'infection et 34 jours d'infection.

Par contre, l'observation des coupes de feuilles dont sont issues ces protoplastes (Figure 12) montre une infection qui s'intensifie au cours du temps et se propage dans les cellules de l'épiderme puis celle du mésophylle. Ceci est contradictoire avec le taux de protoplastes infectés obtenu avec ces mêmes feuilles.

2. Détermination du temps d'acquisition

D'abord nous avons testé en deux répétitions différents temps d'acquisition de 15 minutes à 1 heure. Pour le navet, lors de la première répétition (Figure 16A), nous avons obtenu un taux transmission nul à 15 min mais élevé après 1 heure d'acquisition avec 38% de plantes infectées. Avec le témoin de plante à plante ont à 50% de plantes infectées.

En revanche, pour le melon aucune transmission à partir des protoplastes n'a été observée, alors que le témoin de plante à plante a montré un fort taux de transmission.

L'immunomarcage a montré, que le taux de protoplastes infectés dans les suspensions qui ont été employées dans les tests de transmission, est élevé chez le navet avec plus de la moitié des protoplastes infectés et est très faible chez le melon (Figure 16B).

Les tests FDA de viabilité ont montré que le taux de protoplastes viables (Figure 16B) est plus élevé pour le navet que pour le melon. Nous avons également déterminé la viabilité de protoplastes sains qui est plus élevée que les protoplastes infectés.

Comme nous n'avons pas pu obtenir de la transmission à partir des protoplastes de melon sous aucune condition, seul les protoplastes de navet ont été utilisés pour les autres tests de transmission sauf pour un test de sonication de protoplastes décrit dans la partie suivante.

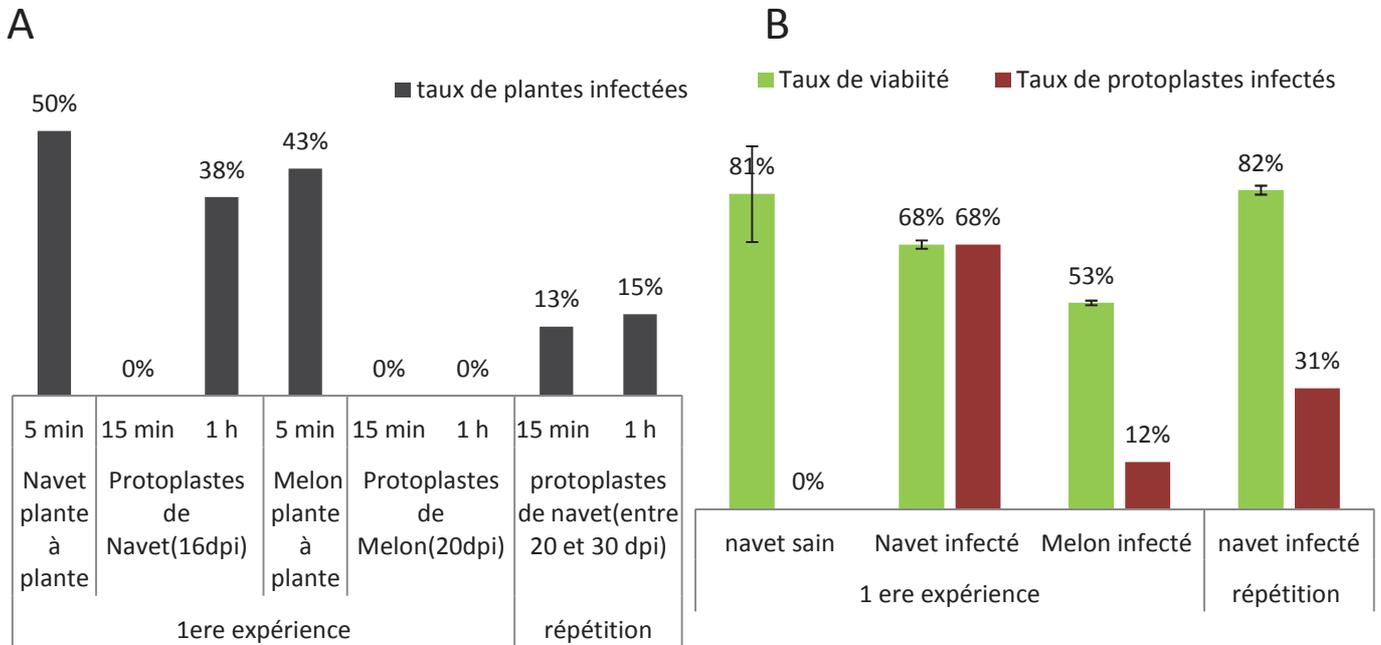


Figure 16: Effet du temps d'acquisition sur la transmission du CMV à partir des protoplastes : (A) taux de transmission en fonction de deux temps d'acquisition et de l'espèce de protoplastes. (A) gauche est montré un témoin positif (transmission par pucerons de plante à plante) ; (B) taux de viabilité des protoplastes et taux de protoplastes infectés utilisés en tests de transmission présentés en (A).

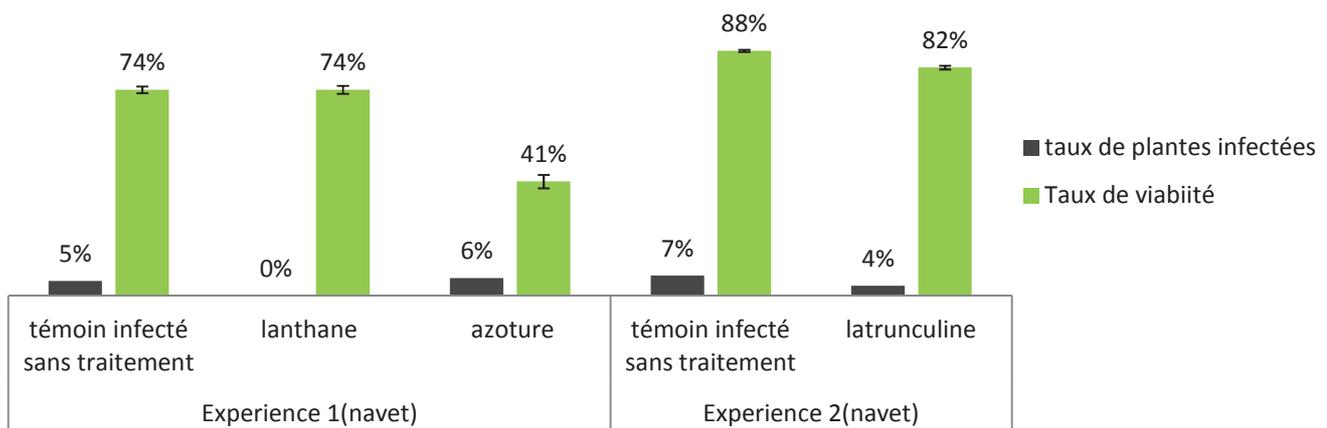


Figure 17: Effet du lanthane, azoture et de la latrunculine sur la transmission à partir des protoplastes de navet: Les histogrammes montrent les taux de transmission et les taux de viabilité des protoplastes pour 2 expériences indépendantes et dans les conditions indiquées

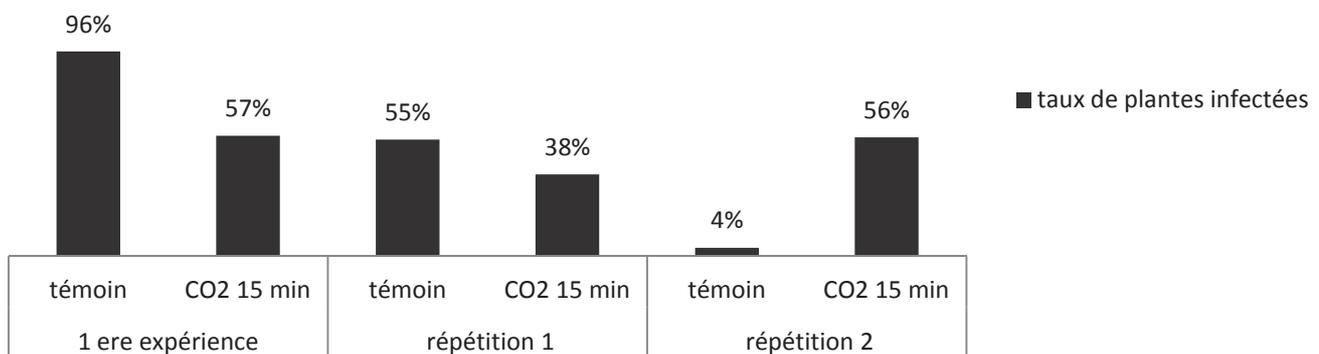


Figure 18: Effet de CO2 sur la transmission de plante à plante du CMV. Les histogrammes montrent les taux de transmission en utilisant des rondelles de feuille de navet comme source virale lors de trois répétitions et un traitement de 15 minutes au CO2.

Lors de la deuxième répétition le taux de transmission est de 13 % après 15 min d'acquisition et de 15 % après 1 heure d'acquisition. Le taux de protoplastes infectés est de 31 % et le taux de viabilité de 82 % pour cette expérience (Figure 16).

Si on combine les deux expériences, 15 minutes d'acquisition étaient suffisantes pour permettre la transmission dans une répétition sur deux, mais 1 heure d'acquisition était nécessaire pour permettre une transmission dans les deux répétitions même si le taux de transmission est nettement plus élevé dans une des deux expériences. Nous avons alors choisi 1 heure d'acquisition pour les autres tests de transmission.

3. Effet de différents traitements sur la transmission du CMV

Pour déterminer s'il existe une activation de la transmission du CMV, nous avons perturbé différentes cascades signalétique puis nous avons effectué des tests de transmission.

Nous avons incubé des protoplastes avec du lanthane, un bloqueur des canaux calciques et de l'azoture un inhibiteur de la chaîne respiratoire, puis employé ces protoplastes dans des tests de transmission pour tester l'effet de ces substances sur la transmission (Figure 17). Nous avons observé des taux de transmission inférieur à 6 % pour les témoins et les conditions. Le taux de viabilité ne change pas en présence de lanthane par rapport au témoin. En revanche le taux chute en présence d'azoture.

Comme nous avons observé que le CMV ne localise pas sur les microtubules, nous avons testé l'effet de la latrunculine, qui dépolymérise les filaments d'actine, sur la transmission (Figure 17). Nous avons observé 4 % de plantes infectées en présence de latrunculine et 7 % de plantes infectées pour le témoin.

Nous avons incubé des rondelles de feuilles avec du CO₂ (qui active la transmission du CaMV) puis nous les avons utilisés dans des tests de transmission par pucerons (Figure 18). Lors de la première expérience on observe une baisse de 40 % de la transmission en présence de CO₂. Lors de la deuxième répétition on obtient également une baisse de la transmission mais moins importante de 17%. Lors de la troisième répétition on observe des résultats complètement contradictoires. 4% des plantes sont infectés chez le témoin alors que 56% des plantes sont infectées en présence de CO₂.

Comme la charge virale n'est pas homogène dans les tissus, les rondelles utilisées en tests de transmission ont été testées avec des dots blots. Nous avons observé qu'il n'y avait pas de corrélation entre l'intensité des dots et les taux de plantes infectés.

Induction de stress sur les protoplastes

1. Effet de différents traitements sur la protéine de capsid par western blot

Le traitement des protoplastes infectés avec le TuMV avec différents agents modifie l'état d'oligomérisation de HC-Pro, une protéine impliquée dans la transmission de ce virus et ceci corrèle avec une transmission altérée. On a voulu savoir s'il y a aussi une modification de la CP du CMV par les traitements. Nous avons donc testé l'azoture (un bloqueur de la chaîne respiratoire), le lanthane (un bloqueur des canaux calciques), le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) qui est une espèce réactive oxygénée (ROS, en anglais : Reactive Oxygen Species) qui agit comme un stress oxydant et la chitine qui est un éliciteur des mécanismes de défense contre les champignons et aussi un composant des stylets des pucerons ce qui pourrait activer la transmission.

Les protoplastes de navet ou de melon infectés traités avec du NaN₃, du H₂O₂ et de la chitine (Figure 19 de A et B) montrent comme avec le témoin la présence de la protéine de capsid à 30 KDa et la révélation

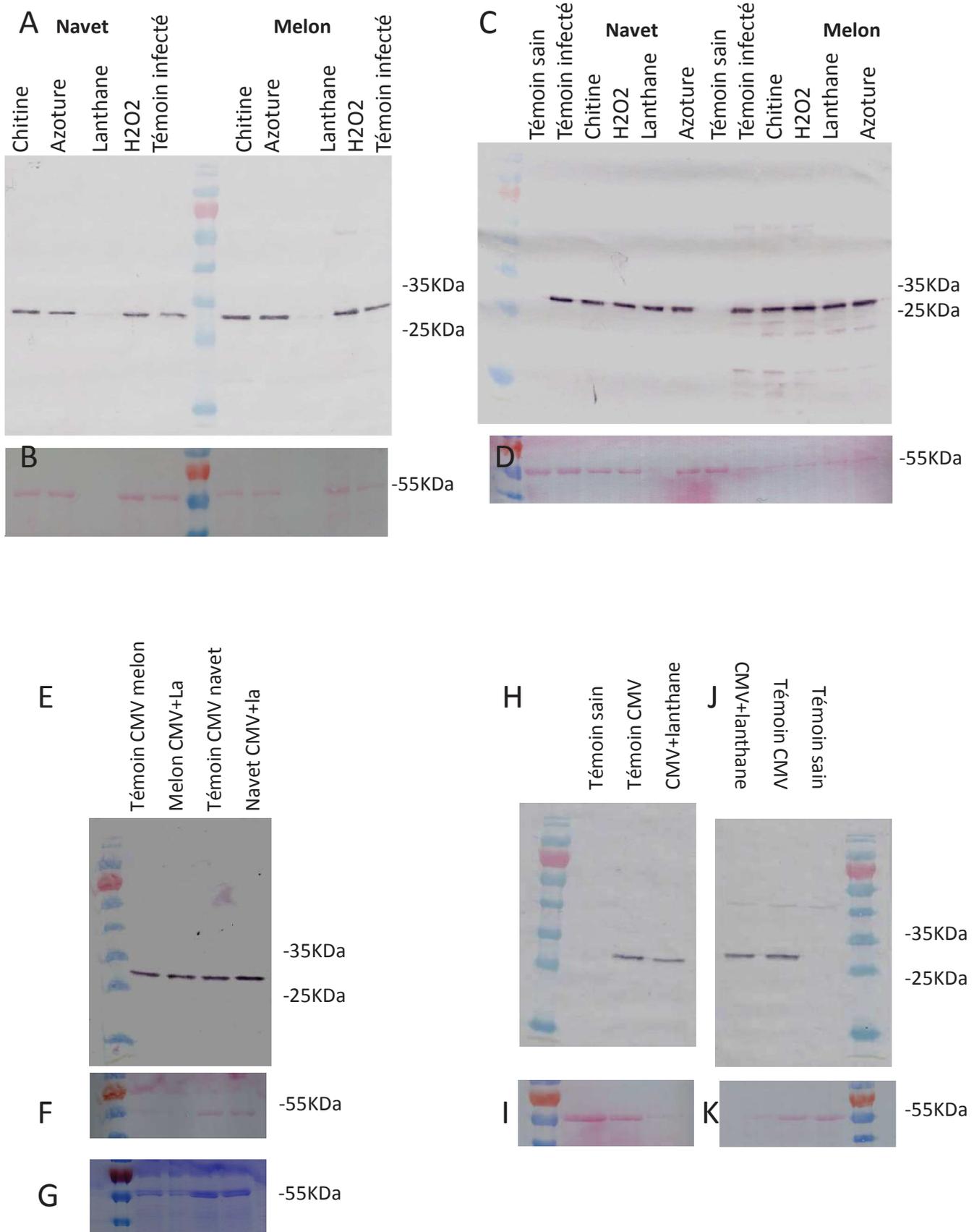


Figure 19: Effet des différents traitements sur la migration de la protéine de capside en SDS-PAGE. Des protoplastes ont été traités comme indiqué, puis séparés par SDS-PAGE et la position de la CP déterminée par Western blot après transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose. (A) révélation de la CP par réaction de la phosphatase alcaline après traitement des protoplastes de navet ou melon comme indiqué (B) Coloration des protéines au rouge de Ponceau avant la révélation de la CP ; (C) et (D) répétition de l'expérience, (E et F) répétition de l'expérience avec le traitement lanthane, (G) Bleu de Coomassie avec traitement lanthane, (H et I) répétition de l'expérience lanthane et (J et K) avec un autre anticorps.

des protéines totales au rouge de Ponceau révèle la présence d'une bande bien visible à 55 KDa. Il s'agit de la grande sous unité de la Rubisco qui nous a servi comme témoin pour la quantité de protéine chargée sur le gel. En revanche en présence de lanthane on observe l'absence de la protéine de capsid et de la sous unité de la Rubisco mais lors de la répétition de la même expérience on constate la présence de la protéine de capsid mais toujours l'absence de la sous unité de la Rubisco dans le cas du navet.

Comme les résultats en présence de lanthane sont contradictoires nous avons fait une répétition en traitant des protoplastes de melon et navet. Nous avons ensuite révélé après SDS-PAGE soit la totalité des protéines par une coloration au bleu de Coomassie soit la CP par western blot (Figure 19 E, F et G). Le bleu de Coomassie ne montre pas de différence entre les protoplastes traités et le témoin. En revanche au rouge de Ponceau la sous unité de 55 KDa de la Rubisco est présente chez le témoin navet est encore absente dans les protoplastes traités au lanthane. Les protoplastes de melon ne montrent pas de différence avec le témoin.

Nous avons également, fait une répétition en changeant d'anticorps anti-CP (Figure 19 H à K). Pour les deux anticorps, la bande correspondant à la sous unité de la Rubisco en présence de lanthane est absente mais la protéine de capsid est clairement révélée.

On a donc déduit que le NaN_3 , le H_2O_2 , la chitine et le lanthane ne montrent aucun effet sur la capsid en Western blot en condition dénaturante. En revanche en présence de lanthane on observe souvent l'absence de la grande sous unité de la Rubisco.

2. Effet des traitements sur la répartition du CMV par microscopie en immunofluorescence

La TA du CaMV est caractérisée par une relocalisation du virus et de la protéine assistant de la transmission P2 sur les microtubules. Cette réaction peut aussi être induite artificiellement par certains réactifs. Pour savoir si le CMV se relocalise aussi lors de ces traitements, des expériences similaires ont été faite avec des protoplastes infectés avec le CMV. Après traitement des protoplastes nous les avons fixés et nous avons marqué la protéine de capsid ainsi que les microtubules.

Nous avons observé deux phénotypes pour les microtubules et deux phénotypes pour la CP (Figure 21). Les résultats sont résumés par le tableau 2 et la spécificité de l'anticorps anti CP est montré dans la Figure 20.

Nous avons testé en plus du le lanthane, de l'azoture, du H_2O_2 , de la chitine et de latrunculine deux hormones : l'auxine et l'acide salicylique.

Les photos correspondant à tous les traitements sont en Annexe.

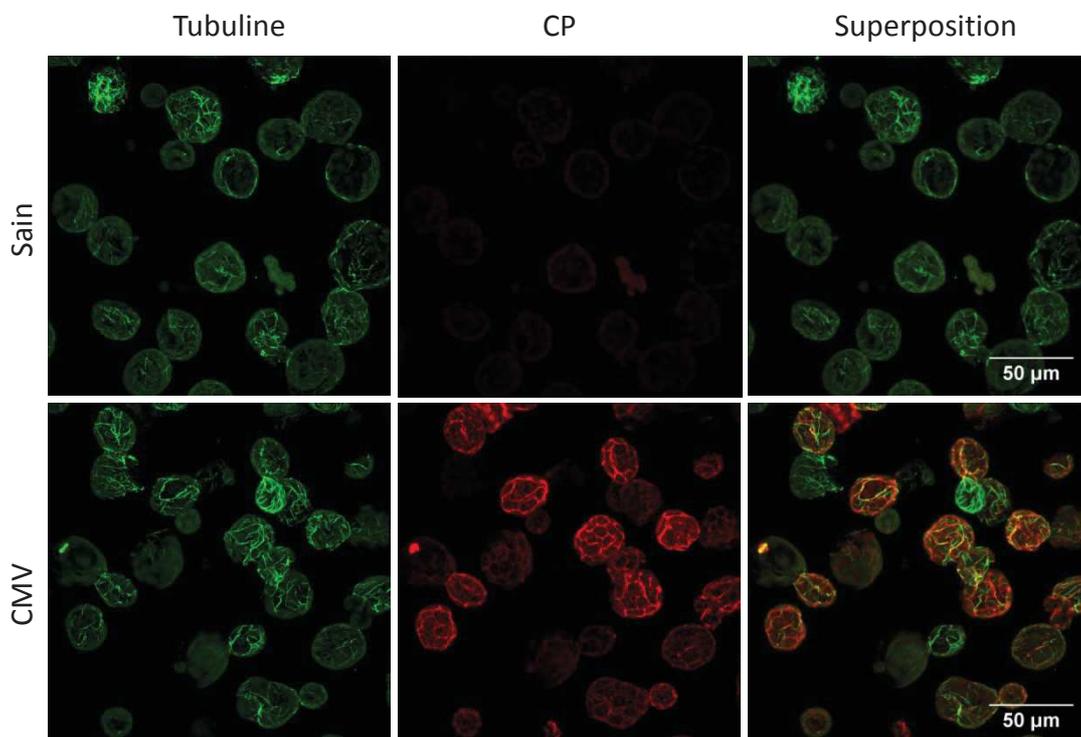


Figure 20: Spécificité de l'anticorps anti CP (rouge) et de l'anticorps anti tubuline α (vert) utilisé dans toutes les manipulations. Les images présentent des projections confocales acquises avec un objectif 63x.

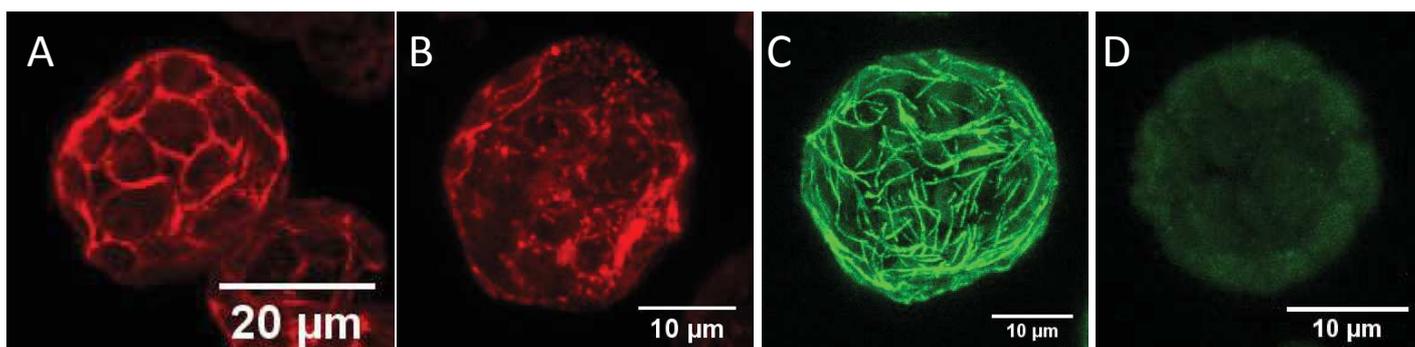


Figure 21: Représentation de 2 phénotypes de CP(rouge) et deux phénotypes de microtubules(vert) retrouvé lors de l'observation des protoplastes de navet infectés ou sain traités. (A) CP lisse qui correspond au phénotype du témoin sans traitement, (B) CP granuleux dans un protoplaste traité à l'auxine, (C) microtubules normal dans un protoplaste sain traité à la chitine, (D) microtubules dissociés dans un protoplaste traité à l'azoture. L'image présente une projection confocale acquise avec un objectif 63x.

Conditions testées ou stress induit	Protoplastes sain		Protoplastes infectés	
	Effet sur les microtubules	Effet sur la CP	Effet sur les microtubules	Effet sur la CP
Témoin aucun traitement	normal	lisse	normal	lisse
Lanthane	normal	lisse	normal	lisse
Chitine	normal	Granuleux ou lisse	normal	Granuleux ou lisse
Azoture	dissociés	granuleux	dissociés	granuleux
H2O2	normal	Granuleux ou lisse	normal	Granuleux ou lisse
Auxine	normal	Granuleux ou lisse	normal	Granuleux ou lisse
Acide Salicylique	normal	Granuleux	dissocié	Granuleux
Choc thermique 37°C		granuleux	normal	granuleux
Latrunculine		granuleux	normal	granuleux

Tableau 2: Effet des différents traitements sur la localisation intracellulaire de la CP et sur le cytosquelette de microtubules. Des protoplastes ont été traités comme indiqué, puis analysés par immunofluorescence contre la CP et la tubuline avec un microscope confocal. Les phénotypes sont présentés Figure 19.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Localisation et répartition du CMV dans les protoplastes

La répartition « en beignet » du CMV dans les protoplastes (Figure 9) suggère que le CMV interagit avec une protéine membranaire. En effet le CMV est concentré près de la membrane plasmique et de l'enveloppe nucléaire.

De plus, en absence des activateurs de la transmission du CaMV, le CMV ne colocalise pas avec les microtubules tout comme le CaMV. Il faudrait également tester la localisation du CMV près des gaines salivaires des pucerons comme il a déjà été fait pour le CaMV pour savoir si la présence du puceron a un effet sur le CMV.

On peut également se demander si le CMV n'est pas sur un autre composant du cytosquelette comme les filaments d'actine ou peut être que le virus est libre dans le cytoplasme. Pour voir si le CMV est perturbé par l'absence des filaments d'actine, on a observé des protoplastes infectés traités par un dépolymérisateur, la latrunculine et on observe que d'un seul coup le CMV forme des agrégats. Il faudrait également tester la latrunculine en test de transmission pour déduire si la perturbation des filaments d'actine joue un rôle dans la transmission du CMV.

Localisation et répartition du CMV dans les tissus foliaires au cours de l'infection

La répartition du CMV localisée d'abord dans les cellules épithéliales facilite probablement la transmission par pucerons. D'ailleurs le CMV est déposé par le puceron dans les cellules de l'épiderme (Krenz et al. 2015).

De plus, la répartition du CMV dans les feuilles au cours de l'infection montre que l'infection par le CMV est systémique. Cela veut dire que le CMV est arrivé via les tubes criblés, il a traversé les cellules compagnes et les cellules du mésophylle pour arriver à l'épiderme. L'absence de marquage dans les cellules du mésophylle en début d'infection est peut être due à un taux de réplication lent dans celle-ci. Peut être que les cellules de l'épiderme ont une spécificité qui les rend plus vulnérables au CMV. En effet on sait que des différences existent entre les cellules de l'épiderme et du mésophylle. Par exemple, les cellules de l'épiderme n'ont pas de chloroplastes.

La formation d'agrégats dans les cellules à un stade d'infection avancé semble être dû à une accumulation accrue du CMV, mais comme nous n'avons pas fait de western blot ou dot blot pour quantifier l'accumulation virale, on ne peut pas le confirmer.

Optimisation des tests de transmission

1. Détermination de l'âge des plantes et du stade d'infection pour faire les tests de transmission

Comme discuté précédemment l'infection se propage des cellules de l'épiderme vers les cellules du mésophylle et des agrégats de la CP se forment dans le cytoplasme des cellules au cours de l'infection. Lorsqu'on observe les protoplastes issus de ces mêmes feuilles on constate une répartition homogène dans

le cytoplasme de la CP aux trois stades d'infection (Figure 13). En revanche une différence importante existe entre les taux de protoplastes infectés. Plus le temps après inoculation augmente et moins il y a de protoplastes infectés dans nos préparations. Ces taux contredisent donc ce que l'on observe dans les coupes de feuilles. Ceci signifie que même si la plante la plus jeune est la moins infectée elle est celle qui permet de purifier le plus de protoplastes infectés. L'étape de protoplastation est sûrement en cause. D'abord, les cellules de l'épiderme ne sont normalement pas protoplastées à cause de leur paroi épaisse. Donc on protoplaste surtout les cellules du mésophylle. On peut aussi assumer, que les feuilles à un stade d'infection avancé sont probablement composées de cellules fragilisées par l'âge et l'infection. Seules les cellules les plus récemment infectées survivent donc à la protoplastation. Le stade d'infection optimal semble donc être de 20 jours. Comme cette expérience a été réalisée une seule fois il faudrait la répéter pour la valider.

2. Détermination du temps d'acquisition optimal

Un temps d'acquisition optimal permettrait d'obtenir 50% de transmission. Ainsi les effets d'un traitement sur la transmission (inhibition et surtout activation) seraient mieux visibles. Or nous n'avons réussi à obtenir un taux de transmission optimal que lors du 1^{er} test de transmission avec le navet. En effet, lors de la répétition on observe un taux presque identique entre la transmission à un temps d'acquisition de 15 minutes et un temps d'acquisition de 1 heure. Comme la répétition n'a pas montré des différences significatives entre ces deux temps d'acquisition, il faudrait faire plus de répétitions pour obtenir des résultats reproductibles.

De plus on observe que le taux de transmission élevé corrèle avec un taux de protoplastes infectés élevé. Cela est probablement dû au fait que le puceron a plus de chance de piquer dans un protoplaste infecté. Ainsi la concentration de protoplastes pourrait influencer sur le taux de transmission. On a vu précédemment que l'âge des plantes et le stade d'infection influe sur le taux de protoplastes infectés. Le meilleur taux de transmission correspond au plus haut taux des protoplastes infectés et a été obtenu avec des plantes à 16 dpi (voir expérience 1, Figure 16). Donc les plantes à 16 dpi sont un bon point de départ pour optimiser les tests de transmission dans le futur. On peut aussi faire une cinétique avec différentes concentrations de protoplastes.

Les tests de transmission effectués avec les protoplastes de melon ont révélé des taux de transmission nuls. Ceci peut s'expliquer par un taux de protoplastes infectés très faible. Si on veut faire des tests de transmission avec les protoplastes de melon il faudrait optimiser le protocole de protoplastation. En effet celui que nous avons utilisé est un protocole pour *Arabidopsis thaliana*. Lors des manipulations on a remarqué que l'ensemble de la feuille utilisée ne se dissout pas. Nous partions alors avec une faible quantité de protoplastes. De plus nous pensons que les cellules déjà fragilisées par l'infection ont été très mal protoplastées d'où ce faible taux de protoplastes infectés. Comme pour les protoplastes de navet, il faudrait faire une cinétique avec différentes concentrations de protoplastes.

Après ces tests, une question nous vient à l'esprit: Pourquoi faut-il un temps d'acquisition aussi long alors que le CMV est transmis de plante à plante efficacement après seulement 2 min d'acquisition? De plus le CaMV ou le TuMV ont besoin de seulement 15 minutes d'acquisition pour permettre une transmission efficace à partir des protoplastes.

Effet de différents traitements sur la transmission du CMV

Les tests de transmission effectués avec laatrunculine, l'azoture et le lanthane ne sont pas exploitables. En effet, les taux de transmission sont très faibles pour permettre une analyse fiable.

Pour la laatrunculine, il faudrait refaire le test de transmission avec la laatrunculin. Ainsi on pourrait en déduire si le cytoplasme joue un rôle dans la TA.

Les deux premiers tests de transmission avec CO₂ sont significatifs on observe une tendance qui est retrouvée dans les deux répétitions or lors de la troisième répétition le témoin est à 4% alors que la condition CO₂ à 56%. Donc soit le résultat avec le témoin est un artefact(4% sont extrêmement faible pour la transmission plante à plante) soit il n'y a pas d'effet du CO₂ sur la transmission. Il faudrait alors refaire l'expérience pour pouvoir conclure un effet.

Si les deux premiers tests sont reproductibles, cela signifierait que le CO₂ inhibe la transmission du CMV. On pourra donc dire qu'il existe un phénomène biologique qui contrôle l'acquisition du virus puisque si l'acquisition du CMV est purement mécanique on n'observerait pas d'effet sur la transmission. Mais Il faudrait également observer ce qu'il se passe avec la répartition du virus dans les tissus avec ce traitement par immunofluorescence. Avec le TuMV on observe une baisse de la transmission alors qu'avec le CaMV on peut observer une réorganisation des corps à transmission sur les microtubules et donc une augmentation du taux de transmission ce qui démontre l'activation du CaMV.

Induction de stress sur les protoplastes

1. Effet de différents traitements sur la protéine de capsidie par western blot

L'absence de la bande de la Rubisco en présence de lanthane est du à un artefact du rouge de Ponceau. En effet on observe la présence de la sous unité de la Rubisco au bleu de Coomassie lorsque celle-ci est pourtant absente au rouge de Ponceau. On peut donc conclure que en présence des différents réactif, aucun effet sur la protéine de capsidie à pu être mis en évidence par western Blot.

2. Effet des traitements sur la répartition du CMV par microscopie en immunofluorescence

Pour déterminer s'il existe une activation de la transmission du CMV nous avons perturbé différente cascades signalétique et observé la répartition du CMV dans les protoplastes. Nous avons observé un effet pour les traitements suivants : l'azoture, l'acide salicylique, le choc thermique et la laatrunculine ont induit une répartition strictement granuleuse du CMV. Si ce phénotype corrèle avec une transmission altérée cela reste à tester dans le futur mais aucune conclusion à ce stade n'est possible.

Conclusion : L'acquisition du CMV à partir des protoplastes est possible, mais il reste beaucoup à faire (optimiser et répéter) pour montrer ou réfuter si cette transmission est mécanique ou si elle implique un processus biologique (par exemple activation de la transmission) comme montré pour deux autres virus, le CaMV et le TuMV.

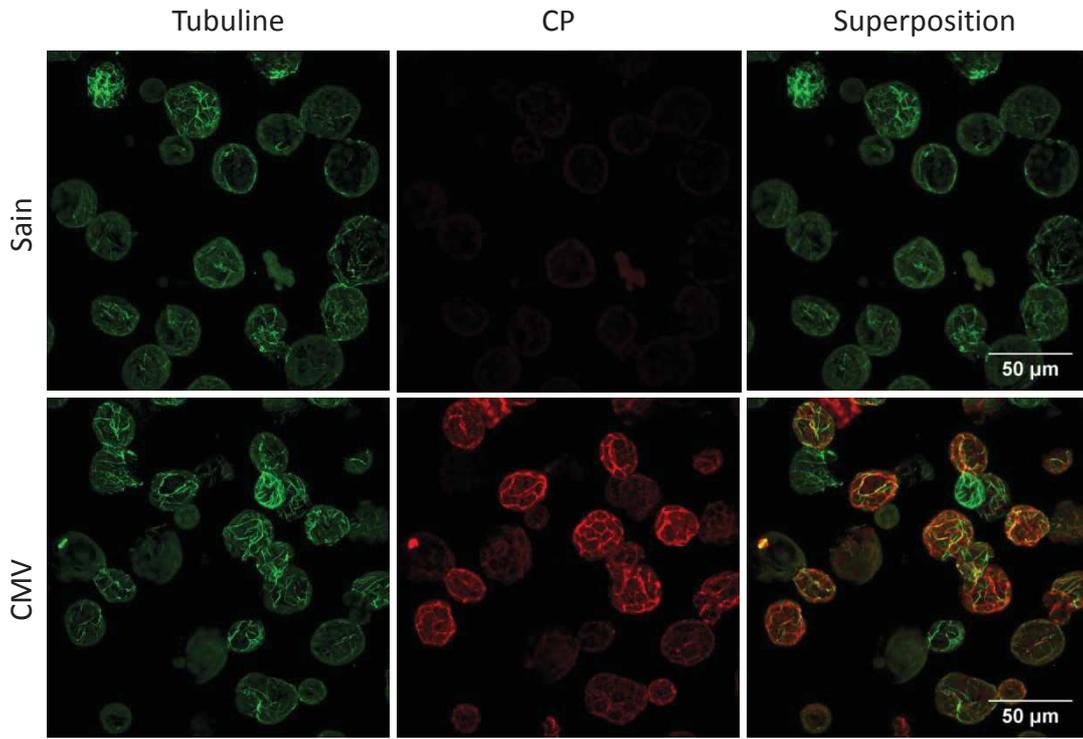
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Bak, Aurélie, Stéphane Blanc, Daniel Gargani, Alexandre Martinière, and Martin Drucker. 2014. "Multiples Fonctions Des Usines Virales : L'exemple Du Virus de La Mosaïque Du Chou-Fleur (*Cauliflower Mosaic Virus*)."
Virologie 18 (4): 201–10. doi:10.1684/vir.2014.0572.
- Blanc, Stephane, Martin Drucker, and Marilyne Uzest. 2014. "Localizing Viruses in Their Insect Vectors."
Annual Review of Phytopathology 52: 403–25. doi:10.1146/annurev-phyto-102313-045920.
- Brault, Veronique, Maryline Uzest, Baptiste Monsion, Emmanuel Jacquot, and Stephane Blanc. 2010. "Aphids as Transport Devices for Plant Viruses."
Comptes Rendus Biologies 333 (6-7): 524–38. doi:10.1016/j.crv.2010.04.001.
- Escriu, F., K. L. Perry, and F. Garcia-Arenal. 2000. "Transmissibility of Cucumber Mosaic Virus by *Aphis Gossypii* Correlates with Viral Accumulation and Is Affected by the Presence of Its Satellite RNA."
Phytopathology 90 (10): 1068–72. doi:10.1094/PHYTO.2000.90.10.1068.
- Gallitelli, Donato. 2000. "The Ecology of Cucumber Mosaic Virus and Sustainable Agriculture."
Virus Research 71 (1–2): 9–21. doi:10.1016/S0168-1702(00)00184-2.
- Gerard LABONNE, Jean-Bernard QUIOT, Pascal Monestiez. 1982. "Rôle des diverses espèces de pucerons vecteurs dans la dissémination du virus de la mosaïque du concombre au niveau d'une parcelle de melon dans le Sud-Est de la France." *Agronomie, EDP Sciences*, 1982, 2 (9), pp.797-804. <hal-00884448>
- Jacquemond, M. 1982. "L'ARN satellite du virus de la mosaïque du concombre IV. - Transmission expérimentale de la maladie nécrotique de la tomate par pucerons". *Agronomie*, 2 (7), 641-646
- Khelifa, Mounia, Sandra Journou, Kalpana Krishnan, Daniel Gargani, Pascal Esperandieu, Stéphane Blanc, and Martin Drucker. 2007. "Electron-Lucent Inclusion Bodies Are Structures Specialized for Aphid Transmission of Cauliflower Mosaic Virus."
The Journal of General Virology 88 (Pt 10): 2872–80. doi:10.1099/vir.0.83009-0.
- Krenz, Bjoern, Agathe Bronikowski, Xiaoyun Lu, Heiko Ziebell, Jeremy R. Thompson, and Keith L. Perry. 2015. "Visual Monitoring of Cucumber Mosaic Virus Infection in *Nicotiana Benthamiana* Following Transmission by the Aphid Vector *Myzus Persicae*."
The Journal of General Virology, May. doi:10.1099/vir.0.000185.
- Kumari, Reenu, Pooja Bhardwaj, Lakhmir Singh, AijazA Zaidi, and Vipin Hallan. 2013. "Biological and Molecular Characterization of Cucumber Mosaic Virus Subgroup II Isolate Causing Severe Mosaic in Cucumber."
Indian Journal of Virology 24 (1): 27–34.
- Martinière, Alexandre, Jean-Luc Macia, Guillaume Bagnolini, Chiraz Jridi, Aurélie Bak, Stéphane Blanc, and Martin Drucker. 2011a. "VAPA, an Innovative 'Virus-Acquisition Phenotyping Assay' Opens New Horizons in Research into the Vector-Transmission of Plant Viruses." Edited by Ching-Hong Yang. *PLoS ONE* 6 (8). doi:10.1371/journal.pone.0023241.
- Martinière, Alexandre, Anouk Zancarani, and Martin Drucker. 2009. "Aphid Transmission of Cauliflower Mosaic Virus."
Plant Signaling & Behavior 4 (6): 548–50.

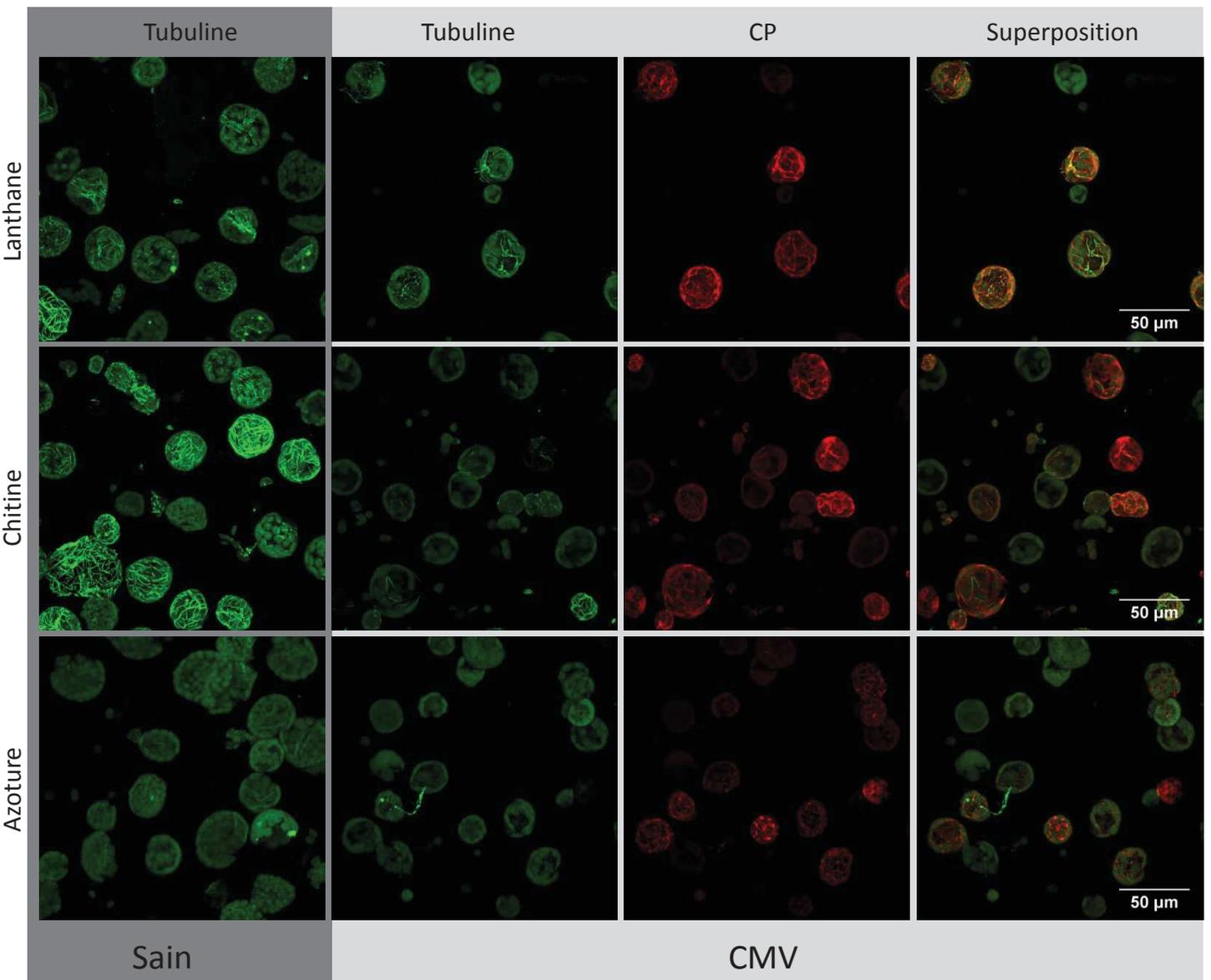
- Osta, Mike A., Zeinab J. Rizk, Pierrick Labbe, Mylene Weill, and Khouzama Knio. "Insecticide Resistance to Organophosphates in *Culex Pipiens* Complex from Lebanon." *Parasites & Vectors* 5 (2012). doi:10.1186/1756-3305-5-132.
- Perry, K. L., L. Zhang, and P. Palukaitis. 1998. "Amino Acid Changes in the Coat Protein of Cucumber Mosaic Virus Differentially Affect Transmission by the Aphids *Myzus Persicae* and *Aphis Gossypii*." *Virology* 242 (1): 204–10. doi:10.1006/viro.1998.8991.
- Plisson, Celia, Marilyne Uzest, Martin Drucker, Remy Froissart, Christian Dumas, James Conway, Daniel Thomas, Stephane Blanc, and Patrick Bron. 2005. "Structure of the Mature P3-Virus Particle Complex of Cauliflower Mosaic Virus Revealed by Cryo-Electron Microscopy." *Journal of Molecular Biology* 346 (1): 267–77. doi:10.1016/j.jmb.2004.11.052.
- Su, Shengzhong, Zhaohui Liu, Cheng Chen, Yan Zhang, Xu Wang, Lei Zhu, Long Miao, Xue-Chen Wang, and Ming Yuan. 2010. "Cucumber Mosaic Virus Movement Protein Severs Actin Filaments to Increase the Plasmodesmal Size Exclusion Limit in Tobacco." *The Plant Cell* 22 (4): 1373–87. doi:10.1105/tpc.108.064212.
- Uzest, Marilyne, Daniel Gargani, Aviv Dombrovsky, Chantal Cazeveille, Didier Cot, and Stéphane Blanc. 2010. "The 'Acrostyle': A Newly Described Anatomical Structure in Aphid Stylets." *Arthropod Structure & Development* 39 (4): 221–29. doi:10.1016/j.asd.2010.02.005.
- Yang, Y., K. S. Kim, and E. J. Anderson. 1997. "Seed Transmission of Cucumber Mosaic Virus in Spinach." *Phytopathology* 87 (9): 924–31. doi:10.1094/PHYTO.1997.87.9.924.

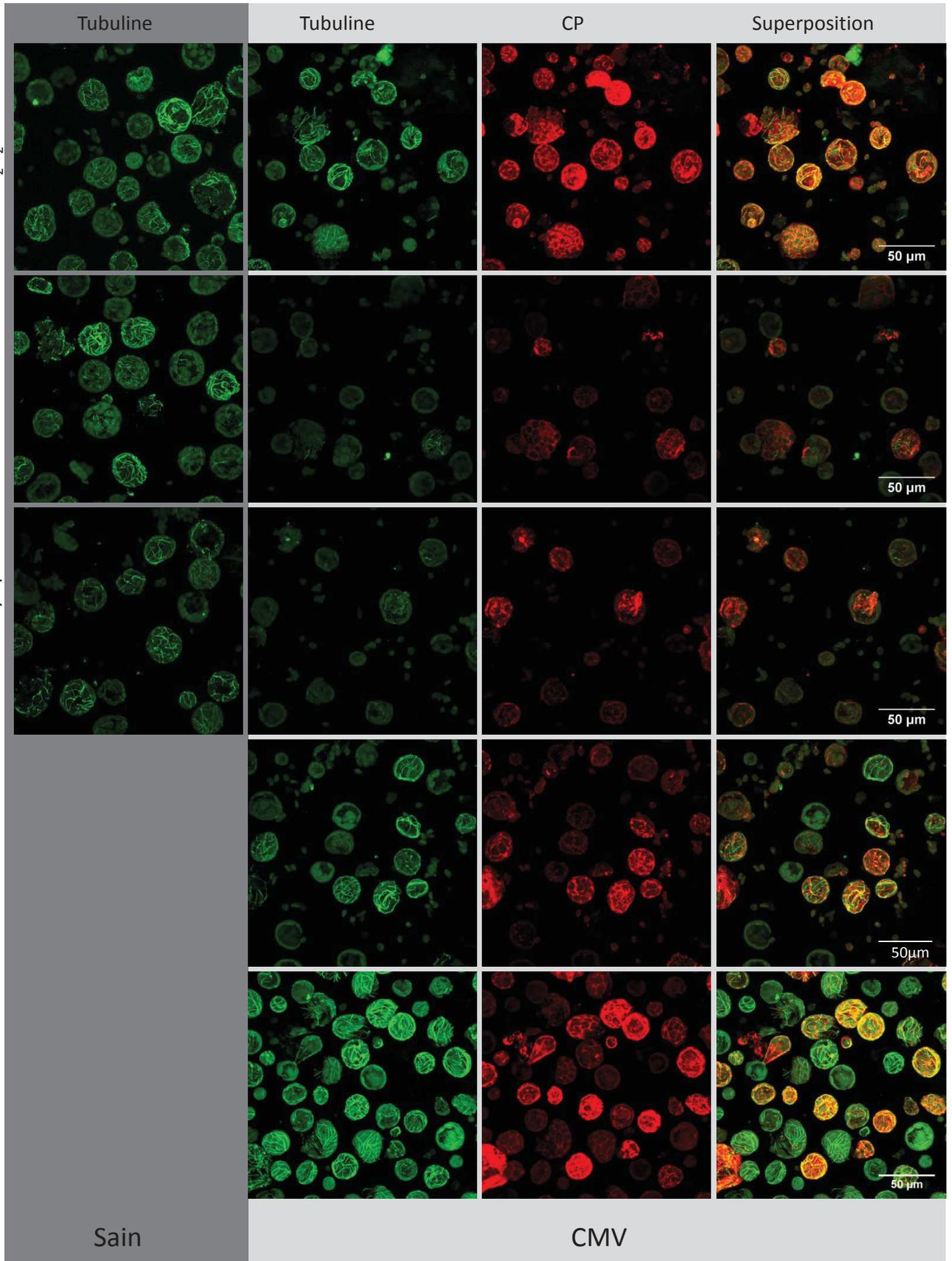
ANNEXE

Témoin



Traitements





Annexe 1 : Effet des différents traitements sur la localisation intracellulaire de la CP et sur le cytosquelette de microtubules. Des protoplastes ont été traité comme indiqué, puis analysé par immunofluorescence contre la CP (rouge) et la tubuline (vert) avec un microscope confocal et un objectif 63x.

Résumé

Il a été démontré que le Cauliflower mosaic virus (CaMV) active sa transmission au moment précis où le vecteur puceron pique dans la cellule de la plante infectée. Ce phénomène d'activation de la transmission (AT) suggère que le CaMV perçoit la présence du puceron, du jamais vu pour un virus. L'objectif de ce stage est de déterminer si un autre virus, le Cucumber mosaic virus (CMV) a la capacité d'AT. Pour cela, des tests de transmission à partir des protoplastes infectés par le CaMV ont été adaptés au CMV avant de procéder aux tests de transmission avec des conditions qui modifient la transmission du CaMV. En parallèle des immunomarquages et des westerns blots ont été réalisés pour détecter un éventuel phénotype pour l'AT du CMV. Le CMV peut être acquis à partir de protoplastes, mais il faut encore améliorer le protocole afin de déduire une possible AT. L'immunomarquage révèle un changement de phénotype du CMV en présence de NaN_3 , d'acide salicylique, du choc thermique et de la latrunculine.

Abstract

It has been well demonstrated that the Cauliflower mosaic virus or CaMV activates its own transmission at this very moment when the aphid vector penetrates the infected plant cell. This Transmission Activation or TA mechanism suggests that the CaMV is able to detect the aphid presence, such phenomenon has never occurred before. The main objective of this internship is to determine whether another virus the Cucumber mosaic virus possesses the TA mechanism. For this purpose, transmission tests were done from CaMV infected protoplasts and were adapted to CMV just before proceeding to transmission tests with conditions which modify CaMV transmission. In parallel immunostaining and western blotting were made to detect a possible phenotype of CMV Transmission Activation. CMV can be acquired from a protoplast, but the protocol still needs to be improved so that we may infer a possible TA mechanism. Immunostaining reveals a CMV phenotype modification in the presence of NaN_3 , salicylic acid, thermal shock and latrunculin.