



HAL
open science

Rôle des gouttelettes lipidiques chez les plantes lors d'une infection virale

Lena Jambou

► **To cite this version:**

Lena Jambou. Rôle des gouttelettes lipidiques chez les plantes lors d'une infection virale. Life Sciences [q-bio]. 2021. hal-04648059

HAL Id: hal-04648059

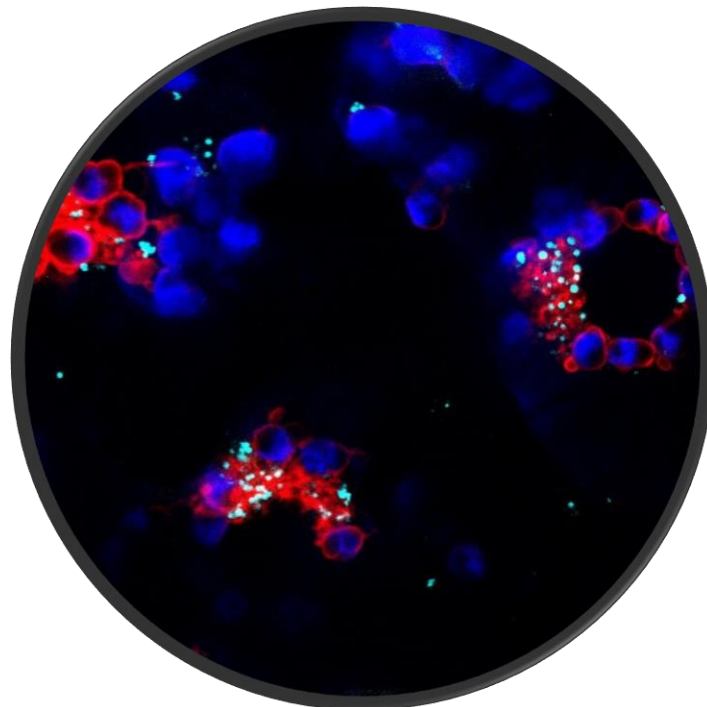
<https://hal.inrae.fr/hal-04648059v1>

Submitted on 15 Jul 2024

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.

Rôle des gouttelettes lipidiques chez les plantes lors d'une infection virale



Tutrices : Sylvie German-Retana et Claire Brehelin

Laboratoires d'accueil :

- Institut national de la recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE) de Bordeaux – Equipe Virologie- UMR 1332 – Biologie du Fruit et Pathologie
- Centre national de la recherche scientifique (CNRS) de Bordeaux – UMR 5200 – Laboratoire de biogénèse membranaire

Sommaire

Introduction	6
1. Matériel et méthodes.....	3
1.1. Matériel	3
1.2. Méthodes	5
2. Résultats.....	8
2.1. Quel est l'impact de l'infection virale sur le nombre et les caractéristiques morphologiques des gouttelettes lipidiques ?.....	8
2.1.2. L'expression d'une protéine virale seule, est-elle suffisante pour induire la formation de GL en l'absence d'infection virale ?.....	9
2.1.3. Observation des gouttelettes lipidiques dans les cellules infectées par le TuMV en microscopie électronique	10
2.2. Ces mécanismes sont-ils généralisables à l'ensemble des phytovirus ?	11
2.3. Quel est l'impact de l'infection virale par un potyvirus sur la composition lipidique des feuilles ?	12
2.4. Quel est le rôle des GL dans le cycle des potyvirus ?	13
3. Discussion et perspectives	14
Bibliographie	18

Abréviations

- ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire
- ARN : Acide ribonucléique
- CI : *Cytoplasmic inclusion*
- DAG : Diacylglycerols
- DGDG : Digalactosyldiacylglycérol
- Dpi : *Day post inoculation*
- ES : Esters de stérol
- ESCRT: *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*
- FFA: *Free fatty acids* ou acides gras libres
- GC-FID: *Gas chromatography flame ionization detector*
- GFP : *green fluorescent protein*
- GL : Gouttelettes lipidiques
- HCV : *hepatitis C virus*
- HPE : Haute performance environnementale
- kDA : Kilo Dalton
- kV : Kilo Volt
- KO : *Knockout*
- LB : *Lysogeny broth*
- LDAP1: *Lipid droplet-associated protein 1*
- MDH : Monodensylpentane
- MGDG : Monogalactosyldiacylglycerol
- OE : *Overexpression* ou sur-expression
- ORP : *Oxysterol related protein*
- PC : Phosphatidylcholines
- PE : Phosphatidyléthanolamines
- PG : Phosphatidylglycérols
- pH : Potentiel hydrogène
- PI : Phosphatidylinositols
- p/v : Poids/volume

- PV : *poliovirus*
- PVA : *potato virus A*
- PVP : Polyvinylpyrrolidone
- PVX : *potato virus X*
- qRT-PCR : *Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction*
- RE : Réticulum endoplasmique
- RFP : *Red fluorescent protein*
- RoLiPV: *Role of lipid droplet in plant virus infection*
- TAG : Triacylglycérols
- TEM : *Transmission electronic microscopy* ou microscopie électronique à transmission
- TuMV : *turnip mosaic virus*
- v/v : Volume/volume
- VRC : *Viral replication complex* ou complexe de Réplication Viral
- YFP : *Yellow fluorescent protein*

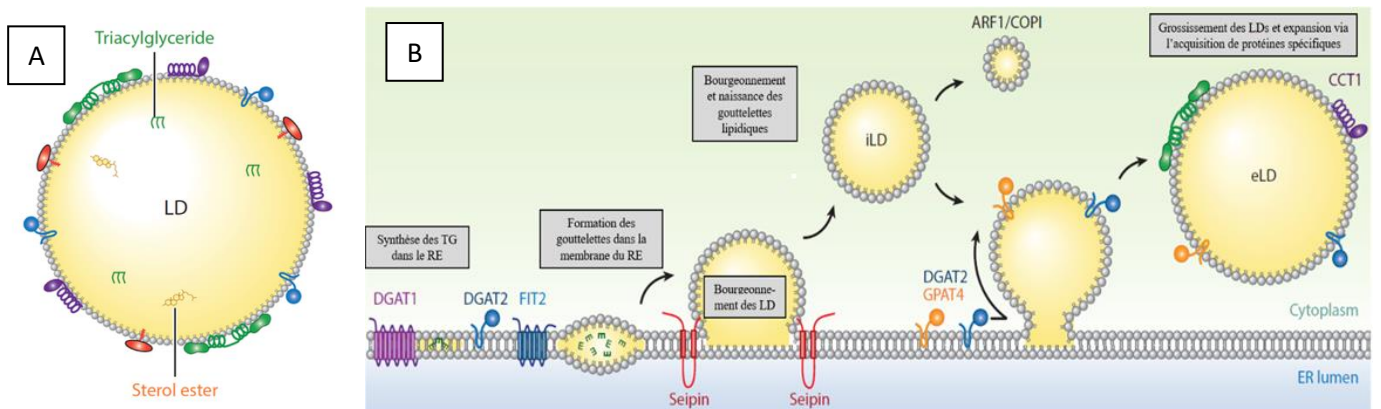


Figure 1 : La biogénèse des GL dans la membrane du RE. (A) : schéma de la structure d'une GL constituée d'une monocouche de lipides (*Lipid Droplet* ou LD) et d'un cœur de lipides neutres (TAG et esters de stérol) (B) : schéma de la formation des GL au niveau de la membrane du RE où elles bourgeonnent grâce aux recrutements de protéines puis grossissent. *diacylglycerol acyltransferase 1* (DGAT1), *diacylglycerol acyltransferase 2* (DGAT2), *Glycerol-3-phosphate acyltransferase 4* (GPAT4) et *Fat storage-inducing transmembrane protein 2* (FIT2) sont des protéines impliquées dans la synthèse des lipides neutres. *T-complex protein 1* (CCT1) est une protéine chaperon. *ADP-ribosylation factor 1* (ARF1) et *coat protein 1* (COPI) jouent un rôle dans la sécrétion et le transport vésiculaire. La protéine SEIPIN interagit avec le RE et la GL mais son rôle précis reste inconnu. iLD = GL initiale ; eLD : GL élargie (D'après Walther *et al.*, 2017).

Introduction

Dans la cellule, on distingue deux grands types de lipides : les lipides polaires, qui constituent les membranes et les lipides neutres qui permettent notamment le stockage d'énergie. Ces lipides neutres sont stockés dans des organites sphériques nommés gouttelettes lipidiques (GL). Les GL sont composées d'un cœur de triacylglycérols (TAG) et d'esters de stérol (ES), qui est entouré par une monocouche de phospholipides dans laquelle sont ancrées des protéines (Figure 1A). Ces organites sont formés au niveau de la membrane du réticulum endoplasmique (RE) où sont localisées les enzymes responsables de la synthèse des TAG. Les TAG nouvellement synthétisés s'accumulent entre les deux feuilletts du RE en formant des "lentilles" qui par la suite bourgeonnent de la membrane du RE, donnant ainsi naissance aux GL. Les GL sont parfois détachées du RE, et peuvent alors se déplacer dans le cytosol et interagir avec d'autres organites cellulaires (Figure 1B ; Walther *et al.*, 2017). Les GL jouent donc un rôle essentiel dans le métabolisme lipidique cellulaire, en étant spécialisées dans le stockage des lipides neutres et le transport intracellulaire de lipides. Par ailleurs, chez les plantes, les GL sont aussi impliquées dans la réponse aux stress environnementaux. Ainsi lors des stress abiotiques (froid ou chaud), le nombre et la taille des GL augmentent (Gidda *et al.*, 2016).

Récemment, il a été décrit que certains virus animaux et en particulier des virus à ARN simple brin de polarité positive, détournent ces organites lors de leur cycle. L'exemple le plus connu est sans doute celui de *hepatitis C virus* (HCV). Ce petit virus enveloppé est présent dans le sang sous forme de lipoviroparticules, où la particule virale est incluse dans une gouttelette lipidique. La présence du HCV dans une cellule hépatique induit une augmentation du nombre et une relocalisation des GL à proximité des sites de réplication du virus : alors qu'elles sont, normalement, réparties dans tout le cytosol des hépatocytes, elles se retrouvent concentrées autour du noyau lors de la réplication du virus. La protéine de capsid virale se lie aux gouttelettes lipidiques et la réplication virale entraîne un remodelage de la membrane du RE qui capture les GL (Lee *et al.*, 2019) formant ainsi des structures soupçonnées d'être le site d'assemblage des virions. En effet, l'association lipide-capsid entoure l'ARN fraîchement répliqué, de sorte que le virion se retrouve inclus dans la gouttelette lipidique. Le *poliovirus* (PV) est un autre virus qui détourne les GL à son profit. Le précurseur viral 2BC ainsi que les protéines 2B et 2C (l'hélicase virale) du poliovirus se fixent à la surface des GL grâce à des hélices amphipathiques et induisent la formation de sites de contacts membranaires entre les GL et les complexes de réplication permettant le transfert d'acides gras depuis les GL. L'interaction entre les extrémités N-terminale des protéines 2C à la surface des GL et des 2C à l'intérieur des complexes de réplication permettrait le contact physique entre les membranes des deux

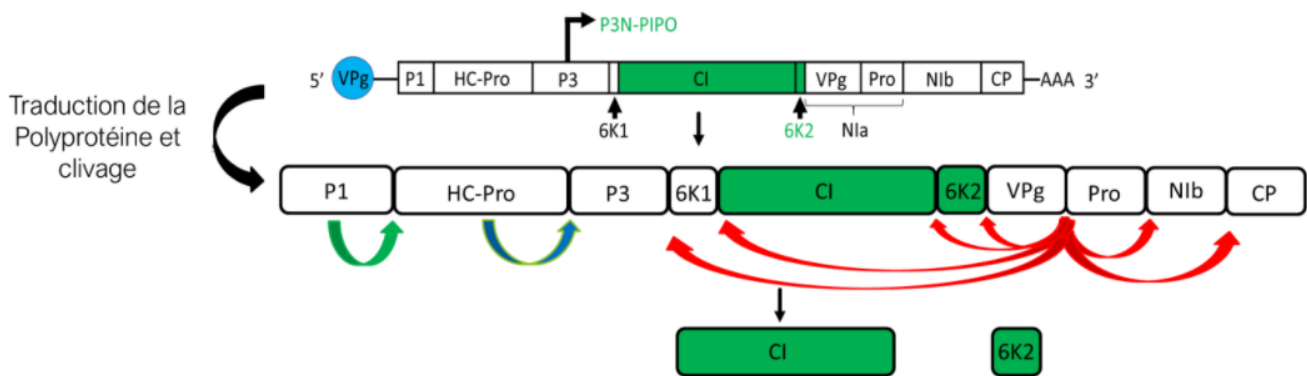


Figure 2 : Organisation génomique du TuMV. Schéma du génome du TuMV qui est traduit en une polyprotéine qui sera elle clivée par les protéases virales pour libérer les protéines. Les flèches vertes et rouges représentent les sites de clivage de la polyprotéine. En vert sont représentées les deux protéines étudiées lors de cette étude.

structures, indispensable pour la réplication du virus (Laufmann *et al.*, 2019). En parallèle, les protéines virales 3A et 3B activent la machinerie de lipolyse cellulaire. Ce détournement permet la synthèse de nouveaux phospholipides à partir des lipides neutres stockés dans les GL, favorisant ainsi le remodelage de la membrane au niveau des complexes de réplication virale. Chez les plantes, à ce jour, aucun cas de détournement des GL par un phytovirus n'a été décrit. Pourtant, certains virus de plantes détournent les lipides lors de leur cycle et notamment les membranes de certains organites cellulaires comme le RE, les mitochondries ou les chloroplastes... afin de former des structures nommées « usines virales ». C'est notamment le cas du *tomato bushy stunt virus*, de la famille des *Tombusviridae*, qui détourne la machinerie de métabolisme lipidique pour former des usines virales. L'ARN polymérase ARN dépendante virale (p92), la protéine p33, l'ARN viral ainsi que des protéines cellulaires forment un complexe au niveau de la membrane du peroxyosome. Le complexe ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) est recruté, va permettre le remodelage de la membrane et la formation de sphérule dans laquelle se déroule la réplication du virus. Pour assurer le maintien de cette structure, la protéine de l'hôte ORP, pour *oxysterol related protein*, va être recrutée et va modifier la composition lipidique de la membrane en augmentant la quantité de phosphatidyléthanolamine (Nagy, 2016). Le *turnip mosaic virus* (TuMV) est un autre phytovirus connu pour provoquer un important remaniement du réseau endomembranaire dans la cellule infectée et former ainsi des complexes de réplication viraux (VRC).

Le TuMV appartient à la famille des *Potyviridae* et au genre des *Potyvirus* qui regroupe environ 30% des virus infectant les plantes. Ces sont des virus causant de nombreux dégâts en agriculture et pour cette raison ils sont au centre des recherches en virologie végétale. Le TuMV est un virus non enveloppé, de 680 à 900 nm de longueur et de 11 à 15 nm de diamètre. La capsid filamenteuse et flexueuse du TuMV renferme un génome à ARN simple brin de polarité positive d'environ 10 kb qui code pour une polyprotéine clivée en cis et en trans en 11 protéines par des protéases virales (Figure 2 ; Wan *et al.*, 2015). Parmi elles, la protéine 6K2 est une petite protéine de 6 kDa composée d'un domaine central transmembranaire, d'une extrémité N-terminale de 19 acides aminés avec une localisation cytosolique et d'une extrémité C-terminale de 11 acides aminés située dans la lumière du RE (Jiang *et al.*, 2015). Cette protéine est impliquée dans le remaniement des membranes cellulaires et plus particulièrement dans la formation de vésicules dérivées du RE, à simple ou à double membrane (Wan *et al.*, 2015). Les vésicules simple membrane contiennent probablement la forme répliquative du génome viral, des facteurs cellulaires ainsi que des protéines virales impliquées dans la réplication dont l'ARN polymérase ARN dépendante et l'hélicase virale CI (cytoplasmic Inclusion). Ces vésicules sont de taille variable (de 0.6 μm à 4.3 μm de diamètre en microscopie confocale (Cotton *et al.*, 2009)) et sont formées à proximité du noyau au niveau d'une

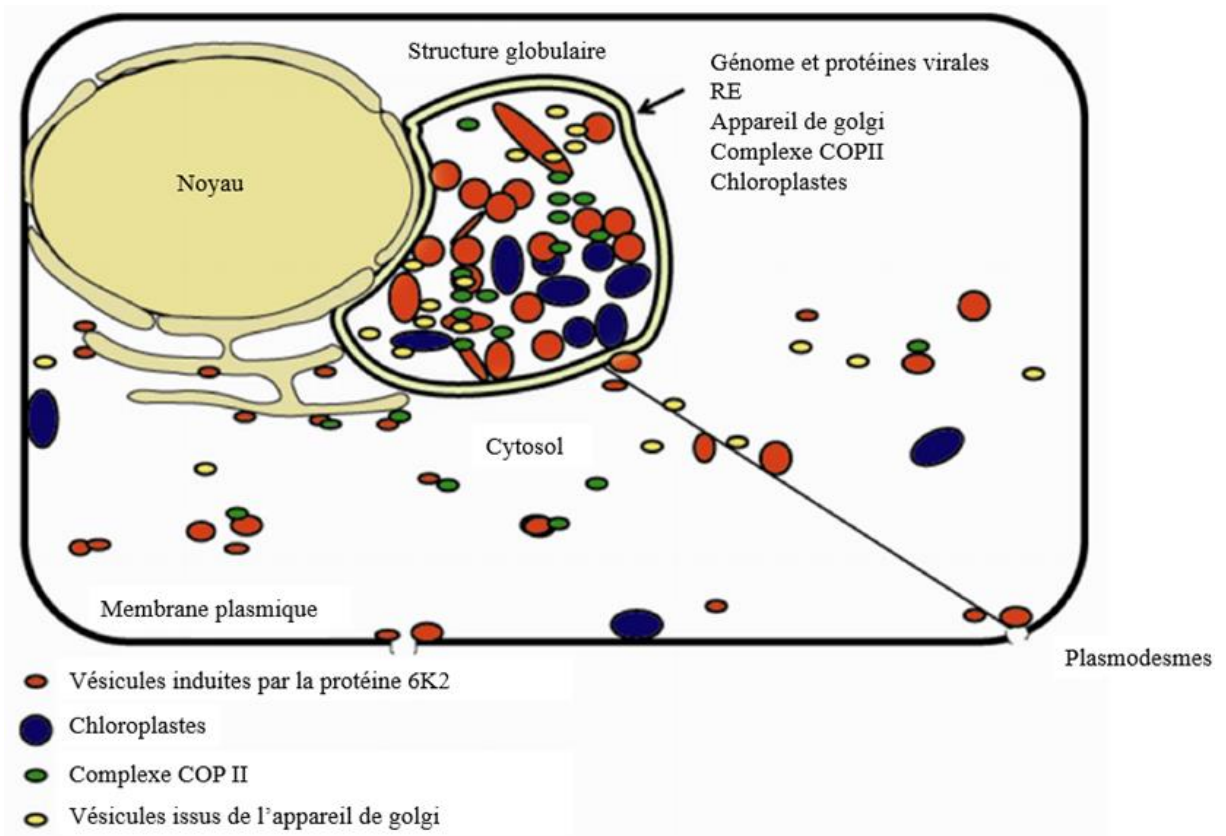


Figure 3 : Modèle de formation de la structure globulaire périnucléaire induite par le TuMV. La structure globulaire est un agrégat de RE, de corps golgiens, de vésicules COPII, de chloroplastes, du génome et des protéines virales. De cette structure, qui se situe à proximité du noyau, des vésicules à simple et à double membrane sont formées. Elles sont exportées jusqu'aux plasmodesmes afin de diffuser de cellule en cellule (D'après Grangeon *et al.*, 2012).

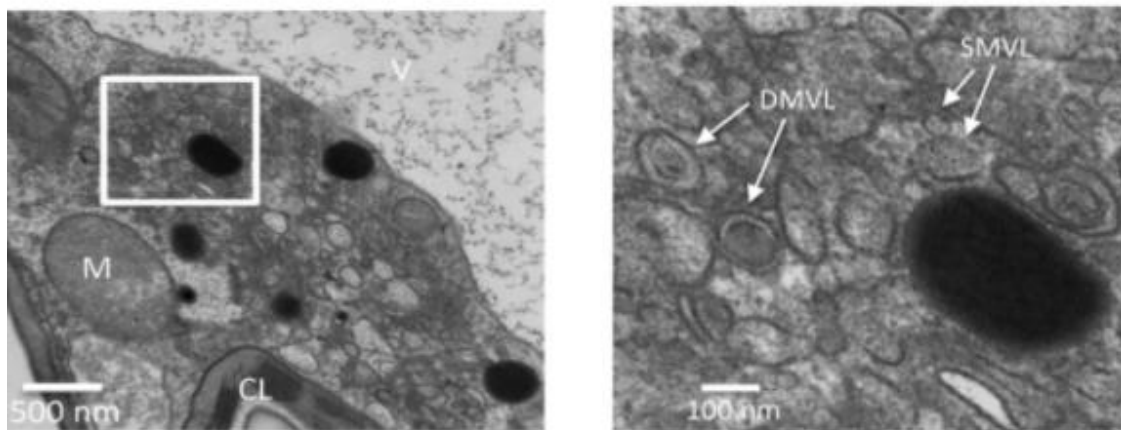


Figure 4 : Observation en microscopie électronique à transmission (TEM) des agrégats membranaires induites par le TuMV lors de l'infection d'une cellule. Cellule du mésophylle de *N. benthamiana*. L'image de droite correspond au grossissement de la zone dans le carré blanc. V : Vacuole ; M : mitochondrie ; CL : chloroplaste ; DMVL : comparable à une vésicule à double membrane et SMVL : vésicule à simple membrane. Barre d'échelle : 500nm (gauche) et 100nm (droite) (Wan *et al.*, 2015).

agrégation de RE, de corps golgiens et de chloroplastes appelée structure globulaire (Figure 3). Ces vésicules seraient adressées aux plasmodesmes via la voie de sécrétion intracellulaire et seraient capables de se déplacer de cellule à cellule (Grangeon *et al.*, 2013) mais les mécanismes ne sont pas encore élucidés.

L'étude de l'ultrastructure des vésicules induites par la protéine 6K2 du TuMV menée par l'équipe de Wan *et al.*, (2015), montre des corps globulaires d'environ 400 nm de diamètre, marqués à l'osmium à proximité des VRC. La présence et l'identité de ces structures ne sont pas discutées dans l'article, mais leurs caractéristiques morphologiques sont similaires à celles des GL (Figure 4), ce qui suggérerait que le TuMV pourrait recruter/capturer les GL lors de son cycle de façon similaire à ce qui est décrit chez les virus animaux.

C'est dans ce contexte que mon stage de master 2 prend place, avec comme objectif principal de déterminer si les GL pourraient jouer un rôle dans le cycle des phytovirus et en particulier celui du TuMV. Ce projet s'articule autour de trois grandes questions. La première s'intéresse à l'impact de l'infection par le TuMV sur la morphologie, la distribution et le nombre de GL dans la feuille. La seconde porte sur l'impact de l'infection virale sur la composition lipidique des feuilles. Enfin, la dernière question a pour but de montrer l'implication des GL dans le cycle des potyvirus.

1. Matériel et méthodes

1.1. Matériel

Plasmides utilisés

- **Clones d'ADNc infectieux**

Le clone infectieux TuMV-6K2*mcherry* a été fourni par l'équipe de J.F Laliberté (INRS, Laval, Canada) (Jiang *et al.* 2015). Le gène de fusion *6K2-mcherry* est inséré entre les gènes *PI* et *HC-Pro* permettant l'expression ectopique de la protéine de fusion 6K2-*mcherry* lors de l'infection virale après excision sous l'action des protéases P1 et NIa (Pro).

Le clone infectieux TuMV-GFP (pCBTuMV-GFP) provient de l'équipe d'A. Wang (AgriFood, London, Canada). Ce virus comporte une insertion de la séquence codant pour le gène rapporteur GFP au sein de son génome entre les séquences *PI* et *HcPro*. Lors de l'infection virale, l'introduction d'un site de clivage reconnu par la protéase virale Nia (Pro) en aval de la GFP permet

l'excision de la protéine marqueur qui se trouve ainsi exprimée sous forme libre dans les cellules infectées.

La construction plasmidique PVA-GFP (pRD400-PVA-GFP) provient de l'équipe de K. Makinen (Université d'Helsinki, Finlande). Le génome du *potato virus A* comporte une insertion du gène GFP cloné entre les séquences des gènes *NIb* et *CP*. La GFP (comme pour le TuMV-GFP ci-dessus) est exprimée sous forme libre lors de l'infection virale, et a une localisation cytoplasmique et nucléaire.

La construction plasmidique PVX-GFP (pGr208-PVX-GFP) provient de l'équipe de Sébastien Mongrand (Laboratoire de biologie membranaire, Bordeaux). Le génome du *potato virus X* comporte une insertion du gène GFP cloné et est exprimé également sous forme libre lors de l'infection virale. Sa localisation est donc cytoplasmique et nucléaire (Perraki *et al.*, 2012).

- **Plasmides permettant l'expression transitoire des protéines**

Les gènes codant pour les protéines de fusion 6K2-RFP ou CI-RFP obtenus par L. Sofer au laboratoire, par recombinaison dans le vecteur binaire pGWB754 (Tanaka *et al.*, 2011). L'expression transitoire de la protéine 6K2-RFP suffit à induire la formation de vésicules dans la cellule en l'absence d'infection virale (Grangeon *et al.*, 2013 ; Movahed *et al.*, 2017). Ces vésicules sont donc marquées avec la RFP. La protéine CI, quant à elle, forme des agrégats dans le cytosol (Wei *et al.*, 2010).

Matériel Végétal

Des plants de *Nicotiana benthamiana* et *Arabidopsis thaliana* sont cultivés en serre de type S2-HPE (Haute Performance Environnementale) à une température moyenne de 23-25°C le jour et 18°C la nuit et une photopériode de 15 heures par jour et d'une humidité de 50-75%. Lors des cinétiques virales sur *N. benthamiana*, les plantes ont été conservées en chambre de culture à 25°C avec une photopériode de 16 heures par jour.

Les différents génotypes d'*Arabidopsis thaliana*, Col-0 (sauvage) ainsi que les mutants ont été obtenus par insertion d'ADN-T ou par Crispr-Cas9 dans le fonds génétique Col-0. Ces mutants ont été fournis par R.Mullen, Canada. Le double mutant seipin (Taurino *et al.*, 2018) et le mutant KO ldap provoquent tous les deux des défauts au niveau de la biogenèse des GL induisant une diminution de leur nombre. Le mutant sur-expression LDAP1 engendre une augmentation de la quantité de GL et la formation de cluster dans les feuilles et le mutant sur-expression SEIPIN1 la formation de grosses GL. Ces plantes mutantes ont été utilisées pour les études de la propagation virale. Les mutants *A.*

thaliana ont été repiqués 2 semaines après semis puis agroinoculés avec le clone TuMV-GFP ou permettant l'expression de la RFP (condition mock) à 4 semaines après semis. Ces plantes ont été cultivées en serre HPE dans les conditions décrites précédemment.

1.2. Méthodes

Expression transitoire de protéines *in planta* par agroinfiltration de virus

La souche C58C1 d'agrobactérie utilisée lors de cette étude possède un plasmide 'helper' pMP90 « désarmé » (dépourvu de ses gènes tumoraux) mais qui contient les gènes de virulence. Une fois transformée avec un plasmide binaire contenant la séquence d'ADN d'intérêt délimitée par les bordures gauche et droite, la bactérie est alors capable de transférer cette séquence vers le génome végétal en utilisant les gènes de virulence apportés en trans par le plasmide helper. Les agrobactéries sont cultivées dans du milieu LB (*lysogeny broth* : Tryptone (10 g/L), extrait de levures (5 g/L) et NaCl (10 g/L)) contenant l'antibiotique gentamycine. Les agrobactéries sont transformées par électroporation avec les vecteurs binaires qui permettent soit l'expression transitoire d'une protéine de fusion (RFP, 6K2-RFP, CI-RFP) soit l'expression du génome viral complet cloné (TuMV-6K2*mcherry*, PVA-GFP ou TuMV-GFP). Les agrobactéries transformées sont sélectionnées sur milieu LB avec les antibiotiques appropriés. Après avoir été cultivées à 28°C pendant environ 48h, les cellules sont resuspendues dans un milieu composé de tampon MES (tampon acide 2-(N-morpholino) éthanosulfonique (5µL/mL), d'acetosyringone (1.5µl/mL) et d'eau à une densité optique à 600 nm de 0,2, et infiltrées à l'aide d'une seringue dans des feuilles d'*A. thaliana* ou de *N. benthamiana* âgées de 4 semaines.

Imagerie confocale

Les plantes ont été observées avec un microscope confocal Zeiss® LSM 880. L'ensemble des images ont été prises avec un objectif à huile X40. La chlorophylle a été excitée par le laser Argon à 488 nm et la lumière émise récupérée entre 682 nm et 735 nm. Le fluorophore *mcherry* a été excité par le laser 561 DPSS et la lumière émise récupérée de 580 nm à 640 nm. La GFP a été excitée à 488 nm et la lumière émise a été récupérée de 500 nm à 544 nm. Le monodansylpentane (MDH) (0.1M), qui permet la coloration des GL en cyan (Chen *et al.*, 2017), a été dilué au 1/500^{ème} puis infiltré dans la feuille immédiatement avant observation. Il a été excité à 405 nm et la lumière émise a été récupérée de 418 nm à 482 nm. Les images obtenues ont été analysées avec le logiciel ImageJ/Fiji (Schroeder *et al.*, 2020).

Microscopie électronique

Des plants de *N. benthamiana* ont été agroinfiltrés avec le TuMV-GFP ou le TuMV-6K2mcherry, puis les feuilles infectées en systémie ont été repérées et prélevées sous l'axiozoom à 7 dpi et placées dans du glutaraldéhyde 2,5% et du tampon phosphate 0.1M pH 7,2, pendant 1 nuit à 4°C. Des lavages au tampon phosphate ont ensuite été effectués. Puis, nous avons contrasté l'échantillon à l'osmium 1% pendant 2h à température ambiante avant de refaire un cycle de lavage au tampon phosphate. Les échantillons ont été déshydratés à l'éthanol 70% pendant 30 min, à l'éthanol 100% pendant 30 min, à l'acétone déshydraté 2 fois 20 min, dans une solution spurr + acétone déshydraté (1/3 v/v puis 3/1 v/v) pendant 1h, avant d'être plongés dans la spurr 100% pendant 1h puis une nuit. Les échantillons ont été déposés dans un moule pendant 16h à 70°C entraînant la polymérisation de gélules de résine. Des coupes ultrafines de 80 nm d'épaisseur sont obtenues grâce à un ultramicrotome EM UC7 (Leica®) et placées sur des grilles afin d'être observées au microscope électronique Tecnai®. Les images ont été analysées avec le logiciel ImageJ/fiji (Schroeder *et al.*, 2020).

Test ELISA

Les tests ELISA ont été effectués avec le kit PolyPoty Agdia® basé sur la détection par un anticorps monoclonal (PTY1) qui cible une séquence conservée de la protéine de capsid des potyvirus. Ce test est un ELISA indirect, c'est-à-dire que l'échantillon est déposé en premier, il est reconnu par un anticorps primaire qui sera lui reconnu par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome permettant la révélation. Les tissus infectés en systémie des différents génotypes d'*A. thaliana* ont été prélevés à 22 dpi (plantes entières). Les feuilles ont été broyées dans un tampon de broyage (1.5mL pour 0.5g de matière fraîche) composé de Na₂CO₃ (105.99 g/mol), de NaHCO₃ (84.01 g/mol) de polyvinylpyrrolidone 40 (PVP40) et d'eau. 100µL de broyat a été déposé dans le puits qui ont été dupliqués. Le tampon ECI utilisé pour diluer les anticorps et le conjugué est composé de BSA, de polyvinylpyrrolidone 40 et de PBS Tween 1x. Le substrat : le purine nucléoside phosphorylase (5mg/pastille) est dilué dans du tampon composé de magnésium chlorure hexahydrate (0.10mg/L), de diéthanolamine (105,14 g/mol) et d'eau. Les lectures de DO ont été faites à 15, à 30 et à 45min à 405nm. Le seuil à partir duquel l'échantillon est considéré comme positif est égal à 3x la valeur du contrôle négatif mock.

Extraction des lipides totaux

Après l'agroinfiltration des *A. thaliana* par le TuMV-GFP, l'infection est suivie grâce au FluorCam qui permet de visualiser la présence de GFP sur plante entière dans les feuilles infectées en systémie. Le prélèvement a été fait grâce à un microscope stéréoscopique Axio Zoom de la marque

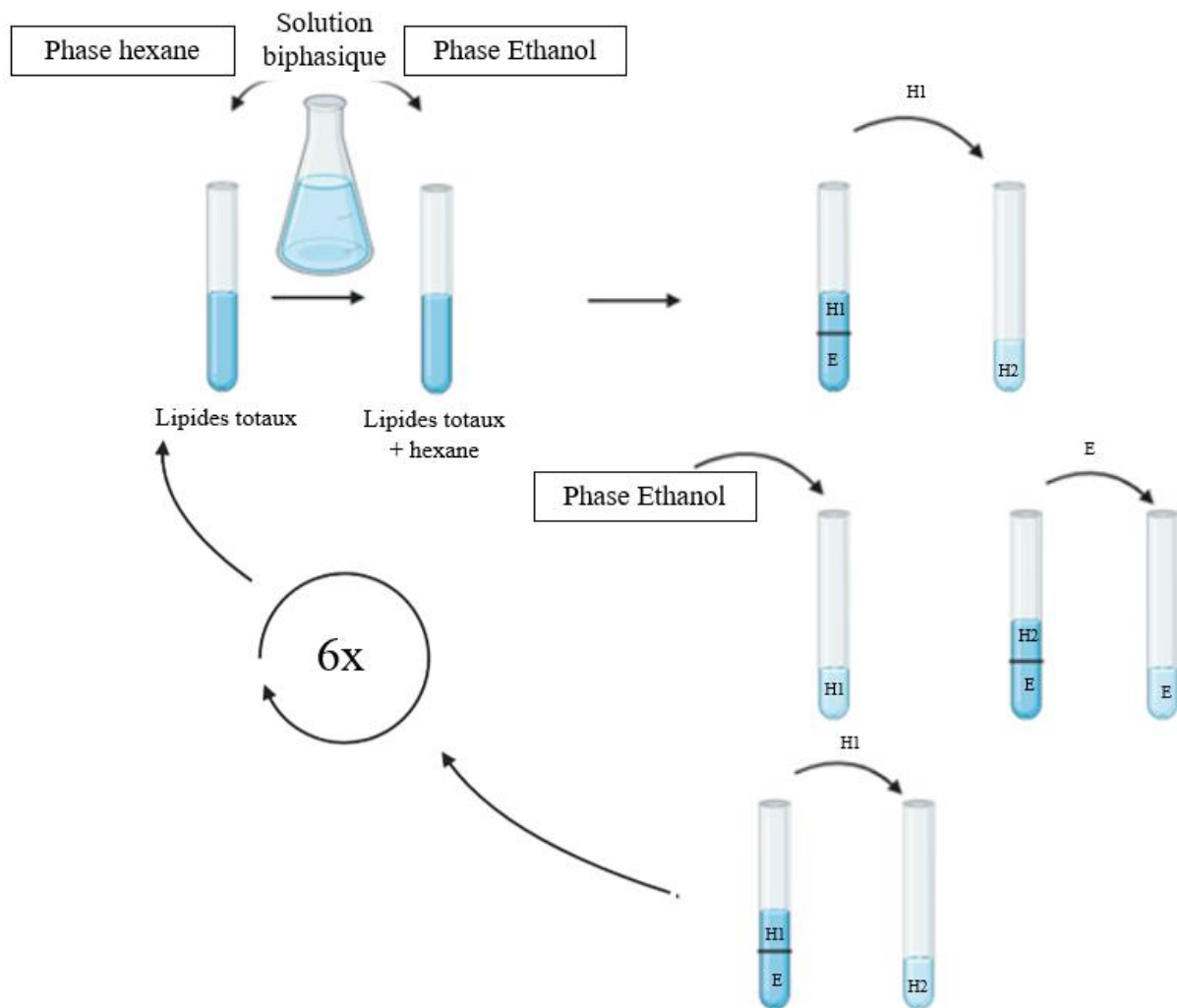


Figure 5 : Schéma du protocole de l'extraction liquide/liquide permettant la séparation des lipides neutres des lipides polaires. La solution biphasique est composée d'eau, d'hexane et d'éthanol. H1: phase hexane 1; H2: phase hexane 2 et E: phase éthanol. Les lipides neutres sont présents dans la phase hexane puisqu'ils sont très hydrophobes et les lipides polaires dans la phase éthanol.

Zeiss®, permettant de visualiser la fluorescence sur les feuilles infectées. Les feuilles prélevées et stockées au préalable à -80°C ont été broyées au TissueLyser® avec une bille de métal. Les broyats ont été repris dans l'isopropanol puis chauffés à 75°C pendant 15 min afin d'inactiver les phospholipases. Ils ont ensuite été incubés dans de l'eau et du chloroforme pendant 1h (2/1 v/v), puis 3x 1h dans du chloroforme/méthanol (2/1 v/v) afin d'extraire les lipides. La phase organique a ensuite été récupérée après avoir ajouté 1 mL de KCl 1M et centrifugée à 3 000 rpm, 5 min à 4°C. Enfin l'extrait a été séché à l'azote à 30°C.

Séparation des lipides polaires et neutres par la méthode liquide/liquide

Nous avons utilisé une solution biphasique composée d'Hexane (119,38 g/mol), éthanol (46,07 g/mol) et d'H₂O. Nous avons ensuite suivi le protocole en figure 5 (Galanos et Kapoulas, 1962).

Chromatographie sur couche mince et chromatographie gazeuse

Les échantillons préalablement évaporés à l'azote à 30°C sont repris dans 100 µL de chloroforme/méthanol (2/1 v/v). 50 µL ont ensuite été déposés pour les lipides polaires et 75 µL pour les lipides neutres. Les standards sont déposés sur la plaque de chromatographie sur couche mince à une concentration finale de 10 mg/mL. Pour les lipides polaires les standards sont : phosphatidylinositol (0.5mg/mL), phosphatidylcholine (0.5mg/mL), phosphatidyléthanolamine (0.4mg/mL), monogalactosyldiacylglycérol (2mg/mL) et digalactosyldiacylglycérol (2mg/mL). Pour les lipides neutres : diacylglycérol (2mg/mL), triacylglycérol (2.5mg/mL), ester de stérol (25µg/mL) et acides gras libres (2mg/mL). Les lipides sont ensuite séparés par chromatographie à l'aide d'une solution composée de chloroforme, de méthanol, de N-propanol, de méthylacetate et de KCl. La révélation est faite sous UV grâce à la primuline (453.5 g/mol) qui est un composé très hydrophobe et donc va se fixer aux acides gras présents sur la plaque. Les lipides séparés sur la plaque sont grattés puis incubés dans une solution de transestérification composée de méthanol, de H₂SO₄ (2.5% v/v), et de C₁₇ (2µg/µL de concentration initiale et 5 mg/mL de concentration finale) qui nous permettra de quantifier chaque type d'acide gras présent dans nos échantillons. L'étape suivante correspond à la transestérification, au cours de laquelle le méthanol et les triesters interagissent pour former un monoester qui est volatil. Pour cela, les échantillons sont mis 1h à 80°C en contact avec le milieu de transestérification préalablement décrit. Pour la chromatographie gazeuse 2 µL et 4 µL pour les lipides polaires et lipides neutres respectivement ont été injectés dans la GC-FID (*Gaz chromatography flame ionization detector*). La température du four de la GC est régulée à 230°C afin de nébuliser le solvant et évaporer les lipides (qui ont été préalablement transestérifiés). Les acides gras, une fois volatiles, sont transportés par le gaz et mis en contact avec une colonne polaire qui va

permettre leur séparation en fonction de leur longueur et leur degré de saturation. Ce chromatographe est couplé à un détecteur à ionisation de flamme, quand l'échantillon passe dans la flamme il est ionisé et provoque un courant électrique détecté par des électrodes et transformé en signal permettant la quantification. Les données sont ensuite extraites et analysées à l'aide d'une macro-commande excel.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel RStudio. Des tests de Wilcoxon ont été réalisés pour comparer les moyennes des échantillons à effectifs inférieurs à 30. Une différence significative entre une condition et le contrôle négatif correspond à une $p\text{-value} < 0.005$.

2. Résultats

Lors de cette étude 2 espèces de plantes sont utilisées selon les expériences menées. La plante modèle utilisée pour les expériences d'expression transitoire de protéines par agroinfiltration est *N. benthamiana* qui est très sensible au TuMV, avec des taux d'infection de 100%. *A. thaliana* est une plante modèle pour laquelle les données bibliographiques sur les GL et de nombreux outils (mutants génétiques notamment) sont disponibles. Pour cette raison, les expériences d'analyse des protéines impliquées dans la biosynthèse des GL, ont été effectuées sur *A. thaliana*. Cependant, contrairement à *N. benthamiana*, dans nos conditions expérimentales, le taux d'infection d'*A. thaliana* par le TuMV atteint rarement 100% et la propagation du virus est plus lente.

2.1. Quel est l'impact de l'infection virale sur le nombre et les caractéristiques morphologiques des gouttelettes lipidiques ?

Afin de vérifier si l'infection du TuMV peut induire une accumulation de GL, nous avons quantifié le nombre de gouttelettes lipidiques observées au cours du temps après agroinoculation du TuMV-6K2*mcherry* dans des feuilles de *N. benthamiana*. Les travaux de l'équipe de J.F Laliberté ont montré que l'expression ectopique de la 6K2-*mcherry* lors de l'infection par le TuMV-6K2*mcherry*, permet de visualiser en microscopie confocale les VRC localisées à proximité du noyau des cellules infectées et associées au RE (Grangeon *et al.*, 2013 ; Movahed *et al.*, 2017). Nous avons donc prélevé les feuilles inoculées à 2, 3 et 4 dpi, et les feuilles infectées en systémie à 7 et 9 dpi, puis observé en microscopie confocale les GL après infiltration de la feuille avec du MDH, une molécule fluorescente qui marque spécifiquement les GL. En parallèle, des plantes ont été agroinfiltrées avec

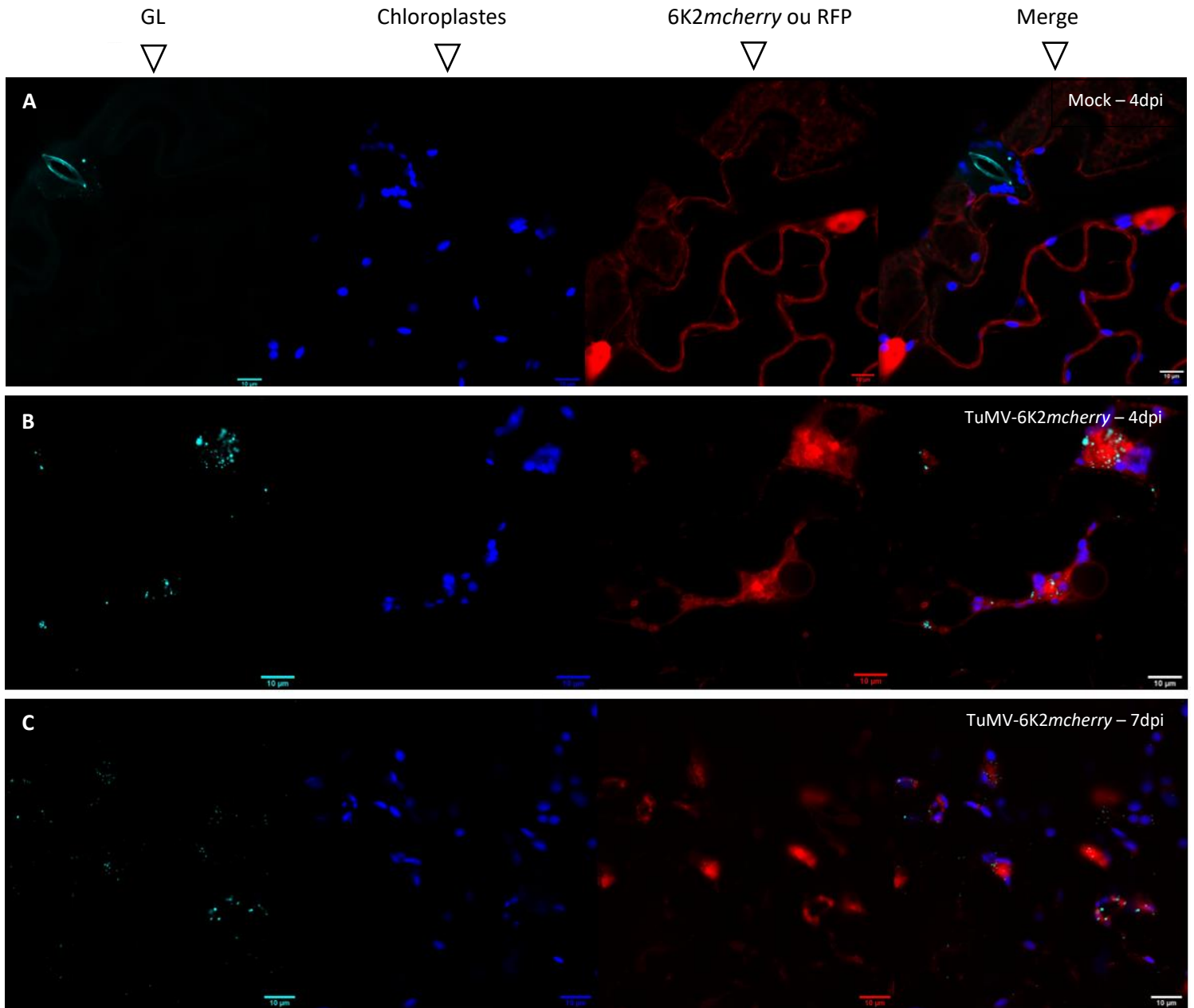


Figure 6 : La présence du TuMV provoque une relocalisation des GL au niveau des vésicules induites par le virus. A à D : images de microscopie confocale avec coloration au MDH sur *N. benthamiana*. Mock (RFP) à 4 dpi (A) ; TuMV-6K2mcherry à 4 dpi sur feuilles inoculées (B) et TuMV-6K2mcherry à 7 dpi sur feuilles systémiques (C). En cyan : GL ; en bleu foncé : chloroplastes ; rouge : RFP ou 6K2mcherry ; merge : superposition des différents canaux. Barre d'échelle = 10μm.

un construit exprimant le fluorochrome RFP seul afin de servir de contrôle négatif d'inoculation (condition "mock"). De plus, nous avons observé des plantes incubées 24h à 4°C afin d'induire de la formation des GL (contrôle positif) ce qui nous a permis de valider le marquage par le MDH.

Dès 2 dpi, et jusqu'à 9 dpi, des GL ont été observées dans toutes les cellules infectées, contrairement à la condition mock. Des photos représentatives des observations faites à 4 dpi sur feuilles inoculées (Figures 6A et 6B) et à 7 dpi sur feuilles infectées en systémie (Figure 6C), montrent que les GL (en cyan) colocalisent avec les VRC (en rouge). Nous pouvons également observer des vésicules induites par la protéine virale 6K2 qui entourent les chloroplastes (en bleu foncé) (Figures 6B et 6C).

Le nombre et la taille de toutes les GL ont été déterminés lors de deux expériences indépendantes afin de quantifier l'augmentation du nombre et potentiellement une variation de la taille des GL induites par le virus. Une différence statistiquement significative du nombre de GL par μm^2 de surface de cellule a été observée pour tous les points de cinétique sur les feuilles inoculées et systémiques par rapport à la condition "mock" (Figures 7A et 7B). L'augmentation du nombre de GL en présence du TuMV, pour 2, 3 et 4 dpi, est comparable à celle induite par un stress froid. Ces résultats confirment donc que le TuMV induit la formation de GL dans les cellules infectées. En revanche, il n'y a aucune différence statistiquement significative entre les différents points de cinétique en condition TuMV-6K2*mcherry*, suggérant qu'il n'y a pas d'augmentation au cours du temps du nombre de GL. Par ailleurs, la taille des GL ne varie pas au cours du temps, avec un diamètre moyen de 0.5 μm (entre 0.2 et 1 μm ; données non montrées). Il est intéressant de noter que les GL formées lors de l'infection par le TuMV-6K2*mcherry* ne sont pas réparties aléatoirement dans la cellule comme observé lors d'un stress froid, mais sont majoritairement colocalisées avec les VRC marquées par la 6K2-*mcherry* (Figure 7C). En effet, le pourcentage de colocalisation des GL avec les VRC est supérieur à 40% pour l'ensemble des points de cinétique et peut aller jusqu'à presque 80% sur les feuilles systémiques, pouvant suggérer un rôle des GL dans la réplication du virus plus qu'une réponse de la plante similaire à celle induite par un stress abiotique.

2.1.2. L'expression d'une protéine virale seule, est-elle suffisante pour induire la formation de GL en l'absence d'infection virale ?

Après avoir constaté l'augmentation de la quantité de GL lors de l'infection virale, la question posée est : est-ce la présence du virus entier qui provoque une réponse de la plante ou est-ce le virus qui induit cette accumulation ? Si l'hypothèse de l'induction que les GL par le virus est vérifiée, est qu'une protéine virale impliquée dans la réplication est suffisante pour induire cette accumulation ?

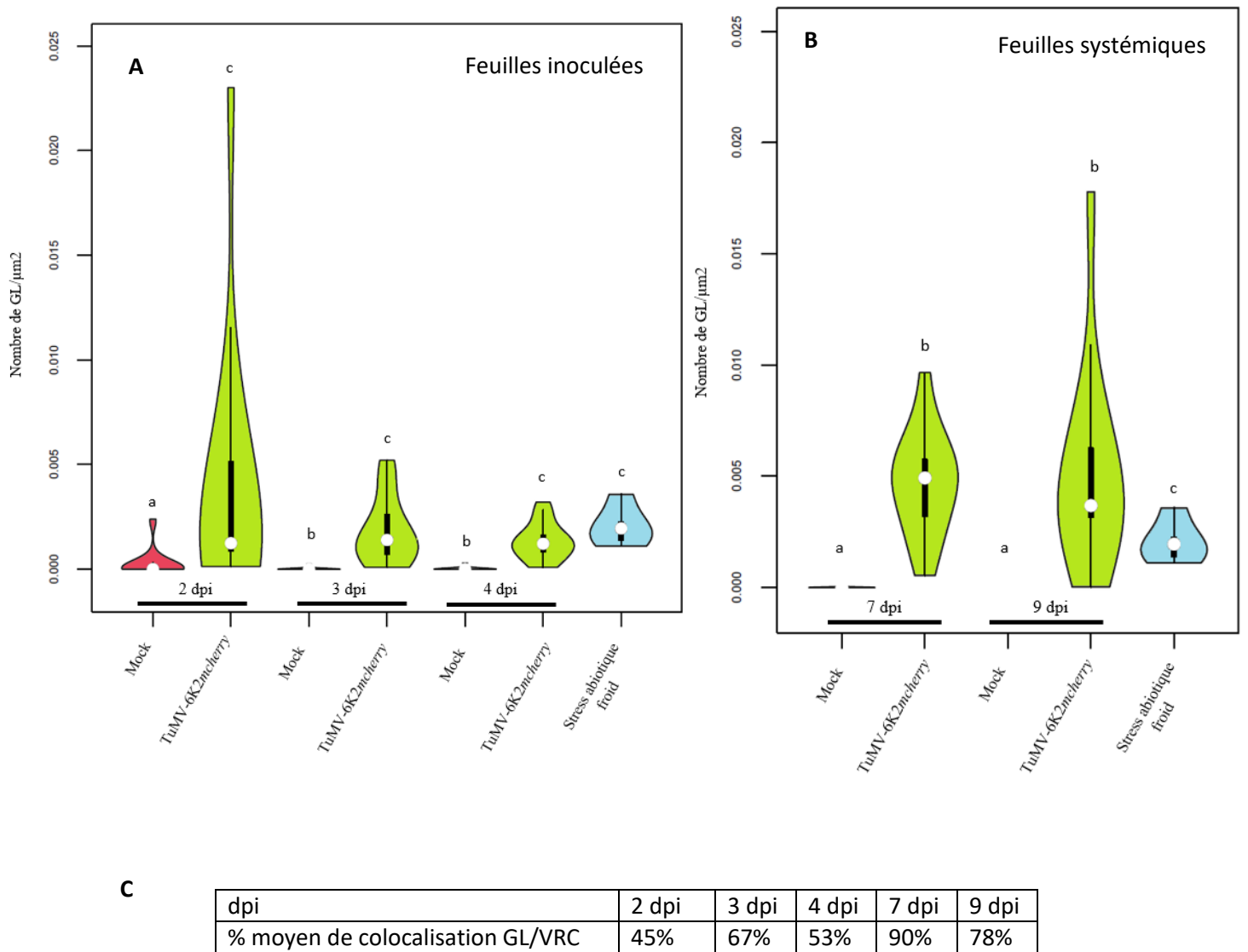


Figure 7 : La présence du TuMV induit une augmentation du nombre des GL et une relocalisation et leur au niveau des VRC. Violin plot du nombre de GL/μm² fonction de la condition (mock : RFP, TuMV-6K2mcherry, témoin positif : stress abiotique froid) sur feuilles inoculées (A) et sur feuilles systémiques (B) de *N. benthamiana*. A chaque lettre minuscule est associé un groupe de résultat significativement différent des autres. La significativité a été évaluée par des tests de Wilcoxon avec une *p-value* < 0.005. La dispersion des GL dans la cellule est représentée sous forme de pourcentage de colocalisation des GL avec les VRC (C). n, le nombre d'échantillon est entre 5 et 23 images.

Pour tester cela nous avons exprimé transitoirement deux protéines virales dans *N. benthamiana* et effectué des observations au microscope confocal à 4dpi. Nous avons testé la protéine 6K2 puisqu'elle induit, seule, la formation de vésicules de réplication dérivées du RE (Movahed *et al.*, 2017 ; Grangeon *et al.*, 2013) et la protéine CI, pour *cylindrical inclusion*, une hélicase virale, impliquée dans la réplication ainsi que dans le mouvement du virus (Sorel *et al.*, 2014). La figure 8 montre des images représentatives des observations faites pour chaque condition. En figure 8A, la condition mock, dans laquelle peu ou pas de GL sont observées. La protéine 6K2-RFP, provoque une augmentation de la quantité de GL et leur accumulation au niveau des vésicules, similaire au profil observé en présence du virus entier (Figure 8B). Enfin la figure 8C représente la condition CI-RFP, où la protéine CI semble également augmenter la quantité de GL mais sans relocalisation. En effet, le nombre moyen de GL par μm^2 de surface de cellule est 6 et 4 fois plus élevé en présence de 6K2-RFP et CI-RFP, respectivement, par rapport au mock (Figure 8D). De plus, l'augmentation du nombre de GL pour les conditions 6K2-RFP et CI-RFP est comparable au témoin positif : stress abiotique froid, ce qui démontre que ces deux protéines virales, sont capables d'induire la formation de GL, de manière indépendante. La taille des GL induites, d'environ 0.5 μm , est identique à celle observées en présence du génome viral complet (données non montrées). La colocalisation des GL avec le signal RFP des protéines a été évaluée, le pourcentage de colocalisation des GL avec la protéine 6K2-RFP est beaucoup plus important qu'avec la CI-RFP (Figure 8E). En effet, la répartition des GL au sein de la cellule est différente, avec une dispersion des GL dans tout le cytosol lors de l'expression de la CI-RFP, contre un regroupement des GL autour des vésicules induites par la 6K2-RFP. Les deux protéines virales semblent donc impliquées dans l'induction des GL par le virus, tout en ayant un impact différent sur leur localisation subcellulaire.

2.1.3. Observation des gouttelettes lipidiques dans les cellules infectées par le TuMV en microscopie électronique

Afin de confirmer l'hypothèse que les corps denses observés dans l'étude de Wan *et al.*, (2015) correspondent bien à des GL, ce que suggèrent aussi nos observations en microscopie confocale (voir § 2.1.1), nous avons agroinoculé *N. benthamiana* avec le TuMV-6K2mcherry ou TuMV-GFP en parallèle du contrôle "mock" (agroinfiltration de la RFP). Nous avons repéré et prélevé les zones infectées des feuilles inoculées à 4 dpi grâce au microscope Axiozoom, puis fixé chimiquement les échantillons selon le protocole utilisé précédemment pour observer de telles GL (Brocard *et al.*, 2017). Les lipides ont été marqués avec du tétrahydroxyde d'osmium (OsO_4) permettant d'une part de contraster l'image au microscope électronique pour visualiser les membranes et organelles et d'autre part de visualiser les GL qui ressortent très contrastées. La présence de structures

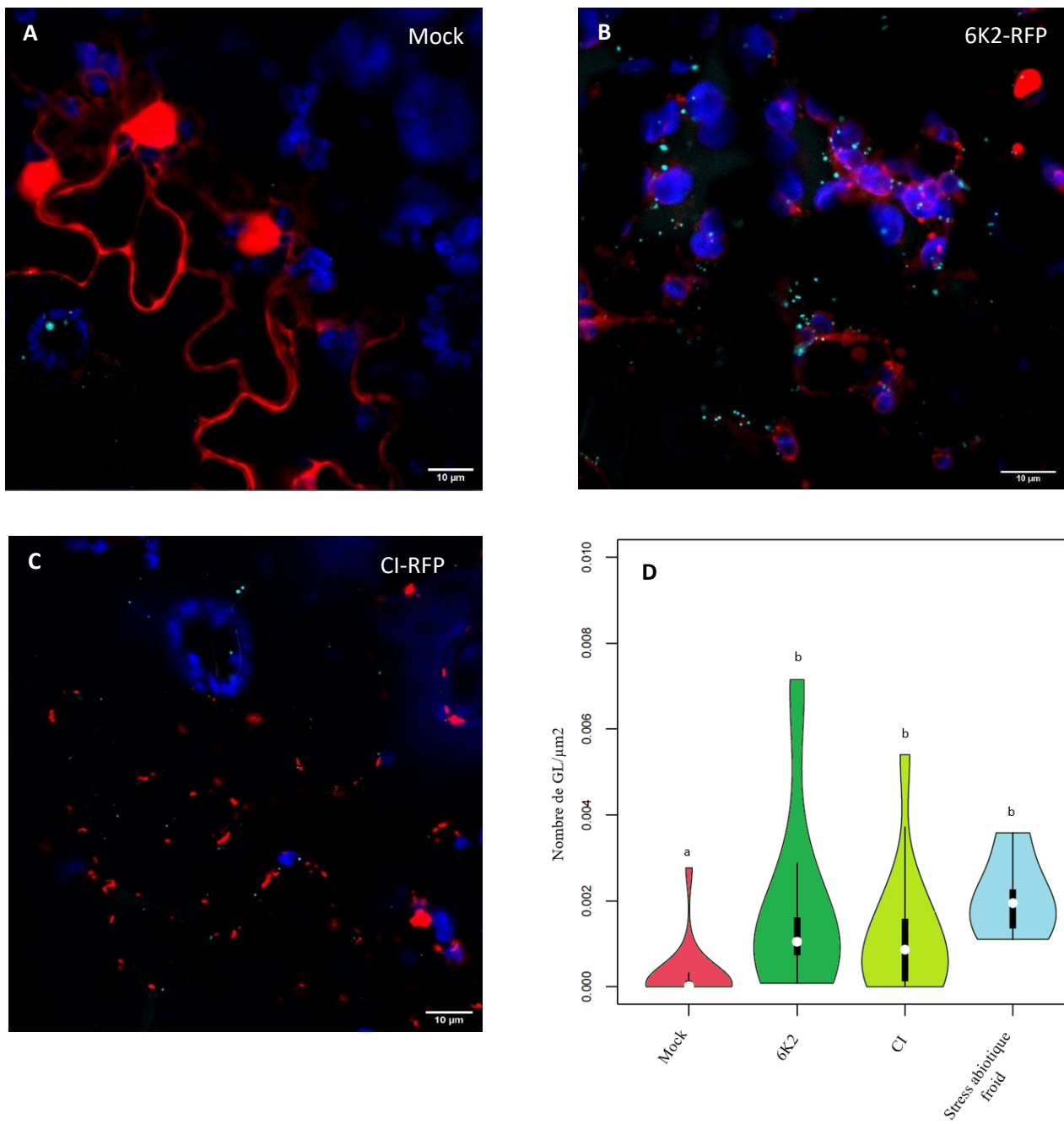


Figure 8 : Les protéines virales 6K2 et CI induisent une augmentation du nombre de GL. A, B et C : Images de microscopie confocale avec coloration au MDH sur *N. benthamiana* à 4dpi. En rouge : RFP ou 6K2-RFP ou CI-RFP ; bleu foncé : chloroplastes et en cyan : GL. Barre d'échelle = 10μm. D : Violin plot du nombre de GL/μm² en présence des différentes protéines (mock : RFP, 6K2-RFP, CI-RFP et témoin positif : stress abiotique froid). A chaque lettre minuscule est associé un groupe de résultat significativement différent des autres. La significativité a été évaluée par un test de Wilcoxon avec une *p-value* < 0.005. E : La dispersion des GL dans les cellules est représentée sous forme de % de colocalisation avec le signal RFP pour chacune des conditions. n, le nombre d'échantillon est entre 6 et 15 images.

caractéristiques de l'infection par un potyvirus (inclusions en forme de roues à aube ou *pinwheels*) permet de confirmer que les cellules observées sont bien infectées par le TuMV. En plus des inclusions en “roue à aubes”, un agrégat de vésicules rondes ou ovales, à simple (d'environ 100 nm de diamètre) ou à double membrane (d'environ 250 nm de diamètre) comme décrit par Wan *et al.*, (2015) est observé. A proximité de ces agrégats de vésicules, des GL sont fréquemment observées aussi bien en présence du TuMV-6K2*mcherry* (Figure 9A) que du TuMV-GFP (figure 9B). Ces observations confirment donc nos résultats de microscopie confocale et établissent de façon certaine la présence de GL au niveau des VRC en réponse à l'infection de la cellule par le TuMV, comme observé dans les images de Wan *et al.*, (2015).

2.2. Ces mécanismes sont-ils généralisables à l'ensemble des phytovirus ?

Nous avons donc démontré que la présence du TuMV induit une augmentation du nombre de GL dans les cellules infectées. Nous nous sommes alors demandé si d'autres virus de la même famille virale pouvaient avoir la même faculté. Le *potato virus A* (PVA) est un virus de la famille des *Potyviridae* et du genre des *Potyvirus*. Comme le TuMV, le PVA induit un remaniement membranaire pour former des complexes de réplication à proximité du noyau de la cellule infectée (Löhmus *et al.*, 2016) grâce, notamment, à la protéine 6K2. Le *potato virus X* (PVX) est un virus de la famille des *Alphaflexiviridae* qui appartient au genre des *Potexvirus*. Le PVX est très différent dans son organisation génomique, en effet il renferme un petit génome (entre 5 et 9 kb) qui ne code que pour 5 protéines. Contrairement aux virus de la famille des *Potyvirus*, il n'induit pas la formation de vésicule et les complexes de réplication sont localisés à proximité des plasmodesmes (Tilsner *et al.*, 2013).

Nous avons infecté des *N. benthamiana* soit avec le TuMV-GFP, soit avec le PVA-GFP, soit avec le PVX-GFP ou enfin avec la RFP seule (mock). Comme précédemment, l'expression transitoire de la protéine RFP seule n'induit peu ou pas de GL (Figure 10A). Avec le second clone du TuMV. Le TuMV-GFP, est observé le même profil d'accumulation de GL que celui obtenu avec le TuMV-6K2*mcherry* (Figure 6B et 6C), confirmant nos résultats. En effet le nombre de GL est plus important et elles semblent colocalisées avec les complexes de réplication suggérés par un agrégat de chloroplaste à proximité du noyau (Figure 10B). Une augmentation du nombre de GL est également observable en présence du PVA mais les GL semblent moins agglomérées (Figure 10C). Nous avons compté le nombre de GL par μm^2 de cellule en fonction de la condition et on peut voir que le TuMV et le PVA induisent une augmentation de la quantité de GL par rapport à la condition mock (figure 10D). Les deux conditions (PVA-GFP et TuMV-GFP) sont comparables au témoin positif : stress

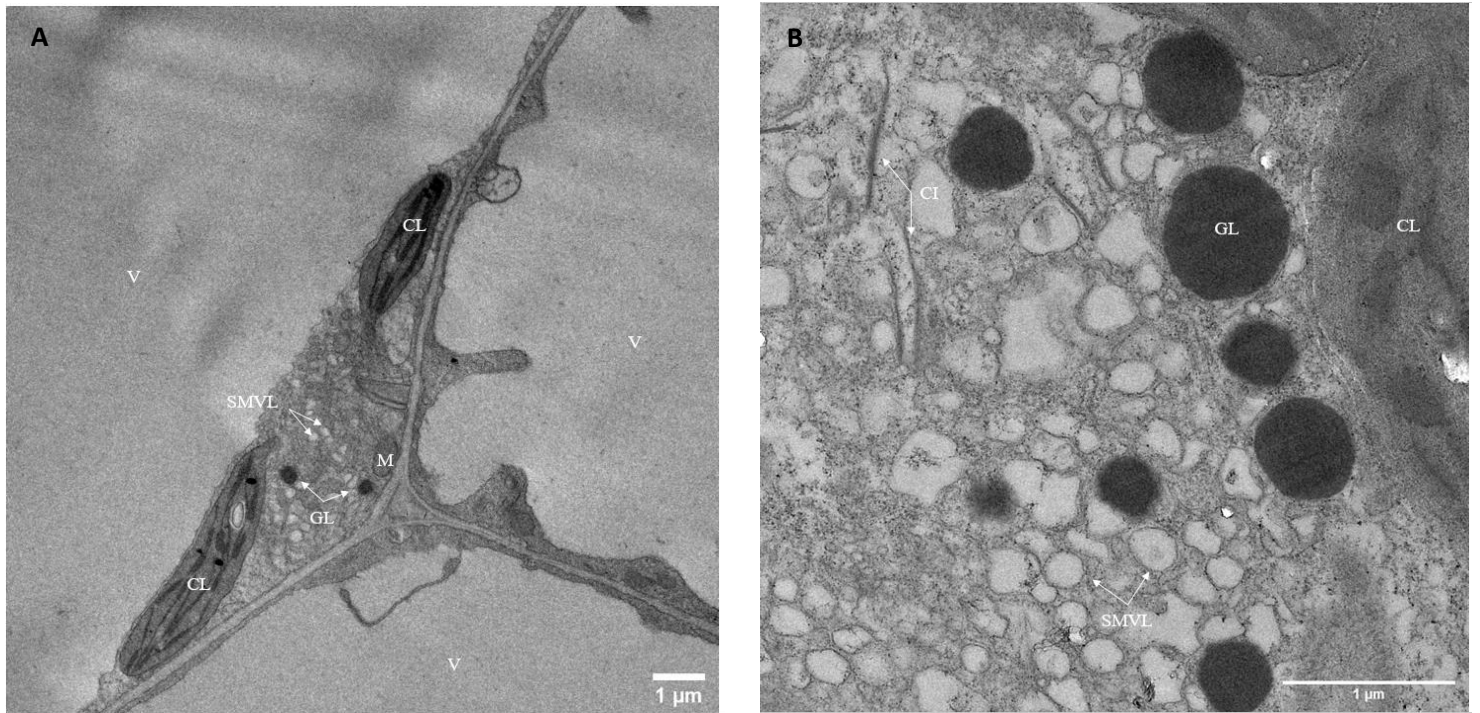


Figure 9 : Observation au microscope électronique à transmission des GL au niveau des agrégats formés par le TuMV. Les feuilles de *N. benthamiana* ont été prélevées puis vérifiées au microscope Axiozoom 4 jours post agroinfiltration de la construction TuMV-6K2*mcherry* (A) et TuMV-GFP (B). Les échantillons ont été fixés chimiquement et les coupes ultrafines de 80 nm observées au microscope électronique à transmission. CL : chloroplaste ; GL : gouttelette lipidique ; CI : protéine virale CI et SMVL : vésicule à simple membrane ; M : mitochondrie V : vacuole. Barre d'échelle : 1 µm.

abiotique froid, confirmant cette augmentation. En revanche, aucune GL n'a été observée en présence du PVX (Figure 10D).

2.3. Quel est l'impact de l'infection virale par un potyvirus sur la composition lipidique des feuilles ?

Nos résultats montrent que l'infection par le TuMV induit la formation de GL. Nous avons donc voulu analyser la composition lipidique des feuilles en cas d'infection virale par rapport au contrôle mock, afin de confirmer nos premiers résultats. En effet, comme dit précédemment, certains phytovirus, et notamment le TuMV, provoque d'important réarrangement membranaire et perturbe donc le métabolisme lipidique de son hôte. Pour étudier cela, des plantes d'*A. thaliana* âgées de 4 semaines ont été agroinfiltrées soit avec le clone TuMV-GFP soit avec une construction exprimant la RFP seule (mock). Les feuilles infectées en systémie ont été prélevées à 24 dpi après confirmation de l'infection virale par observation de la GFP au microscope Axiozoom (figure 11A), broyées puis les lipides totaux ont été extraits. Les différentes classes de lipides, neutres et polaires, ont été séparées par chromatographie sur couche mince puis quantifiées par chromatographie gazeuse couplée à un détecteur à ionisation de flamme après trans-estérification. Comme attendu, la quantité totale en µg de lipides (polaires et neutres) diminue en présence du virus (Figure 11B). Nous nous sommes donc demandé quels lipides sont impactés par l'infection virale. Pour les lipides polaires, nous avons étudié les monogalactosyldiacylglycerols (MGDG), digalactosyldiacylglycerols (DGDG), phosphatidyléthanolamines (PE) et phosphatidylglycérols (PG) qui sont les constituants principaux des membranes des thylakoïdes dans les chloroplastes des plantes, ils jouent un rôle important dans la photosynthèse mais également dans la signalisation cellulaire (Hölzl et Dörman, 2019). Les phosphatidylinositols (PI) qui sont des lipides présents dans la couche interne de la membrane plasmique et jouent également un rôle dans la signalisation cellulaire, ont aussi été étudiés. Enfin, la dernière classes de lipide polaire est représentée par les phosphatidylcholines (PC) qui sont présents dans les membranes cellulaires et jouent un rôle dans les réponses aux stress abiotiques (Zhang and Majerus, 1998). Pour les lipides neutres, nous avons étudié les TAG et les esters de stérol qui sont les composants du cœur lipidique des GL, les diacylglycérols (DAG) qui sont des intermédiaires du métabolisme des TAG. Enfin nous avons quantifié les acides gras libres (*free fatty acids* ou FFA), qui sont le résultat de l'hydrolyse des lipides suite à un stress.

Pour les lipides polaires, la présence de TuMV ne semble pas provoquer d'important changement dans la distribution, ceci-dit, une légère diminution des PG, notamment, est observable (Figure 11C). En revanche, pour les lipides neutres, on observe une proportion de TAG qui augmente,

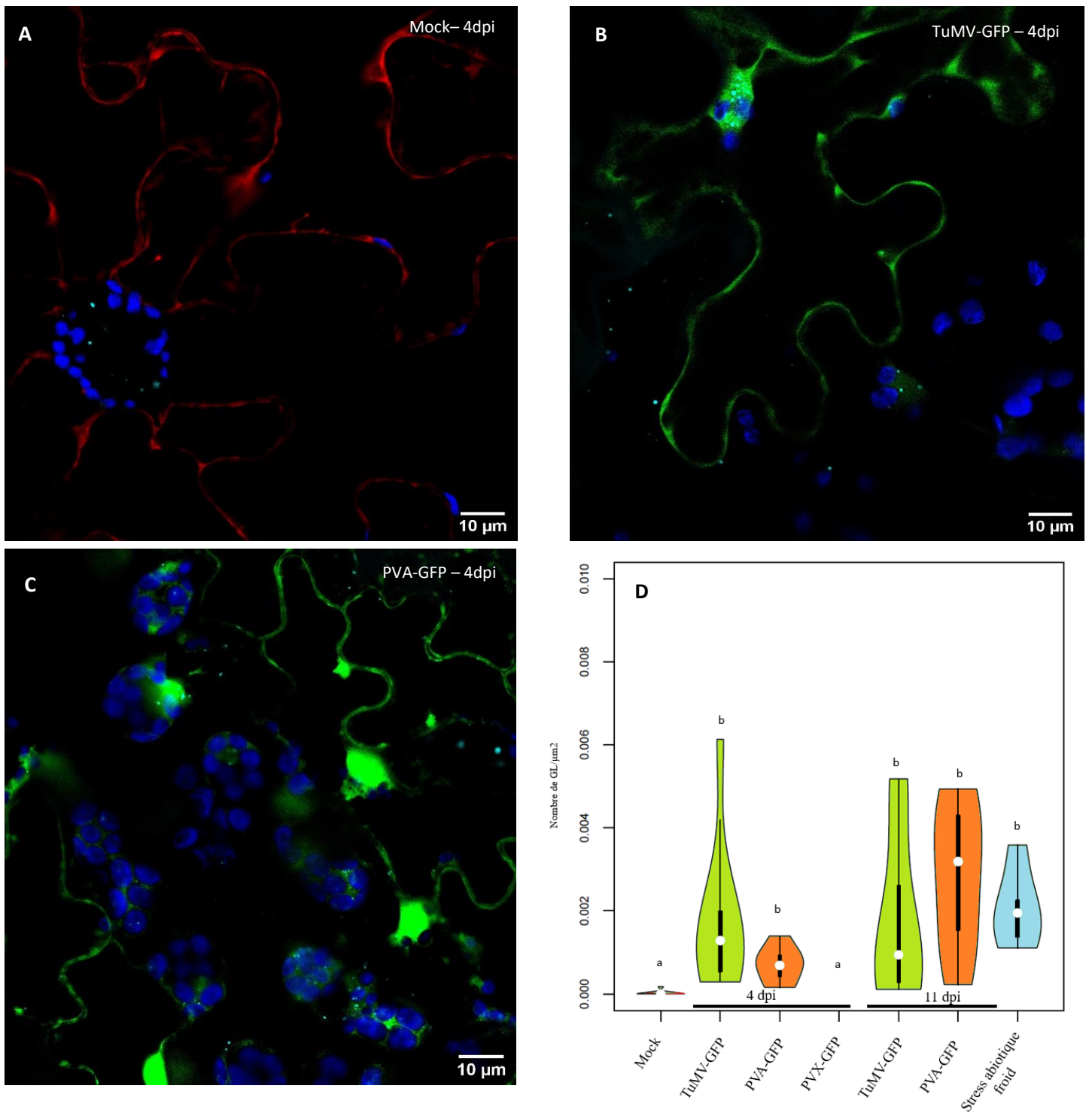


Figure 10 : Le PVA induit une augmentation de la quantité de GL. A et B : Images de microscopie confocal avec coloration au MDH sur *N. benthamiana* du mock à 4 dpi (A), du TuMV-GFP à 4 dpi (B) et du PVA-GFP à 11 dpi (C). En rouge : RFP ; en vert : GFP ; bleu foncé : chloroplastes et en cyan : GL. Barre d'échelle = 10μm. D : Violin plot du nombre de GL/μm² en fonction de la condition (mock : RFP, TuMV-GFP, PVA-GFP et témoin positif : stress abiotique froid). A chaque lettre minuscule est associé un groupe de résultat significativement différent des autres. La significativité a été évaluée par un test de Wilcoxon avec une *p-value* < 0.005. n, le nombre d'échantillon est entre 6 et 10 images.

au détriment des autres lipides neutres, en présence du TuMV-GFP par rapport à la condition mock (respectivement 43% et 27% ; Figure 11D). Les TAG étant les composants principaux du cœur des GL, ces résultats concordent avec l'augmentation de la quantité de GL dans les feuilles lors de l'infection virale. A l'inverse, la distribution stable des différentes classes de lipides polaires en condition "TuMV-GFP" et mock suggère une faible modification de la composition des membranes par le TuMV. La composition en acide gras (c'est-à-dire la longueur des chaînes de carbone ainsi que la saturation) de chacun des lipides polaires et neutres ne varie pas non plus en réponse à l'infection virale (données non montrées).

En revanche, la quantité absolue de chaque classe de lipides, exprimée par rapport à la masse sèche, est réduite en réponse à l'infection virale (figures 11E et 11F). Ceci traduit probablement l'impact important du virus sur le métabolisme général de la cellule, avec une dégradation globale des membranes cellulaires.

2.4. Quel est le rôle des GL dans le cycle des potyvirus ?

Chez *A. thaliana* plusieurs protéines impliquées dans la biogenèse des GL ont pu être mises en évidence, dont les protéines SEIPIN et LDAP (*lipid droplet associated proteins*). La famille de protéines SEIPIN est composée de trois protéines qui favorisent l'accumulation des TAG au niveau du RE et participent ainsi à la régulation de la formation des GL (Cai *et al.*, 2015). LDAP1 est l'un des trois membres de la famille des LDAP qui sont présents à la surface des GL de feuille (Gidda *et al.*, 2016 ; Coulon *et al.*, 2020) mais absents dans les graines. Ces protéines jouent un rôle important dans la biogénèse des GL et dans leur stabilité. Les mutants d'*A. thaliana* pour ces deux familles de protéines (sur-expressseurs (OE) ou mutants de type *Knock-out* ou KO), utilisés au cours de cette étude, sont décrits dans le tableau 1.

Ces mutants ont été agroinoculés avec le clone TuMV-GFP. L'ensemble des feuilles à l'exception des feuilles inoculées ont été prélevées à 22 dpi pour estimer le niveau d'accumulation virale par un test ELISA (Figure 12). Seules 3 plantes sauvages (Col 0) sur 9 ont été infectées (Figure 12A), suggérant un problème lors de l'agroinoculation et des échappées à l'infection, ce qui nous incite à prendre avec beaucoup de réserve les résultats de cette expérience. Néanmoins, dans le cas du KO *ldap1*, seulement 4 plantes sur 10 sont positives (c'est-à-dire environ la même quantité que pour Col 0) (Figure 12B) alors que la totalité (10/10 plantes) des OE LDAP1 sont infectées (Figure 12C), suggérant peut-être un impact positif de la surexpression de cette protéine dans l'infection par le TuMV. Inversement, quand la protéine SEIPIN1 est surexprimée, c'est-à-dire que la membrane du RE est remodelée (Taurino *et al.*, 2018), 3 *A. thaliana* sur 10 étaient positives (comparable à la

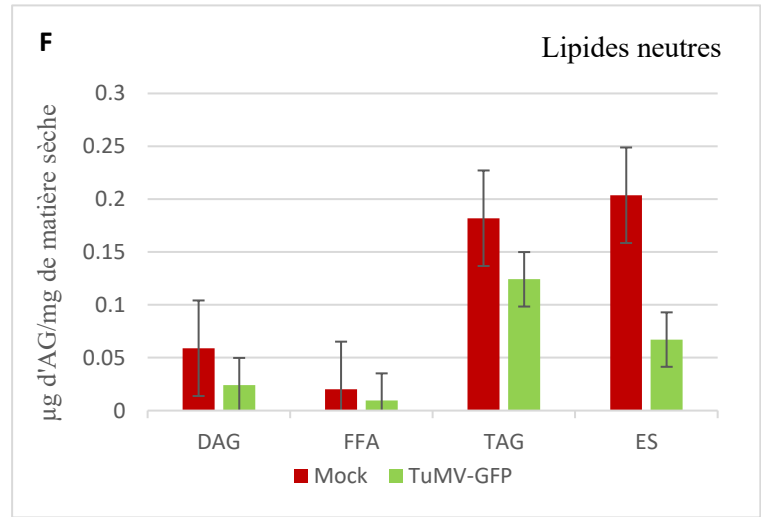
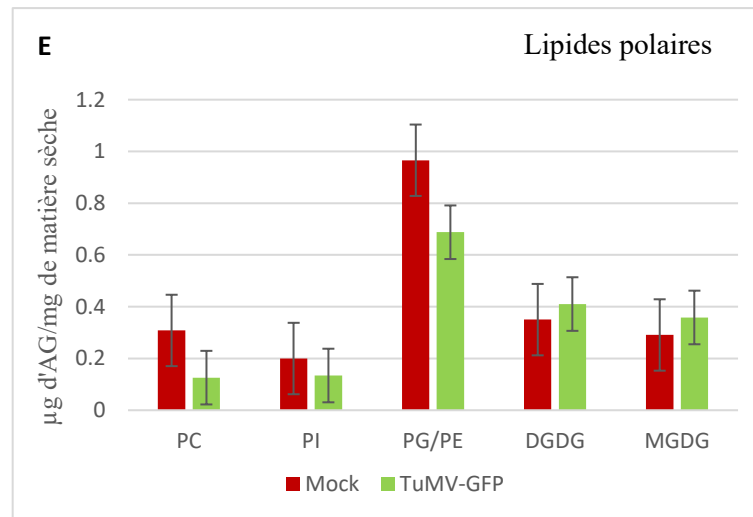
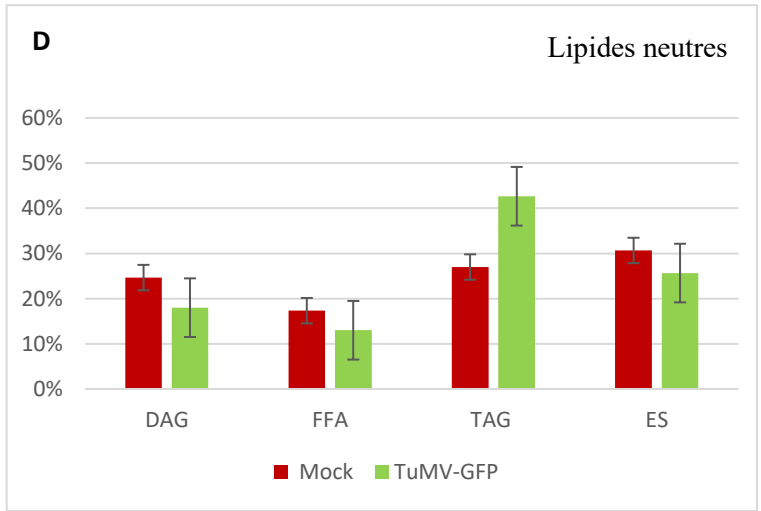
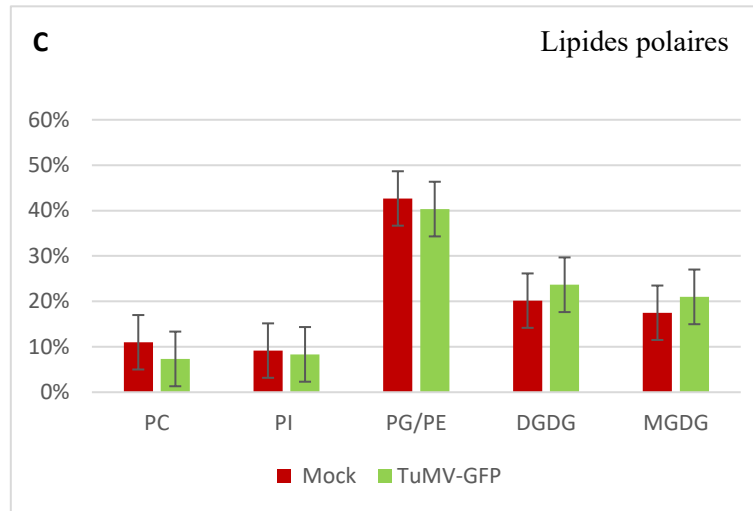
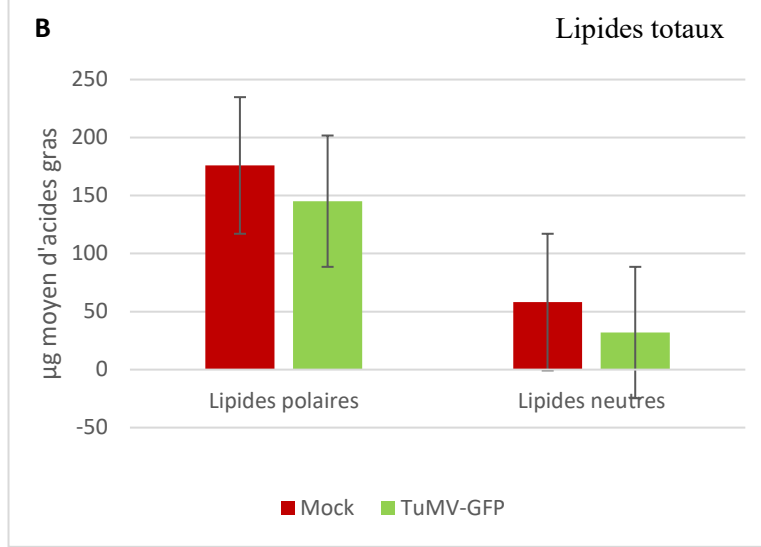
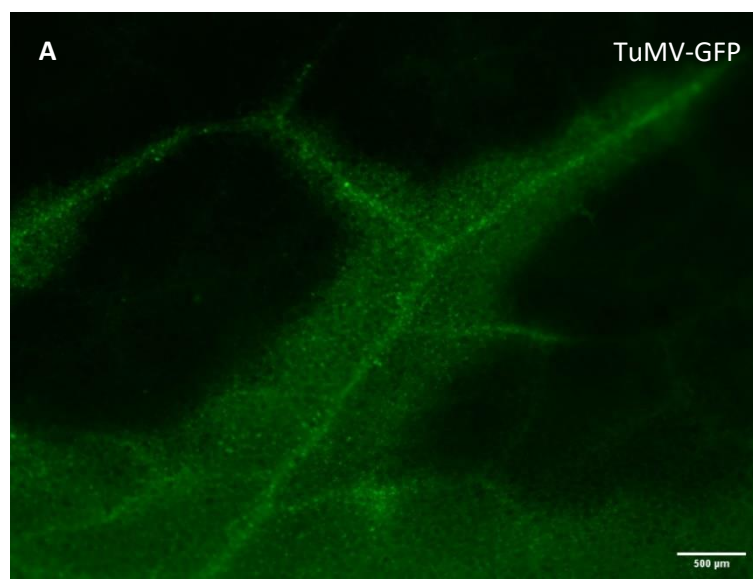


Figure 11 : Modification de la composition en lipides polaires et neutres des feuilles lors de l'infection virale. Observation au microscope axiozoom, au grossissement x5, des feuilles d'*A. thaliana* infectées par le TuMV-GFP pour le prélèvement à 24 dpi (A). Barre d'échelle : 500μm. Le μg moyen d'acides gras des plantes agroinfiltrées soit avec le clone infectieux TuMV-GFP soit avec le plasmide contenant le gène de la RFP (B). La quantité d'acides gras en μg/mg de matière sèche pour chaque classe de lipides est représentée en (C) pour les lipides polaires et en (D) pour les lipides neutres. La distribution des différentes classes de lipides en % est donnée en (E) pour les lipides polaires et en (F) pour les lipides neutres. Mock (en rouge) et feuilles en système de plante agroinfiltré avec le clone infectieux TuMV-GFP (en vert). PC : phosphatidylcholine ; PE : phosphatidyléthanolamine ; PI : phosphatidylinositol ; PG : phosphatidylglycerol ; DGDG : digalactosyldiacylglycerol ; MGDG : monogalactosyldiacylglycerol ES : esters de stérol ; TAG : triacylglycérides ; FFA : *free fatty acid* ou acides gras libres ; DAG : diacylglycerides. Ces données ont été obtenues avec 3 réplicas de chaque condition (RFP ou TuMV-GFP). 3 réplicas de chaque échantillon (RFP ou TuMV) ont été testés.

condition témoin Col 0) (Figure 12E). Enfin aucun des mutants KO seipin n'est positif (Figure 12D), suggérant que la protéine SEIPIN est essentielle à l'infection virale. Il semble donc que les deux protéines SEIPIN et LDAP jouent un rôle différent dans le cycle viral mais cette expérience n'a été réalisée qu'une seule fois, ces résultats sont préliminaires et nécessitent donc d'être confirmés en répétant l'essai.

3. Discussion et perspectives

Cette étude a permis de montrer pour la première fois que lors de l'infection par un virus de plante, le TuMV, une augmentation de la quantité de GL a lieu dans les feuilles inoculées et infectées en systémie. Cette augmentation a été observée aussi bien avec le clone infectieux TuMV-6K2*mcherry* qu'avec un second clone, le TuMV-GFP, alors qu'aucune induction n'est observée lors de l'agroinfiltration d'une construction non virale (RFP : mock), confirmant que ce n'est pas la construction ou l'agroinfiltration qui induit cette augmentation du nombre de GL mais bien la présence du virus. La quantité de GL, ne varie pas significativement, entre les différents points de la cinétique sur *N. benthamiana*, ce qui laisse penser que cette induction ne se déroule qu'au début du cycle viral dans la plante. Par ailleurs, alors qu'un stress abiotique induit la formation des GL dispersées dans la cellule, un regroupement des GL est observé en condition d'infection virale, situé au niveau des VRC, aussi bien par microscopie confocale (Figure 6) qu'en microscopie électronique (Figure 9). Le recrutement par le virus des GL à proximité des VRC pourrait permettre d'apporter une source d'énergie nécessaire à sa réplication ou encore, comme le fait le PV, permettre le remodelage membranaire (Laufman *et al.*, 2019). Ce type d'expérience (cinétique en microscopie confocal et confirmation des résultats en microscopie électronique) a été effectué chez *A. thaliana*. Il serait intéressant de les répéter chez *A. thaliana* afin de déterminer les jours où la quantité de GL est la plus importante et ainsi d'optimiser notamment l'utilisation des outils comme les mutants disponibles pour cette plante. En effet les expériences que nous avons réalisées sur *A. thaliana* (test ELISA) montrent qu'une optimisation de l'infection est nécessaire. Des expériences de collaborateurs (Roxane Lion, communication personnelle) laissent suggérer que le TuMV serait présent en systémie à partir de 6 ou 7 dpi chez *A. thaliana*, nous donnant une idée des points de cinétique à choisir. Il reste à déterminer la charge virale inoculée la plus adaptée pour avoir une quantité suffisante de virus dans les plantes. Par ailleurs, lors des expériences de nombreux problèmes liés à l'état général des plantes ont pu fausser les résultats, pour cette raison l'ensemble des expériences effectuées lors de cette étude doivent être répétées avec des plantes de meilleur état physiologique.

Nom du mutant	Construction	Phénotype précédemment décrit des GL
Mutants knockdown ou knockout		
Triple KO ldap	Inactivation des gènes LDAP1 à 3 par la technique Crispr-Cas9 (don de R.Mullen, Canada)	Défaut de biogenèse des GL = diminution de la quantité de GL et de la stabilité (Kim <i>et al.</i> , 2016)
Double mutant seipin	Mutation gènes SEIPIN 2 et 3 (Taurino <i>et al.</i> , 2018) (don de R.Mullen, Canada)	Défaut de biogenèse des GL = théoriquement plus de synthèse de GL (Taurino <i>et al.</i> , 2018)
Mutants surexpressions		
LDAP1-YFP	pUBQ10 :: LDAP1-YFP (don de R.Mullen, Canada)	Augmentation de la quantité GL dans les feuilles et formation de cluster de GL (Brocard <i>et al.</i> , 2017)
OE SEIPIN1	p35S :: SEIPIN1 (Taurino <i>et al.</i> , 2018) (don de R.Mullen, Canada)	Formation de grosses GL (Cai <i>et al.</i> , 2015)
Contrôle		
Col 0	/	/

Tableau 1 : Caractéristiques des mutants *A. thaliana* utilisés dans cette étude.

Les images de microscopie confocale ont également permis de mettre en évidence l'implication des protéines virales 6K2 et CI dans le détournement des GL. En effet, leur expression transitoire seule, dans *N. benthamiana*, sans contexte d'infection virale, induit une augmentation de l'abondance des GL (Figure 8). Comme en condition d'infection par le TuMV, la protéine 6K2 seule relocalise les GL au niveau des vésicules qu'elle induit. En revanche, en présence de la protéine CI, seule, les GL restent dispersées dans le cytosol (Figure 8). La protéine 6K2 contrairement à la protéine CI, induit la formation de vésicules (Wan *et al.*, 2015) laissant suggérer un rôle des vésicules dans le détournement et l'agrégation des GL. Il serait alors intéressant d'isoler et d'analyser ces vésicules ainsi que les protéines qui leurs sont associées comme l'étude faite sur le PVA dans l'article de Lõhmus *et al.*, (2016). L'étude d'une potentielle interaction entre les protéines CI et 6K2 et la surface des GL ou avec les protéines à la surface des GL permettrait de mieux comprendre le mécanisme par lequel le virus augmente la quantité de GL et modifie leur localisation. Dans ce cadre, une analyse protéomique par spectrométrie de masse de la composition des GL lors d'une infection virale, en comparaison avec celle des GL induite par un stress abiotique pourrait être envisagée. En effet, cela permettrait d'une part d'identifier des protéines d'*A. thaliana* spécifiquement associées aux GL en réponse aux virus, et d'autre part, d'identifier d'autres protéines virales éventuelles impliquées. La purification des GL puis l'analyse des interactants protéiques (en cherchant notamment les protéines 6K2 et CI qui sont les principaux interactants putatifs) semble être essentielle à développer.

Les analyses ont démontré que la protéine 6K2 est importante pour l'accumulation des GL dans les cellules infectées. Il serait intéressant, par la suite, de tester une autre construction de la protéine 6K2 : RFP-6K2 pour étudier l'impact de la fusion de la protéine avec la RFP (en N-terminal à la place de C-terminal) sur la formation des vésicules. Tester l'impact de différents types de mutants de la 6K2 et notamment un comportant une mutation dans le domaine transmembranaire de la protéine provoquant une relocalisation de la protéine et un défaut dans la réplication du virus (Cabanillas *et al.*, 2018), sur l'accumulation des GL. Cette expérience permettrait de déterminer comment la protéine 6K2 induit cette accumulation de GL lors de l'infection par le TuMV et quel domaine est impliqué dans ce détournement.

Des essais d'observation en microscopie électronique, avec les protéines virales CI et 6K2 pourraient être aussi envisagés. L'objectif étant de visualiser les modifications induites par les protéines, notamment les vésicules formées par la protéine 6K2 et leur association avec les GL, mais aussi de vérifier si la taille et le nombre de GL est aussi plus important qu'en condition mock. Ces images permettraient de confirmer nos observations au microscope confocal.

Pour l'ensemble des images de microscopie confocale, le témoin positif a été la condition stress "froid". En effet, la littérature décrit une augmentation de la quantité de GL en présence de

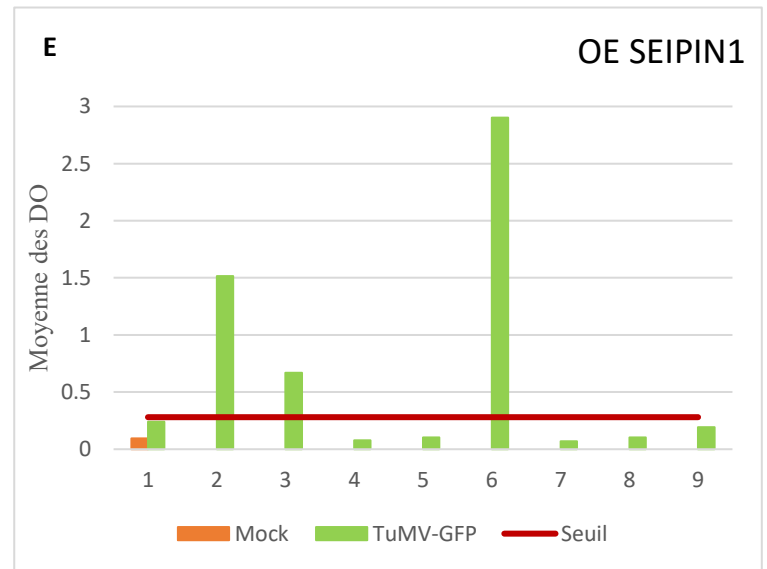
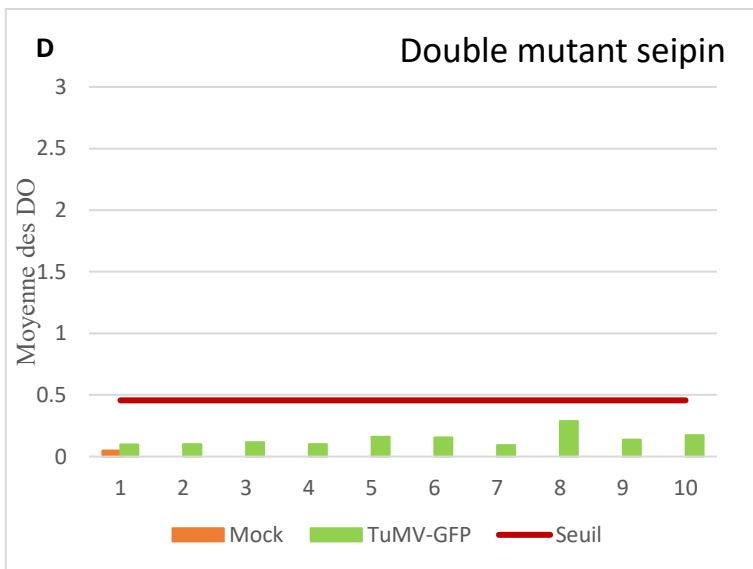
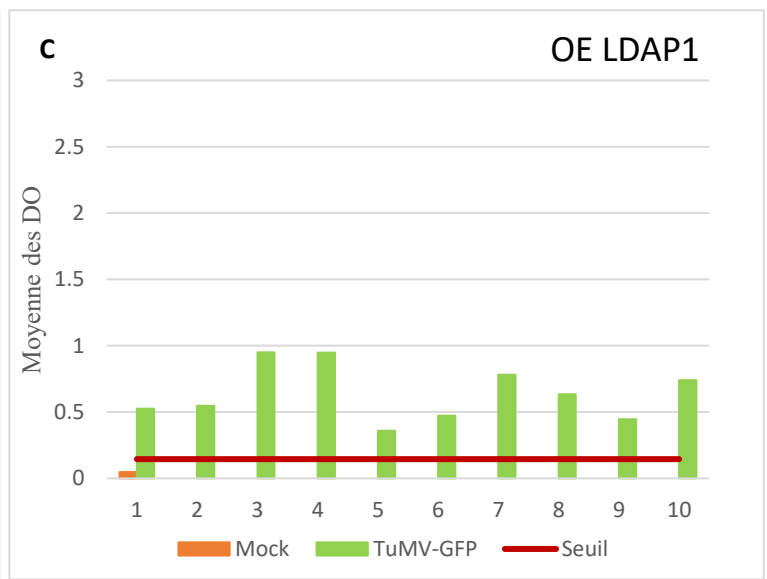
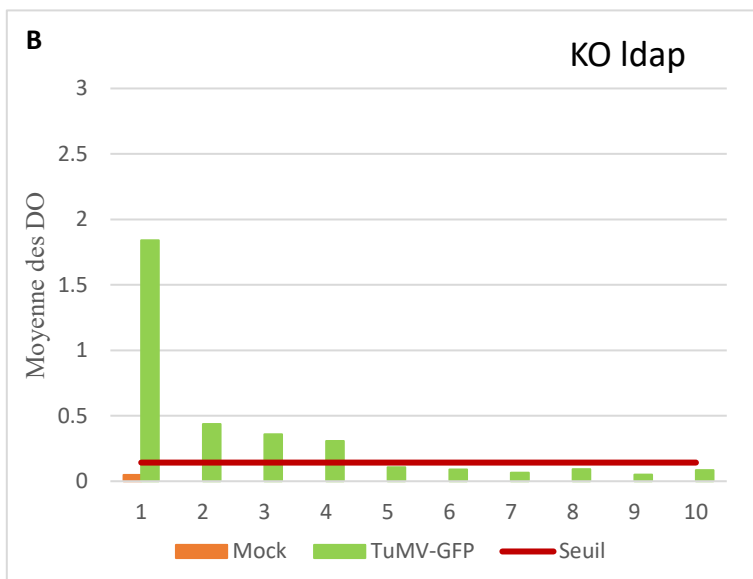
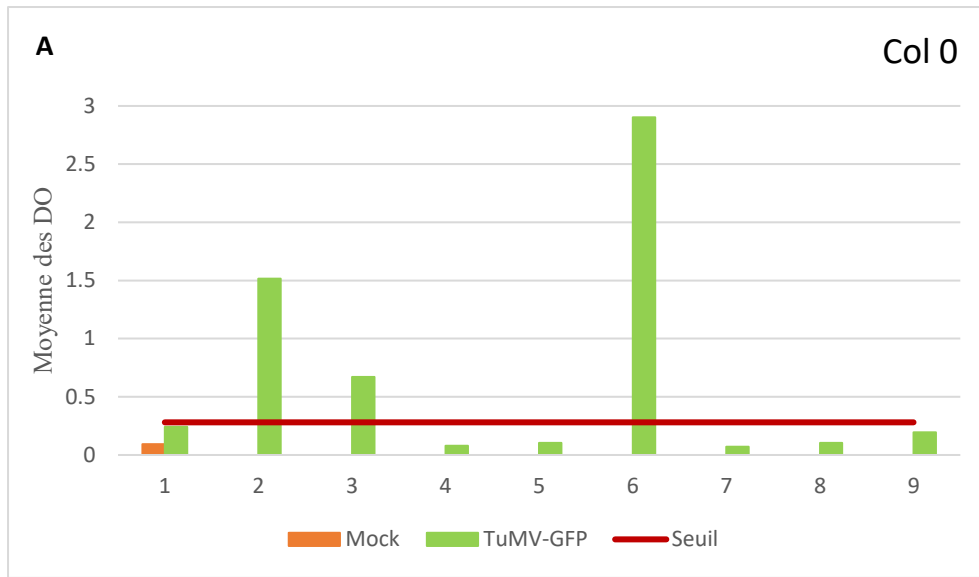


Figure 12 : Rôle des protéines SEIPIN et LDAP1 dans l'infection par le TuMV par test ELISA. Les graphiques représentent la DO moyenne mesurée dans les deux puits pour chaque échantillon. Le témoin : Col 0 (A) ; le mutant KO ldap 1,2 et 3 (B) ; OE LDAP1 (C) ; Double mutant seipin 2 et 3 (D) et OE SEIPIN1 (E). En orange : le mock et en vert le TuMV-GFP. Le trait rouge représente le seuil à partir duquel l'échantillon est considéré positif au virus, il est égal à 3x la valeur du mock.

stress abiotique (1h à 37°C pour la condition “chaud” et 24h à 4°C pour la condition “froid”) chez *A. thaliana*. Les mêmes conditions ont été testées chez *N. benthamiana*, le froid semble avoir le même impact que chez *A. thaliana* en revanche, 1h au chaud n’a pas suffi à induire une augmentation des GL. Des nouvelles données doivent être collectées afin d’avoir un témoin positif plus fiable car nous avons étudié peu d’images lors de notre étude (n=5).

Les virus à ARN simple brin de polarité positive sont connus pour avoir un impact important sur le métabolisme lipidique (Medina-Puche and Lozano-Duran, 2019), pour cette raison la composition en lipides ainsi que la distribution des différents types d’acides gras ont été analysées lors de l’infection par le TuMV. La quantité totale en µg de lipides polaires et neutres diminue lors de l’infection virale (Figure 11B), sans doute en lien avec la dégradation des membranes lors de la mort de la plante après l’apparition des symptômes. Ces résultats concordent avec ceux de Adam et Nagy, (1988). Dans cet article est étudié l’impact de l’infection par des phytovirus sur la composition des membranes. Une diminution de la quantité de phospholipides et galactolipides (lipides présents dans la membrane des chloroplastes) est observable lors de l’infection par le *barley stripe mosaic virus* qui est également un virus à génome ARN simple brin de polarité positive. Le TuMV modifie la distribution en pourcentage des classes de lipides neutres, la quantité de TAG augmentant au détriment de celle des autres lipides neutres (Figure 11F). Nos analyses lipidiques confirment donc l’hypothèse selon laquelle le virus induit la formation de GL lors de l’infection, puisque les TAG sont les composants principaux des GL. Cette expérience n’a été effectuée qu’une seule fois et sur seulement trois échantillons par conditions (mock et TuMV-GFP), ces résultats restent donc préliminaires et doivent être confirmés. Pour les répétitions de l’essai, il faudra revoir à la hausse la charge virale inoculée (par exemple DO finale = 0.4 ou 0.5) afin d’avoir une quantité de virus dans les feuilles systémiques suffisamment tôt pour éviter que les plantes ne soient trop âgées et en mauvais état.

Deux des protéines impliquées dans la biogenèse des GL ont été étudiées lors de ce stage : LDAP et SEIPIN. L’absence de la protéine LDAP dans les plantes engendre une diminution de la quantité de GL et une instabilité (Kim *et al.*, 2016), mais ne semble pas avoir d’impact sur le cycle du TuMV. En revanche, quand la protéine LDAP1 est surexprimée et, donc, que la quantité de GL est plus importante (Brocard *et al.*, 2017), l’infection par le TuMV est considérablement augmentée (Figure 12B et 12C). La présence de GL semble avoir une importance pour le cycle du TuMV, et plus la quantité est importante et plus le virus est infectieux. La protéine SEIPIN, quant à elle, a un impact sur la taille des GL, plus que le nombre, en effet quand SEIPIN1 est surexprimé, la taille des GL est largement augmentée (Cai *et al.*, 2015). La taille des GL ne semble pas avoir d’impact sur le détournement par le TuMV puisque la quantité de plantes “positives” est similaire au témoin Col 0

(Figure 12E). Comme dit précédemment, la famille des SEIPIN est composée de trois protéines, cependant seules SEIPIN2 et SEIPIN3 sont présentes dans les feuilles, pour cette raison le mutant double KO seipin 2 et 3 a été utilisé. Dans ce cas-là, l'infection par le TuMV semble très impactée puisqu'aucune plante n'a été infectée (Figure 12D), la présence des GL semble donc indispensable à l'infection et/ou la propagation par ce virus. Une autre question se pose face à ces résultats, est-ce les protéines SEIPIN et/ou LDAP qui sont détournées par le virus et donc nécessaires au cycle, ou est-ce simplement la présence de GL en grande quantité dans la cellule ? Néanmoins, ces résultats restent préliminaires et les tests ELISA doivent être répétés. En effet, les témoins positifs (*N. benthamiana* infectées par le TuMV-GFP et prélevées à 4 dpi) ne sont pas ressortis positifs certainement à cause du prélèvement fait de manière trop prématurée. Un essai sur feuilles inoculées, uniquement, et non sur plantes entières comme réalisé lors de cette étude, serait à effectuer afin d'étudier cet impact en début de cycle viral. Cette étude doit également être confirmée par des qRT-PCR permettant une quantification précise de la charge virale et donc de l'influence de la présence ou non des protéines SEIPIN et LDAP sur la charge virale et la propagation du TuMV.

Une fois l'impact de la présence ou non de SEIPIN et LDAP sur l'infection virale étudié, il serait intéressant, de compléter les résultats obtenus, en étudiant, cette fois-ci, l'impact de l'infection virale sur le niveau d'expression des gènes correspondant chez la plante sauvage. L'objectif de cette partie serait, de corrélérer précisément l'expression des gènes codant les protéines impliquées dans la biogenèse des GL avec la charge virale afin d'étudier l'impact de la présence du virus sur ces gènes. L'étude de l'expression de l'ensemble des gènes codant pour des protéines impliquées dans le métabolisme lipidique pourrait de plus être envisagée afin de comprendre l'impact du virus sur la synthèse ou la dégradation des lipides lors de l'infection.

Enfin, nos résultats préliminaires de microscopie confocale montrent qu'une autre espèce du genre *Potyvirus*, Le PVA induit également la formation de GL dans les cellules de *N. benthamiana* (Figure 10C), suggérant que ce mécanisme pourrait être généralisable à l'ensemble du genre des *Potyvirus*. Un clone de PVA-6K2-YFP nous a été donné par Maija Pollari (Helsinki, Finlande), qui nous permettra d'effectuer le même type de cinétique, sur le PVA, que sur le TuMV avec le même type d'analyse : nombre, taille et distribution des GL lors de l'infection en comparaison avec une condition mock. Si l'induction de GL par le PVA est confirmée, des essais avec des virus d'autres genres des *potyviridae* mais également sur d'autres familles de phytovirus pourraient être réalisés pour déterminer si ce détournement est généralisable à l'ensemble des virus de plante. Les premiers résultats obtenus sur le PVX, ne semblent pas aller dans cette direction, puisqu'aucune GL n'a été observée (Figure 10D). Cependant, le cycle du PVX nécessiterait d'être plus étudié pour recommencer cette étude afin de choisir le jour post inoculation le plus adapté pour les observations.

Cette expérience n'ayant été effectuée qu'une seule fois, ces résultats restent préliminaires et donc à confirmer.

En conclusion, notre étude montre pour la première fois une implication des GL dans l'infection virale chez les plantes. Ce résultat est un réel tournant dans la compréhension des mécanismes viraux par lesquels le virus détourne la machinerie cellulaire de l'hôte. Les potyvirus représentant une importante partie des virus à impact agronomique important, ces données pourraient faire l'objet d'importantes recherches pour contrer ces virus. En effet, si la présence de ces organites cellulaires a réellement un rôle dans l'infectivité et/ou la réplication du virus, des pistes pour des luttes anti-virales pourraient être envisagées, par exemple avec la protéine SEIPIN qui semble bloquer l'infection par son absence. D'autres protéines de cette même voie métabolique pourraient permettre de bloquer l'infection et/ou la propagation du TuMV. De plus, ce mécanisme pourrait être généralisable au moins au genre de *Potyvirus*, mais peut être à l'ensemble de la famille des *Potyviridae* et permettre de limiter l'impact agroéconomique qu'ont ces virus sur les cultures, actuellement.

Bibliographie

- Ádám, A., et Nagy, P.D. (1989). Variations in membrane polar lipids of barley leaves infected with three strains of barley stripe mosaic virus and with poa semilatifolius virus. *Plant Science* 61, 53–59.
- Cabanillas, D.G., Jiang, J., Movahed, N., Germain, H., Yamaji, Y., Zheng, H., et Laliberté, J.-F. (2018). Turnip mosaic virus uses the SNARE Protein VTI11 in an unconventional route for replication vesicle trafficking. *The Plant Cell* 30, 2594–2615.
- Cai, Y., Goodman, J.M., Pyc, M., Mullen, R.T., Dyer, J.M., et Chapman, K.D. (2015). Arabidopsis SEIPIN proteins modulate triacylglycerol accumulation and influence lipid droplet proliferation. *Plant Cell* 27, 2616–2636.
- Chen, B.-H., Yang, H.-J., Chou, H.-Y., Chen, G.-C., et Yang, W.Y. (2017). Staining of lipid droplets with monodansylpentane. *Methods Mol Biol* 1560, 231–236
- Cotton, S., Grangeon, R., Thivierge, K., Mathieu, I., Ide, C., Wei, T., Wang, A., et Laliberté, J.-F. (2009). Turnip mosaic virus RNA replication complex vesicles are mobile, align with microfilaments, and are each derived from a single viral genome. *J Virol.* 83, 10460–10471.
- Coulon, D., Brocard, L., Tophile, K., et Bréhélin, C. (2020). Arabidopsis LDIP protein locates at a confined area within the lipid droplet surface and favors lipid droplet formation. *Biochimie* 169, 29–40.
- Gidda, S.K., Park, S., Pyc, M., Yurchenko, O., Cai, Y., Wu, P., Andrews, D.W., Chapman, K.D., Dyer, J.M., et Mullen, R.T. (2016). Lipid droplet-associated proteins (LDAPs) are required for the dynamic regulation of neutral lipid compartmentation in plant cells. *Plant Physiol* 170, 2052–2071.
- , R., Jiang, J., Wan, J., Agbeci, M., Zheng, H., et Laliberté, J.-F. (2013). 6K2-induced vesicles can move cell to cell during turnip mosaic virus infection. *Front Microbiol* 4.
- Hözl, G., et Dörmann, P. (2019). Chloroplast lipids and their biosynthesis. *Annu Rev Plant Biol* 70, 51–81.

- Jiang, J., Patarroyo, C., Garcia Cabanillas, D., Zheng, H., et Laliberté, J.-F. (2015). The vesicle-forming 6K2 protein of turnip mosaic virus interacts with the COPII coatomer Sec24a for viral systemic infection. *J Virol* 89, 6695–6710.
- Kim, E.Y., Park, K.Y., Seo, Y.S., et Kim, W.T. (2016). Arabidopsis small rubber particle protein homolog SRPs play dual roles as positive factors for tissue growth and development and in drought stress responses. *Plant Physiology* 170, 2494–2510.
- Laufman, O., Perrino, J., et Andino, R. (2019). Viral generated inter-organelle contacts redirect Lipid flux for genome replication. *Cell* 178, 275-289.
- Lee, J.-Y., Cortese, M., Haselmann, U., Tabata, K., Romero-Brey, I., Funaya, C., Schieber, N.L., Qiang, Y., Bartenschlager, M., Kallis, S., et al. (2019). Spatiotemporal coupling of the hepatitis C virus replication cycle by creating a lipid droplet- proximal membranous replication compartment. *Cell Rep* 27, 3602-3617.
- Löhmus, A., Varjosalo, M., et Mäkinen, K. (2016). Protein composition of 6K2-induced membrane structures formed during potato virus A infection. *Mol Plant Pathol* 17, 943–958.
- Medina-Puche, L., et Lozano-Duran, R. (2019). Tailoring the cell: a glimpse of how plant viruses manipulate their hosts. *Curr Opin Plant Biol* 52, 164–173.
- Movahed, N., Patarroyo, C., Sun, J., Vali, H., Laliberté, J.-F., et Zheng, H. (2017). Cylindrical Inclusion protein of turnip mosaic virus serves as a docking point for the intercellular movement of viral replication vesicles. *Plant Physiology* 175, 1732–1744.
- Nagy, P.D. (2016). Tombusvirus-host interactions: co-opted evolutionarily conserved host factors take center court. *Annu Rev Virol* 3, 491–515.
- Perraki, A., Cacas, J.-L., Crowet, J.-M., Lins, L., Castroviejo, M., German-Retana, S., Mongrand, S., et Raffaele, S. (2012). Plasma membrane localization of *Solanum tuberosum* remorin from group 1, homolog 3 is mediated by conformational changes in a novel C-terminal anchor and required for the restriction of potato virus X movement. *Plant Physiol* 160, 624–637.
- Schroeder, A.B., Dobson, E.T.A., Rueden, C.T., Tomancak, P., Jug, F., et Eliceiri, K.W. (2021). The ImageJ ecosystem: open-source software for image visualization, processing, and analysis. *Protein Sci* 30, 234–249.

- Sorel, M., Garcia, J.A., et German-Retana, S. (2014). The Potyviridae cylindrical inclusion helicase: a key multipartner and multifunctional protein. *Mol Plant Microbe Interact* 27, 215–226.
- Tanaka, Y., Nakamura, S., Kawamukai, M., Koizumi, N., et Nakagawa, T. (2011). Development of a series of gateway binary vectors possessing a tunicamycin resistance gene as a marker for the transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Biosci Biotechnol Biochem* 75, 804–807.
- Taurino, M., Costantini, S., Domenico, S.D., Stefanelli, F., Ruano, G., Delgadillo, M.O., Sánchez-Serrano, J.J., Sanmartín, M., Santino, A., et Rojo, E. (2018). SEIPIN Proteins Mediate lipid droplet biogenesis to promote pollen transmission and reduce seed dormancy. *Plant Physiology* 176, 1531–1546.
- Tilsner, J., Linnik, O., Louveaux, M., Roberts, I.M., Chapman, S.N., and Oparka, K.J. (2013). Replication and trafficking of a plant virus are coupled at the entrances of plasmodesmata. *J Cell Biol* 201, 981–995.
- Walther, T.C., Chung, J., et Farese, R.V. (2017). Lipid droplet biogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 33.
- Wan, J., Basu, K., Mui, J., Vali, H., Zheng, H., et Laliberté, J.-F. (2015). Ultrastructural characterization of Turnip mosaic virus-induced cellular rearrangements reveals membrane-bound viral particles accumulating in vacuoles. *J Virol* 89, 12441-12456.
- Wei, T., Zhang, C., Hong, J., Xiong, R., Kasschau, K.D., Zhou, X., Carrington, J.C., et Wang, A. (2010). Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathog* 6.
- Zhang, X., et Majerus, P.W. (1998). Phosphatidylinositol signalling reactions. *Semin Cell Dev Biol* 9, 153–160.

Remerciements

Je souhaite remercier mes deux maitres de stage : Sylvie German-Retana et Claire Bréhélin de m'avoir permise de faire un stage dans leurs équipes. Je tiens à vous remercier également de m'avoir si bien encadré, accompagné et guidé pour les expérimentations d'une part mais également pour vos nombreux conseils pour mon avenir professionnel. Je tiens aussi à vous remercier pour ces longues heures de discussions et de réflexion sur ce sujet si passionnant que j'ai eu la chance d'étudier pendant ce stage.

J'aimerais remercier également Luc et Denis de m'avoir encadré lors des expérimentations, partagé votre savoir, vos expériences et votre rigueur dans le travail. Merci de votre patience et votre pédagogie.

J'aimerais remercier la PEF (petite équipe fonctionnelle) de Sylvie : Minghuo, Roxane et Vincent qui n'ont pas hésité à me venir en aide quand j'en avais besoin. Et en particulier à toi Roxanne, qui m'a consacré énormément de temps qui a accepté notamment de faire des ELISA de type industriel avec moi, heureusement que la musique était là pour nous faire tenir le coup ces longues heures de pipetage.

Merci à toutes les filles de mon bureau : Deborah, Maryam, Mingsuo, Jessica, Fanny et Roxane, qui en plus d'avoir été tous les jours de mon stage, l'ont aussi été lors des week-ends quand, pendant cette pandémie, j'étais si seule dans une région totalement inconnue. Merci pour ces marches, ces pique-niques (ces coups de soleil évidemment) et j'espère bientôt pouvoir profiter en terrasse avec vous.

Merci également aux deux équipes qui m'ont accueilli chaleureusement dans leurs laboratoires.

Enfin merci à tous mes amis, notamment, Heemee et Lucas... qui m'ont soutenue et fait tenir le coup pendant ces longues soirées confinées. Merci pour ces heures à discuter virologie, PCR et Western blot et autres manip loupées. Merci à Guillaume, Julie, Julien et Loïc pour toutes ces soirées jeux vidéo, de folles parties d'échec, de pillage de village à base de titan et musiques de pirate.

Les gouttelettes lipidiques (GL) sont des organites cellulaires qui jouent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie du métabolisme cellulaire notamment en stockant les lipides neutres, une source d'énergie. Récemment, il a été découvert que des virus ARN simple brin de polarité positive animaux détournent ces GL pour leurs cycles. Parmi ces virus, le plus connu, l'*hepatitis C virus* qui forme des lipoviroparticules (le virion est entouré par une GL). Pour le moment, aucun mécanisme similaire n'a été décrit chez les phytovirus. L'objectif de mon stage est d'étudier le rôle de ces GL dans le cycle du *turnip mosaic virus* (TuMV) qui est connu pour induire d'important remaniement membranaire dans les cellules infectées. Notre étude a permis de mettre en évidence que le TuMV provoque une augmentation de la quantité et une relocalisation des GL lors de cycle. En effet, en présence du virus les GL colocalisent avec les complexes de réplication induits par la protéine virale 6K2. Un second essai a permis de mettre en évidence l'implication des protéines virales 6K2 et CI dans cette accumulation des GL. L'expression ectopique des protéines seules provoque, dans les deux cas, l'augmentation de la quantité de GL, en revanche, seule la protéine 6K2 semble colocaliser. Afin de mieux comprendre l'impact de l'infection virale sur le métabolisme lipidique de la plante, la composition en lipides des feuilles a été étudiée. Comme attendu, la proportion de triacylglycérides (composant principale des GL) augmente au détriment des autres lipides neutres en présence du virus. Enfin le rôle des GL dans le cycle du TuMV a été étudié grâce à des mutants *A.thaliana* ayant un défaut la biogenèse des GL ou sur-exprimant des protéines impliquées dans la formation de ces organites. Ces résultats sont très préliminaires mais les protéines SEIPIN et LDAP1 semblent jouer un rôle dans le cycle des potyvirus. La suite de l'étude permettra peut-être de généraliser ce mécanisme au genre des *potyvirus* et à la famille des *potyviridae*, laissant une possibilité de lutte anti-virale contre ces virus si néfastes pour l'agriculture.

Tutrices : Sylvie German-Retana et Claire Brehelin

Laboratoires d'accueil :

- Institut national de la recherche pour l'agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE) de Bordeaux – Equipe Virologie- UMR 1332 – Biologie du Fruit et Pathologie
- Centre national de la recherche scientifique (CNRS) de Bordeaux – UMR 5200 – Laboratoire de biogénèse membranaire