



HAL
open science

Effet des stress environnementaux sur la transmission des virus de plantes

Manuella van Munster

► **To cite this version:**

Manuella van Munster. Effet des stress environnementaux sur la transmission des virus de plantes. Sciences du Vivant [q-bio]. Université Montpellier II, 2019. tel-03148587

HAL Id: tel-03148587

<https://hal.inrae.fr/tel-03148587v1>

Submitted on 22 Feb 2021

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.



Université de Montpellier
Ecole Doctorale GAIA



Effet des stress environnementaux sur la transmission des virus de plantes

**Mémoire pour obtenir
l'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR)**

Présenté par

Manuella van Munster

CR1 INRA

UMR BGPI (Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite)
INRA-CIRAD-Montpellier SupAgro, Campus de Baillarguet, Montpellier, France



Déposé le 19 avril 2019

Table des matières

<i>Curriculum vitae</i>	5
Activités d'enseignement et d'encadrement	6
Contribution au fonctionnement du collectif et expertise scientifique	7
Obtention de financement et dépôt de brevet	8
Publications scientifiques	8
Communications orales	11
Communications par affiche	12
A/ Travaux de thèse	15
B/ Post-Doctorat	17
1. Des insectes non cibles sont ils sensibles à <i>Btk</i> ?	17
2. Expression temporelle des gènes du TnSNPV	17
C/ Développement des activités de recherche au sein de l'INRA	18
1. Mode d'action et résistance aux toxines Cry de <i>B. thuringiensis</i>	18
1.1 Problématique et objectifs du travail	18
1.2 Caractéristiques de la résistance à la toxine Cry3A chez le coléoptère <i>C. tremulae</i>	19
1.3 Recherche et identification des gènes codant pour la cadhérine et les aminopeptidases chez <i>C. tremulae</i>	19
1.3.1. Séquençage du gène codant pour la cadhérine	20
1.3.2. Mutations et délétions détectées chez les individus résistants	21
1.3.3. Niveau d'expression similaire chez les individus sensibles et résistants	21
1.3.4. Synthèse d'anticorps dirigés contre la cadhérine	21
1.3.5. Synthèse de peptides correspondant au site de fixation de la toxine	22
1.3.6. Il y a 3 classes d'aminopeptidases chez <i>C. tremulae</i>	22
1.4 Perspectives	22
D/ Facteurs moléculaires impliqués dans la transmission du <i>Cauliflower mosaic virus</i>	23
1. Contexte	24
2. Rôle de la protéine P3 dans la transmission du CaMV	25
2.1 Données structurales sur la protéine P2	27
2.1.1. Construction P2Nter-Foldon	27
2.1.2. Construction P2Nter-GFP	27
2.1.3. Construction P2Nter-His tag	27
2.2. Validation du rôle de P3 en tant que senseur-redox	28
2.2.1. Construction de protéines P3 mutantes et production	28
2.2.2. Analyse par dichroïsme circulaire de P3wt et P3 mutant	28
2.2.3. Tests d'interaction P2-P3 mutants	28
2.2.4. Tests de transmission à partir de virus P3 mutants	28
3. Recherche et identification de récepteurs du CaMV	29
3.1 La transmission par vecteur	29
3.2 La transmission circulante	29
3.3 Déterminants moléculaires dans la transmission non circulante : le cas du CaMV	30
3.4 L'outil bioinformatique à la rescousse, identification des protéines cuticulaires de puceron	30

E/Le changement climatique influe-il sur la capacité de dispersion des virus phytopathogènes ? 33

1. Problématique et objectifs du travail	34
1.1 Les virus de plante réagissent à leur environnement	34
1.2 Objectifs du projet	35
2. Essai d'applications de différents stress biotiques et abiotiques sur plantes infectées	36
2.1 Essais non concluants	36
2.2 Essai concluant : le déficit hydrique	36
2.2.1 Etablissement du déficit hydrique, mesures des traits de la plante.	37
2.2.2 Effet du stress hydrique sur les plantes	37
2.2.3 Effet du déficit hydrique sur la transmission	38
3. Effet du déficit hydrique sur la transmission d'un virus circulant	38
3.1 Effet sur la transmission	38
3.2. Charge virale et comportement alimentaire	39
4. Etude des interactions plante-virus chez <i>A. thaliana</i> infectée par le CaMV	40
4.1. Protocole expérimental	40
4.2. Résultats obtenus	40
5. Perspectives	42
5.1. Effet du déficit hydrique sur les plante receveuses	42
5.1.1 Le priming, un mécanisme de défense de la plante	42
5.1.2 Travaux préliminaires : <i>B. rapa</i> /CaMV	43
5.1.3. Effet d'un déficit hydrique sur la phase d'inoculation chez <i>A. thaliana</i>	43
5.2. Compréhension des mécanismes impliqués	45
5.2.1 Morphologie des cellules en déficit hydrique	45
5.2.2 Comportement alimentaire	45
5.2.3 Relocalisation cellulaire	45
5.2.4 Priming et relocalisation cellulaire	46
5.2.5 Accumulation de P2 et HCPro	46
5.3. Virus différant par leur stratégie de transmission	46
5.4. Utilisation de mutants <i>A. thaliana</i> impliqués dans les voies de signalisation	47
5.5. Elargissement à d'autres stress	47
Conclusions générales	48
Bibliographie	49

PREMIERE PARTIE

Curriculum vitae

Manuella VAN MUNSTER

manuella.van-munster@inra.fr
Chargée de Recherche 1^{ère} classe
INRA- Département SPE

Unité Mixte de Recherche "Biologie & Génétique des interactions plantes pathogènes" (U.M.R. BGPI) INRA-CIRAD-SupAgro

Equipe VIP Interactions Virus Insecte Plante
TA A54/K –Campus International de Baillarguet
34398 Montpellier cedex 05

<http://umr-bgpi.cirad.fr/equipes/equipe2-detail-projet-vanmunster.htm>

<http://umr-bgpi.cirad.fr/>

☎ : 04.99.62.48.59

Formation

- 1999-2002** **Doctorat** Développement et Adaptation des Plantes, Université Montpellier II.
Doctorat effectué au Plant Research International, Wageningen, Pays Bas grâce à une Bourse de doctorat Européenne Marie Curie (Contrat FAIR-BM-98-3051). Soutenue le 15 novembre.
Titre: Caractérisation biologique et moléculaire de virus infectant les pucerons et évaluation de leur potentiel comme biopesticides.
- 1996** **Diplôme d'Etudes Approfondies (DEA)** Bases de la Production Végétale, Université Montpellier II.
Option Amélioration des Plantes et Biotechnologies
Sujet de travail : Implication des peroxydases et des polyphénoloxydases dans l'interaction Platanus spp.-Ceratocystis fimbriata f.sp. platani.
- 1995** **Maîtrise de Physiologie Végétale Appliquée-Biochimie**, Université Montpellier II.
- 1994** **Licence de Physiologie Végétale Appliquée**, Université Montpellier II.
- 1993** **Diplôme d'Etudes Universitaires Générales (DEUG)**, Université Montpellier II. Option Biochimie-Chimie.

Expérience professionnelle

- 2011-** **Chargée de Recherche 1^{ère} classe, INRA ; UMR BGPI Montpellier**
Effet des stress abiotiques et biotiques sur la transmission des phytovirus.
- 2006-2010** **Position permanente, Chargée de Recherche 2^{ième} classe, INRA Sophia-Antipolis**
Identification des gènes de résistance aux toxines de Bacillus thuringiensis chez le coléoptère Chrysomela tremulae.

- 2004-2006** Post-doctorat à l'Institut de recherche en Biotechnologie (IRB-CNRC), Montréal, Canada. Laboratoire de Roland Brousseau & Luke Masson
Analyse des données de biopuces par l'outil informatique GeneSpring (Silicon Genetics, CA).
Financement par le Réseau Biocontrôle Canadien.
- 2003 (5 mois)** Post-doctorat. IRD-CBGP Baillarguet, Montpellier. Laboratoire de F. Pellegrin et D. Nandris
Mise au point de techniques moléculaires afin de détecter des ARNs viraux potentiellement responsables de la nécrose de l'écorce de l'Hévéa (Trunk Phloem Necrosis ; TPN).
- 1997-1998** Stagiaire volontaire. Université Montpellier II. Laboratoire de J.J. Macheix
Purification et identification d'une phytoalexine induite par l'infection par Ceratocystis fimbriata f.sp. platani chez Platanus acerifolia par chromatographie à phase liquide (HPLC).

Activités d'enseignement et d'encadrement

Enseignement

6^{ième} Université d'Été Internationale en Biologie et Ecologie Intégrative proposé par le LabEx TULIP. *Plant-virus-insect interactions under abiotic stresses*. 15-21 juillet 2017, Lesponne, Pyrénées (**Conférence invitée**).

Cours Master 1, filière Amélioration des Plantes, SupAgro, Montpellier : *Développement de résistances chez les plantes transgéniques-Bt*. Octobre 2013 (3 heures).

Ecole Chercheurs Insect Science and Biotechnology. *Bacillus thuringiensis : an alternative to chemicals, mode of action*. 11-13 avril 2007, Maratea, Italie (**Conférence invitée**).

Cours Master 1, Université de Montréal, Canada : *Les Biopesticides*. Février 2005 (2 heures).

Cours d'initiation à l'entomovirologie dans le cadre des journées portes ouvertes à l'Université de Wageningen, Pays-Bas. 2002-2003.

Activité d'encadrements

Sandy Bergès, thèse, Université Montpellier II. *Etude des interactions plante-virus après un stress hydrique sévère*. 2016-2019.

Anabella Heintz. Master 1, Université Toulouse III-Paul Sabatier. *Effet du déficit hydrique sur la transmission virale lors de la phase d'inoculation dans une nouvelle plante hôte*, 2019.

Rémy Dussaut. Master 1, Interactions Microorganismes, Hôtes et Environnements. Université Montpellier II. *Implication des voies de signalisation ABA et ROS dans la réponse de Arabidopsis thaliana soumis à une infection virale sous déficit hydrique*, 2018.

Sandy Bergès. Master 2, Biologie des Plantes et des Micro-organismes, Biotechnologies, Bioprocédés. Université Montpellier II. *Adaptation des plantes à la sécheresse et épidémiologie d'un virus non circulant, le Cauliflower mosaic virus*, 2016.

Christoph Joachim. Séjour post doctoral dans le cadre d'une collaboration avec l'Université de Munich, Department of Ecology and Ecosystem Management. *Effect of a plant virus on transgenerational wing induction in pea aphids, Acyrthosiphon pisum*. Novembre-décembre 2012.

Liliane Meunier. Master 2, Microbiologie et Immunologie, Université de Montréal, Canada. *Réponse transcriptionnelle de la tordeuse des bourgeons de l'épinette à l'exposition sous-létale de la protoxine Cry1Ab du Bacille de Thuringe*, 2004-2006.

Comités de thèse

Vanessa Eyraud (Laboratoire de Biologie Fonctionnelle, Insectes et Interactions), INSA Lyon. *Etude d'un insecticide naturel nommé PA1b : mécanisme d'action et expression hétérologue*. Thèse soutenue en mars 2014.

Jury de thèse

Cécilia Multeau (Laboratoire Diversité, Génomes & Interactions Microorganismes-Insectes), Université Montpellier II. *Contribution à l'étude du potentiel d'utilisation des Densovirus en lutte microbiologique*. Thèse soutenue en janvier 2012.

Contribution au fonctionnement du collectif et expertise scientifique

2015-2019 Membre suppléant élu du Conseil d'Unité de l'UMR BGPI (Collège des cadres scientifiques)

2017- Membre des BOGOS : Organisation des séminaires de l'Unité

2017 Annotation manuelle d'une famille de protéines cuticulaires (protéines à motif R&R) chez le puceron *Myzus persicae* à vocation d'une mise à disposition pour la communauté scientifique internationale (intégration dans la base de données AphidBase; <https://www.aphidbase.com/>). Cette annotation manuelle que j'ai réalisée est décrite dans Mathers et al. (2017).

Relecture d'articles

Molecular BioSystems, Comparative Biochemistry and Physiology, Virology, Ecological Entomology, Molecular Plant Pathology...

Evaluation de projets

Expertise d'un projet de recherche : VIOPTI (Virus Insecticide OPTimization). Programme Régional structurant "Objectif Végétal Recherche-Formation-Innovation en Pays de la Loire". Mai 2016.

Evaluation d'un projet de recherche auprès du Ministère de l'Agriculture et Développement Rural Israélien: *Application of a new isolate of the Aphid lethal paralysis virus (ALPV) in biological control of aphids*. Institute of Plant Protection, the Volcani Center, Bet Dagan, Israël Proposal NO. 132-1652-13. Juillet 2012.

2019 Co-organisatrice des Rencontres de Virologie Végétale d'Aussois 2019. Ce colloque a lieu tous les 2 ans et regroupe les scientifiques travaillant dans différents secteurs de la virologie végétale. 150 à 200 personnes participent à ce colloque (Aussois, 27-31 Janvier 2019).

Obtention de financement et dépôt de brevet

2016-2018 Région. Participant au projet APSEVIR : Adaptation des plantes à la sécheresse et épidémiologie virale. Financement obtenu: 70 k€

2013-2015 INRA – AAP SPE : Stress et transmission : Les changements climatiques influent-ils sur la capacité de dispersion des virus phytopathogènes ?
Financement obtenu: 30 k€

2009-2010 INRA – AAP SPE : Etude des aspects génomiques, génétiques et biochimiques du mode d'action et de la résistance à *Bacillus thuringiensis* chez les Coléoptères. Financement obtenu: 15 k€

1999-2002 Financement Européen Thèse Marie Curie : sur projet

2003 **Dépôt international de brevet.** F. van der Wilk & **M. van Munster**. Nucleic acid derived from an ALPV virus, compositions containing said nucleic acid and uses thereof. *Patent PCT/NL02/00682*.

Publications scientifiques

Cette liste recense mes 18 publications dans des revues scientifiques avec un IF indexé (source : Journal Citation Reports, 2017). Les 5 publications suivies d'un @ sont jointes à ce mémoire. Les étudiants que j'ai encadrés sont soulignés dans les articles co-signés avec eux.

1. Webster C.G., Pichon E., **van Munster M.**, Monsion B., Deshoux M., Gargani D., Calevro F., Jimenez J., Moreno A., Krenz B., Thompson J.R., Perry K.L., Fereres A., Blanc S., Uzest M. **(2018)**. Identification of Plant Virus Receptor Candidates in the Stylets of Their Aphid Vectors. *Journal of Virology* 92:e00432-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00432-18>. @ **(IF= 4.368)**
2. Bergès S., Vile D., Vazquez-Rovere C., Blanc S., Yvon M., Bédiée A., Rolland G., Dauzat M., **van Munster M.** **(2018)**. Interactions Between Drought and Plant Genotype Change Epidemiological Traits of *Cauliflower mosaic virus*. *Frontiers in Plant Science* 9 : 703. doi: 10.3389/fpls.2018.00703 @ **(IF= 3.677)**
3. Yvon M., Vile D., Brault V., Blanc S., **van Munster M.** **(2017)**. Drought reduces transmission of *Turnip yellows virus*, an insect-vectorred circulative virus. **(2017)**. *Virus Research*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2017.07.009> @ **(IF= 2.484)**
4. **van Munster M.**, Yvon M., Vile D., Dader B., Fereres A., Blanc S. Water deficit enhances the transmission of plant viruses by insect vectors. **(2017)**. *PLoS ONE* 12(5): e0174398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174398> @ **(IF= 2.766)**
5. Mathers T., Chen Y., Kaihakottil G., Legeai F., Mugford S., Baa-Puyoulet P., Bretaudeau A., Clavijo B., Colella S., Collin O., Dalmay T., Derrien T., Feng H., Gabaldón T., Jordan A., Julca I., Kettles G., Kowitzanich K., Lavenier D., Lenzi P., Lopez-Gomollon S., Loska D., Mapleson D., Maumus F., Moxon S., Price D., Sugio A., **van Munster M.**, Uzest M., Waite D., Jander G., Tagu D., Wilson A., van Oosterhout C., Swarbreck D., Hogenhout S. Rapid transcriptional plasticity of duplicated gene clusters enables a clonally reproducing aphid to colonise diverse plant species. **(2017)**. *Genome Biology*, 18:27 DOI 10.1186/s13059-016-1145-3. @ **(IF= 13.214)**
6. Clavijo, G., **van Munster, M.**, Monsion, B., Bochet, N., Brault, V. **(2016)**. Transcription of densovirus endogenous sequences in the *Myzus persicae* genome. *Journal of General Virology*, 97, 1000-1009. DOI:10.1099/jgv.0.000396. **(IF= 2.838)**
7. Gutiérrez S., Michalakakis Y., **van Munster M.**, Blanc S. **(2013)**. Plant feeding by insect vectors can affect life cycle, population genetics and evolution of plant viruses. *Functional Ecology* 27, 610-622. **(IF= 4. 857)**
8. **van Munster M.**, le Gleuher M., Pauchet Y., Augustin S., Courtin C., Amichot M., ffrench-Constant R., Pauron D. **(2011)**. Molecular characterization of three genes encoding aminopeptidases N in the poplar leaf beetle *Chrysomela tremulae*. *Insect Molecular Biology* 20(2), 267-278. **(IF= 2.529)**

9. Pauchet Y., Wilkinson P., **van Munster M.**, Augustin S., Pauron D., ffrench-Constant R. H. (2009). Pyrosequencing of the midgut transcriptome of the poplar leaf beetle *Chrysomela tremulae* reveals new gene families in Coleoptera. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39(5-6), 403-413. (IF= 3.117)

10. **van Munster M.**, Préfontaine G., Meunier L., Elias M., Mazza A., Brousseau R. & Masson L. (2007). Altered gene expression in *Choristoneura fumiferana* and *Manduca sexta* in response to sublethal intoxication by *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Insect Molecular Biology* 16(1), 25-35. (IF= 2.529)

11. Pellegrin F., Duran-Vila N., **van Munster M.** & Nandris D. (2007). Rubber tree (*Hevea brasiliensis*) trunk phloem necrosis: aetiological investigations failed to confirm any biotic causal agent. *Forest Pathology* 37, 9-21. (IF= 0.744)

12. **van Munster M.**, Willis L.G., Elias M., Erlandson M.A., Brousseau R., Theilmann D.A. & Masson L. (2006). Analysis of the temporal expression of *Trichoplusia ni* single nucleopolyhedrovirus genes following transfection of BT1-Tn-5B1-4 cells. *Virology* 354(1), 154-166. (IF= 3.525)

13. Meunier L., G. Préfontaine, **van Munster M.**, Brousseau R., Masson L. (2006). Transcriptional response of *Choristoneura fumiferana* to sublethal exposure of Cry1Ab protoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Molecular Biology* 15(4), 475-483. (IF= 2.639)

14. **van Munster M.**, Janssen A., Clériveret A. & van den Heuvel J.F.J.M. (2005). Can plants use an entomopathogenic virus as a defense against herbivores ? *Oecologia* 143(3), 396-401. (IF= 3.032)

15. **van Munster M.**, Dullemans A.M., Verbeek M., van den Heuvel J.F.J.M., Brault V., Reinbold C., Clériveret A. & van der Wilk F. (2003). Characterization of a new densovirus infecting the green peach aphid *Myzus persicae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 84(1), 6-14. (IF= 0.798)

16. **van Munster M.**, Dullemans A.M., Verbeek M., van den Heuvel J.F.J.M., Brault, V., Reinbold C., Clériveret A. & van der Wilk F. (2003). A new virus infecting *Myzus persicae* has a genome organization similar to the members of the genus *Densovirus*. *Journal of General Virology* 84, 165-172. (IF= 3.036)

17. **van Munster M.**, Dullemans A.M., Verbeek M., van den Heuvel J.F.J.M., Clériveret A. & van der Wilk F. (2002). Sequence analysis and genomic organization of *Aphid lethal paralysis virus*: a new member of the family *Dicistroviridae*. *Journal of General Virology* 83, 3131-3138. (IF= 3.300)

18. Alami I., Clériveret A., Naji M., **van Munster M.** & Macheix JJ. (1999). Elicitation of *Platanus x acerifolia* cell-suspension cultures induces the synthesis of xanthoarnol, a dihydrofuranocoumarin phytoalexin. *Phytochemistry* 51, 733-736. (IF= 1.106)

Articles en préparation

Bergès S.E, Bédiée A., Rolland G., Dauzat M., **van Munster M.** & Vile D. (*in prep*). Effects of water availability on plant response to Cauliflower mosaic virus in diverse accessions of *Arabidopsis thaliana*.

Bergès S.E, Bédiée A., Yvon M., Rolland G., Dauzat M., Vile D. & **van Munster M.** (*in prep*). Relationships between viral traits are modified under water deficit in *Arabidopsis thaliana*.

Rispe C., Legeai F., Arora A.K., Baa-Puyoulet P, Barberà M., MaBouallègue M, Brisson J.A., Calevro F., Cappy P., Chertemps T., Douglas A.E., Dufault-Thompson K., Escuer P, Feng H., Fernández R., Gabaldón T., Guigó R., Hilliou F., Hinojosa S., Hsiao Y-M, Jacquín-Joly E., James J., Johnston S., Le Goff G., Liu S., Lu H-L, Maïbèche M., Martínez-Torres D., Montagné N., Moran N., Makni M., Marcet-Houben M., Meslin C., Parisot N., Rahbé Y., Ripoll A., Sánchez-Gracia A., Sánchez-Herrero J.F., Santesmasses D., Tang M., Thompson K., **van Munster M.**, Wilson A., Zhang Y., Zhao J., Zhao S., Zhou X., International Aphid Genomics Consortium, Delmotte F. & Tagu D. (*in prep*). Insights on the evolution and diversity of the genome of the grape phylloxera, an invasive pest.

Masson V., Deshoux M., Arafah K., Voisin S., Gushinskaya N., Rahbé Y., Cayrol B., Webster C.G., **van Munster M.**, Blanc S., Bulet P., Uzest M. (*in prep*). Cuticular structure proteomics in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* reveals new plant virus receptor candidates at the surface of the acrostyle.

Communications orales

Bergès S., Vile D., **van Munster M.** **2019**. Plant-virus-vector interactions under water deficit. Relationships between epidemiological traits of the *Cauliflower mosaic virus* and *Arabidopsis thaliana* growth-related traits under artificial drought. Rencontres de Virologie Végétale (RVV). 33, 27-31 janvier 2019.

van Munster M., Bergès S., Vile D. Drought alters epidemiological traits of phytoviruses. 9^{ème} journée du Réseau thématique transversal « Interactions Micro-organismes-Hôtes » 09 février Montpellier.

van Munster M., Yvon M., Vile D., Dader Alonso B., Fereres A., Blanc S. **2016**. Water-stress can enhance the transmission of plant viruses by insect vectors. 13th International plant virus epidemiology symposium. International Plant Virus Epidemiology, 6-10 juin Avignon.

Bergès S., Vile D., **van Munster M.** **2016**. Effet d'un stress hydrique sur l'épidémiologie d'un virus non circulant, le *Cauliflower mosaic virus* et adaptation des plantes à la sécheresse. Printemps de Baillarguet, Montferrier-sur-Lez, France.

- Webster C., Hoh, F., **van Munster M.**, Gargani D., Padilla A., Bron P., Blanc S., Uzest M. Stylin-1, the first protein located in the acrostyle and its role in non-circulative virus transmission by aphids. **2015**. 8ièmes rencontres du réseau Biologie Adaptative des Pucerons et Organismes Associés. 4-6 novembre, Paris.
- Brault V., Clavijo G., Rustenholz C., **van Munster M.** **2015**. Towards the construction of an aphid densovirus-derived vector for gene functional validation. Rencontres de Virologie Végétale, 18-22, Aussois, France.
- Uzest M., Webster C., Gargani D., **van Munster M.**, Almeida R., Hoh F., Bron P., Blanc, S. **2015**. The acrostyle within aphid's stylets: role in plant virus transmission and in plant-aphid interactions. Séminaire Université de Californie, Berkeley (USA).
- van Munster M.**, Clavijo G., Wilson A., Filloux D., Brault, V. Integration et expression de séquences de densovirus dans le génome de *Myzus persicae*. **2014**. 7ièmes Rencontres du réseau Biologie Adaptative des Pucerons et Organismes Associés, 20-21 novembre 2014, Avignon.
- van Munster M.**, Hoh F., Uzest M., Giral A., Drucker M., Plisson-Chastang C., Bron P., Blanc S. & Dumas C. **2011**. Apport de la biologie structurale dans la compréhension de la transmission d'un virus de plante par un insecte vecteur; structure tridimensionnelle de la protéine P3 du *Cauliflower mosaic virus*. Rencontres de Virologie Végétale, 16-20 janvier Aussois, France.
- Gressent F., Chouabe C., Le Gleuher M., Rahioui I., Da Silva P., **van Munster M.**, Royer C., Pauron D. **2010**. Mécanisme d'action de PA1b, une entomotoxine d'origine végétale. Colloque de la Biologie de l'Insecte, Lyon.
- van Munster M.**, Préfontaine G., Mazza A., Meunier L., Elias M., Brousseau R. & Masson L. **2005**. Gene expression response of the spruce budworm, *Choristoneura fumiferana*, after exposure to various doses of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin using microarray technology. Bt Rim Pacific, Victoria, Canada.
- Meunier L., Préfontaine G., **van Munster M.**, Brousseau R. & Masson L. **2005**. Quantitative PCR analysis of *Choristoneura fumiferana* genes differentially expressed in response to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin exposure. Bt Rim Pacific, Victoria, Canada.
- van Munster M.**, Theilmann D., Erlandson M., Willis L., Brousseau R. & Masson L. **2005**. Microarray technology, genomics and proteomics in entomopathogen research. 38th Annual Meeting of the Society of Invertebrate Pathology, Anchorage, Alaska.
- van Munster M.**, Dullemans A., Verbeek M., van den Heuvel J. F. J. M., Brault V., Reinbold C., Clérvet A. & van der Wilk. F. **2001**. Characterization and biological effects of a new virus from the aphid *Myzus persicae*. Nederlandse Kring voor Plantevirologie Symposium, Wageningen.

Communications par affiche

- Bergès S., **van Munster M.**, Blanc S., Yvon M., Vazquez-Rovere C. and Vile D. 2017. Epidemiological traits of the *Cauliflower mosaic virus* under artificial drought. 16ièmes Rencontres de Virologie Végétale (RVV, 15-19 janvier 2017, Aussois).
- Brault V., Clavijo G., Rustenholz C., van Munster, M. 2015. Towards the construction of an aphid densovirus-derived vector for gene functional validation. 15ièmes Rencontres de Virologie Végétale (RVV, 18-22 janvier 2015, Aussois).
- Pauron D., **van Munster M.**, Augustin, S., Pauchet Y., Amichot M., Esposito M.-P. 2013. Characterization of midgut Cadherin in Bt Cry3A-susceptible and resistant populations of the beetle *Chrysomela tremulae*. 46th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology Conference on Invertebrate Pathology and Microbial Control (SIP, 11-15 August 2013; Pittsburgh, Pennsylvanie USA).
- van Munster M.**, Augustin S., Courtin C., Bourguet D. & Pauron D. 2007. Study of the mechanism of resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry3A toxin in a natural population of the leaf beetle *Chrysomela tremulae* (Coleoptera : Chrysomelidae). COST Meeting, Alès, France.
- van Munster M.**, Willis L., Elias M., Erlandson M., Theilmann D., Brousseau R. & Masson L. 2005. Analysis of the temporal expression of *Trichoplusia ni* single nucleopolyhedrovirus genes following transfection of Tn5-B1 cells. 38th Annual Meeting of the Society of Invertebrate Pathology, Anchorage, Alaska, EU.
- van Munster M.**, Dullemans A. M., Verbeek M., van den Heuvel J. F. J. M., Brault V., Reinbold C., Clériveret A. & van der Wilk F. 2002. Characterization of a new densovirus infecting the green peach aphid *Myzus persicae*. Virologie Symposium, Utrecht, Pays-Bas.
- van Munster M.**, Dullemans A. M., Verbeek M., van den Heuvel J. F. J. M., Brault V., Reinbold C., Clériveret A. & van der Wilk F. 2002. Characterization of a new densovirus infecting the green peach aphid *Myzus persicae*. International Congress of Virology (ICTV), Paris.

Travaux scientifiques

Si je devais résumer mon parcours scientifique et ce qui en fait sa cohérence malgré la diversité des modèles sur lesquels j'ai travaillé, je dirais que le fil conducteur a été l'étude des interactions hôtes - pathogènes.

Et ce, que ce soit dans le cadre de la caractérisation moléculaire et de l'évaluation comme agents de contrôle biologique des virus entomopathogènes, ou dans l'évaluation de l'impact sur les espèces non cibles des toxines Cry produites par *Bacillus thuringiensis* durant mes travaux de thèse et de Post Doctorat. En 2006, à l'issue de mon post doctorat, j'ai été recrutée à l'INRA en tant que Chargée de Recherche 2^{ième} classe dans l'Unité IBSV de Sophia Antipolis (équipe Entomotox dirigée par D. Pauron). Le projet que j'y ai développé durant 4 ans visait à décortiquer le mécanisme de résistance mis en place par *Chrysomela tremulae*, un ravageur du peuplier, contre la toxine Cry3A de *B. thuringiensis*.

En septembre 2010, suite à un souhait de mobilité, j'ai rejoint l'équipe CaGeTE créée en 2004 (renommée depuis VIP pour Virus-Insecte-Plante) dirigée par S. Blanc lors de l'installation de l'UMR "Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite" (BGPI) sur le site de Baillarguet à Montpellier.

A/ TRAVAUX DE THÈSE (PRI, Wageningen, Les Pays Bas ; 1999-2002)

Suite à mon DEA en Physiologie des Plantes effectué à l'Université Montpellier II, j'ai obtenu une bourse doctorale Européenne (Marie Curie Grant) pour réaliser ma thèse au sein de l'équipe de Virologie de Hans van den Heuvel à Wageningen (Plant Research International). C'est là que je me suis familiarisée avec mes premiers pucerons *Rhopalosiphum padi* et *Myzus persicae* et leur virus respectif : *Aphid lethal paralysis virus* (ALPV), et un parfait inconnu que j'allais caractériser et nommer *Myzus persicae densovirus* (MpDV). Les pucerons (famille des hémiptères) sont des ravageurs majeurs des cultures, par leur action directe sur la plante hôte qu'ils colonisent et affaiblissent, et par leur grande capacité à transmettre des virus phytopathogènes. Les mesures de contrôle de ces insectes reposent encore trop sur l'application d'insecticides non spécifiques conduisant à des problèmes sanitaires en même temps qu'à l'apparition de résistances des insectes cibles.

Il s'agissait donc au cours de ma thèse de caractériser au niveau moléculaire et biologique des virus entomopathogènes pouvant être potentiellement utilisés en lutte biologique.

- **L'ALPV**, un virus à ARN identifié originellement chez le puceron des céréales *R. padi* en Afrique du Sud par le groupe de Barbara von Wechmar (Department of Microbiology, University of Cape Town) a été dans un premier temps entièrement séquencé. Pour cela nous avons mis au point une technique de purification virale à partir d'individus infectés, puis l'ARN viral a été extrait et deux banques d'ADNc construites et screenées. L'obtention du génome viral total a permis d'assigner ce virus à la famille des *Dicistroviridae* (van Munster et al., 2002). Son potentiel en tant que biopesticide a été évalué en raison de son effet foudroyant sur *R. padi* (quelques heures après infection les pucerons commencent à avoir des mouvements désordonnés, tombent de la plante hôte et meurent de paralysie en 48h), et a donné lieu à un dépôt de brevet (van der Wilk & van Munster, 2003).

- De la même manière, un nouveau virus identifié dans un élevage de laboratoire de *M. persicae* à Colmar (laboratoire de Véronique Brault) a été caractérisé, **le MpDV** : j'ai

développé un protocole de purification à partir d'individus infectés, et des anticorps polyclonaux spécifiques dirigé contre les protéines de capsid a été produit. Cela nous a permis de caractériser plus avant les protéines structurales (par Western blot notamment) et de réaliser des expériences de détection par DAS-ELISA. L'ADN viral été séquencé et nous a permis de classer ce nouveau virus dans la famille *Parvoviridae*, genre *Densovirus* (rebaptisé depuis *Ambidensovirus*) (van Munster et al., 2003b). Depuis sa caractérisation en 2003 ce virus a été détecté dans de nombreux élevages de *M. persicae* en laboratoire (en Grande Bretagne, aux Etats Unis ..) ainsi qu'au champ. Cette forte prévalence semble être due à la capacité de ce virus à être transmis de manière verticale et horizontale *via* la plante hôte comme j'ai pu le montrer au cours de ma thèse (van Munster et al., 2005).

Toujours dans l'objectif d'utilisation potentielle de ces virus comme biopesticides j'ai évalué le potentiel entomopathogène de MpDV sur *M. persicae* (effet sur le développement, sur la fécondité, sur la mortalité..). Force est de conclure que ce virus n'est pas un pathogène « foudroyant » : il n'est pas létal pour les pucerons infectés, et n'a qu'un effet marginal sur la biologie de son hôte (van Munster et al., 2003a). Une utilisation pratique comme biopesticide semble donc peu prometteuse.

Récemment, lors d'analyses bioinformatiques réalisées sur *M. persicae* afin d'en rechercher le répertoire des protéines cuticulaires (voir chapitre 3.4), nous avons montré qu'une partie du génome de MpDV était intégrée au génome de son hôte (Clavijo et al., 2016).

Des questions se posent : quel est le rôle de ces séquences virales intégrées ? Ont-elles un rôle dans la non virulence de MpDV envers *M. persicae* ? Comment expliquer la forte prévalence de ce virus *in natura* ?

Articles associés

Clavijo, G., van Munster, M., Monsion, B., Bochet, N., Brault, V. (2016). Transcription of densovirus endogenous sequences in the *Myzus persicae* genome. *Journal of General Virology*, 97, 1000-1009. DOI:10.1099/jgv.0.000396.

van Munster M., Janssen A., Clériveret A. & van den Heuvel J.F.J.M. (2005). Can plants use an entomopathogenic virus as a defense against herbivores ? *Oecologia* 143(3), 396-401.

van Munster M., Dullemans A.M., Verbeek M., van den Heuvel J.F.J.M., Brault V., Reinbold C., Clériveret A. & van der Wilk F. (2003). Characterization of a new densovirus infecting the green peach aphid *Myzus persicae*. *Journal of Invertebrate Pathology* 84(1), 6-14.

van Munster M., Dullemans A.M., Verbeek M., van den Heuvel J.F.J.M., Brault, V., Reinbold C., Clériveret A. & van der Wilk F. (2003). A new virus infecting *Myzus persicae* has a genome organization similar to the members of the genus *Densovirus*. *Journal of General Virology* 84, 165-172.

van Munster M., Dullemans A.M., Verbeek M., van den Heuvel J.F.J.M., Clériveret A. & van der Wilk F. (2002). Sequence analysis and genomic organization of *Aphid lethal paralysis virus*: a new member of the family *Dicistroviridae*. *Journal of General Virology* 83, 3131-3138.

Brevet International. F. van der Wilk & M. van Munster. Nucleic acid derived from an ALPV virus, compositions containing said nucleic acid and uses thereof. *Patent PCT/NL02/00682*.

B/ POST-DOCTORAT (IRB, Montréal, Canada ; 2004-2006)

Lors de mon stage post-doctoral (2004-2006) réalisé à l'Institut de Recherche en Biotechnologie (IRB/CNRC-NRC) de Montréal j'ai continué à travailler sur la question des biopesticides mais cette fois avec une approche d'analyse bioinformatique de données transcriptomiques. J'ai travaillé sur deux agents entomopathogènes des Lépidoptères, *Bacillus thuringiensis var. kurstaki (Btk)* et un baculovirus (*Trichoplusia ni single nucleopolyhedrovirus ; TnSNPV*).

1. Des insectes non cibles sont ils sensibles à *Btk* ?

Dans le cas de *Btk* c'est la toxine Cry1Ab que la bactérie synthétise qui confère le pouvoir entomopathogène chez les larves de Lépidoptères. L'ingestion de la toxine entraîne une paralysie des intestins des larves qui ne peuvent ainsi plus se nourrir et meurent quelques heures plus tard.

Au Canada, depuis 1987, *Btk* est le seul moyen de contrôle utilisé contre la tordeuse de l'épinette (*Choristoneura fumiferana*), l'insecte le plus destructeur des peuplements de conifères de l'Amérique du Nord (source : sopfim.qc.ca). La grande spécificité d'action des toxines *Bt* en fait l'agent de lutte biologique commercialisé le plus répandu. Cependant des doutes subsistent sur l'innocuité de ces toxines envers des insectes dits non cibles. Au cours de cette étude nous avons évalué l'effet de doses sous létales de cette toxine sur un insecte non cible, *Manduca sexta*.

Pour cela nous avons analysé l'altération des profils transcriptomiques de larves *M. sexta* ayant ingéré des doses sous létales de Cry1Ab. Des librairies cDNA soustractives ont été réalisées par Liliane Meunier, étudiante en M2 que j'encadrais, et l'expression différentielle de plus de 1000 clones mesurée par puces à ADN, et analysée par l'outil GeneSpring™ (Silicon Genetic Genetics, CA) (Meunier et al., 2006). Cela a permis de montrer qu'un nombre important de gènes impliqués dans le métabolisme et la réponse aux stress était altéré dans cet insecte non cible (van Munster et al., 2007).

2. Expression temporelle des gènes du TnSNPV

Au cours de ces deux ans, j'ai eu également l'opportunité de travailler sur un baculovirus (autre famille majeure de biopesticides commercialisée). L'équipe de David Theilmann (Pacific Agri-Food Research Centre, Summerland, Canada) avait récemment caractérisé le TnSNPV qui infecte *Trichoplusia ni* (la fausse-arpenteuse du chou), un insecte ravageur à répartition quasi-cosmopolite (Willis et al., 2005). En collaboration avec D. Theilmann et L. Willis je me suis intéressée à l'expression temporelle des différents gènes viraux afin de mieux comprendre le processus d'infection et de pathogénicité. TnSNPV possède un génome à ADN circulaire double brin de 134, 394 pb et la transcription, comme celle des autres baculovirus, est supposée être régulée de manière temporelle par trois classes de promoteurs séquence-dépendant (gènes précoces, tardifs et très tardifs). J'ai utilisé mon expertise acquise sur l'analyse des puces à ADN pour analyser le profil

transcriptomique de l'ensemble des 144 gènes viraux avec le logiciel GeneSpring (van Munster et al., 2006).

Articles associés

van Munster M., Préfontaine G., Meunier L., Elias M., Mazza A., Brousseau R. & Masson L. (2007). Altered gene expression in *Choristoneura fumiferana* and *Manduca sexta* in response to sublethal intoxication by *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Insect Molecular Biology* 16(1), 25-35.

van Munster M., Willis L.G., Elias M., Erlandson M.A., Brousseau R., Theilmann D.A. & Masson L. (2006). Analysis of the temporal expression of *Trichoplusia ni* single nucleopolyhedrovirus genes following transfection of BT1-Tn-5B1-4 cells. *Virology* 354(1), 154-166.

Meunier L., G. Préfontaine, van Munster M., Brousseau R., Masson L. (2006). Transcriptional response of *Choristoneura fumiferana* to sublethal exposure of Cry1Ab protoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Molecular Biology* 15(4), 475-483.

C/ DÉVELOPPEMENT DES ACTIVITÉS DE RECHERCHE AU SEIN DE L'INRA

A la fin de mon stage post-doctoral j'ai été recrutée à l'INRA sur le centre de Sophia-Antipolis (UMR Interactions Biotiques et Santé Végétale) dans l'équipe Entomotox dirigée par David Pauron. L'équipe travaillait sur le mode d'action des toxines Cry produites par *B. thuringiensis*.

1. Mode d'action et résistance aux toxines Cry de *B. thuringiensis*

1.1 Problématique et objectifs du travail

Bacillus thuringiensis (Bt), bactérie entomopathogène ubiquitaire produisant plus de 200 toxines (Cry) actives contre différentes classes d'insectes, est le bioinsecticide le plus employé : 98 % des produits phytosanitaires biologiques commercialisés sont issus de Bt sous forme de formulations de spores et cristaux (épandage) ou par insertion de gènes cry dans des plantes d'intérêt agronomique. En 2005, les cultures transgéniques-Bt occupaient 16,2 millions d'hectares (ISAAA, 2006). Cependant il existe un décalage important entre l'utilisation grandissante des produits dérivés de Bt et l'insuffisance de données moléculaires sur le mode d'action des toxines Cry. Si les premières étapes du processus infectieux ont été élucidées chez les Lépidoptères, les étapes postérieures à la fixation de la toxine sur un/des récepteurs et conduisant à la mort de l'insecte restent à l'état d'hypothèses. A cette boîte noire que constituent les étapes finales de l'infection s'ajoute l'apparition de résistances au champ. Plusieurs mécanismes ont été identifiés chez les Lépidoptères mais ils n'expliquent pas tous les phénomènes de résistance observés et font supposer une grande capacité d'adaptation des insectes cibles. Les Coléoptères et, en particulier, certains ravageurs de la famille des Chrysomélidés (*Diabrotica virgifera*, *Chrysomela tremulae*) occasionnent des pertes annuelles estimées à plusieurs millions d'euros. Les toxines Cry3 sont utilisées contre cette famille d'insectes (cf. Maïs MON863 de Monsanto contre *D. virgifera*) et ce en dépit du

manque de données sur le mode d'action/résistances encore plus criant que dans le cas des Lépidoptères.

1.2 Caractéristiques de la résistance à la toxine Cry3A chez le coléoptère *C. tremulae*

Sylvie Augustin (INRA, Unité de Zoologie Forestière, Orléans) et Denis Bourguet (CBGP, Montpellier) ont montré la présence dans une population naturelle de *C. tremulae* d'individus capables de se développer normalement sur des feuilles de peupliers transgéniques exprimant la toxine Cry3A et cela avec une fréquence élevée. A partir d'individus résistants, trois lignées isofemelles résistantes ont été constituées et le déterminisme de la résistance a été étudié sur l'une de ces souches. La résistance à la toxine Cry3A y est très élevée (facteur de résistance > 6400), récessive et conférée par un seul gène autosomal (Augustin et al., 2004).

Par ailleurs, des études préliminaires conduites au laboratoire ont montré qu'un dérivé biotinylé de la toxine Cry3A se fixait à un récepteur présent dans des préparations membranaires de cellules épithéliales de chrysomèles sensibles mais pas de chrysomèles résistantes (Pauchet et Pauron, résultats non publiés). Ces différents résultats sont caractéristiques de l'implication d'un récepteur de type cadhérine dans la mise en place de la résistance. Les cadhérines comme les aminopeptidases ont été caractérisées chez les lépidoptères comme récepteurs des toxines Cry et des altérations de séquences sont responsables du développement de la résistance (Gahan et al., 2001).

1.3 Recherche et identification des gènes codant pour la cadhérine et les aminopeptidases chez *C. tremulae*

Le point de départ de mon programme de recherche a été d'obtenir les séquences correspondant à des gènes potentiellement impliqués comme récepteurs et dans la résistance aux toxines Cry. Pour cela je me suis attachée à cloner et séquencer l'allèle de la cible potentielle la plus vraisemblable de la résistance à Cry3A, à savoir une cadhérine présente sur les cellules épithéliales du tube digestif et qui a déjà été isolée chez plusieurs lépidoptères. En parallèle, j'ai également réalisé la caractérisation moléculaire de trois aminopeptidases (APN), connues chez les Lépidoptères comme étant des récepteurs secondaires des toxines Cry. Ces APN peuvent également être impliquées dans des phénomènes de résistance à Bt (Herrero et al., 2005).

Dans un premier temps j'ai essayé d'obtenir ces séquences par utilisation d'amorces dégénérées sur des ARN totaux extraits de larves de *C. tremulae* en combinant des expériences de RT-PCR et de PCR. Cependant les différents essais d'amplification en utilisant cette stratégie se sont révélés peu fructueux. Cela est clairement dû au manque de données moléculaires chez les coléoptères et en particulier à la grande hétérogénéité des gènes codant pour les cadhérines. Il est cependant à noter que dans le cas des aminopeptidases j'ai obtenu des séquences qui m'ont permis de caractériser entièrement un gène codant pour cette protéine par cette technique.

Devant cet échec à identifier la cadhérine chez *C. tremulae* nous avons choisi une stratégie des séquençages haut débit qui a été rendue possible grâce à la mise en place d'une collaboration avec le Dr. Richard French-Constant et le Dr. Yannick Pauchet de l'Université d'Exeter en Grande Bretagne. Nous avons ainsi synthétisé une banque d'ADN

complémentaire issue de l'intestin de *C. tremulae* et caractérisé par pyroséquençage plus de 7500 séquences uniques. Une analyse bioinformatique a permis, entre autre, l'identification de gènes candidats présentant des homologies de séquences avec des cadhérines et des aminopeptidases.

Ces résultats ont fait l'objet d'une publication (Pauchet et al., 2009).

Autres résultats marquants :

1.3.1. Séquençage du gène codant pour la cadhérine

A partir de 7 contigs uniques identifiés dans la banque ADNc j'ai séquencé entièrement l'ADNc de la cadhérine chez des individus sensibles et résistants à la toxine Cry3A et ce, à partir d'ARN total d'intestin de larves. La séquence codante obtenue fait 5398 nucléotides et la séquence protéique correspondante 1706 acides aminés.

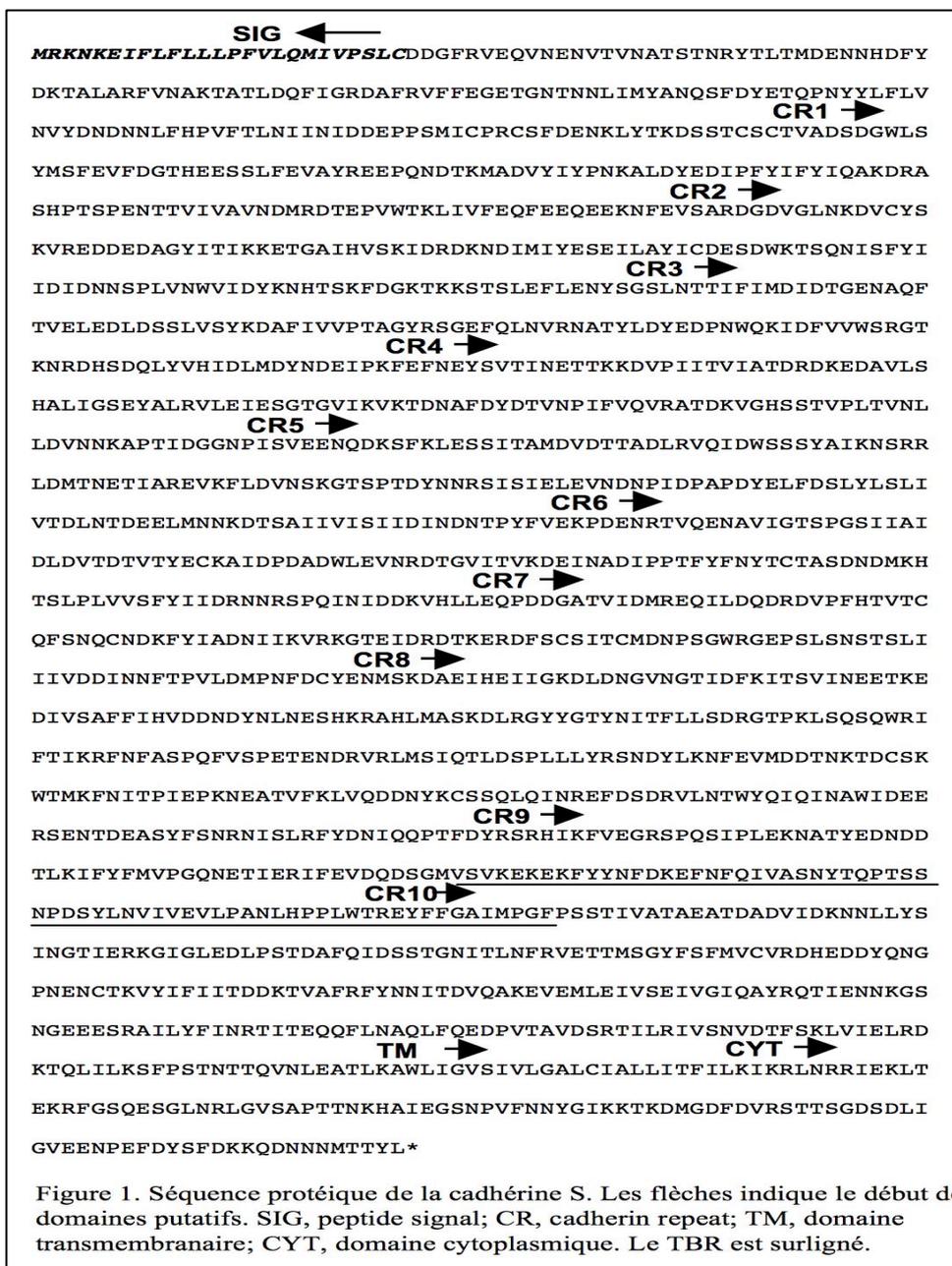


Figure 1. Séquence protéique de la cadhérine S. Les flèches indiquent le début de domaines putatifs. SIG, peptide signal; CR, cadherin repeat; TM, domaine transmembranaire; CYT, domaine cytoplasmique. Le TBR est surligné.

L'analyse bioinformatique des différents domaines montre la présence de 10 CR (Cadherin repeats) de 100 aa, d'une région transmembranaire et d'un signal peptide (Figure 1). L'alignement de séquences avec les autres cadhérines d'insectes révèlent également la présence d'une région présentant des homologies avec la région de fixation de la toxine (TBR : Toxin Binding Region) (Figure 2).

T.molitor	1262	IQSSNADKLNLD DALEETKFALTIQ VVDQND ESP VFDQTEYFT
T.castaneum	1263	IQSSNKDTINANANE EETKFQ LTI Q VDVND ELP VFDQKEYIS
D.virgifera	1294	IVASN-DSQVR MLDPRSS LN VTVN FLPRNRRAPQWKSTKFFG
C.tremulae	1308	IVASN-YTQPT SSNPDS YLN VIVEV L PANL HPPLWTREYFFG
B.mori	1320	IAASN-SPTGG IAL-T ST ITIT TVNVREADPQ-PYFVRDLYTA
M.sexta	1321	VAASN-SPDGG IPLPAS IL TVTV TVREADPR-PVFVRELYTA
H.armigera	1328	IGASD-TPN PAAVLQ AST LT TVTVNVREANPR-PVFQALYTA
		: *: : : : . : . * : :

Figure 2. Alignement du site putatif TBR de différentes cadhérines d'insectes.

1.3.2. Mutations et délétions détectées chez les individus résistants

La comparaison des séquences protéiques entre les individus sensibles et résistants à la toxine révèlent une délétion de 2 aa ainsi que des mutations et ce, dans le site putatif de fixation de la toxine (Figure 3). Ces données doivent être confirmées par le séquençage de cette région chez un nombre significatif d'individus sensibles et résistants.

CadS	1285	SGMVS VKEKEK FYYNFDKEFN FQ IVASNYTQPTSSNPDSYLN VIVEV L PANL HPPLWTRE	1345
CadR	1285	SGMVS V -- E IFYYNFDKEFN FQ IVASNYTQPTSSNPDSYLN VIVEV L PANL MPPLWTRE	1343

Figure 3. Délétion et mutations dans le TBR du gène de la Cadhérine R

1.3.3. Niveau d'expression similaire chez les individus sensibles et résistants

Les expériences de PCR semi quantitative (qPCR) et de northern blots afin de voir s'il y avait des différences de niveaux d'expression entre individus sensibles et résistants n'ont montré aucune différence.

1.3.4. Synthèse d'anticorps dirigés contre la cadhérine

Afin de pouvoir réaliser des expériences de binding (notamment à l'aide du Biacore) et de détection de la cadhérine (western blots ; histolocalisation ...) je me suis attachée à la synthèse d'anticorps. J'ai réalisé deux constructions correspondant à 2 fragments de la cadhérine (dont une correspondant à la région de fixation de la toxine) et la production de ces deux protéines en *E.coli* a été réalisée. Un anticorps fonctionnel dirigé contre ces deux

peptides a été réalisé qui permet la détection de la cadhérine de manière spécifique par western blots.

1.3.5. Synthèse de peptides correspondant au site de fixation de la toxine

Deux peptides correspondant au site de fixation de la toxine dans une cadhérine « sensible » et une cadhérine « résistante » c'est à dire présentant la délétion et la mutation ont été synthétisés et exprimés en bactéries. Ces peptides purifiés ont été utilisés en Biacore afin de détecter des différences de binding attribuables à ces délétions/mutations.

1.3.6. Il y a 3 classes d'aminopeptidases chez *C. tremulae*

A partir de la banque d'ADNc, 11 contigs uniques ayant des homologies de séquences avec des APN d'insectes ont été détectées. Des expériences de RT-PCR ont permis de regrouper ces différents contigs en 3 classes d'APN. La caractérisation moléculaire de ces 3 APN ainsi que leur rôle potentiel dans la résistance à la toxine Cry3A ont été décrits dans une publication (van Munster et al., 2011).

1.4 Perspectives

Les résultats moléculaires prometteurs sur le rôle de la cadhérine dans la résistance nécessitent une validation fonctionnelle. L'utilisation d'un appareil à Résonance Plasmonique de Surface de type Biacore 3000 semble parfaitement appropriée. Cet appareil disponible sur le Centre de Sophia-Antipolis permet la réalisation des expériences de liaison entre la toxine purifiée greffée sur les chips de type CM5 et les protéines candidates (cadhérine). Des essais préliminaires en utilisant le peptide synthétisé correspondant au site de fixation de la cadhérine muté et non muté n'ont pas permis de conclure.

Articles associés

van Munster M., le Gleuher M., Pauchet Y., Augustin S., Courtin C., Amichot M., ffrench-Constant R., Pauron D. (2011). Molecular characterization of three genes encoding aminopeptidases N in the poplar leaf beetle *Chrysomela tremulae*. *Insect Molecular Biology* 20(2), 267-278.

Pauchet Y., Wilkinson P., van Munster M., Augustin S., Pauron D., ffrench-Constant R. H. (2009). Pyrosequencing of the midgut transcriptome of the poplar leaf beetle *Chrysomela tremulae* reveals new gene families in *Coleoptera*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 39(5-6), 403-413.

DEUXIÈME PARTIE

Facteurs moléculaires impliqués dans la transmission du *Cauliflower mosaic virus* (CaMV)

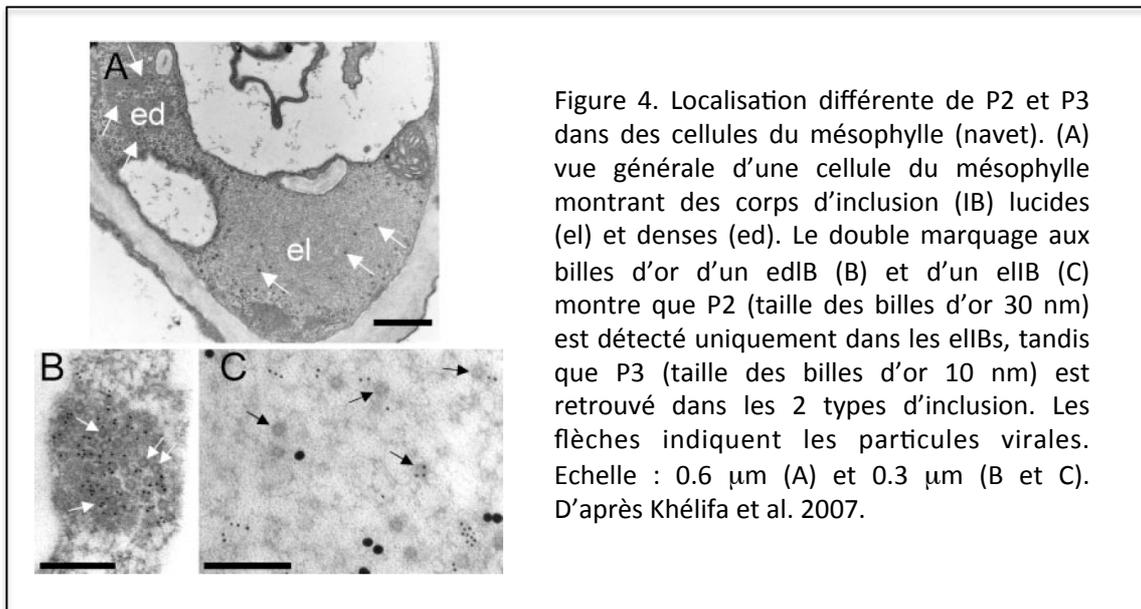
En septembre 2010, suite à un souhait de mobilité, j'ai rejoint l'équipe CaGeTE créée en 2004 lors de l'installation de l'UMR "Biologie et Génétique des Interactions Plante-Parasite" (BGPI) sur le site de Baillarguet à Montpellier et dirigée par Stéphane Blanc.

Deux champs scientifiques, intimement liés, sont au cœur de l'ensemble des programmes de recherche de l'équipe. D'une part l'étude des mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la transmission des virus de plantes et, d'autre part la biologie des virus multipartites. Le projet de recherche que nous avons proposé avec Stéphane Blanc en 2010 au Département SPE afin d'argumenter ma mobilité a été conçu afin de permettre une intégration rapide et une prise en main complète de la thématique, du modèle biologique et des techniques associées. Ainsi, ce premier projet portant sur l'apport de la biologie structurale dans la compréhension de la transmission d'un virus de plante par un insecte vecteur se positionnait à l'interface de deux programmes majeurs de l'équipe : 1) comprendre comment dans une cellule végétale infectée le virus « réagit » à la présence de son vecteur et se prépare immédiatement à l'acquisition (programme mené par M. Drucker) et 2) identifier la ou les protéines réceptrices de virus non-circulants dans les stylets de l'insecte vecteur (programme mené par M. Uzest).

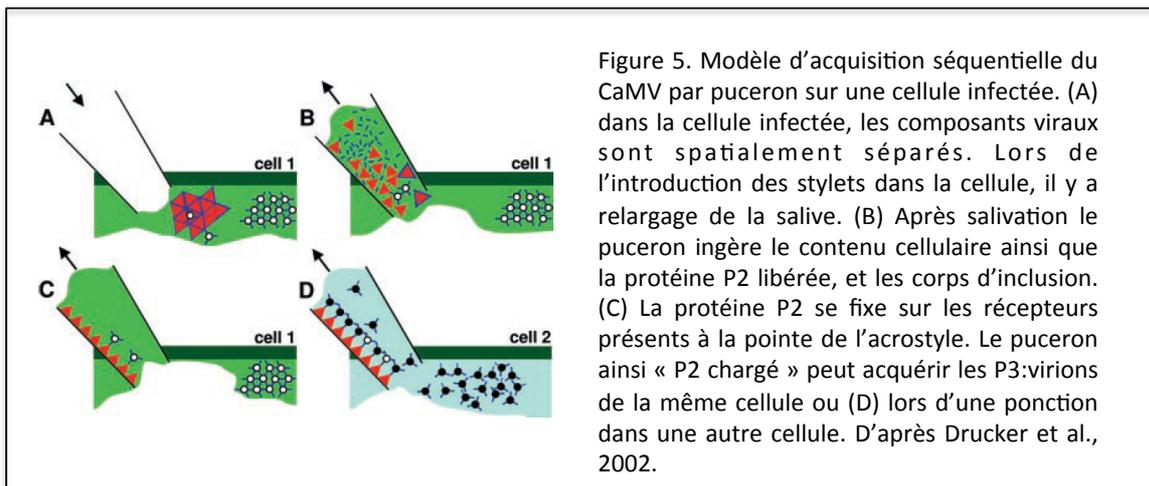
1. Contexte

De manière historique, l'équipe travaille sur le virus de la mosaïque du chou-fleur ou *Cauliflower mosaic virus* (CaMV). C'est un des modèles viraux chez les plantes actuellement le mieux caractérisé, et pour lequel de nombreux outils sont disponibles. Le CaMV, archétype de la famille des *Caulimoviridae* infecte des plantes de la famille *Brassicaceae*. C'est un virus dit non circulant, ie. qui reste retenu au niveau des pièces buccales ou du tube digestif antérieur du vecteur, pendant que l'insecte se nourrit sur plante infectée, et qui sera relargué directement depuis ces sites de rétention sans effectuer de passage à l'intérieur de son hôte.

Le génome à ADN double brin circulaire de 8000 pb est encapsidé dans une particule icosahédrique dont la structure 3D a été résolue en collaboration avec le Centre de Biologie Structurale (CBS, Montpellier) (Plisson et al., 2005). Parmi les six protéines virales produites *in planta*, trois sont directement impliquées dans la transmission par puceron et forment le « complexe transmissible ». Il s'agit de la protéine de capsid P4, de la protéine virale P3 qui décore la capsid (Leh et al., 2001; Leh et al., 1999; Plisson et al., 2005), et de la protéine P2 qui établit le lien entre le récepteur chez l'insecte et les complexes P3-virions. Au sein d'une cellule végétale infectée, toutes les protéines du CaMV sont d'abord synthétisées au niveau d'inclusions particulières, les usines virales, qui sont aussi le siège de la réplication du génome viral et de l'encapsidation. Après synthèse, la totalité de la protéine P2 est exportée, via le réseau de microtubules, dans un autre type d'inclusion nommé le Transmission Body (TB) (Martinière et al., 2009). Le TB est unique dans chaque cellule et contient aussi une partie de la protéine P3, et quelques très rares particules virales (Drucker et al., 2002; Khelifa et al., 2007; Martinière et al., 2009) (Figure 4). Les éléments du complexe transmissible sont donc majoritairement séparés -95 % des P3-virions dans les usines virales, et 100 % de P2 co-agrégés avec P3 dans le TB, ce qui pose logiquement la question de leur assemblage efficace au moment du prélèvement du contenu cellulaire par le puceron.



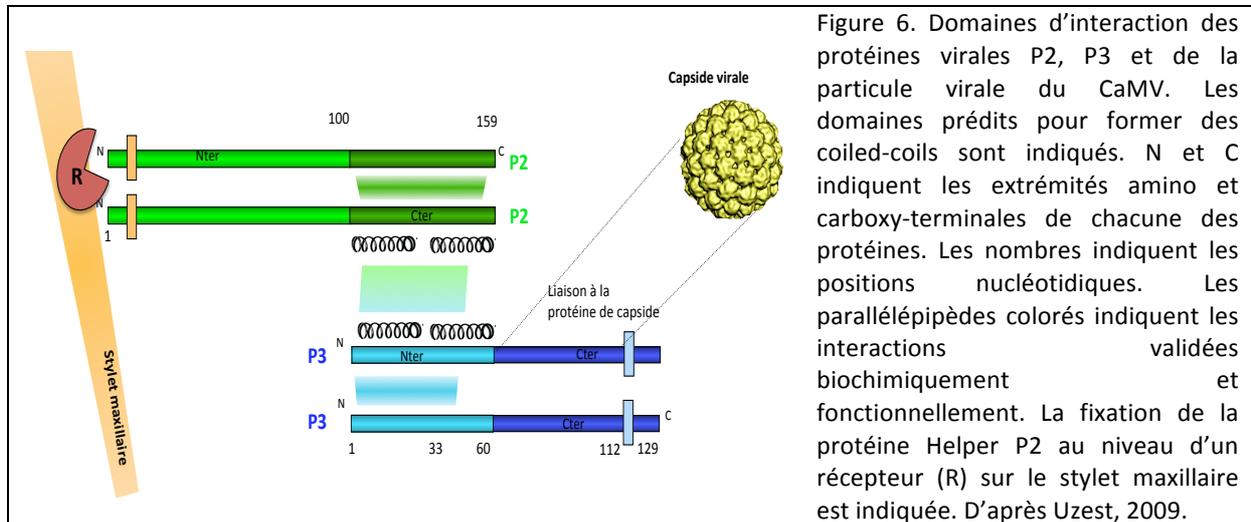
Un modèle d'acquisition séquentielle de ce complexe transmissible a été proposé (Drucker et al., 2002), où le TB se désintègre lors de l'ingestion par le puceron, libérant P2 qui sature alors les sites récepteurs dans les stylets (Figure 5). Lors de piqûres ultérieures, des complexes P3-virions sont efficacement acquis à partir des usines virales, voire du phloème (Palacios et al., 2002).



2. Rôle de la protéine P3 dans la transmission du CaMV

De manière très encourageante, l'étude structurale de la protéine P3-libre (non-associée au virion) apporte des données tout à fait pertinentes, qui permettent d'échafauder des hypothèses expliquant la désintégration du TB. Une étude

cristallographique nous a procuré la structure 3D du domaine N-terminal de la protéine P3 à 2,6 Å de résolution (PDB ID 3F6N ; (Hoh et al., 2010). Ce domaine N-terminal est responsable des interactions avec P2 dans le complexe transmissible (Figure 6).



Dans les cristaux, le domaine N-terminal de P3 est organisé sous forme de tétramère parallèle qui est « verrouillé » par un anneau de ponts disulfures interchaines (au travers du motif CPC porté par chacune des molécules de P3). Comme cela a déjà été décrit une fois dans la littérature, nous proposons que le motif CPC puisse être un « senseur » conférant à P3 un rôle de capteur des changements du potentiel redox dans les conditions environnantes. Ainsi, les ponts disulfures ne seraient pas formés dans le cytoplasme, généralement réducteur, laissant les 4 molécules du tétramère de P3 dans une conformation plus « ouverte », avec une plus grande surface d'échange pouvant interagir avec d'autres molécules, comme P2 dans le TB. Suite à un stress - la piqûre du puceron dans la cellule par exemple - les conditions pourraient devenir subitement oxydantes. Le tétramère de P3 serait alors verrouillé par les ponts disulfures, les domaines d'interaction seraient masqués, empêchant toute interaction avec P2 (ou autres partenaires), conduisant à la désintégration du TB. La protéine P2 libérée recouvrerait sa capacité à interagir avec les microtubules sur lesquels elle pourrait être redistribuée.

Ce projet comportait donc deux objectifs complémentaires:

a. Travailler à l'amélioration de nos connaissances sur la structure du complexe transmissible du CaMV. Notamment augmenter la résolution de notre modèle 3D du complexe P3-virion (Plisson et al., 2005), et acquérir des données structurales sur la protéine P2.

b. Valider expérimentalement l'hypothèse originale de P3 en tant que senseur-redox, qui régulerait le fonctionnement du TB au moment précis de l'acquisition par puceron.

2.1 Données structurales sur la protéine P2

Lorsque j'ai commencé ce projet il n'existait aucune donnée structurale détaillée de la protéine P2 car cette protéine, dont l'oligomérisation de base semble être un trimère parallèle assemblé via un coiled-coil situé dans la moitié C-terminale (Hebrard et al., 2001), engendre une polymérisation d'ordre supérieur qui la précipite et nous interdit des études cristallographiques. L'obtention de données structurales sur le domaine N-terminal de P2 (aa 1-100) qui interagit spécifiquement avec le récepteur chez l'insecte vecteur est très importante, et je me suis donc attachée à obtenir une construction contenant le domaine N-terminal de P2 correctement structuré et soluble.

2.1.1. Construction P2Nter-Foldon

Dans un premier temps j'ai tenté de remplacer la partie C-terminale de P2 par une séquence hétérologue engendrant un trimère correspondant au domaine foldon de la fibritine du bactériophage T4 (Meier et al., 2002). Cette stratégie a déjà été utilisée avec succès afin de stabiliser des domaines protéiques et permettre leur étude cristallographique (Papanikolopoulou et al., 2004; Papanikolopoulou et al., 2008).

Un plasmide pT7-7 contenant la séquence du foldon (90 bp) a été utilisé afin d'y insérer 300 nucléotides correspondant à la séquence N terminale de P2 (P2Nter). Cependant, malgré de nombreux essais, je n'ai jamais réussi à obtenir le plasmide contenant la construction P2Nter-foldon. Nous savons que P2 est hautement toxique pour les cellules eucaryotes (Froissart et al., 2004) et bactériennes (S. Blanc, résultats non publiés) et il est possible que cette construction partiellement structurée en trimère parallèle conserve cette toxicité, faisant de cette approche une impasse.

2.1.2. Construction P2Nter-GFP

Devant cet échec et afin de vérifier si le problème était d'ordre technique (le vecteur PT7-7-foldon ne serait pas adapté au sous clonage de la protéine P2 ?) ou biologique (toxicité de la protéine P2 lorsque celle ci est exprimée en bactéries) nous avons choisi une autre stratégie consistant à exprimer P2Nter dans un vecteur pGFP, le but étant d'obtenir une protéine fusion P2Nter-GFP. D'autre part, l'obtention d'une telle construction serait un outil essentiel dans l'identification des séquences indispensables à l'accrochage de la protéine P2 sur les stylets de l'insecte vecteur.

La construction P2Nter-GFP a été récemment obtenue et semble exprimée en bactéries comme cela a été vérifiée par western blot. Cependant, des expériences de mise au point afin d'optimiser la production de la protéine fusion (notamment en testant différentes températures d'induction) sont en cours.

La prochaine étape sera donc d'utiliser cette protéine fusion en l'hybridant directement sur les stylets et vérifier son accrochage spécifique comme cela a déjà été réalisé avec la protéine P2 entière fusionnée à la GFP exprimée en cellules d'insectes (Uzest et al., 2007). Ce travail est maintenant réalisé par M. Uzest dans le cadre de son travail sur l'identification des récepteurs présents dans les stylets.

2.1.3. Construction P2Nter-His tag

Afin de purifier facilement le peptide P2Nter en vue d'études cristallographiques j'ai réalisé la construction d'une nouvelle fusion dans laquelle la protéine GFP est remplacée par un tag Histidine. Il sera ainsi facile de purifier cette protéine par chromatographie d'affinité sur résine de nickel. Cependant les divers essais de production en bactéries se sont révélés négatifs (peut être toujours ce problème de toxicité).

2.2. Validation du rôle de P3 en tant que senseur-redox

2.2.1. Construction de protéines P3 mutantes et production

Afin de valider le rôle de « senseur » du motif CPC (aa 60-62) de P3, la séquence codant pour P3 a été mutée dans ce motif (mutants SPC, SPS, CPS, et APA) et clonée dans le plasmide pET3a. Ces mutants ont été exprimés en bactéries BL21 (*E. coli*) et un protocole de purification des protéines P3 mutantes a été mis au point.

2.2.2. Analyse par dichroïsme circulaire de P3wt et P3 mutant

La stabilité thermique du mutant P3-SPS a été comparée à celle de P3wt par des analyses de dichroïsme circulaire par nos collaborateurs du Centre de Biochimie Structurale (C. Dumas et F. Hoh) afin de voir si l'absence du motif CPC entraînait une conformation moins stable, plus « ouverte » du tétramère de P3. Contrairement aux prédictions issues de la structure 3D de P3, les résultats obtenus ne semblent pas montrer de différence de conformation majeure entre P3wt et P3-SPS.

2.2.3. Tests d'interaction P2-P3 mutants

Des expériences d'interaction par Biacore entre P2 et P3wt précédemment réalisés ont démontré que le tétramère « verrouillé » de P3 n'avait plus aucune affinité pour P2 (Drucker et al., 2002). J'ai donc réalisé des tests d'interaction afin de voir si P3 mutants « non-verrouillables » conservent effectivement une affinité pour P2. Pour cela il a été nécessaire de purifier la protéine HP2 (His-tag fusionné en N-ter) à partir du système baculovirus/cellule d'insecte (BCI). La partie C-terminale de P2 (HP2Cter), qui interagit avec P3, est quant à elle exprimée en système bactérien pET3a.

Après une « pré-purification » de HP2 et HP2Cter, ces protéines sont fixées sur résine de nickel. La capacité d'interaction de P3wt ou P3 mutant avec P2 est réalisée par passage sur colonne HP2 et HP2Cter. Les différents « flow-through », lavages et éluats sont récupérés, déposés sur gel et la semi-quantification de P3 fixée/non fixée sur la résine est estimée par western blot. Cependant, il n'a pas été possible de détecter des différences d'interaction en utilisant cette technique qui puisse valider notre hypothèse.

2.2.4. Tests de transmission à partir de virus P3 mutants

Des clones viraux mutants infectieux (Cabb B-JI-P3 mutants / vecteur pCA24) ont été construits par la technique QuickChange (réalisé par M. Uzeit) et inoculés à des plants de *B.*

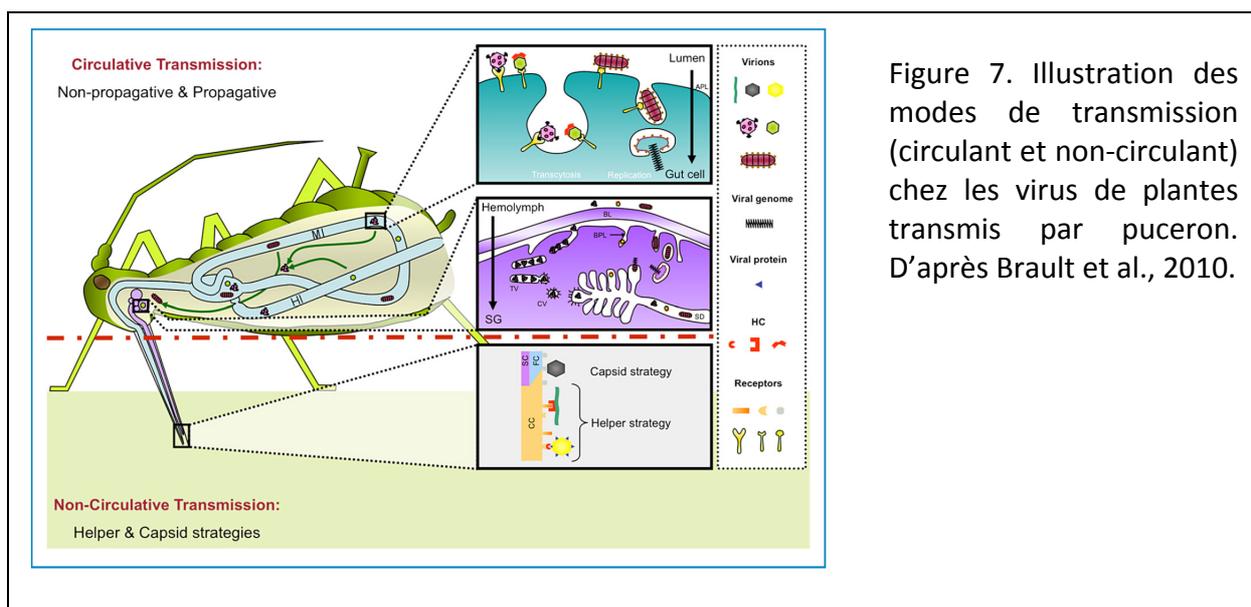
rapa. Les taux de transmission des CaMV-P3-mut ont été quantifiés relativement au CaMVwt, permettant de vérifier si (comme prévu), P3 interrompt ses interactions au sein du TB lors de l'acquisition pour en libérer ses différents composants et si ce phénomène est nécessaire au succès ou à l'efficacité de la transmission.

Les expériences ont été réalisées sur deux espèces vectrices : *Brevicoryne brassicae* et *Myzus persicae* avec un temps d'acquisition court (15-30 mns) ou long (3 h). Les analyses statistiques concernant une acquisition courte montre une réduction du taux de transmission significative dans le cas des doubles mutants (APA et SPS) lorsque l'espèce vectrice est *B. brassicae*. Dans le cas de *M. persicae* les résultats n'ont pas été concluants, à savoir que l'on n'a pas pu noter de différence significative dans la transmission entre le CaMVwt ou CaMV mutants.

3. Recherche et identification de récepteurs du CaMV

3.1 La transmission par vecteur

Les virus de plantes ont développé de nombreuses stratégies afin d'optimiser leur passage d'un hôte malade vers un nouvel hôte sain. Du fait de leur comportement alimentaire très particulier, explorant et échantillonnant différents tissus végétaux (épiderme, mésophylle, et tissus vasculaires) les pucerons sont de loin les vecteurs de virus les plus performants, transmettant plus de 30 % espèces de virus de plantes décrites à ce jour (Hogenhout et al., 2008). Trois mécanismes d'interaction virus-puceron ont été défini sur des critères de localisation du virus dans son insecte vecteur, et le temps de latence nécessaire à l'infection d'une nouvelle plante par un insecte virulifère : la transmission non circulante qui concerne la plupart des phytovirus comme le CaMV, la transmission circulante multipliante et la transmission circulante non multipliante (Brault et al., 2010) (Figure 7).



3.2 La transmission circulante

En ce qui concerne les phytovirus transmis selon le mode circulant les périodes d'acquisition, de latence et d'inoculation sont de l'ordre de plusieurs jours. Le virus après ingestion par son vecteur et internalisé dans l'intestin moyen (ou postérieur) via des récepteurs localisés sur les cellules apicales du plasmalemma. L'internalisation des virions est suivie d'une transcytose sans réplication (ou avec réplication dans le cas des virus multipliants e.g. *Rhabdovirus*). Le relargage des virions dans l'hémolymphe est suivi d'une internalisation dans les cellules des glandes salivaires selon un mécanisme de transcytose équivalent à celui mis en jeu au niveau de l'intestin moyen. Finalement, les virus sont relargués dans le conduit salivaire afin d'infecter une nouvelle plante. A ce jour les récepteurs cellulaires impliqués dans la transmission circulante sont loin d'être caractérisés. Mais, récemment, la caractérisation d'un récepteur de l'éphryne présent sur les membranes intestinales et permettant l'internalisation du *Turnip yellows virus* et impliqué dans la transmission du virus a été décrite (Mulot et al., 2018).

3.3 Déterminants moléculaires dans la transmission non circulante : le cas du CaMV

Dans ce mode de transmission, qui concerne la majorité des virus transmis par puceron, Les étapes d'acquisition, de rétention et d'inoculation sont très rapides (quelques secondes à quelques minutes) et ne nécessitent pas un passage à l'intérieur du corps du vecteur.

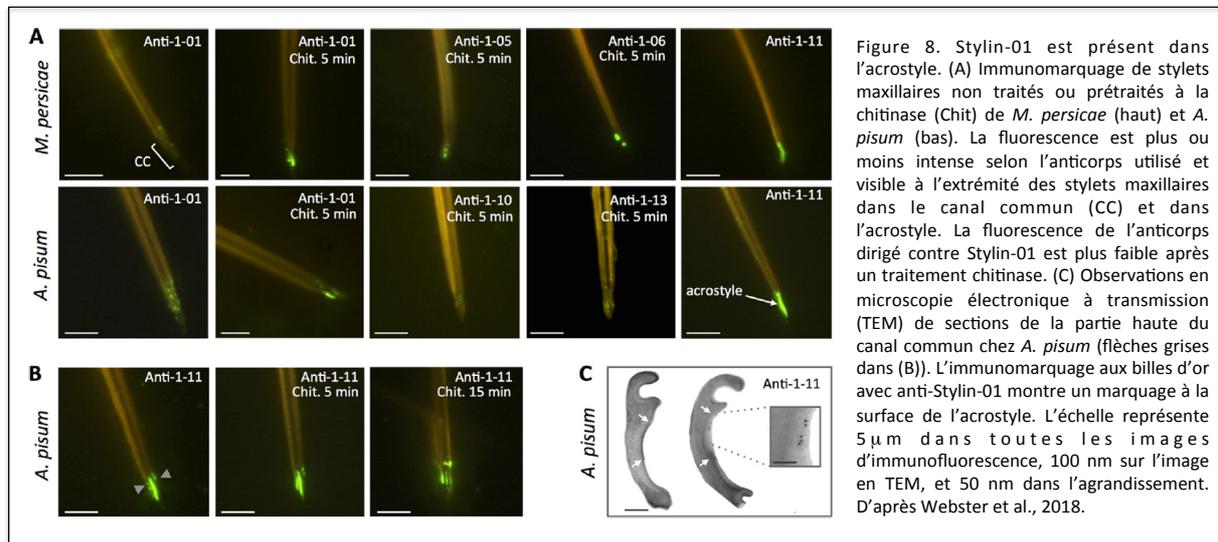
Considérée longtemps comme non-spécifique et purement mécanique (Bradley and Ganong, 1955), il est maintenant bien établi que la transmission non circulante implique en réalité des interactions moléculaires virus-vecteur hautement spécifiques (Blanc et al., 2014). Il existe deux stratégies virales : la stratégie « capsid » et la stratégie « helper » (Figure 7). Dans la stratégie « capsid », le virus interagit directement avec le vecteur via sa protéine de capsid, tandis que dans la stratégie « helper » l'interaction virus-vecteur est médiée par une protéine virale, nommée helper.

Dans le cas du CaMV, la localisation précise de la zone de fixation du virus via la protéine helper P2 dans les stylets, au niveau d'un organe spécifique l'acrostyle, a été mise en évidence au laboratoire par l'équipe de M. Uzest (Uzest et al., 2010; Uzest et al., 2007). Une première caractérisation avait permis de déterminer la nature biochimique du récepteur du CaMV : une/des protéine(s) non glycosylée(s) enchassée(s) dans la chitine formant la cuticule des stylets (Uzest et al., 2010). Par la suite, de nombreux essais afin d'identifier et caractériser plus avant ce/ces récepteur(s) se sont révélés infructueux.

3.4 L'outil bioinformatique à la rescousse, identification des protéines cuticulaires de puceron

L'obtention des génomes de *Acyrtosiphon pisum* (en 2010) et *Myzus persicae* (en 2013) et disponibles sur la plateforme Aphidbase (<http://bipaa.genouest.org/is/aphidbase/>) a permis de débloquent la situation. *A. pisum* et *M. persicae* sont deux pucerons vecteurs du CaMV et à ce titre la disponibilité de leur génome particulièrement intéressante. A partir d'une banque de séquences peptidiques « tête spécifique » (données de K. Perry, Université

de Cornell) j'ai réalisé des analyses bioinformatiques (recherche des protéines candidates, design d'anticorps spécifiques...) qui ont participé à l'identification et la caractérisation de deux protéines cuticulaires de type RR1. Ces protéines appartiennent à la famille des CPR (protéines cuticulaires avec une séquence consensus Rebbers and Riddiford) qui représentent la majorité des protéines cuticulaires décrites chez les arthropodes. Chez les pucerons, selon la séquence RR, les protéines CPR sont divisées en sous groupes : RR-1, RR-2 et RR-3 (Willis, 2010). Ces deux protéines, présentes à la surface de l'acrostyle et très conservées chez toutes les espèces de pucerons, ont été nommées Stylin-01 et Stylin-02 (Webster et al., 2018) (Figure 8). Des expériences complémentaires réalisées par l'équipe de M. Uzest (test de compétition, RNAi) ont montré de manière remarquable que Stylin-01 était impliquée dans la transmission du CaMV (Webster et al., 2018). Cette étude qui représente la première description des protéines cuticulaires des stylets de pucerons a permis de caractériser Stylin-01 comme récepteur candidat potentiel du CaMV.



Un répertoire exhaustif des protéines cuticulaires présentes dans les stylets de *A. pisum* a été également réalisé. De manière très intéressante certaines de ces protéines sont localisées à la surface dans l'acrostyle, donc susceptibles de s'accrocher aux protéines virales et représentent donc de bons récepteurs candidats pour d'autres virus non circulants (Masson et al., in prep).

En parallèle de ce travail j'ai entamé une collaboration avec Denis Tagu et Fabrice Legeai qui gèrent la plateforme génomique Aphibase sur laquelle sont déposés les différents génomes de pucerons. Je me suis chargée d'annoter l'ensemble des protéines cuticulaires de *M. persicae* et d'en faire l'analyse phylogénétique (Mathers et al., 2017). Je suis également impliquée dans l'annotation des protéines cuticulaires du génome du Phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae*) (Rispe et al., in prep) et de *Aphis glycines* (collaboration R. Giordano, University of Illinois, EU).

Collaborations

D. Tagu (INRA, UMR IGEPP, le Rheu), M. Uzest (INRA, UMR BGPI), S. Colella (INRA, UMR LSTM), R. Giordano (University of Illinois, EU).

Articles associés

Webster C.G., Pichon E., van Munster M., Monsion B., Deshoux M., Gargani D., Calevro F., Jimenez J., Moreno A., Krenz B., Thompson J.R., Perry K.L., Fereres A., Blanc S., Uzest M. (2018). Identification of Plant Virus Receptor Candidates in the Stylets of Their Aphid Vectors. *Journal of Virology* 92:e00432-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00432-18>.

Mathers T., Chen Y., Kaihakottil G., Legeai F., Mugford S., Baa-Puyoulet P., Bretaudeau A., Clavijo B., Colella S., Collin O., Dalmay T., Derrien T., Feng H., Gabaldón T., Jordan A., Julca I., Kettles G., Kowitwanich K., Lavenier D., Lenzi P., Lopez-Gomollon S., Loska D., Mapleson D., Maumus F., Moxon S., Price D., Sugio A., van Munster M., Uzest M., Waite D., Jander G., Tagu D., Wilson A., van Oosterhout C., Swarbreck D., Hogenhout S. Rapid transcriptional plasticity of duplicated gene clusters enables a clonally reproducing aphid to colonise diverse plant species. (2017). *Genome Biology*, 18:27 DOI 10.1186/s13059-016-1145-3.

Rispe C., Legeai F., Arora A.K., Baa-Puyoulet P., Barberà M., MaBouallègue M, Brisson J.A., Calevro F., Capy P., Chertemps T., Douglas A.E., Dufault-Thompson K., Escuer P, Feng H., Fernández R., Gabaldón T., Guigó R., Hilliou F., Hinojosa S., Hsiao Y-M, Jacquin-Joly E., James J., Johnston S., Le Goff G., Liu S., Lu H-L, Maïbèche M., Martínez-Torres D., Montagné N., Moran N., Makni M., Marcet-Houben M., Meslin C., Parisot N., Rahbé Y., Ripoll A., Sánchez-Gracia A., Sánchez-Herrero J.F., Santessmasses D., Tang M., Thompson K., van Munster M., Wilson A., Zhang Y., Zhao J., Zhao S., Zhou X., International Aphid Genomics Consortium, Delmotte F. & Tagu D. (*in prep*). Insights on the evolution and diversity of the genome of the grape phylloxera, an invasive pest.

Masson V., Deshoux M., Arafah K., Voisin S., Gushinskaya N., Rahbé Y., Cayrol B., Webster C.G., van Munster M., Blanc S., Bulet P., Uzest M. (*in prep*). Cuticular structure proteomics in the pea aphid *Acyrtosiphon pisum* reveals new plant virus receptor candidates at the surface of the acrostyle.

Aphidbase : Annotation des protéines cuticulaires de *M. persicae*, *D. vitifolia* et *A. glycines*.

TROISIÈME PARTIE

Stress et transmission : Le changement climatique influe-il sur la capacité de dispersion des virus phytopathogènes ?

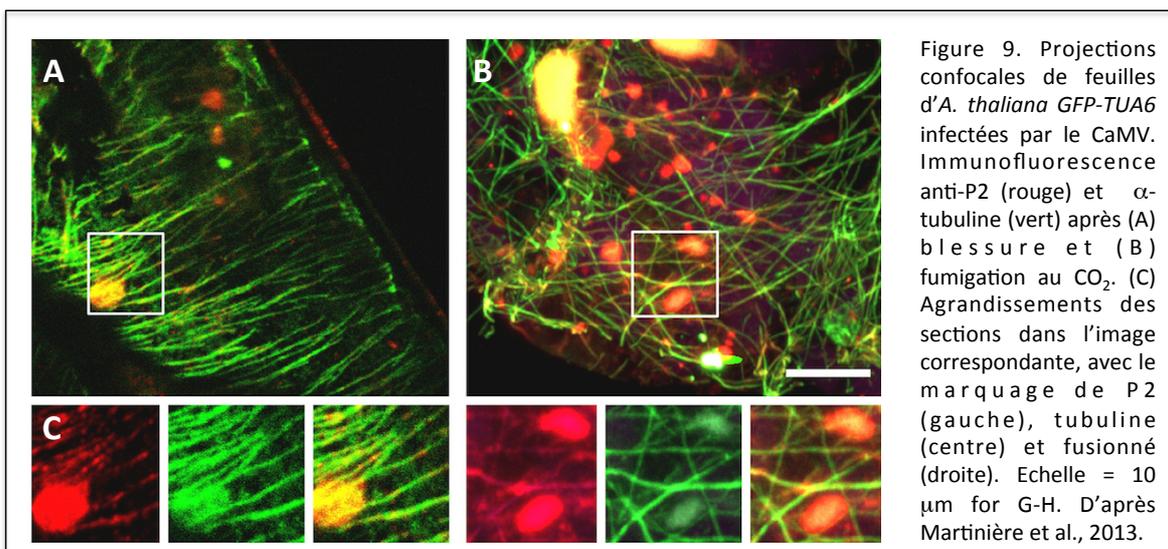
1. Problématique et objectifs de mon projet de recherche

La présence du vecteur, et des phytophages en général, est perçue par la plante comme un stress (désigné comme un des stress biotiques de la plante pouvant inclure aussi des pathogènes tels que les champignons, bactéries et virus), stress qui va entraîner potentiellement l'induction d'une/plusieurs voies de signalisation/défense et permettre la mise en place de réponses adéquates. Nombre de ces voies possiblement activées lors des stress biotiques (dépolérisation membranaire, fluctuations calciques, production de formes réactives de l'oxygène (ROS), déclenchement de la cascade de kinases (MAPK), facteurs de transcription, signalisation hormonale etc...), sont au moins partiellement similaires avec celles activées dans le cas de stress abiotiques (fortes variations des températures, élévation de la teneur de l'air en CO₂, stress hydrique, déficit en nutriments, forte salinité etc...).

1.1 Les virus de plante réagissent à leur environnement

Les études montrant la capacité des virus à percevoir et réagir à des changements de leur environnement sont de plus en plus nombreuses. En particulier des travaux récents montrent qu'ils réagissent à différents stress abiotiques imposés à la plante hôte (blessure, salinité élevée, haute température, CO₂ atmosphérique...), avec en particulier une altération de la charge virale et de la virulence (Aguilar et al., 2015; Del Toro et al., 2015; Huang et al., 2012; Nancarrow et al., 2014; Suntio and Makinen, 2012).

Dans le même temps, au laboratoire, l'équipe de M. Drucker montrait l'incroyable capacité du CaMV à percevoir et réagir à la présence du puceron vecteur sur la plante infectée (Martinière et al., 2013). Cette réaction du virus se traduit par une relocalisation cellulaire très rapide (de l'ordre de la milli seconde) du partenaire viral essentiel à la transmission, la protéine P2. La finalité de cette relocalisation intracellulaire de P2 sur les microtubules de la cellule infectée suite à un stress de type blessure ou CO₂ (Figure 9) conduit à une optimisation de son acquisition et donc de sa transmission par le puceron vecteur (Bak et al., 2013; Martinière et al., 2013).



Ce phénomène nommé ‘transmission activation’ ou TA n’est pas unique au CaMV (Drucker and Then, 2015). Le *Turnip mosaic virus* (TuMV ; *Potyviridae*), un autre virus non circulant utilisant également la stratégie helper, voit sa transmission activée par les ROS et la signalisation calcique (Berthelot et al., 2019). Dans ce cas, la protéine helper (HcPro) essentielle à la transmission opère un changement de conformation (formations d’oligomères) qui lui permet de former des complexes viraux transmissibles (Berthelot et al., 2019).

De par la similarité des réponses de la plante face à un stress donné (qu’il soit biotique ou abiotique) il est tentant d’imaginer que certains virus puissent réagir de manière « erronée » à des stress abiotiques et y répondent de la même manière qu’ils répondraient à leur insecte vecteur, en augmentant leur transmissibilité.

Ces hypothèses innovantes sur la capacité potentielle des virus de plantes à percevoir des signaux de stress de la plante, et à y répondre en augmentant leur efficacité de transmission ont été publiées dans un article de revue (Gutiérrez et al., 2013) et le projet correspondant a été financé par le Département SPE lors des Appels à Projets 2013 et 2014.

1.2 Objectifs du projet

L’idée principale est d’étudier l’effet de différents stress biotiques et abiotiques appliqués à des plantes infectées par des virus ayant des mode de transmission différents afin de voir si il existe une modification du taux de transmission. Ces données sur la transmission en fonction de l’état physiologique de la plante sont essentielles dans une perspective prédictive sur l’écologie et l’épidémiologie des virus, en particulier dans un contexte de changement global.

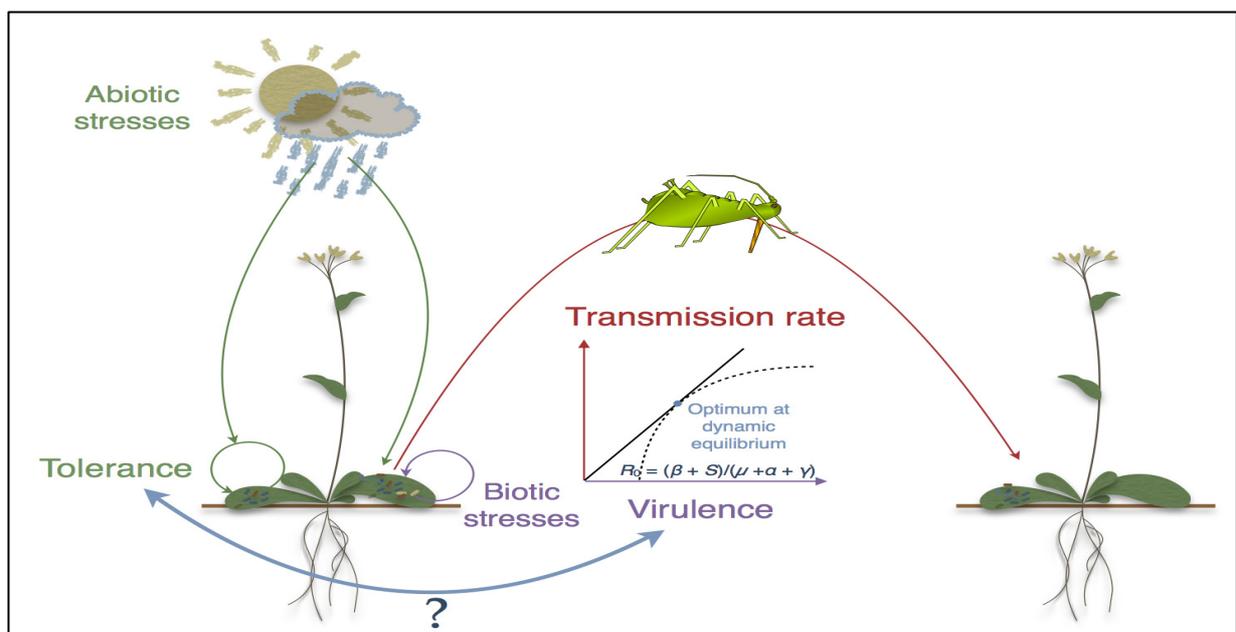


Figure 10: Illustration du projet

2. Essai d'applications de différents stress biotiques et abiotiques sur plantes infectées

Nous avons démarré ce programme de recherche en testant différents protocoles de stress sur des plantes de navets (*Brassica rapa*) infectés soit par le CaMV (souche BJ-I) soit par le TuMV (souche UK-1). Le protocole de stress sur ces plantes dites 'donneuses' est suivi de la réalisation d'un test de transmission par vecteur afin d'évaluer s'il y a ou pas altération du taux de transmission par rapport à un groupe de plantes contrôle n'ayant pas subi de stress (Figure 11). Toutes les expériences sont réalisées en chambre climatique où les conditions de culture sont standardisées et contrôlées (humidité ambiante, luminosité et température).

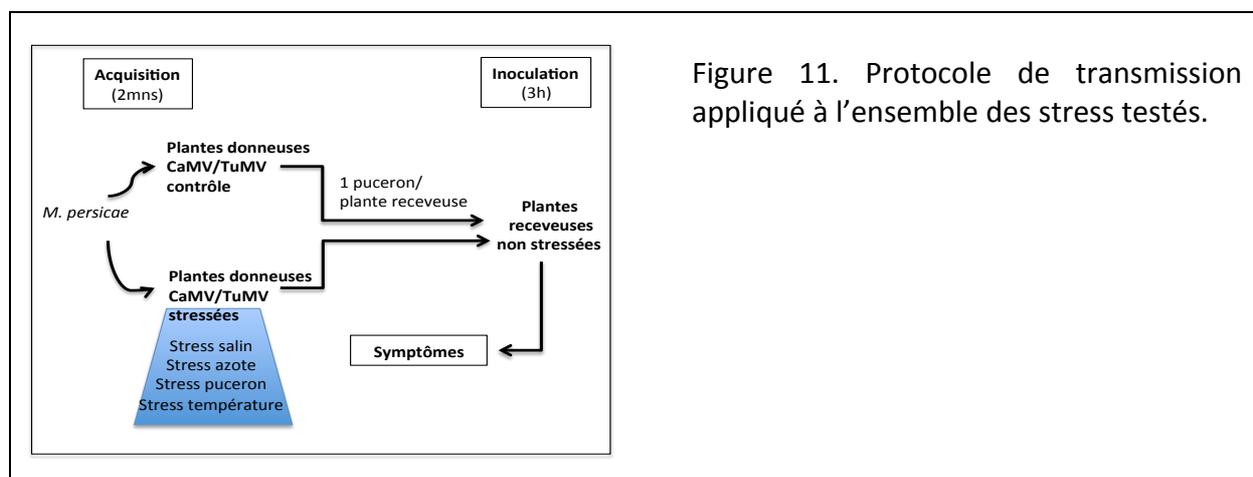


Figure 11. Protocole de transmission appliqué à l'ensemble des stress testés.

2.1 Essais non concluants

L'application d'un **stress édaphique salin** (10 mM ou 30 mM), **azote** (NO₃, 3 mM ou 6 mM ; avec des modalités de temps d'application court ou long), **stress chaleur** (plantes placées à 32°C/28°C avec une modalité courte ou longue) sur des plantes infectées n'ont pas été concluantes. Il n'a pas été possible de montrer une différence significative avec le traitement contrôle en terme de taux de transmission.

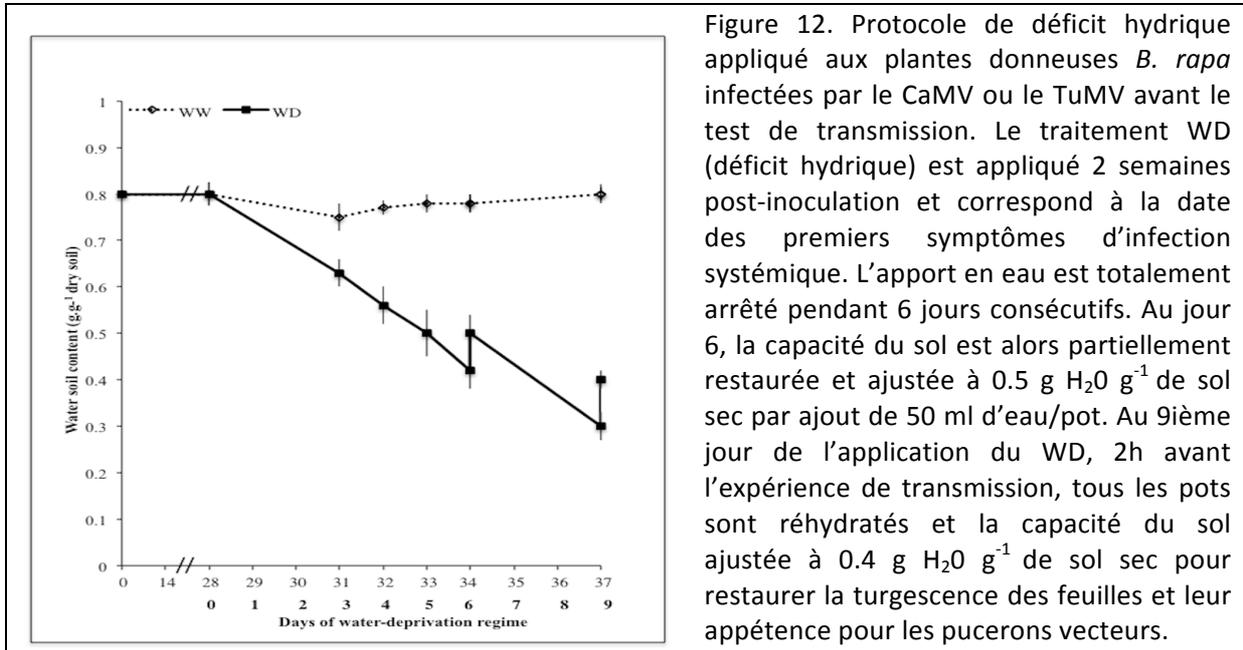
Nous avons également testé un **stress biotique** à savoir la présence d'une population importante du vecteur (*M. persicae*) sur la plante infectée.

2.2 Essai concluant : le déficit hydrique

Les essais de déficit hydrique sévère appliqués aux plantes sources infectées ont permis finalement de démarrer ce programme positivement. Les premières données que nous avons obtenues étaient prometteuses et nous avons donc poursuivi en nous focalisant sur ce type de stress.

2.2.1. Etablissement du déficit hydrique, mesures des traits de la plante.

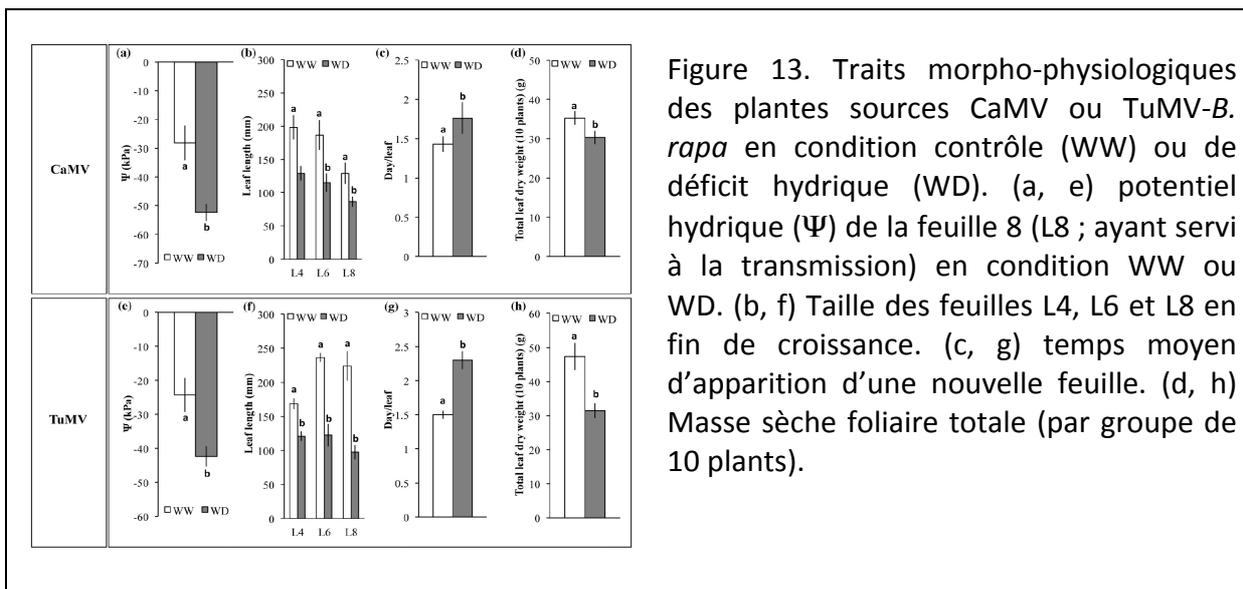
Nous avons développé un protocole de déficit hydrique appliqué à la plante *B. rapa* (Figure 12).



2.2.2 Effet du stress hydrique sur les plantes

Afin de quantifier l'effet du stress appliqué plusieurs paramètres physiologiques (surface foliaire, vitesse d'apparition des feuilles, masses fraîche/sèche, potentiel hydrique ...) ont été mesurés.

Les différents traits de la plante sont significativement altérés (Figure 13) ce qui permet de valider le protocole de stress que nous avons mis en place.



2.2.3 Effet du déficit hydrique sur la transmission

De manière reproductible nous observons une augmentation significative du taux de transmission du TuMV et du CaMV lorsque les plants de navets sont en déficit hydrique sévère. Cette augmentation est doublée dans le cas du TuMV et augmente de plus de 30 % pour le CaMV (van Munster et al., 2017). Cette augmentation de la transmission n'est cependant pas corrélée à une altération de la charge virale de ces deux virus non circulants (van Munster et al., 2017).

Les mécanismes sous-tendant ces résultats ne sont pas à ce jour élucidés. Je discuterai des différentes possibilités dans le Chapitre 5.2 'Compréhensions des mécanismes impliqués'.

3. Effet du déficit hydrique sur la transmission d'un virus circulant

Au vu de ces résultats obtenus sur des virus non circulants, la question se posait si ce phénomène était généralisable à l'ensemble des virus transmis par vecteur quel que soit le mode de transmission. Pour cela j'ai utilisé un autre pathosystème : le pathosystème *Arabidopsis thaliana* / Turnip yellows virus (TuYV). Il s'agit d'un virus circulant de la famille des *Luteoviridae* (genre *Polerovirus*), limité au phloème et infectant plusieurs espèces de *Brassicaceae* d'intérêt économique (Juergens et al., 2010). Cependant chez *Arabidopsis* il n'induit pas de symptômes visuels. Pour pouvoir donc réaliser nos expériences de stress/transmission, nous avons utilisé une construction du TuYV (TuYV-SUL obtenue de V. Ziegler-Graaf) induisant des symptômes de chlorose des nervures et transmis de manière similaire au TuYV sauvage (V. Ziegler-Graaf, communication personnelle).

3.1 Effet sur la transmission

De manière opposée à ce que nous avons trouvé dans le cas des virus non circulants, nous avons montré que le déficit hydrique appliqué à des plants sources d'*A. thaliana* infectés par le TuYV entraînait une forte réduction de l'efficacité de transmission (Yvon et al., 2017). Dans ce cas le taux de transmission est réduit de plus de la moitié : alors que le taux de transmission est de approx. 70 % dans les plantes sources contrôle cette efficacité chute à approx. 32 % lorsque les plantes sources sont en déficit hydrique (Yvon et al., 2017).

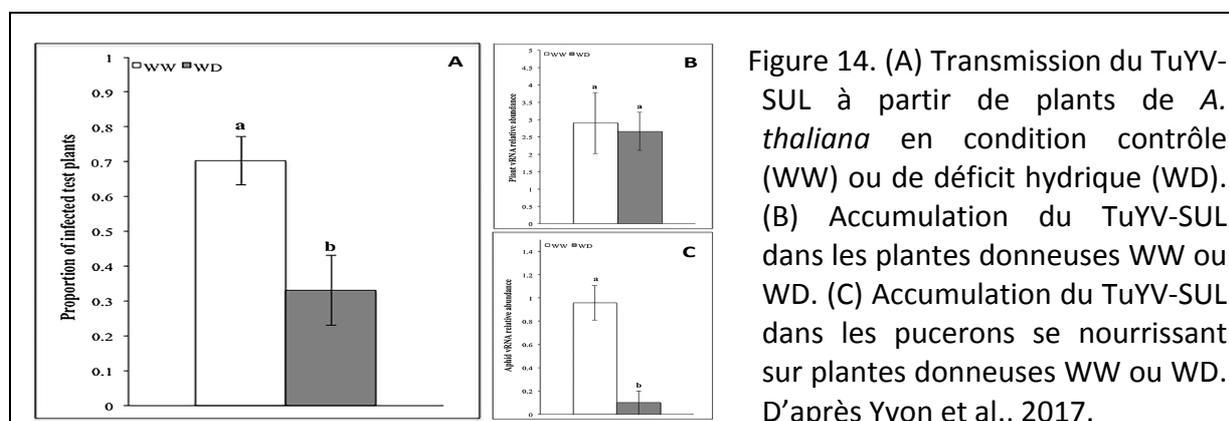


Figure 14. (A) Transmission du TuYV-SUL à partir de plants de *A. thaliana* en condition contrôle (WW) ou de déficit hydrique (WD). (B) Accumulation du TuYV-SUL dans les plantes donneuses WW ou WD. (C) Accumulation du TuYV-SUL dans les pucerons se nourrissant sur plantes donneuses WW ou WD. D'après Yvon et al., 2017.

3.2 Charge virale et comportement alimentaire

Dans ce cas le paramètre explicatif majeur de cette altération du taux de transmission semble être une modification du comportement alimentaire du puceron détectée via la charge virale. Cela est tout à fait logique car dans ce mode de transmission la phase d'acquisition optimale (phase durant laquelle le puceron se nourrit donc sur la plante stressée-ou pas) a une durée de 24 h (vs. 2 mns pour les virus non circulants étudiés). L'état physiologique de la plante est donc primordial pour une bonne prise de nourriture, et de virus, d'autant plus que celui ci est restreint au phloème. Un potentiel hydrique trop bas en particulier peut altérer cette prise de nourriture. Il a été montré par des expériences d'EPG que les pucerons se nourrissaient davantage sur les vaisseaux du xylème lorsque la plante hôte était en déficit hydrique (Vickers, 2011). L'absorption de la sève brute permet d'équilibrer la pression osmotique due à l'augmentation de la concentration en sucres de la sève élaborée et évite la déshydratation des pucerons (Pompon et al., 2010).

En effet à charge virale similaire dans les plantes sources stressées ou contrôle, la quantité de virus acquis par le vecteur au bout de 24 h se nourrissant sur les plantes en déficit hydrique est drastiquement réduite (correspondant à 10 % de la charge virale détectée dans des pucerons se nourrissant sur les plantes contrôles) (Yvon et al., 2017). En conséquence, la faible accumulation virale détectée dans le vecteur semble être la raison au faible taux de transmission observé lorsque les plantes sont en déficit hydrique. (Figure 14).

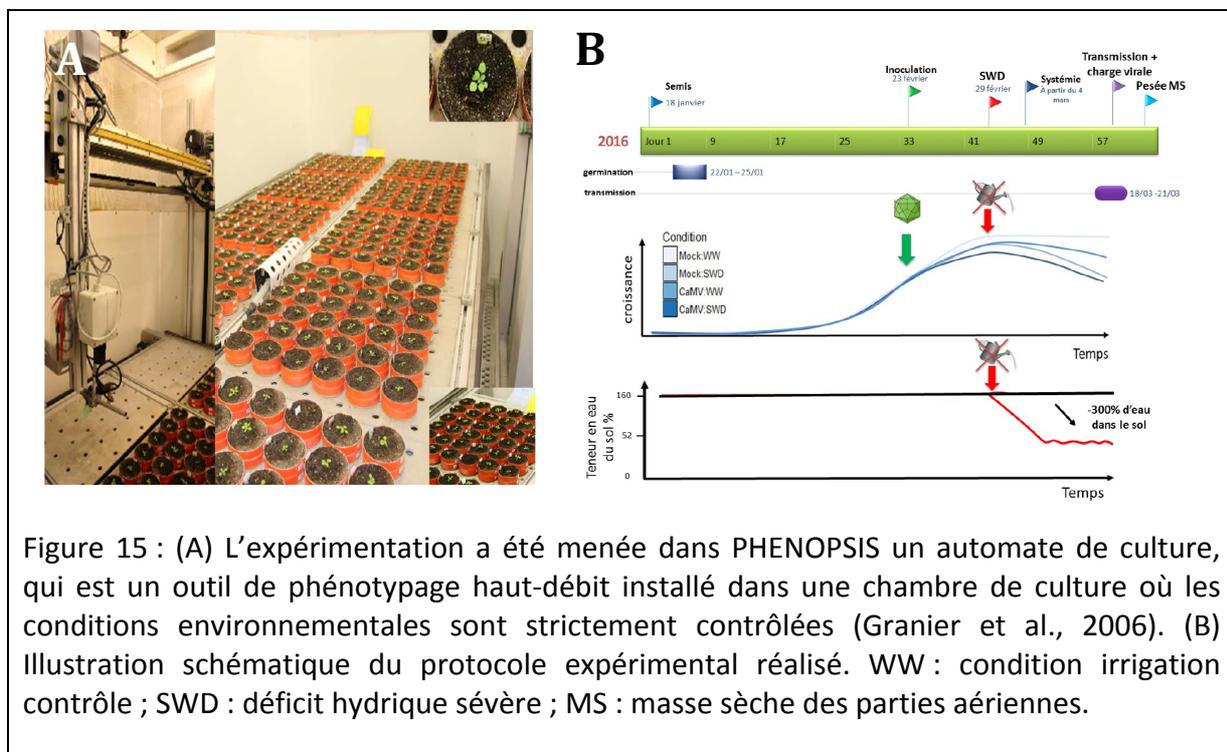
Ces travaux pionniers m'ont permis d'entamer une collaboration solide avec Denis Vile (INRA, LEPSE) spécialiste dans la réponse des plantes aux stress environnementaux et responsable de l'outil de phénotypage haut-débit PHENOPSIS (INRA, Campus de La Gaillarde, Montpellier).

Au travers de cette collaboration j'ai co-encadrée Sandy Bergès tout d'abord durant son stage M2 puis durant sa thèse qu'elle soutiendra en décembre 2019.

4. Etude des interactions plante-virus chez *A. thaliana* infectée par le CaMV lors d'un déficit hydrique

Au cours de son Master 2, Sandy a étudié la réponse de 9 génotypes d'*A. thaliana* (sélectionnés pour leur tolérance contrastée au déficit hydrique (Vile et al., 2012)) à un double stress : l'infection par le CaMV et l'application d'un déficit hydrique. Plusieurs paramètres physiologiques de la plante ainsi que les traits viraux (charge virale, virulence, vitesse d'apparition des symptômes et transmission) ont été mesurés.

4.1 Protocole expérimental



4.2 Résultats obtenus

Le phénomène que nous avons observé, à savoir l'augmentation significative du taux de transmission du CaMV et du TuMV sur navet semble être hôte-dépendant. En effet dans le cas des 9 accessions d'*A. thaliana*, les résultats sont plus contrastés et seules deux accessions (Mr-0 et Sha) voient leur transmission accrue lorsque les plantes infectées sont en déficit hydrique (Figure 16). Il est à noter que ces deux accessions font partie de celles qui sont le plus sensible au déficit hydrique (Bergès et al., 2018).

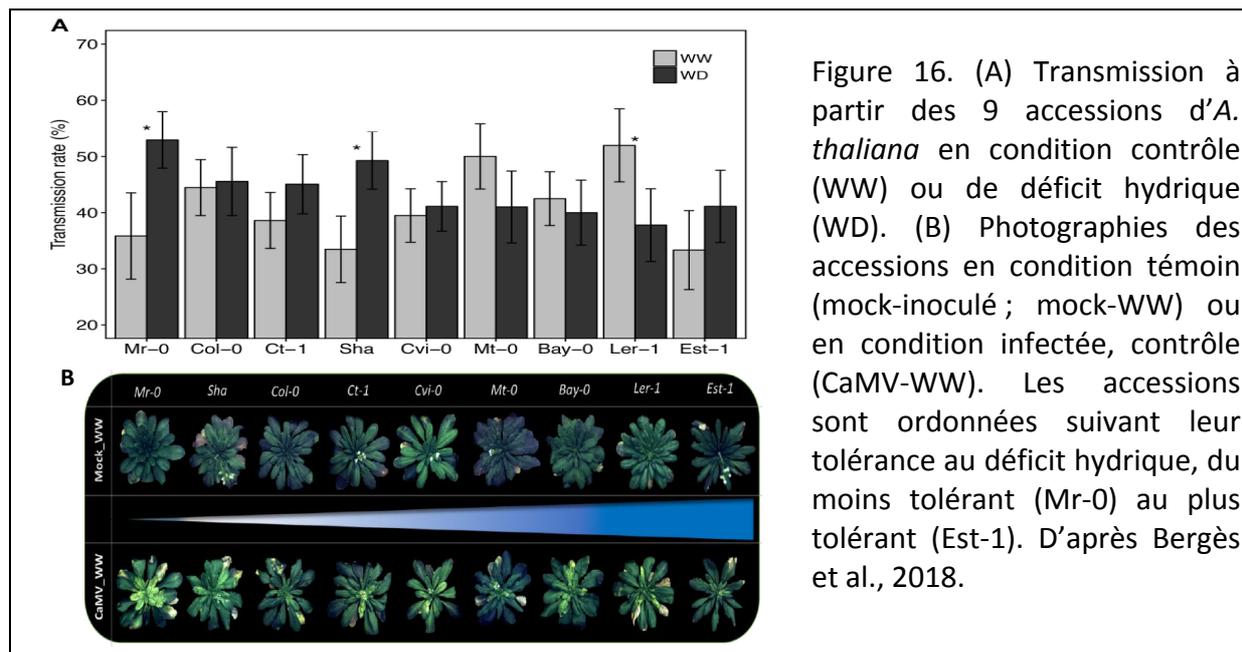


Figure 16. (A) Transmission à partir des 9 accessions d'*A. thaliana* en condition contrôle (WW) ou de déficit hydrique (WD). (B) Photographies des accessions en condition témoin (mock-inoculé ; mock-WW) ou en condition infectée, contrôle (CaMV-WW). Les accessions sont ordonnées suivant leur tolérance au déficit hydrique, du moins tolérant (Mr-0) au plus tolérant (Est-1). D'après Bergès et al., 2018.

De plus nous avons montré dans cette étude que le déficit hydrique altérait la relation : transmission/virulence. Alors que dans la condition contrôle (bien irriguée) ces deux paramètres sont positivement corrélés (plus une accession est sensible au CaMV, plus le taux de transmission est élevé), en cas de déficit hydrique cette relation semble inversée : les génotypes les plus tolérants au CaMV deviennent alors de meilleures sources virales (Bergès et al., 2018).

Ce travail « préparatoire » afin d'évaluer notamment sa faisabilité dans PHENOPSIS (en terme de logistique : gestion du matériel végétal en haut-débit, de la capacité à utiliser des souches virales dans un laboratoire d'écophysiologie..), couronné de succès, a permis de « passer à la vitesse supérieure » : enrichissement du nombre d'accessions naturelles, des traits physiologiques mesurés ... (thèse S. Bergès 2016-2019).

Désormais ce sont plus de 30 génotypes naturels d'*A. thaliana* qui sont testés quant à leur réponse à un double stress : infection virale X déficit hydrique dans le but de répondre aux questions :

- Quels sont les effets combinés d'une infection virale et d'un déficit hydrique édaphique sur la croissance et le développement végétatif de la plante ?
- Quelles sont les conséquences d'un déficit hydrique sur les traits viraux ?
- Quelles sont les voies de signalisation de la plante perçues par le virus pour optimiser sa transmission ?

Collaborations

D. Vile (INRA, LEPSE, Montpellier), A. Fereres (ICS, Madrid), C. Vazquez-Rovere (INTA, Argentine), V. Brault (INRA, UMR SVQV).

Articles associés

Bergès S., Vile D., Vazquez-Rovere C., Blanc S., Yvon M., Bédiée A., Rolland G., Dauzat M., van Munster M. (2018). Interactions Between Drought and Plant Genotype Change Epidemiological Traits of *Cauliflower mosaic virus*. *Frontiers in Plant Science* 9 : 703. doi: 10.3389/fpls.2018.00703

Yvon M., Vile D., Brault V., Blanc S., van Munster M. (2017). Drought reduces transmission of *Turnip yellows virus*, an insect-vector transmitted circulative virus. (2017). *Virus Research*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virusres.2017.07.009>

van Munster M., Yvon M., Vile D., Dader B., Fereres A., Blanc S. Water deficit enhances the transmission of plant viruses by insect vectors. (2017). *PLoS ONE* 12(5): e0174398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174398>

5. Perspectives

5.1 Effet du déficit hydrique sur les plante receveuses : que se passe t'il au niveau de la phase d'inoculation du virus en cas de déficit hydrique ?

Voici donc l'état des travaux à ce jour, et les perspectives à plus ou moins long terme sont nombreuses. La capacité des virus non circulants à augmenter leur efficacité de transmission de manière dramatique lorsque la plante source est soumise à un déficit hydrique est un résultat surprenant et plein de conséquences. Ce que cela implique à l'échelle du champ est potentiellement une augmentation des épidémies virales en cas d'épisodes de sécheresse, épisodes qui deviennent de plus en plus fréquents dans le contexte de changement climatique.

Dans les études que j'ai présenté nous n'avons étudié que la phase d'acquisition du virus, et l'effet de ce stress sur la phase d'inoculation reste inconnu.

Pourtant que se passe-t-il lorsque les plantes receveuses subissent elles aussi (ou ont subi) un stress abiotique ? Est ce que le fait d'avoir subi un stress abiotique les rend plus résistantes à l'infection ? Est ce qu'il y a une altération de l'inoculation virale ? Y a t'il une altération du développement de l'infection ?

Ces questions sont particulièrement pertinentes dans le cas des virus non circulants où la transmission par vecteur se fait sur de courtes distances et où vraisemblablement la plante receveuse se développe dans le même environnement abiotique que la plante donneuse.

5.1.1 Le priming, un mécanisme de défense de la plante

D'autres notions entrent alors en jeu tel que la notion de « priming ». Dans la nature les plantes sont soumises à des stress multiples qu'ils soient de type abiotiques ou biotiques. Ces stress peuvent être simultanés ou séquentiels, ils peuvent engendrer des conséquences différentes sur le développement physiologique de la plante qui les subi et ils peuvent aussi avoir des effets combinatoires complexes.

Par exemple l'application simultanée d'un stress abiotique (ex. déficit hydrique) et d'un stress biotique (ex. une infection virale) peut entraîner un effet synergique délétère sur la physiologie de la plante et une sensibilité accrue au pathogène comme nous l'avons montré dans Bergès et al., (2018). En revanche lorsque les stress ne sont pas simultanés mais séquentiels, l'effet sur la plante peut s'avérer moins néfaste. On parlera alors de « priming », un phénomène de mémoire des défenses de la plante faisant intervenir entre autres la voie hormonale de l'ABA et les molécules signal ROS (Mauch-Mani et al., 2017). Le priming permet ainsi à la plante de répondre plus rapidement et plus efficacement quand elle est soumise à un stress subséquent qu'il soit biotique ou abiotique, la rendant ainsi plus résistante, ou tolérante (Mauch-Mani et al., 2017). Le priming est divisé en trois phases distinctes : la phase d'induction (correspondant au premier stress auquel la plante est confronté), la phase défensive après exposition à un stress et le maintien dans le temps du priming (Martinez-Medina et al., 2016). Ce maintien de la tolérance aux stress peut également être transgénérationnel (Luna et al., 2012).

5.1.2 Travaux préliminaires : *B. rapa*/CaMV

Nous avons démarré un double protocole de stress (déficit hydrique) sur des plantes receveuses (*B. rapa*) afin d'estimer le taux d'inoculation par le CaMV et la dynamique d'apparition des symptômes suite à des expériences de transmission par vecteur.

1.2.1. Mise en place du protocole de déficit hydrique

Les teneurs en eau du sol correspondant à un traitement contrôle et de déficit hydrique ont été établis sur la base de l'observation de l'état physiologique des plantules utilisées comme plantes receveuses. Une teneur en eau de $3.3 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ sol sec}$ permet un développement optimal et est donc retenu comme valeur du traitement contrôle. Au bout de 10 jours d'arrêt total de l'irrigation les plantules présentent un retard de développement significatif et une perte de turgescence des tissus foliaires. Cela correspond à une teneur en eau de $0.6 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ sol sec}$ (protocole de déficit hydrique).

1.2.2 Expériences de transmission

Des expériences de transmission en utilisant ces plantes receveuses (contrôle ou en déficit hydrique) sont réalisées afin d'évaluer 1/ l'effet combiné du stress hydrique et de l'infection virale soit 2/ l'effet séquentiel du stress hydrique puis de l'infection virale (notion de priming). Cela fait l'objet d'un stage Master 1 (A. Heintz, Université de Toulouse, 2019).

Les résultats préliminaires que nous obtiendrons serviront de base à ce nouveau volet que je développe.

5.1.3 Effet d'un déficit hydrique sur la phase d'inoculation chez *A. thaliana*

Les plantes donneuses (*Arabidopsis thaliana* accession Col-0) infectées soit par le CaMV, soit par le TuMV seront cultivées dans PHENOPSIS en conditions contrôlées sans déficit hydrique. Nous appliquerons deux protocoles de stress sur les plantes receveuses afin d'évaluer soit 1) l'effet combiné du stress hydrique et de l'infection virale (manip

transmission « stress ») soit, 2) l'effet séquentiel du stress hydrique puis de l'infection virale (manip transmission « priming ») sur la transmission et le développement de l'infection. Il est à noter que l'automate de phénotypage PHENOPSIS permettra en outre d'analyser les effets du stress hydrique et de l'infection virale sur la croissance, la physiologie et le développement des plantes receveuses.

la voie de signalisation ABA ainsi que les ROS sont impliquées dans les réponses aux stress abiotiques et dans les voies de défenses contre divers pathogènes dont les virus (fermeture des stomates, dépôt de callose au niveau des plasmodesmes, altération de la voie du silencing antiviral) (Alazem and Lin, 2017). Des résultats préliminaires obtenus dans le cadre d'un stage de Master 1 en 2018 (R. Dussaut) laissent supposer un rôle de l'ABA dans la transmission et ce au niveau de la phase d'acquisition du virus. En effet, lorsque l'on utilise un mutant Col-0 *pyr/pyl* insensible à l'ABA en condition de déficit hydrique, le CaMV est significativement moins bien acquis (et donc *in fine* moins bien transmis) que les mêmes plantes en condition bien irriguée. Dans cette même expérience lorsque l'on utilise des plantes Col-0 type sauvage il y a bien une augmentation significative de la transmission lorsque les plantes infectées sont en déficit hydrique comme décrit dans van Munster et al. (2017).

Nous allons donc utiliser différents mutants Col-0 affectés dans les voies de signalisation de l'ABA ou des ROS comme plantes receveuses afin d'évaluer l'importance de ces voies dans le processus de transmission du virus.

1) Dans un premier cas (manip transmission « stress ») les plantes receveuses en déficit hydrique seront inoculées par le puceron *Myzus persicae* avec le virus acquis préalablement sur les plantes donneuses. Dans ce cas là nous regardons donc l'effet combiné du stress hydrique et du stress dû au pathogène. Le taux de transmission sera déterminé et la dynamique d'infection (apparition des symptômes, vitesse d'apparition des symptômes, implantation de la systémie, quantification virale) évaluée dans les différents génotypes testés. En parallèle, plusieurs paramètres physiologiques (biomasse foliaire fraîche et sèche, surface foliaire, dynamique de croissance, nombre de feuilles de la rosette) seront mesurés.

2) dans un deuxième cas (manip transmission « priming ») la transmission se fera sur des plantes receveuses ayant 'récupéré' d'un déficit hydrique (phase de réhydratation préalable à l'inoculation par puceron). Dans ce cas là ce sera l'effet du priming comme trait adaptatif modulant les défenses de la plante dans des environnements changeants qui sera étudié. L'état « primé » des plantes pourra être confirmé grâce à des marqueurs moléculaires connus chez *Arabidopsis* : accumulation des protéines kinases MPK3 et MPK6, augmentation de l'expression de facteurs de transcription (ex. WRKYs et MY2) entre autres. Les mêmes paramètres tels que décrits dans 1) seront mesurés.

Des plantes receveuses n'ayant subi aucun stress hydrique avant inoculation constitueront le groupe contrôle ou « naïf ». La comparaison des différents paramètres mesurés dans 1) et 2) avec ce groupe nous permettra de comparer l'efficacité des défenses de la plante contre le virus selon que celle ci est primée ou pas (moins bonne transmission, systémie retardée ...).

Par la suite afin d'avoir une idée globale sur l'effet d'un double stress (déficit hydrique et infection virale) sur la transmission (acquisition plus inoculation), des expériences similaires à celles décrites ci-dessus seront réalisées en utilisant des plantes donneuses également en stress hydrique.

5.2 Compréhension des mécanismes impliqués au niveau de la phase d'acquisition lors d'un déficit hydrique

En parallèle de ces expériences afin de détecter d'éventuelles altérations dans la phase d'inoculation lors d'un stress, un autre volet important de mon projet consistera à mettre en évidence les mécanismes impliqués dans la réactivité du CaMV et du TuMV lors de la phase d'acquisition. Nous avons déjà exploré quelques pistes.

5.2.1 Morphologie des cellules en déficit hydrique

Nous avons regardé si le protocole de stress hydrique sur navet (voir Figure 12) affectait l'intégrité des cellules. Des coupes de navet infecté par le CaMV contrôle et en stress hydrique ont été ainsi observés après fixation en microscopie électronique (réalisé par D. Gargani). Nous n'avons pas observé de différence que ce soit au niveau des structures des différents organelles ou des parois cellulaires selon les traitements hydriques. Au niveau de l'infection par le CaMV, Les usines virales et des corps à transmission sont également identiques quelque soit le traitement.

5.2.2 Comportement alimentaire

Une collaboration avec Alberto Fereres (ICA, Madrid) a été mise en place afin de réaliser des expériences d'électropénétrographie (EPG, Tjallingii, 2006). Cette technique permet de caractériser de manière très fine le passage des stylets du puceron à travers les différents compartiments cellulaires de la plante hôte. Les résultats obtenus au cours de deux expériences indépendantes conduites sur des plantes saines, ou infectées par le CaMV, contrôle et en déficit hydrique permettent d'écarter le rôle d'une altération du comportement alimentaire dans l'augmentation de la transmission.

5.2.3 Relocalisation cellulaire

La thèse privilégiée reste celle que nous avons émise, à savoir un mécanisme cellulaire de relocalisation (pour le CaMV) ou de changement de conformation de la protéine Helper du TuMV au travers de la perception des signaux de stress de la plante. Mais nous ne l'avons pas encore clairement démontré.

Nous avons réalisé quelques expériences préliminaires d'immunomarquages (α -P2, α -tubuline) et d'observations en microscopie confocale afin de détecter une relocalisation de P2 sur les microtubules/formation de TA plus importante dans des navets CaMV-infectés et en déficit hydrique comparé à des plantes non stressées. Dans ces expériences préliminaires

nous n'avons pas observé de différence significative. Ces expériences demandent à être reproduites.

5.2.4 Priming et relocalisation cellulaire

A défaut d'observer ce phénomène de relocalisation « constitutif » dans les plantes en déficit hydrique dans nos expériences préliminaires, nous avons émis l'hypothèse d'une sorte de « priming » qui se traduirait par une « réactivité » plus grande des plantes en déficit hydrique face à un stress ultérieur tel que la piqûre du puceron. Le stress mécanique/ou chimique (éliciteurs et/ou effecteurs dans la salive) provoque des réponses de la plante (dépoliarisation membranaire, flux calciques, production de ROS ...) qui est détecté par le virus (pour revue Bak et al., 2013). Ainsi le passage des stylets dans les cellules de la plante hôte déclenche à proximité l'éclatement des TB et la relocalisation de P2 (Martiniere et al., 2013). Lors du mouvement des stylets dans les tissus, un gel salivaire est sécrété qui polymérise et forme des gaines salivaires qu'il est possible de suivre en microscopie à fluorescence. Il est possible alors de voir les cellules infectées qui « réagissent » et déclenche un TA (Martiniere et al., 2013).

En rajoutant un stress hydrique préliminaire à la piqûre du puceron, nous n'avons pas vu de différence significative dans le déclenchement de l'activation de la transmission du CaMV à proximité des gaines salivaires

De nouvelles expériences seront conduites afin de valider ou infirmer cette hypothèse.

5.2.5 Accumulation de P2 et HCPro

L'effet d'un stress abiotique peut modifier l'accumulation virale *in planta*, comme cela a été montré dans le cas du *Tobacco mosaic virus* et du *Potato virus A* (Dorokhov et al., 2012; Suntio and Makinen, 2012) et cette charge virale peut être corrélée positivement à l'efficacité de transmission (pour revue Froissart et al., 2010). Dans nos études, que ce soit sur le pathosystème *B. rapa*/CaMV ou TuMV ou le pathosystème *A. thaliana*/CaMV nous n'avons pas pu trouver de corrélation entre l'accumulation virale, mesurée par qPCR ou qRT-PCR, et la transmission (Bergès et al., 2018; van Munster et al., 2017).

Nous testerons plus spécifiquement l'accumulation des protéines P2 et HCPro par qRT-PCR mais aussi par western blot grâce à des anticorps spécifiques dans des plantes stressées vs. non-stressées. En effet même si nous ne voyons pas de différence au niveau génomique il est possible que ces protéines directement impliquées dans la transmission soient spécifiquement régulées lors du déficit hydrique.

5.3. Virus différant par leur stratégie de transmission

Jusqu'à présent nous avons testé des virus non circulants ayant une stratégie impliquant un facteur assistant (P2 ou HCPro). Nous testerons le *Cucumber mosaic virus* (CMV ; Cucumovirus) qui a une stratégie dite 'capside', la particule virale se fixant directement au niveau des stylets du puceron. La plante hôte de ce virus étant la courgette

(*Cucurbita pepo*, *Cucurbitaceae*) il faudra tout d'abord mettre au point un protocole de déficit hydrique adéquat.

La transmission du virus de la mosaïque jaune de la courgette, *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) un potyvirus (comme le TuMV) sera également testée sur la courgette. Cela nous permettra de comparer les stratégies capsidique/ helper sur la même plante hôte (réponses du virus face au stress hôte-dépendant ?).

5.4. Utilisation de mutants *A. thaliana* impliqués dans les voies de signalisation

Afin de décortiquer les voies de signalisation impliquées dans la perception et la capacité des virus à augmenter leur transmission, nous utiliserons le large panel de mutants d'*A. thaliana* altérés dans ces voies qui sont disponibles. Nous disposons déjà de quelques mutants affectés dans la voie de signalisation de l'ABA et des ROS.

1/ Nous utiliserons un protocole de déficit hydrique sur des plants mutants infectés par différents virus non circulants et réaliserons des tests de transmission afin de voir si il y a toujours une augmentation de la transmission,

2/ De même nous utiliserons ces mêmes mutants pour analyser la deuxième phase de la transmission : la réponse de la plante stressée à l'inoculation. Les plantes receveuses mutantes seront stressées et les résultats de transmission comparée à des plantes contrôle wt.

5.5. Elargissement à d'autres stress

J'envisage également de tester d'autres types de stress résultant de pratiques agricoles tels que l'apport d'intrants (herbicides, engrais...) qui en modifiant le statut physiologique des plantes cultivées ou adventices augmenterait la transmission de certains virus.

Perspectives

A ce jour, les effets d'environnements perturbés sur la transmission virale sont très peu documentés. Nous avons, dans nos études précédentes commencé à décortiquer l'effet des stress abiotiques (en l'occurrence un déficit hydrique) sur l'efficacité de la transmission. Nous avons pu ainsi montrer que l'acquisition des virus non circulants était améliorée. Reste à comprendre les mécanismes impliqués dans cette altération de l'efficacité de transmission. De plus, en étudiant plus précisément la phase d'inoculation nous obtiendrons des données complémentaires sur le processus de transmission. L'utilisation de deux protocoles de stress (combiné ou séquentiel) visant à mettre en lumière un mécanisme de priming pourraient nous donner des résultats contrastés où une application simultanée du stress hydrique et de l'inoculation virale conduirait à une augmentation de la transmission (affaiblissement des défenses de la plante conférée par le stress abiotique) tandis que cette transmission se

verrait réduite lorsque les plantes auraient été préalablement « primées » par le déficit hydrique (augmentation des défenses de la plante).

Que les résultats obtenus soient ceux attendus ou pas ils permettront de poser un jalon supplémentaire sur la réalité de la transmission virale dans des environnements changeants. Ils permettront d'évaluer si l'augmentation de l'acquisition que nous avons décrit précédemment impacte réellement le taux de transmission. Si nous observions une réduction significative de la capacité d'inoculation dans les plantes ayant subi un stress hydrique, nous pourrions supposer que le taux de transmission soit inchangé en comparaison avec des plantes n'ayant subi aucun stress. Dans ce cas les conséquences en épidémiologie virale seraient faibles. En revanche, si cette capacité d'inoculation s'avérait accrue voire inchangée comparée à des plantes n'ayant pas subi de déficit hydrique cela pourrait entraîner des conséquences plus importantes pour l'épidémiologie virale dans un environnement en mutation.

Conclusions générales

La transmission est essentielle pour maintenir la survie d'un pathogène dans l'environnement. Les virus ont développé de multiples stratégies de manipulation de la plante hôte ou de l'insecte vecteur afin d'optimiser cette phase essentielle de leur cycle de vie (pour revue Gutiérrez et al., 2013). Enfin on sait désormais que le dialogue moléculaire plante-vecteur (i.e. activation des voies de signalisation) peut être intercepté par le virus et utilisé à son avantage pour promouvoir sa transmission (Berthelot et al., 2019; Martiniere et al., 2013).

Les virus, parasites obligatoires, sont de ce fait prisonniers de leur « habitat » et vulnérables à une détérioration ou à la destruction de leur hôte. Dans ce projet j'ai montré que le statut physiologique de la plante (déficit hydrique) était un facteur activant de la transmission virale. Au delà d'une simple perception « erronée » des voies de signalisation (présence du vecteur), il est possible que le virus mette en place un processus « d'échappement ». Sentant sa plante hôte « mal en point », le virus mettrait en place des mécanismes pour accélérer/optimiser sa transmission. La capacité remarquable d'un parasite à ressentir le danger dans lequel se trouve son hôte et le mécanisme d'échappement est un phénomène qui a déjà été décrit dans d'autres pathosystèmes (Ponton et al., 2006).

A cela s'ajoute une autre notion très intéressante : les virus peuvent augmenter la tolérance des plantes à un stress abiotique (température, hydrique, salin...) (Westwood et al., 2013; Xu et al., 2008).

Cette caractéristique des virus semble être très répandue : le CaMV et le TuMV permettent également à des plants *B. rapa* de mieux survivre à un déficit hydrique sévère comme nous avons pu le montrer (van Munster et al., 2017).

Peut on imaginer que dans des conditions adverses, comme une forte sécheresse, les virus aient développé des mécanismes de manipulation extrêmement poussés afin de maintenir leur hôte en vie en attendant de pouvoir s'en échapper, et ce de manière beaucoup plus efficace que dans des conditions normales ?

Bibliographie

- Aguilar, E., Allende, L., Del Toro, F.J., Chung, B.N., Canto, T., Tenllado, F., 2015. Effects of Elevated CO₂ and Temperature on Pathogenicity Determinants and Virulence of Potato virus X/Potyvirus-Associated Synergism. *Mol Plant Microbe Interact* 28(12), 1364-1373.
- Alazem, M., Lin, N.S., 2017. Antiviral Roles of Abscisic Acid in Plants. *Front Plant Sci* 8, 1760.
- Augustin, S., Courtin, C., Rejasse, A., Lorme, P., Genissel, A., Bourguet, D., 2004. Genetics of resistance to transgenic *Bacillus thuringiensis* poplars in *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Journal of economic entomology* 97(3), 1058-1064.
- Bak, A., Martiniere, A., Blanc, S., Drucker, M., 2013. Early interactions during the encounter of plants, aphids and arboviruses. *Plant signaling & behavior* 8(6), e24225.
- Berges, S.E., Vile, D., Vazquez-Rovere, C., Blanc, S., Yvon, M., Bediee, A., Rolland, G., Dauzat, M., van Munster, M., 2018. Interactions Between Drought and Plant Genotype Change Epidemiological Traits of Cauliflower mosaic virus. *Front Plant Sci* 9, 703.
- Berthelot, E., Ducouso, M., Macia, J.L., Bogaert, F., Baecker, V., Thebaud, G., Gallet, R., Yvon, M., Blanc, S., Khelifa, M., Drucker, M., 2019. Turnip mosaic virus is a second example of a virus using transmission activation for plant-to-plant propagation by aphids. *J Virol*.
- Blanc, S., Drucker, M., Uzest, M., 2014. Localizing viruses in their insect vectors. *Annu Rev Phytopathol.* 52, 23.
- Bradley, R.H., Ganong, R.Y., 1955. Some effects of formaldehyde on potato virus Y in vitro, and ability of aphids to transmit the virus when their stylets are treated with formaldehyde. *Can J Microbiol* 1(9), 783-793.
- Brault, V., Uzest, M., Monsion, B., Jacquot, E., Blanc, S., 2010. Aphids as transport devices for plant viruses. *C R Biol* 333(6-7), 524-538.
- Clavijo, G., van Munster, M., Monsion, B., Bochet, N., Brault, V., 2016. Transcription of densovirus endogenous sequences in the *Myzus persicae* genome. *J Gen Virol* 97(4), 1000-1009.
- Del Toro, F.J., Aguilar, E., Hernandez-Walias, F.J., Tenllado, F., Chung, B.N., Canto, T., 2015. High Temperature, High Ambient CO₂ Affect the Interactions between Three Positive-Sense RNA Viruses and a Compatible Host Differentially, but not Their Silencing Suppression Efficiencies. *PLoS One* 10(8), e0136062.
- Dorokhov, Y.L., Komarova, T.V., Petrunia, I.V., Kosorukov, V.S., Zinovkin, R.A., Shindyapina, A.V., Frolova, O.Y., Gleba, Y.Y., 2012. Methanol may function as a cross-kingdom signal. *PLoS One* 7(4), e36122.
- Drucker, M., Froissart, R., Hebrard, E., Uzest, M., Ravallec, M., Esperandieu, P., Mani, J.C., Pugniere, M., Roquet, F., Fereres, A., Blanc, S., 2002. Intracellular distribution of viral gene products regulates a complex mechanism of cauliflower mosaic virus acquisition by its aphid vector. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(4), 2422-2427.
- Drucker, M., Then, C., 2015. Transmission activation in non-circulative virus transmission: a general concept? *Curr Opin Virol* 15, 63-68.
- Froissart, R., Doumayrou, J., Vuillaume, F., Alizon, S., Michalakis, Y., 2010. The virulence-transmission trade-off in vector-borne plant viruses: a review of (non-)existing studies. *Philosophical transactions of the Royal Society of London* 365(1548), 1907-1918.

- Froissart, R., Uzest, M., Ruiz-Ferrer, V., Drucker, M., Hebrard, E., Hohn, T., Blanc, S., 2004. Splicing of Cauliflower mosaic virus 35S RNA serves to downregulate a toxic gene product. *J Gen Virol* 85(Pt 9), 2719-2726.
- Gahan, L.J., Gould, F., Heckel, D.G., 2001. Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*. *Science* 293(5531), 857-860.
- Granier, C., Aguirrezabal, L., Chenu, K., Cookson, S.J., Dauzat, M., Hamard, P., Thioux, J.J., Rolland, G., Bouchier-Combaud, S., Lebaudy, A., Muller, B., Simonneau, T., Tardieu, F., 2006. PHENOPSIS, an automated platform for reproducible phenotyping of plant responses to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana* permitted the identification of an accession with low sensitivity to soil water deficit. *The New phytologist* 169(3), 623-635.
- Gutiérrez, S., Michalakakis, Y., van Munster, M., Blanc, S., 2013. Plant feeding by insect vectors can affect life cycle, population genetics and evolution of plant viruses. *Functional Ecology* 27, 13.
- Hebrard, E., Drucker, M., Leclerc, D., Hohn, T., Uzest, M., Froissart, R., Strub, J.M., Sanglier, S., van Dorselaer, A., Padilla, A., Labesse, G., Blanc, S., 2001. Biochemical Characterization of the Helper Component of Cauliflower Mosaic Virus. *Journal of Virology* 75(18), 8538-8546.
- Herrero, S., Gechev, T., Bakker, P.L., Moar, W.J., de Maagd, R.A., 2005. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes. *BMC Genomics* 6, 96.
- Hogenhout, S.A., Ammar el, D., Whitfield, A.E., Redinbaugh, M.G., 2008. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annual review of phytopathology* 46, 327-359.
- Hoh, F., Uzest, M., Drucker, M., Plisson-Chastang, C., Bron, P., Blanc, S., Dumas, C., 2010. Structural insights into the molecular mechanisms of cauliflower mosaic virus transmission by its insect vector. *J Virol* 84(9), 4706-4713.
- Huang, L., Ren, Q., Sun, Y., Ye, L., Cao, H., Ge, F., 2012. Lower incidence and severity of tomato virus in elevated CO₂ is accompanied by modulated plant induced defence in tomato. *Plant Biol (Stuttg)* 14(6), 905-913.
- Juergens, M., Paetsch, C., Kramer, I., Zahn, M., Rabenstein, F., Schondelmaier, J., Schliephake, E., Snowdon, R., Friedt, W., Ordon, F., 2010. Genetic analyses of the host-pathogen system Turnip yellows virus (TuYV)-rapeseed (*Brassica napus* L.) and development of molecular markers for TuYV-resistance. *Theor Appl Genet* 120(4), 735-744.
- Khelifa, M., Journou, S., Krishnan, K., Gargani, D., Esperandieu, P., Blanc, S., Drucker, M., 2007. Electron-lucent inclusion bodies are structures specialized for aphid transmission of cauliflower mosaic virus. *J Gen Virol* 88(Pt 10), 2872-2880.
- Leh, V., Jacquot, E., Geldreich, A., Haas, M., Blanc, S., Keller, M., Yot, P., 2001. Interaction between the open reading frame III product and the coat protein is required for transmission of cauliflower mosaic virus by aphids. *J Virol* 75(1), 100-106.
- Leh, V., Jacquot, E., Geldreich, A., Hermann, T., Leclerc, D., Cerutti, M., Yot, P., Keller, M., Blanc, S., 1999. Aphid transmission of cauliflower mosaic virus requires the viral PIII protein. *Embo J* 18(24), 7077-7085.
- Luna, E., Bruce, T.J., Roberts, M.R., Flors, V., Ton, J., 2012. Next-generation systemic acquired resistance. *Plant Physiol* 158(2), 844-853.

- Martinez-Medina, A., Flors, V., Heil, M., Mauch-Mani, B., Pieterse, C.M.J., Pozo, M.J., Ton, J., van Dam, N.M., Conrath, U., 2016. Recognizing Plant Defense Priming. *Trends Plant Sci* 21(10), 818-822.
- Martiniere, A., Bak, A., Macia, J.L., Lautredou, N., Gargani, D., Doumayrou, J., Garzo, E., Moreno, A., Fereres, A., Blanc, S., Drucker, M., 2013. A virus responds instantly to the presence of the vector on the host and forms transmission morphs. *Elife* 2, e00183.
- Martinière, A., Gargani, D., Uzest, M., Lautredou, N., Blanc, S., Drucker, M., 2009. A role for plant microtubules in the formation of transmission-specific inclusion bodies of Cauliflower mosaic virus. *The Plant Journal* 58(1), 135-146.
- Mathers, T.C., Chen, Y., Kaithakottil, G., Legeai, F., Mugford, S.T., Baa-Puyoulet, P., Bretaudeau, A., Clavijo, B., Colella, S., Collin, O., Dalmay, T., Derrien, T., Feng, H., Gabaldon, T., Jordan, A., Julca, I., Kettles, G.J., Kowitzanich, K., Lavenier, D., Lenzi, P., Lopez-Gomollon, S., Loska, D., Mapleson, D., Maumus, F., Moxon, S., Price, D.R., Sugio, A., van Munster, M., Uzest, M., Waite, D., Jander, G., Tagu, D., Wilson, A.C., van Oosterhout, C., Swarbreck, D., Hogenhout, S.A., 2017. Rapid transcriptional plasticity of duplicated gene clusters enables a clonally reproducing aphid to colonise diverse plant species. *Genome Biol* 18(1), 27.
- Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., Flors, V., 2017. Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. *Annual review of plant biology* 68, 485-512.
- Meier, M., Lustig, A., Aebi, U., Burkhard, P., 2002. Removing an interhelical salt bridge abolishes coiled-coil formation in a de novo designed peptide. *J Struct Biol* 137(1-2), 65-72.
- Meunier, L., Prefontaine, G., Van Munster, M., Brousseau, R., Masson, L., 2006. Transcriptional response of *Choristoneura fumiferana* to sublethal exposure of Cry1Ab protoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect molecular biology* 15(4), 475-483.
- Mulot, M., Monsion, B., Boissinot, S., Rastegar, M., Meyer, S., Bochet, N., Brault, V., 2018. Transmission of Turnip yellows virus by *Myzus persicae* Is Reduced by Feeding Aphids on Double-Stranded RNA Targeting the Ephrin Receptor Protein. *Front Microbiol* 9, 457.
- Nancarrow, N., Constable, F.E., Finlay, K.J., Freeman, A.J., Rodoni, B.C., Trebicki, P., Vassiliadis, S., Yen, A.L., Luck, J.E., 2014. The effect of elevated temperature on Barley yellow dwarf virus-PAV in wheat. *Virus Res* 186, 97-103.
- Palacios, I., Drucker, M., Blanc, S., Leite, S., Moreno, A., Fereres, A., 2002. Cauliflower mosaic virus is preferentially acquired from the phloem by its aphid vectors. *J Gen Virol* 83(Pt 12), 3163-3171.
- Papanikolopoulou, K., Forge, V., Goeltz, P., Mitraki, A., 2004. Formation of highly stable chimeric trimers by fusion of an adenovirus fiber shaft fragment with the foldon domain of bacteriophage t4 fibritin. *J Biol Chem* 279(10), 8991-8998.
- Papanikolopoulou, K., van Raaij, M.J., Mitraki, A., 2008. Creation of hybrid nanorods from sequences of natural trimeric fibrous proteins using the fibritin trimerization motif. *Methods Mol Biol* 474, 15-33.
- Pauchet, Y., Wilkinson, P., van Munster, M., Augustin, S., Pauron, D., ffrench-Constant, R.H., 2009. Pyrosequencing of the midgut transcriptome of the poplar leaf beetle *Chrysomela tremulae* reveals new gene families in Coleoptera. *Insect Biochem Mol Biol* 39(5-6), 403-413.

- Plisson, C., Uzest, M., Drucker, M., Froissart, R., Dumas, C., Conway, J., Thomas, D., Blanc, S., Bron, P., 2005. Structure of the mature P3-virus particle complex of cauliflower mosaic virus revealed by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol* 346(1), 267-277.
- Pompon, J., Quiring, D., Giordanengo, P., Pelletier, Y., 2010. Role of xylem consumption on osmoregulation in *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas). *Journal of insect physiology* 56(6), 610-615.
- Ponton, F., Lebarbenchon, C., Lefevre, T., Biron, D.G., Duneau, D., Hughes, D.P., Thomas, F., 2006. Parasitology: parasite survives predation on its host. *Nature* 440(7085), 756.
- Suntio, T., Makinen, K., 2012. Abiotic stress responses promote Potato virus A infection in *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Pathol* 13(7), 775-784.
- Tjallingii, W.F., 2006. Salivary secretions by aphids interacting with proteins of phloem wound responses. *J Exp Bot* 57(4), 739-745.
- Uzest, M., Gargani, D., Dombrovsky, A., Cazevieille, C., Cot, D., Blanc, S., 2010. The "acrostyle": a newly described anatomical structure in aphid stylets. *Arthropod Struct Dev* 39(4), 221-229.
- Uzest, M., Gargani, D., Drucker, M., Hebrard, E., Garzo, E., Candresse, T., Fereres, A., Blanc, S., 2007. A protein key to plant virus transmission at the tip of the insect vector stylet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(46), 17959-17964.
- Van Munster, M., Dullemans, A.M., Verbeek, M., Van Den Heuvel, J.F., Clerivet, A., Van Der Wilk, F., 2002. Sequence analysis and genomic organization of Aphid lethal paralysis virus: a new member of the family Dicistroviridae. *J Gen Virol* 83(Pt 12), 3131-3138.
- van Munster, M., Dullemans, A.M., Verbeek, M., van den Heuvel, J.F., Reinbold, C., Brault, V., Clerivet, A., van der Wilk, F., 2003a. Characterization of a new densovirus infecting the green peach aphid *Myzus persicae*. *J Invertebr Pathol* 84(1), 6-14.
- van Munster, M., Dullemans, A.M., Verbeek, M., van den Heuvel, J.F., Reinbold, C., Brault, V., Clerivet, A., van der Wilk, F., 2003b. A new virus infecting *Myzus persicae* has a genome organization similar to the species of the genus Densovirus. *J Gen Virol* 84(Pt 1), 165-172.
- van Munster, M., Janssen, A., Clerivet, A., van den Heuvel, J., 2005. Can plants use an entomopathogenic virus as a defense against herbivores? *Oecologia* 143(3), 396-401.
- van Munster, M., le Gleuher, M., Pauchet, Y., Augustin, S., Courtin, C., Amichot, M., Ffrench-Constant, R.H., Pauron, D., 2011. Molecular characterization of three genes encoding aminopeptidases N in the poplar leaf beetle *Chrysomela tremulae*. *Insect molecular biology* 20(2), 267-278.
- van Munster, M., Prefontaine, G., Meunier, L., Elias, M., Mazza, A., Brousseau, R., Masson, L., 2007. Altered gene expression in *Choristoneura fumiferana* and *Manduca sexta* in response to sublethal intoxication by *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Insect molecular biology* 16(1), 25-35.
- van Munster, M., Willis, L.G., Elias, M., Erlandson, M.A., Brousseau, R., Theilmann, D.A., Masson, L., 2006. Analysis of the temporal expression of *Trichoplusia ni* single nucleopolyhedrovirus genes following transfection of BT1-Tn-5B1-4 cells. *Virology* 354(1), 154-166.
- van Munster, M., Yvon, M., Vile, D., Dader, B., Fereres, A., Blanc, S., 2017. Water deficit enhances the transmission of plant viruses by insect vectors. *PLoS One*.
- Vickers, L., 2011. Aphid responses to drought : a combined physiological and transcriptomic approach. Thesis, 260.

- Vile, D., Pervent, M., Belluau, M., Vasseur, F., Bresson, J., Muller, B., Granier, C., Simonneau, T., 2012. Arabidopsis growth under prolonged high temperature and water deficit: independent or interactive effects? *Plant Cell Environ* 35(4), 702-718.
- Webster, C.G., Pichon, E., van Munster, M., Monsion, B., Deshoux, M., Gargani, D., Calevro, F., Jimenez, J., Moreno, A., Krenz, B., Thompson, J.R., Perry, K.L., Fereres, A., Blanc, S., Uzest, M., 2018. Identification of Plant Virus Receptor Candidates in the Stylets of Their Aphid Vectors. *J Virol* 92(14).
- Westwood, J.H., McCann, L., Naish, M., Dixon, H., Murphy, A.M., Stancombe, M.A., Bennett, M.H., Powell, G., Webb, A.A., Carr, J.P., 2013. A viral RNA silencing suppressor interferes with abscisic acid-mediated signalling and induces drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Pathol* 14(2), 158-170.
- Willis, J.H., 2010. Structural cuticular proteins from arthropods: annotation, nomenclature, and sequence characteristics in the genomics era. *Insect Biochem Mol Biol* 40(3), 189-204.
- Willis, L.G., Seipp, R., Stewart, T.M., Erlandson, M.A., Theilmann, D.A., 2005. Sequence analysis of the complete genome of *Trichoplusia ni* single nucleopolyhedrovirus and the identification of a baculoviral photolyase gene. *Virology* 338(2), 209-226.
- Xu, P., Chen, F., Mannas, J.P., Feldman, T., Sumner, L.W., Roossinck, M.J., 2008. Virus infection improves drought tolerance. *The New phytologist* 180(4), 911-921.
- Yvon, M., Vile, D., Brault, V., Blanc, S., van Munster, M., 2017. Drought reduces transmission of Turnip yellows virus, an insect-vectored circulative virus. *Virus Res* 241, 131-136.