

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC  
INRS-Institut Armand Frappier

**CONTRIBUTION DE LA CELLULE HÔTE LORS DU  
MOUVEMENT INTERCELLULAIRE DU VIRUS DE LA  
MOSAÏQUE DU NAVET.**

Par Maxime Agbeci

Mémoire présenté  
pour l'obtention  
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)  
en virologie et immunologie

Jury d'évaluation

Présidente du jury et examinatrice interne

Angela Pearson

Examineur externe

Jacques Archambault (IRCM)

Directeur de recherche

Jean-François Laliberté

FÉVRIER 2013

## Remerciements

Tout d'abord je dédie ce mémoire à ma femme qui est pour moi la plus belle des gemmes jamais trouvées, et à ma fille Maelly dont la naissance en début de maîtrise bien qu'étant un défi supplémentaire, m'a apporté la joie de vivre, l'amour, la force et le courage nécessaire pour poursuivre mes études.

Ma liste de remerciement est exhaustive, car plusieurs personnes m'ont apporté une aide inestimable tout au long de ma maîtrise. Cependant, je tiens tout particulièrement à remercier mon directeur, monsieur Jean-François Laliberté pour m'avoir donné l'opportunité de faire ma maîtrise dans son laboratoire. Sa personnalité humble, son bagage culturel, sa philosophie et son encadrement hors pair font de lui un modèle à émuler.

Je remercie aussi tous mes collègues de laboratoires qui sont d'ailleurs devenus des amis avec lesquels j'ai pu partager des moments inoubliables dans et à l'extérieur et du laboratoire.

## Résumé

Le mouvement intercellulaire viral est une étape cruciale pour l'infection d'un hôte par un phytovirus. En ce qui concerne les phytovirus, ceux-ci quittent leur foyer d'infection en se déplaçant des cellules initialement infectées vers les cellules voisines. Les virus vont par la suite atteindre le système vasculaire de la plante et établir l'infection systémique de cette dernière. Pour pouvoir se déplacer de cellule en cellule, les phytovirus codent pour des protéines de mouvement (MP). Cependant, l'action de ces dernières ne peut se faire sans la participation de certains facteurs de la cellule hôte. En agissant de concert avec les MP, ces facteurs de la cellule hôte permettent le passage du complexe ribonucléoprotéique viral à travers les plasmodesmes (PDs). Parmi ces facteurs qui composent la machinerie de transport cellulaire et qui sont impliqués dans le mouvement intercellulaire viral, nous pouvons citer le cytosquelette, les myosines, et le système sécrétoire.

Contrairement à la grande majorité des phytovirus connus à ce jour, les potyvirus n'ont pas de protéine dont le seul rôle est d'assurer le mouvement intercellulaire de l'entité virale. Aussi de précédentes études portant sur le mouvement intercellulaire viral ont montré que les voies de transport empruntées par les virus pour se déplacer de cellule en cellule ne sont pas toujours les mêmes, et peuvent être différentes d'un virus à un autre. De plus, les méthodes utilisées dans ces études ne permettent pas de toujours faire une distinction sans équivoque entre le mouvement intercellulaire viral et la réduction de la réplication de l'ARN viral.

Dans cette étude, en étant capable de faire la différence entre les premières cellules infectées et celles résultantes du mouvement intercellulaire viral, nous avons conçu un nouvel outil qui nous a permis d'étudier la contribution du mécanisme de transport de la cellule hôte lors du mouvement intercellulaire du virus de la mosaïque du navet (TuMV).

Afin de pouvoir différencier les foyers d'infection primaires des foyers d'infection secondaires qui eux sont dû au mouvement intercellulaire viral, nous avons inséré dans un vecteur binaire pCambia à la fois la séquence codante pour le clone infectieux du TuMV couplé à la protéine fluorescente mCherry et le gène codant pour une protéine GFP ciblée au réticulum endoplasmique (ER). Les deux gènes étant livrés dans la même cellule, les premières cellules infectées suite à l'agroinfiltration exprimaient les deux fluorochromes. Les foyers d'infection primaire étaient verts et rouges. Quatre à six jours suivant l'agroinfiltration, en plus de ces cellules vertes et rouges, on pouvait observer des cellules exprimant le fluorochrome rouge seulement, signifiant que le virus se déplaçait de cellule en cellule.

Pour déterminer l'implication des voies de sécrétion précoces et tardives, de l'endocytose et du cytosquelette lors du mouvement intercellulaire du TuMV, nous avons utilisé des inhibiteurs chimiques et protéiques qui affectent différentes étapes de la machinerie de transport cellulaire. Le traitement par la Brefeldin A ou la Concanamycin A et l'expression de mutants dominants négatifs des protéines ARF1 ou RAB-E1d ont réduit de manière drastique le mouvement intercellulaire viral sans pour autant affecter sa réplication dans les foyers d'infection primaire. Un test d'interférence pharmacologique utilisant la Tyrphostin A23 et la Wortmannin a montré que l'inhibition de l'endocytose n'avait aucun effet sur le mouvement intercellulaire du TuMV. De plus, le manque de colocalisation entre FM4-64, Ara7 (AtRabF2b) et le complexe de réplication virale induit par la protéine 6K<sub>2</sub> ont confirmé que l'endocytose n'était pas impliquée dans ce processus. Contrairement aux microtubules, la dépolymérisation des microfilaments a aussi eu un effet drastique sur le mouvement intercellulaire du TuMV et un fait intéressant à noter est que l'usage de l'interférence ARN induite par un virus a montré que ce mouvement qui dépend des

microfilaments était soutenu par l'action de la myosine XI-2, mais pas par les myosines VIIIs et XI-F.

Nous proposons alors que lors du mouvement intercellulaire du TuMV, le complexe viral passe par des étapes de maturation progressive tout au long de la voie de sécrétion où le trafic post-Golgi, le réseau d'actine et de myosines sont importants pour qu'il puisse rejoindre les PDs et passer d'une cellule à une autre.

## Abstract

Plant viruses move from the initially infected cell to neighbouring cells during local movement and then over long distances through vascular tissues to establish a systemic infection of the plant. Transport between cells involves moving a viral RNA-protein complex through plasmodesmata (PDs) that requires among others viral movement proteins (MP). Although viral MP are at the core of virus intra- and intercellular movement, it is clear that host factors that are components of the host cell transport machinery, in particular the cytoskeleton, myosin motors and the secretory pathway are required. Potyviruses have no dedicated MP, which contrasts with the other viruses that have been investigated for intercellular movement. Past studies on sustained intercellular movement of some viruses have shown that viruses may use different trafficking pathways to move from one cell to another. Also in those studies, the assays that have been used to investigate virus intercellular movement cannot always differentiate between reduced viral RNA replication and intercellular movement. In this study by using a dual gene cassette construct encoding fluorescent proteins that can differentiate between primary infected cells from cells infected after intercellular transport we have designed a new tool to investigate the contribution of the transport machinery of the host cell in the intercellular movement of Turnip mosaic virus (TuMV).

In order to discriminate between agroinfiltrated primary infected cells from secondary infected cells and thus to assay viral intercellular movement, a gene cassette expressing GFP-HDEL was inserted adjacent to a TuMV infectious cassette expressing 6K<sub>2</sub>-mCherry both within the T-DNA borders of the binary vector pCambia. Since both gene cassettes were delivered into the same cell, primary infection foci were emitting both green and red fluorescence. Between day 4 and 6 after agroinfiltration, in addition to cells emitting both red and green fluorescence, cells emitting red fluorescence only were readily observed as a result of TuMV spreading from one cell to another. To determine if either the early secretory pathway, late secretory pathway, endocytosis or the cytoskeleton were important for TuMV intercellular movement, chemical and protein inhibitors that affect different stages of the host cell transport machinery were used. Treatment with Brefeldin A or Concanamycin A and expression of ARF1 or RAB-E1d dominant negative mutants drastically reduced cell-to-cell movement of the virus but did not hamper virus replication in primary infected cells. A pharmacological interference assay using Tyrphostin A23 and Wortmannin showed that endocytosis in TuMV intercellular movement was not important. Lack of co-localization with the FM4-64 and Ara7 (AtRabF2b) and TuMV-induced 6K<sub>2</sub>-tagged vesicles further indicated that these endocytic pathways are not important for TuMV local cellular spread. Microfilament, but not microtubule, depolymerising drugs also blocked intercellular movement of TuMV. Interestingly, virus-induced gene silencing showed that sustained movement relied on myosin XI-2, but not on myosin VIII and XI-F. We propose that intercellular TuMV movement requires a progressive viral complex maturation along the secretory pathway where post-Golgi trafficking and the actomyosin network are important for proper PD targeting and delivery into neighbouring cells.

# Table des matières

CONTRIBUTION DE LA CELLULE HÔTE LORS DU MOUVEMENT INTERCELLULAIRE DU VIRUS DE LA MOSAÏQUE DU NAVET.....	I
REMERCIEMENTS.....	II
RÉSUMÉ .....	III
ABSTRACT .....	V
TABLE DES MATIÈRES .....	VI
LISTE DES FIGURES.....	IX
LISTE DES TABLEAUX.....	X
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	XI
CHAPITRE 1 : INTRODUCTION.....	1
<b>Introduction générale .....</b>	<b>1</b>
<b>Hypothèse de recherche.....</b>	<b>4</b>
<b>Objectifs de recherche.....</b>	<b>4</b>
CHAPITRE 2 : REVUE DE LITTÉRATURE .....	6
<b>Les virus à ARN positif .....</b>	<b>6</b>
<b>Les potyvirus .....</b>	<b>7</b>
Généralités .....	7
Organisation génomique et stratégie d'expression .....	9

Structure génomique : les protéines virales .....	12
Cycle de réplication viral.....	14
<b>Mouvement du virus dans la plante.....</b>	<b>17</b>
Les plasmodesmes.....	17
Les protéines de mouvement : rôle, stratégies et mécanisme.....	20
Les virus qui ont besoin d'une seule protéine de mouvement pour assurer leur transport intercellulaire .....	22
Les virus nécessitant à la fois l'action d'une protéine de mouvement et d'une protéine auxiliaire (p. ex. la protéine de capsid CP) pour assurer leur mouvement intercellulaire.....	22
Les virus nécessitant trois protéines de mouvement codées par le Triple Gene Block.....	23
Les virus nécessitant plusieurs protéines de mouvement.....	25
Les virus formant des tubules .....	26
Complémentarité entre les MP .....	26
<b>Facteurs de l'hôte impliqués dans le mouvement intercellulaire des phytovirus à ARN positifs ....</b>	<b>27</b>
ÉTAT DES CONNAISSANCES SUR LE MOUVEMENT DU TUMV.....	29
CHAPITRE 3: CONTRIBUTION OF HOST INTRACELLULAR TRANSPORT MACHINERIES TO INTERCELLULAR MOVEMENT OF TURNIP MOSAIC VIRUS .....	31
<b>Résumé .....</b>	<b>32</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>33</b>
<b>AUTHORS' SUMMARY .....</b>	<b>34</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>35</b>
<b>RESULTS .....</b>	<b>38</b>
An <i>in vivo</i> quantitative assay for TuMV intercellular movement.....	38
Intercellular movement of TuMV requires both the early and late secretory pathways .....	39
Cell-to-cell transport of TuMV is independent of the endocytic pathway .....	40
Intercellular movement of TuMV depends on myosin XI-2 motors .....	41

<b>Discussion.....</b>	<b>63</b>
<b>Materials and Methods .....</b>	<b>66</b>
Fluorescent proteins and molecular clones .....	66
Protein expression in plants .....	66
FM4-64 staining .....	67
Inhibitor treatment.....	67
VIGS and Quantitative RT-PCR .....	67
Confocal microscopy .....	68
Statistical Analyses:.....	68
<b>ACKNOWLEDGMENTS.....</b>	<b>69</b>
CHAPITRE 4 : DISCUSSION GÉNÉRALE .....	70
<b>Mode de propagation du TuMV .....</b>	<b>70</b>
<b>Le TuMV et la machinerie de transport cellulaire.....</b>	<b>74</b>
CONCLUSION ET PERSPECTIVE. ....	80
<b>Autre publication .....</b>	<b>100</b>
IMPACT ON THE ENDOPLASMIC RETICULUM AND GOLGI APPARATUS OF TURNIP MOSAIC VIRUS INFECTION. ....	100



## Liste des figures

Figure 1 : Symptômes de l'infection par les potyvirus.....	8
Figure 2 : Particule virale d'un potyvirus.....	10
<b>Figure 3 : Organisation génomique et stratégie d'expression des potyvirus (Exemple du TuMV).....</b>	<b>11</b>
Figure 4 : Description schématique des principales étapes de la réplication des potyvirus.....	16
Figure 5 : Représentation simplifiée d'un plasmodesme (PD). .....	19
Figure 6 : Modèle conventionnel pour la propagation virale.....	72
Figure 7 : Modèle pour la propagation virale du TuMV .....	73
Figure 8 : Modèle hypothétique du mouvement intercellulaire du TuMV.....	79

## Liste des tableaux

Tableau 1 : Protéines de mouvements de différents virus .....	21
---	----

## Liste des abréviations

ABD2	Actin-Binding Domain 2
AMV	Virus de la mosaïque de la luzerne
ARF1	ADP-ribosylation factor 1
BFA	Brefeldin A
BMV	Virus de la mosaïque du brome
BSMV	Virus de la mosaïque striée de l'orge
BYV	Virus de la betterave jaune
CaLCuV	Cabbage leaf curl virus
CI	Cylindrical Inclusion protein
CMA	Concanamycin A
CMV	Virus de la mosaïque du concombre
CP	Protéine de capsid
CPm	Protéine de capsid mineure
CPMV	Virus de la mosaïque du niébé
CytD	cytochalasin D
DENV	Virus de la dengue
ER	Réticulum endoplasmique
ERES	Endoplasmic Reticulum Exit Sites
ERGIC	Endoplasmic Reticulum/Golgi Intermediate Compartment
GVFV	Virus du court-noué de la vigne
Hpi	Hours post infiltration
HC-Pro	Helper Component-Protease
INRS	Institut national de la recherche scientifique
JEV	Virus de l'encéphalite japonaise
LatB	latrunculin B
MNSV	Virus de la tache nécrotique de melon
MP	Protéines de mouvement
PABP	Poly(A)-binding protein
PCV	Virus du rabougrissement de l'arachide
PD	Plasmodesme
PDCB1	plasmodesmata callose binding 1
PDs	Plasmodesmes
PDLP1	Plasmodesmata Located Protein 1
PMTV	Virus des pommes de terre à sommet touffu
PMV	Virus de la mosaïque de la papaye
PPV	Virus de la sharka
PSbMV	Pea seed-borne mosaic virus
PVX	Virus X de la pomme de terre

PYMV	Virus de la mosaïque jaune de la pomme de terre
RdRp	RNA-dependent RNA polymerase
RTG	Réseau trans-golgien
SEL	Taille d'exclusion limite
SF-I	Superfamille I
SRAS	Syndrome respiratoire aigu sévère
ssARN	ARN simple brin
SYTA	Synaptotagmin
TEV	Virus de la gravure du tabac
TGB	Tripe Gene Block
TGBp3	Triple gene block 3
TGN	Trans-Golgi Network
TMV	Virus de la mosaïque du tabac
TuMV	Virus de la mosaïque du navet
TVCV	Virus de la veine de compensation du navet
TVMV	Virus de la marbrure nervaire du tabac
TyMV	Virus de la mosaïque du navet jaune
VIGS	Virus-induced gene silencing
VPg	Viral Protein genome-linked
VRCs	Viral replication complexes
WCIMV	Virus de la mosaïque du trèfle blanc

# Chapitre 1 : introduction

## Introduction générale

Les bactéries, les champignons, les nématodes et les virus représentent les grands groupes de pathogènes de plantes. Parmi eux, les virus sont les seuls à vivre exclusivement dans le cytoplasme de leur cellule hôte. Ce sont des parasites intracellulaires obligatoires. Les virus à ARN positif sont les plus répandus, aussi bien dans le règne animal que le règne végétal. Dans ce grand groupe, on retrouve le genre des *Potyvirus*. C'est le genre qui contient le plus grand groupe de phytovirus. Il fait partie de la famille des *Potyviridae* qui représente 30 % des virus de plantes connues (182). Les *Potyvirus* sont répandus dans le monde entier, infectent plus de 30 familles de plantes, et occasionnent de ce fait même les plus grosses pertes économiques en agriculture et en horticulture (182, 240). Le virus de la mosaïque du navet (TuMV) fait partie de ce genre. Selon le ministère de l'Agriculture, de l'Alimentation et des Affaires rurales de l'Ontario, le TuMV cause chaque année d'énormes pertes de récolte dans la province. La maladie causée par le TuMV est devenue un problème au début des années 1950, et la propagation virale a été particulièrement importante dans les régions de Guelph et de Bradford au cours des années 1960. En 1971, l'infection atteint des niveaux élevés dans les principales régions de production au sud-ouest de la province et depuis quelques années, cette maladie cause des pertes de récolte majeures dans tout l'Ontario, les plus importantes dans les comtés de Huron et Middlesex. Malgré la forte prévalence des *Potyvirus*, et leur important impact économique, nous ne savons que très peu de choses sur leur cycle de réplication. L'organisation génomique et la stratégie de réplication des *Potyvirus* sont semblables à celles de la famille des *Picornaviridae* qui elle affecte le règne animal. Le matériel génétique des virus est très limité et certains facteurs de l'hôte leurs sont indispensables afin de compléter leur cycle de réplication et ainsi assurer l'infection de ce dernier. Cela fait déjà quelque temps que la séquence génomique du TuMV est connue (98, 148) et qu'un clone infectieux de ce dernier est disponible (191). Ces outils font du TuMV un excellent modèle pour l'étude de l'interaction entre le virus et sa cellule hôte lors de l'infection. Plusieurs protéines au cœur de l'interaction entre la cellule hôte et le virus ont déjà été identifiées (27, 115). Dans le cas des *Potyvirus*, ces interactions ont été mises en évidence en association avec des membranes intracellulaires faisant office de complexes de réplication (200). Dans ces complexes de réplication, encore

appelés vésicules, on retrouve de l'ARN viral, la réplicase RNA-dépendent RNA polymérase (RdRp) (56), les facteurs eucaryotes d'initiation de la traduction eIF(iso)4E (19) et eIF4G (gao164), les protéines Poly(A)-binding protein (PABP) (20) et Hsc-70 (56) et des facteurs d'élongation eEF1A (223). En plus d'être le site de synthèse de l'ARN viral, ces vésicules sont mobiles et interagissent avec le cytosquelette de la cellule (45). Cependant, les différents protagonistes de l'un des aspects les plus importants du cycle d'infection des potyvirus soit le mouvement intercellulaire sont peu connus.

Pour établir l'infection systémique de la plante, les virus de plantes doivent traverser la paroi cellulaire qui sépare la cellule infectée des cellules voisines non infectées. Pour la plupart de ces virus, ce mouvement de cellule à cellule se fait par l'entremise d'un organite spécialisé unique au monde végétal : le plasmodesme (PD) (136). Les PDs sont des micro-canaux qui traversent la paroi cellulaire et permettent une continuité cytoplasmique et endomembranaire entre cellules voisines (132, 136). Ils régulent le transport micromoléculaire et macromoléculaire (252) de manière assez sélective grâce à leur taille d'exclusion limite (SEL). Cette limitation de taille empêche toute entité virale de diffuser librement à travers ces derniers. Pour pallier à cela, les virus possèdent des gènes codant pour des protéines de mouvement (MP). Ces MP, suite à des interactions avec des protéines de la cellule hôte, vont modifier la SEL des PDs et permettre le passage de l'entité virale d'une cellule à une autre (27, 35, 199, 230). Basé sur les caractéristiques de leur transport intracellulaire, les virus de plantes peuvent être classés en plusieurs groupes. Le premier groupe comprend les tobamovirus. Les virus de ce groupe possèdent une seule protéine de mouvement qui va permettre le passage du virion ou du génome viral à travers les PDs modifiés (106). Le deuxième groupe comprend de nombreux virus de plantes qui ont une particule icosaédrique, et exige l'action combinée de la protéine de mouvement et de la protéine d'enveloppe (CP) pour former une structure tubulaire au niveau des PDs à travers laquelle le virion va pouvoir se déplacer (117). Le troisième groupe comprend plusieurs virus aux particules filamenteuses, telles que les potexvirus, qui contiennent un ensemble de trois gènes appelé le triple gene block responsable du mouvement. Ces gènes codent pour des protéines qui vont fonctionner de manière coordonnée, mais sans former de structure tubulaire, pour transporter des particules virales ou des génomes viraux via les Pds (125, 234).

Les MP utilisent différentes stratégies pour rejoindre les PDs et induire ainsi le mouvement intercellulaire viral. Ces stratégies sont diverses, mais reposent toutes sur la machinerie de

transport cellulaire. Ainsi, selon différentes études, le mouvement du virus de la mosaïque du tabac (TMV) nécessite l'action des microfilaments d'actine (106, 126, 251), des myosines (83) des microtubules (30, 31, 83, 106, 126, 155, 251), et aussi l'implication de la voie endocytaire (123).

La participation des microfilaments lors du mouvement intercellulaire viral a été montrée pour beaucoup de phytovirus indépendamment de leur genre ou de la famille à laquelle ils appartiennent (45, 47, 67, 82, 117, 168, 253). Par exemple, alors que le mouvement intercellulaire du TMV dépend du cytosquelette (149, 155, 199), celui du tobamovirus de la veine de compensation du navet (TVCV) qui lui est apparenté ne dépend ni des microtubules ni des microfilaments (84). Dans le même ordre d'idée, la voie de sécrétion précoce est exploitée par bon nombre de phytovirus afin de se déplacer à l'intérieur de la cellule hôte et pour permettre à leurs MP de rejoindre les PDs et de se déplacer entre les cellules (7, 47, 67, 74, 117, 247, 254). Cependant, ceci n'est pas une généralité. Par exemple la localisation au niveau des PDs de la MP du virus de la mosaïque du niébé (CPMV), et celle de la protéine triple gene block 3 (TGBp3) du virus semi-latent du poa n'est aucunement affectée par la perturbation du cytosquelette et de la voie de sécrétion précoce (166, 198). Pour ce qui est de l'endocytose, son implication a récemment été mise en évidence pour le Potato mop-top virus (PMTV) dont les MP TGB2 et TGB3 sont recrutées dans des endosomes marqués au FM4-64 desquels elles peuvent se rendre soit aux PDs, soit vers la vacuole (87). De plus, il a été montré que l'inhibition de la synaptotagmin (SYTA), qui est un régulateur de l'endocytose, inhibe le mouvement intercellulaire du *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) et du TMV (123). Dans le cas du TuMV, aucune protéine n'a été spécifiquement identifiée comme MP, mais plusieurs sont mis à contribution lors du mouvement du virus (35, 188, 232, 248). Cependant, les processus moléculaires et cellulaires impliqués dans ce mouvement restent à déterminer.

Grâce au développement de nouvelles technologies qui permettent l'expression rapide et simple des protéines dans les plantes (agroinfiltration), leur visualisation et suivie dans les cellules (protéines autofluorescentes et microscopie confocale), et des outils de génétique inverse, nous sommes maintenant en mesure de clarifier les différents processus menant au mouvement intercellulaire du TuMV.

Dans cette étude, nous avons pour but de déterminer les différents acteurs de la machinerie de transport cellulaire impliqués dans le mouvement intercellulaire de TuMV.

Ce projet fait avancer la recherche pour la lutte contre le TuMV en apportant des renseignements importants pour la compréhension de la pathogenèse virale et sur le fonctionnement de différents processus cellulaires.

## **Hypothèse de recherche**

Le cytosquelette et les myosines sont des éléments essentiels du trafic des organites dans les cellules végétales (220). Ils font partie de la machinerie de transport cellulaire qui comprend aussi le système de sécrétion et la voie endocyttaire. Cette machinerie de transport est impliquée dans le mouvement de nombreux virus (7, 47, 67, 83, 87, 117, 123, 198, 238), avec cependant plusieurs exceptions notables. Il est alors impossible d'établir une corrélation entre le type de facteur cellulaire impliqué dans le mouvement intercellulaire d'un virus et sa classification. Le choix d'une composante particulière étant propre à chaque virus, notre principale hypothèse de recherche est que le TuMV détourne à son profit certaines des composantes de la machinerie de transport pour assurer son mouvement intercellulaire et établir l'infection systémique de la plante.

De manière plus spécifique, ce mémoire est basé sur les hypothèses suivantes :

- Le TuMV interagit avec le cytosquelette de la plante.
- Le système sécrétoire de la plante et la voie endocyttaire sont mis à contribution lors du mouvement intercellulaire du TuMV.

## **Objectifs de recherche**

L'objectif principal de ce projet était de savoir quels étaient les différents acteurs de la machinerie de transport cellulaire impliquée dans le mouvement intercellulaire du TuMV. Pour atteindre cet objectif global, les objectifs spécifiques suivants ont été formulés :

1. Produire un clone du TuMV permettant de le suivre lors de son passage de cellule en cellule au microscope confocal.
2. Utiliser des inhibiteurs chimiques, des mutants dominants négatifs et l'ARN interférence, afin de déterminer l'implication du cytosquelette, du système



sécrétoire, et de la voie endocytaire de la plante lors du mouvement intercellulaire du TuMV.

## Chapitre 2 : revue de littérature

### Les virus à ARN positif

Il existe sept différentes classes de virus qui infectent les cellules eucaryotes. De ces différentes classes, les virus à ARN positif sont les plus nombreux. On y retrouve de nombreux virus affectant gravement la santé humaine tel que le virus de la dengue (DENV), le virus de l'encéphalite japonaise (JEV), ou encore le coronavirus responsable du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS). On y retrouve aussi un grand nombre de phytovirus très importants sur le plan économique. Nous pouvons citer en exemple le virus de la mosaïque du tabac (TMV), le virus de la mosaïque jaune de la pomme de terre (PYMV), et le virus de la mosaïque du navet (TuMV).

Ce type de virus se caractérise par un génome de petite taille allant de 3,5 kb pour les bactériophages à 30 kb pour les coronavirus(34) . Les virus à ARN positif sont les plus répandus autant dans le règne animal que dans le règne végétal. Et d'ailleurs, la majorité des phytovirus connue ont un ARN de polarité positive. Leur génome les démarque des autres virus par le fait qu'il est directement infectieux. La polarité positive de l'ARN génomique de ces virus fait qu'ils sont reconnus comme des ARNs messagers (ARNm). Suite à son entrée dans la cellule de son hôte et sa décapsidation, l'ARN viral est alors immédiatement traduit par la machinerie cellulaire.

Bien qu'il existe une grande disparité dans la régulation de l'expression de leur génome et dans leur mode de réplication, on peut quand même les classer en 2 groupes différents (34). Le premier groupe comprend les virus dont la traduction se fait de manière séquentielle. Suite à la traduction précoce d'une partie de leur génome, ces virus produisent des ARNm sous-génomiques. Le reste de leur génome est traduit de façon tardive. C'est un mode de réplication qui permet l'expression de protéines précoces et tardives. C'est le cas des togavirus. Le second groupe comprend les virus qui produisent une polyprotéine qui sous l'action des protéases virales va donner des polypeptides matures et leurs précurseurs. Ici, la notion de protéines précoces et tardives ne s'applique pas. C'est le cas des potyvirus.

# Les potyvirus

## Généralités

Le genre Potyvirus appartient à la famille des *Potyviridae* (9). Dans cette famille on retrouve aussi les genres Brambyvirus (Blackberry virus Y), Ipomovirus (Sweet potato mild mottle virus), Macluravirus (Maclura mosaic virus), Rymovirus (Ryegrass mosaic virus), Tritimovirus (Wheat streak mosaic virus), et Bymovirus (Barley yellow mosaic virus) (9).

Le genre potyvirus est le plus important chez les virus de plante. À lui seul il représente environ 30 % des phytovirus connus (182). Le virus de la mosaïque du navet (TuMV) fait partie de ce genre. Les potyvirus sont répartis sur tous les continents, et leur impact sur l'économie ne cesse de grandir. Le TuMV infecte un large spectre d'hôtes, principalement les plantes de la famille des Brassicacées (canola, choux, moutarde, rutabaga, navet, etc.) et induisent une variété de symptômes.

Dans le cas du TuMV, les différents symptômes observables suite à l'infection sont des taches chlorotiques, la présence d'anneaux nécrotiques sur les feuilles, la déformation des feuilles, et un retard de croissance (99) (figure 1). La transmission du virus se fait de manière non persistante par des insectes piqueurs de la famille des aphidés (9) comme les pucerons, mais selon Riechmann et al (182), les mouches et les mites sont aussi des vecteurs potentiels. Dans certains cas comme celui du Pea seed-borne mosaic virus (PSbMV), la transmission du virus peut aussi se faire par la graine.

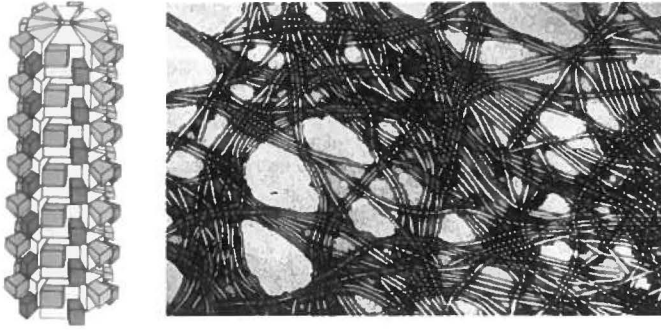


**Figure 1 : Symptômes de l'infection par les potyvirus.**

De gauche à droite les images montrent le retard de croissance d'un plant de *N.benthamiana* infecté par le TuMV, des taches nécrotiques sur un chou blanc infecté par le TuMV, des taches chlorotiques, anneaux nécrotiques et déformation des feuilles causé par le virus de la sharka.

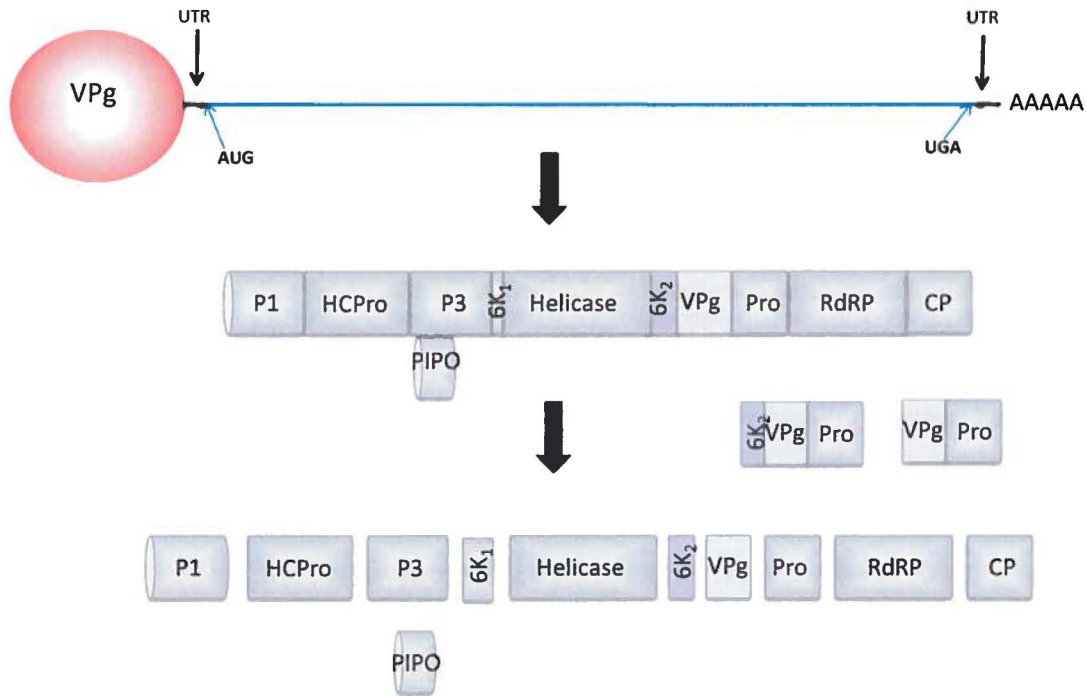
## **Organisation génomique et stratégie d'expression**

La particule virale des potyvirus est cylindrique, non enveloppée, filamenteuse et flexible. Sa longueur varie de 680 à 900 nm et sa largeur de 11 à 13 nm (9) (figure 2). Elle est composée à 95 % de la protéine de capsid (CP) et de 5 % de génome. Le génome viral est un ARN de polarité positif d'environ 9,7 kb, protégé par une capsid formée par la CP. L'extrémité 5' de l'ARN est liée de façon covalente à la protéine virale VPg (202), et on retrouve une queue polyadénylée à son extrémité 3'. Ne possédant qu'un seul cadre ouvert de lecture, l'ARN va être traduit en une seule polyprotéine de 358 kDa (148) qui sera clivée en 10 protéines matures suite à l'action de trois différentes protéases virales (figure 3).



**Figure 2 : Particule virale d'un potyvirus**

L'image de gauche est la représentation schématique de la particule d'un potyvirus (de Shukla and Ward (1989), *Adv.Virus Res.*, 36,273-314). L'image de droite est une photo de microscopie électronique de la particule virale du TuMV coloré avec du méthylamine tungstate (de Walsh and Jenner, (2002), *Molecular plant Pathology Journal*).



**Figure 3 : Organisation génomique et stratégie d'expression des potyvirus (Exemple du TuMV).**

La ligne horizontale symbolise l'ARN viral lié en 5' de façon covalente à la protéine VPg et polyadénilé en 3'. L'ARN viral est traduit en une polyprotéine. La polyprotéine est ensuite clivée par les protéases virales P1, HC-Pro et VPg-Pro au cours de la traduction. Ce clivage donnera au final 10 protéines matures en passant par les 2 précurseurs, 6K<sub>2</sub>-VPg-Pro et VPg-Pro.

## Structure génomique : les protéines virales

Comme le montre la figure 3, de son extrémité N-terminale à son extrémité C-terminale, la polyprotéine est composée des protéines virales suivantes : P1, la protéase HC-Pro (Helper Component-Protease), P3, 6K<sub>1</sub>, l'hélicase CI (Cylindrical Inclusion protein), 6K<sub>2</sub>, VPg (Viral Protein genome-linked), Pro (protéase résultant du précurseur VPg-Pro), la RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) et CP (248).

P1 est une sérine protéase, dont le site de clivage se trouve entre elle-même (P1) et HC-Pro (182). Le gène codant pour la protéine P1 est très variable et c'est l'une des protéines les moins conservées parmi les potyvirus. Seuls quelques acides aminés se trouvant dans la partie C-terminale de P1 sont bien conservés. Ces acides aminés sont très importants et correspondent à la partie catalytique de la protéine qui est constituée par le trio histidine, asparagine et sérine (236). La substitution d'un seul de ces acides aminés rend le virus inactif (231). Outre sa fonction protéase, diverses propriétés lui sont attribuées. Notamment la capacité de se lier au matériel génétique (187, 207) et une action lors des mouvements intercellulaire et systémique du virus (187).

La protéine HC-Pro est multifonctionnelle (133). Elle possède une activité auto-protéolytique. Son domaine catalytique est du type cystéine-protéase (151). Elle s'auto-clive en son extrémité C-terminale avant la protéine P3 au niveau des résidus Gly-Gly (9). HC-Pro est un régulateur de la transmission vectorielle. Dans sa partie N-terminale se trouve une séquence hautement conservée parmi les potyvirus (KITC) qui permet la liaison du virus au stylet des aphides et de ce fait même sa transmission (25). HC-Pro est aussi impliquée lors du processus d'amplification du génome viral, et lors du mouvement intercellulaire du virus (104) et elle modifie la taille des PDs pour faciliter le passage de l'ARN viral d'une cellule infectée à une autre (188). Une autre des nombreuses fonctions de HC-Pro est l'inhibition du gene-silencing (6) qui est considéré comme le mécanisme naturel de défense de la plante. Cette inhibition du gene-silencing est directement reliée au développement des symptômes et la synergie résultant de l'infection par deux potyvirus (171, 201).

P3 est la protéine la moins conservée et la moins caractérisée. P3 semble être impliquée dans différentes étapes du cycle de réplication des potyvirus, soit la réplication, l'accumulation et le mouvement systémique. En effet lors des premières étapes de l'infection par le virus de la marbrure nervaire du tabac (TVMV), P3 est localisée dans le cytoplasme, associée à la protéine



d'inclusion cytoplasmique CI (hélicase) (185). Les mutants d'insertion du TVMV dans le gène codant pour la protéine P3 sont incapables de se répliquer autant dans les plantes que dans les protoplastes (110). Chez le virus de la gravure du tabac (TEV), P3 est localisé dans le noyau en association avec la protéase NIa (VPg-Pro). Ces observations ont permis de dire que P3 est importante lors de la réplication du virus. Une étude sur le TuMV a aussi montré que la région codante pour la protéine P3 est impliquée dans l'accumulation du virus et dans le mouvement de ce dernier menant à l'infection systémique de la plante (214). P3 semble aussi être à l'origine du pouvoir pathogène du virus, car une délétion du site de clivage entre 6K<sub>1</sub> et P3 chez le virus de la sharka (PPV) permet l'infection virale, mais une absence totale de symptômes (181).

L'hélicase CI possède une activité ATPase (231). Elle s'accumule dans des corps d'inclusions au sein du cytoplasme des cellules infectées (9). CI peut se lier à des nucléotides et à l'ARN. Lors de l'infection par un potyvirus, CI est localisée au niveau des PDs et forment des structures coniques qui traversent la paroi intercellulaire (184, 185, 248). Donc en plus d'être requise pour la réplication, il a été suggéré que CI interagit directement avec les PDs, et la protéine CP pour faciliter le transport du complexe ribonucléoprotéique d'une cellule infectée à une cellule voisine non infectée (35).

La protéine 6K<sub>2</sub> ne possède aucune activité enzymatique connue. C'est une protéine transmembranaire qui s'associe aux membranes grâce aux 19 acides aminés constituant son domaine hydrophobe (197). Ses formes précurseur sont 6K<sub>2</sub>-VPg et 6K<sub>2</sub>-VPg-Pro. 6K<sub>2</sub> est impliquée dans la formation des vésicules cytoplasmiques (complexe de réplication) au niveau du ER en étant le point d'ancrage de la protéine 6K<sub>2</sub>-VPg-Pro (19).

La protéine VPg-Pro est composée de deux domaines séparés par un site interne de clivage. Le domaine VPg en N-terminal et le domaine Pro en C-terminal. VPg-Pro possède une activité protéase majeure qui provient du domaine Pro. Elle est responsable du clivage de la plupart des sites présents dans la polyprotéine virale. De manière plus spécifique, la protéase reconnaît les sites Gln/Glu-(Ser/Gly/Ala) (9). Chez certains potyvirus, la protéine VPg-Pro s'accumule dans des corps d'inclusion nucléaire (79, 179). Sa localisation dans le noyau est dû à un signal de localisation nucléaire situé dans son domaine VPg (196). Ceci lui vaut l'appellation NIa pour Nuclear Inclusion a.

La protéine VPg est liée de façon covalente en 5' au génome viral via un résidu tyrosine hautement conservé (182). Elle appartient à une classe de protéines dites intrinsèquement désordonnées. Ces protéines ont la capacité de se lier à plusieurs protéines différentes (100).

VPg interagit avec plusieurs protéines virales et cellulaires essentielles pour la réplication et la transcription. Elle interagit aussi avec l'un des isoformes du facteur d'initiation de la traduction eIF4E. Dû à ses nombreux partenaires protéiques, c'est une protéine incontournable qui joue de multiples rôles lors du cycle de réplication viral.

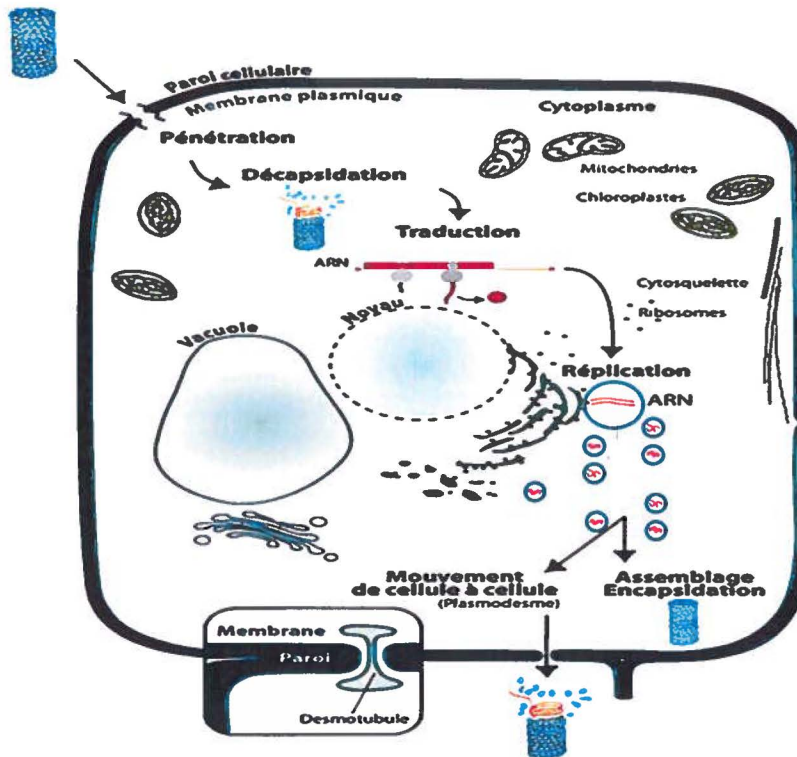
L'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) encore appelée Nib (Nuclear Inclusion b) comme son nom l'indique est la polymérase des potyvirus. La réplication se déroule dans le cytoplasme, mais la protéine RdRp s'accumule aussi dans le noyau, car elle possède deux signaux de localisation nucléaire (124) mais son rôle dans le noyau n'est pas connu.

La protéine de capsid (CP) dont la principale fonction est d'induire l'encapsidation du génome viral est aussi impliquée dans la transmission par les aphidés (15), la régulation de l'amplification de l'ARN viral (231) et le mouvement intercellulaire viral (188).

### **Cycle de réplication viral**

Le cycle cellulaire des potyvirus comme celui de la plupart des phytovirus à ARN positif [ARN (+)] se déroule dans le cytoplasme. Il se divise en plusieurs étapes distinctes qui sont : l'entrée, la traduction initiale, l'assemblage du complexe de réplication, la réplication et la traduction, l'assemblage du virion et le mouvement (intercellulaire et systémique) (Figure 4). L'entrée du virus dans le cytoplasme de la cellule infectée se fait de manière mécanique sous l'action d'un organisme tiers, soit un vecteur (aphide dans le cas du TuMV). Suite à son entrée, le virus va être décapsidé par des enzymes cellulaires et va libérer son matériel génétique (ARN(+)). L'ARN(+) viral servant directement d'ARN messenger, il va être traduit en une polyprotéine qui va être clivée pour donner toutes les protéines virales nécessaires à la multiplication du génome et à la poursuite de l'infection. Le cycle viral est ensuite marqué par la constitution d'un complexe de réplication dans lequel sera mis en place une stratégie d'amplification du génome viral via la synthèse de brins d'ARN à polarité négative (ARN(-)) dans un premier temps puis de brins d'ARN à polarité positive. En effet le brin d'ARN de polarité négative sert de matrice pour la production d'un grand nombre d'ARN(+). La réplication virale étant asymétrique, pour une molécule d'ARN(-) il y aurait environ 40 à 70 molécules d'ARN(+) de produites. Par la suite de nouvelles particules virales sont assemblées, et vont transiter de cellule en cellule via les PDs pour établir l'infection systémique de la plante.

Toutes ces étapes du cycle de réplication des virus ARN(+) de l'entrée au mouvement intercellulaire nécessitent la participation de différents facteurs de l'hôte (1, 27, 80, 145, 222, 223, 237, 241).



Adapté du cours d'initiation à la virologie de l'Université Catholique de Louvain par Bragard, Goubau, Mahillon, Michiels, AFD, IPM .

**Figure 4 : Description schématique des principales étapes de la réplique des potyvirus.**

Le virus entre dans la cellule suite à une transmission mécanique. Dès son entrée, il va subir la décapsidation par les enzymes cellulaires ce qui libèrera son matériel génétique (ARN(+)). L'ARN (+) ainsi libéré est traduit en une polyprotéine qui va être clivée pour donner toutes les protéines virales nécessaires à la multiplication du génome et à la poursuite de l'infection. Ces protéines vont alors permettre la formation d'un complexe de réplique dans lequel le génome viral sera amplifié. Dans ce complexe de réplique il y'a synthèse d'un brin d'ARN à polarité négative (ARN(-)) qui va servir de matrice pour la production d'un grand nombre d'ARN(+). De nouvelles particules virales sont ensuite assemblées, et vont transiter de cellule en cellule via les PDs pour établir l'infection systémique de la plante.

## **Mouvement du virus dans la plante**

Le mouvement du virus dans la plante représente l'ensemble des processus de propagation du virus ou de son matériel génétique à partir des cellules initialement infectées au reste de la plante. Il est séparé en trois étapes distinctes : le mouvement intracellulaire, le mouvement intercellulaire, et le mouvement systémique (33).

Le mouvement intracellulaire est défini comme étant l'ensemble des processus nécessaires au virus pour rejoindre la périphérie de la cellule afin de délivrer son génome aux PDs (33). Lors de ce mouvement, les facteurs de l'hôte et les protéines virales travaillent de concert et sont recyclés de façon continue afin d'assurer le transport de l'entité virale vers la périphérie. Le mouvement intercellulaire fait suite au mouvement intracellulaire, et c'est le passage du virus à travers les PDs d'une cellule infectée à une cellule voisine. Et finalement, le mouvement systémique représente le passage du virus des cellules initiales au système vasculaire de la plante.

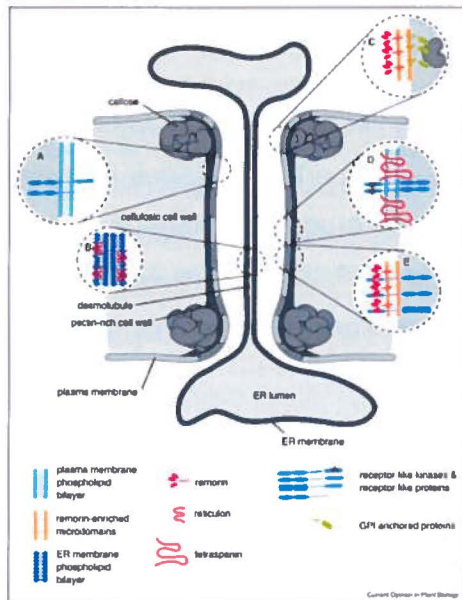
### **Les plasmodesmes**

Organite intercellulaire unique au monde végétal, les plasmodesmes (PDs) sont des canaux traversant les parois cellulaires des plantes. Ils permettent la communication directe entre cellules adjacentes, en reliant le cytoplasme, le ER, et la membrane plasmique de deux cellules voisines (136, 137). Le diamètre des PDs est d'environ 30 à 60 nm, ils s'étendent à travers la paroi cellulaire et contiennent en leur centre une structure dérivée du réticulum endoplasmique (le desmotubule), plusieurs microdomaines enrichis de protéines, de la callose, et des microfilaments (figure 5) (38, 85, 137, 138). La densité des PDs varie selon le type de cellules et de plantes auxquels ils appartiennent. La taille du canal par lequel passent les différentes molécules est hautement régulée. La taille maximale d'une molécule capable de diffuser à travers leur canal se situe entre 800 et 1000 Da, ce qui définit la taille limite d'exclusion (SEL) des PDs (97, 138). Cette SEL n'est pas statique. Dans certaines circonstances le canal est maintenu fermé, et dans d'autre il est suffisamment dilaté pour laisser passer des molécules de taille supérieures à 10 000 Da.

Plusieurs facteurs biotiques et abiotiques affectent la perméabilité des PDs. Parmi ces facteurs se trouvent la concentration de calcium ( $Ca^{2+}$ ), le cycle métabolique du callose, le stade

d'oxydo-réduction des mitochondries et des plastides et l'infection par un pathogène. Une augmentation du  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique inhibe de façon réversible le déplacement des molécules à travers ces structures (91). Un dépôt de callose par la callose synthase au niveau de la membrane plasmique entraîne la fermeture des PDs alors que la dégradation du callose par le  $\beta$ -1,3 glucanase encré au glycosylphosphatidylinositol extracellulaire entraîne l'ouverture des PDs (77, 96, 122). Et contrairement à l'oxydation des plastides, l'oxydation des mitochondries favorise l'ouverture des PDs (22, 211, 212).

La taille d'une particule virale ou d'un génome virale est généralement 3 à 4 fois supérieure à la limite de diffusion normale des PDs (138). Pour pouvoir les traverser, les virus codent pour des protéines qui tout comme les facteurs cités ci-dessus vont modifier la SEL des PDs. Ces protéines sont appelées protéines de mouvement (MP) (27, 35, 130, 230).



Maule et al. 2011

**Figure 5 : Représentation simplifiée d'un plasmodesme (PD).**

Ce schéma montre les différents domaines structuraux d'un PD. La paroi cellulaire (cellulose et riche en pectine), la membrane plasmique, et le desmotubule. En plus de la membrane plasmique et du réticulum endoplasmique, le PD est aussi composé de callose et de microdomaines enrichis de protéines. Le microdomaine enrichi de remorin est concentré en protéines à encre GPI, et tout comme le microdomaine enrichi de tetraspanine il sert de plate-forme pour les récepteurs de type kinases.

## **Les protéines de mouvement : rôle, stratégies et mécanisme**

La première évidence de l'existence de protéines capables de réguler les processus menant au mouvement d'un virus est survenue suite à différentes études portant sur des mutants thermosensibles du virus de la mosaïque du tabac (TMV). Ces études ont montré que le génome du TMV code pour une protéine non structurale de 30 kDa impliquée dans le mouvement de ce dernier (11, 49, 94). Par la suite différentes protéines de mouvement ont été mises en évidence autant pour les virus ARN que pour les virus ADN (36, 130, 138) (tableau 1). À ce jour, aucune similarité de séquence n'a été mise en évidence parmi ces protéines. Bien qu'elles aient toutes pour but de conduire à la propagation virale il a été montré que selon le virus auquel elles appartiennent, ces protéines ont chacune différentes particularités fonctionnelles. Par exemple, alors que certaines protéines de mouvement vont transporter l'entité virale sous forme de virions, d'autres telle que la protéine 30K du TMV vont la transporter sous forme de complexe ribonucléoprotéique (36, 68, 69, 120, 130). Outre cela, pour certains virus, l'action d'une seule protéine de mouvement est suffisante pour assurer leur transport alors que pour d'autres ce transport ne peut se faire que sous l'action combinée de plusieurs protéines de mouvement.



Groupe	Genre	Virus	MP(s)	Autre protéine virale impliquée dans le mouvement
I	Tobamovirus	TMV	30 KDa	-----
	Dianthovirus	RCNMV	35 KDa	-----
	Umbravirus	GRV	ORF4	-----
II	Bromovirus	CCMV	3a	
		BMV	3a	CP
	Cucumovirus	CMV	3a	CP
III	Begomovirus	BDMV/SLCV	BC1	BV1
IV	Potyvirus	TEV/BCMNL/MV	HC-Pro + CP	CI
	Hordei-like viruses	BSMV	TGBp1	TGBp2 + TGBp3
V	Potex-like viruses	PVX/WCIMV	TGBp1	TGBp2 + TGBp3 + CP

Tableau 1 : Protéines de mouvements de différents virus

***Les virus qui ont besoin d'une seule protéine de mouvement pour assurer leur transport intercellulaire***

Les umbravirus (218), les dianthrivirus (65) et le TMV pour ne citer que ceux-là, font partie de ce type de virus. Leurs protéines de mouvement ont toutes les mêmes propriétés à quelques différences près. Nous allons alors décrire la protéine virale 30K responsable du mouvement intercellulaire du TMV (49). La protéine 30K est capable de se lier à l'ARN de manière non spécifique grâce à ses deux domaines situés entre les résidus 112-185 et 186-268 (42, 43). Elle est associée au cytosquelette (141), et comme toutes les protéines de mouvement, la protéine 30K augmente la SEL des PDs (250). Elle est phosphorylée in vivo (243) et il a été suggéré qu'elle existe sous deux formes au niveau des PDs. Une forme active qui augmente de façon transitoire la SEL des PDs lors des étapes précoces de l'infection, et une forme inactive qui reste localisée aux PDs mais qui n'affecte plus leur taille (217). La phosphorylation de la MP lors du passage à travers les PDs a pour rôle d'inhiber l'action de la MP sur la SEL des PDs et de déstabiliser le complexe RNP viral permettant ainsi la libération de l'ARN et la suite du processus infectieux (217). Le résultat du complexe RNP formé de la protéine 30K et de l'ARN est une structure très fine dont la taille varie entre 2 et 3 nm observable autant par la microscopie électronique (43) que par la microscopie à force atomique (108). La taille des PDs dilatées se situant entre 3 et 4 nm (131), il semblerait donc que dans le cas des virus nécessitant une seule protéine de mouvement tel que le TMV, c'est le complexe RNP qui traverse les PDs lors du mouvement du virus. De plus, le mouvement de ces virus est indépendant de la protéine CP (48, 217), ce qui écarte la possibilité de se déplacer sous forme de virion.

***Les virus nécessitant à la fois l'action d'une protéine de mouvement et d'une protéine auxiliaire (p. ex. la protéine de capsid CP) pour assurer leur mouvement intercellulaire.***

Pour pouvoir se déplacer d'une cellule à l'autre, certains virus ont non seulement besoin de leur protéine de mouvement, mais aussi de la protéine de capsid CP. Bien qu'il semble évident que le rôle de la CP lors du mouvement consiste en la formation du virion comme c'est le cas pour les comovirus, dans d'autres cas elle a une toute autre fonctionnalité. Lors du mouvement intercellulaire du virus de la mosaïque du concombre (CMV) la MP 3a et la protéine CP

travaillent de concert pour former un complexe RNP capable de traverser les PDs (103). La CP du CMV va interagir avec la partie C-terminale de la protéine 3a, pour modifier sa conformation et augmenter son affinité de liaison à l'ARN (8, 107, 156, 189). Cette modification conformationnelle a aussi été notée dans le cas du virus de la mosaïque de la luzerne (AMV) (190) et du virus de la mosaïque du brome (BMV) (217).

### ***Les virus nécessitant trois protéines de mouvement codées par le Triple Gene Block***

Le Triple Gene Block (TGB) est un groupe de gènes ayant trois cadres de lecture ouverts se chevauchant partiellement. Ces gènes codent pour trois protéines de mouvement nommées en fonction de leurs positions génique TGB1, TGB2 et TGB3 (144). L'observation de séquences virales a permis de noter la présence de ce groupe de gènes parmi 8 différents genres de virus : les Potexvirus, Carlavirus, Alexivirus, Foveavirus, Hordeivirus, Benyvirus et les Pecluvirus (144). La disposition des cistrons des gènes composant le TGB est bien conservée parmi ces virus, cependant la position du TGB proprement dit varie considérablement dans le génome des virus de différents genres (144). Bien que la position du TGB soit variable dans les génomes viraux, en comparant leurs structures primaires, leurs organisations génomiques et leurs propriétés biologiques, on peut classer les virus possédant ce gène en deux grands groupes : les virus de type Hordei (hordei-like viruses) et les virus de type Potex (potex-like-viruses).

Le groupe Hordei comprend les virus en forme de tige avec un génome ARN simple brin (ssARN) segmenté. On peut citer les genres Hordeivirus, Benyvirus, Pomovirus, et Pecluvirus (144). Quant au groupe Potex, il comprend les virus filamenteux ayant un génome ssARN monopartite. On peut citer les genres Potexvirus, Carlavirus, Foveavirus, et Alexivirus (144). Quel que soit le groupe auquel elle appartient, la protéine TGB1 contient un domaine NTPase/hélicase. Ce domaine contient 7 motifs conservés des hélicases de la superfamille I (SF-I) et est semblable aux hélicases impliquées dans la réplication des virus de type alpha (71, 72, 113). La protéine TGB1 possède alors une activité NTPase et une activité hélicase dépendante de l'ATP (144). En plus de son domaine NTPase/hélicase, la protéine TGB1 des virus du groupe Hordei contient un domaine de masse variable à son extrémité N-terminale (144).

Les deux autres protéines TGB2 et TGB3 possèdent un domaine transmembranaire hydrophobe. Ce domaine a été prédit comme étant le domaine d'interaction de la protéine avec la membrane (142-144). Considérant son organisation moléculaire il est à noter que TGB2 est la protéine la mieux conservée parmi les protéines TGB des différents virus (143, 204, 205). Différentes analyses de mutants de clones infectieux viraux ont montré que les trois protéines TGB sont chacune essentielles pour le mouvement intercellulaire et systémique des virus auxquels elles appartiennent (21, 89, 162, 163). Cependant, ces protéines doivent toutes les trois provenir du même virus pour pouvoir compléter son mouvement d'une cellule à l'autre (62, 118, 206). De plus concernant leur mouvement, il existe plusieurs différences notables entre les virus des groupes *Hordei* et *Potex*.

Le mouvement intercellulaire et systémique des virus du groupe *Hordei* tels que le virus de la mosaïque striée de l'orge (BSMV), le virus du rabougrissement de l'arachide (PCV), et le virus des pommes de terre à sommet touffu (PMTV) ne nécessite pas l'action de la protéine CP (89, 119, 140, 162, 194). Pour les virus du groupe *Potex* tel que le virus X de la pomme de terre (PVX), le virus de la mosaïque du trèfle blanc (WCIMV), et le virus de la mosaïque de la papaye (PMV), la protéine CP est non seulement essentielle, mais indispensable (37, 63, 203). La protéine TGB1 de par sa capacité de liaison à l'ARN est la MP responsable de la formation du complexe RNP viral (26, 32, 46, 55, 102). Les protéines TGB2 et TGB3 servent de point d'ancrage à la membrane plasmique lors de la livraison du complexe RNP au PD. Alors que la protéine TGB1 du groupe *Hordei* ne peut à elle seule rejoindre les plasmodesmes et modifier leur taille, sans l'action des protéines TGB1 et TGB 2 (60-62, 255), celle du groupe *Potex* a non seulement la capacité de rejoindre les PDs mais peut aussi modifier leurs SEL pour permettre son propre mouvement (92, 127, 128). Toutes ces observations permettent de dire que bien que ces différents virus utilisent tous les protéines de mouvement de type TGB, le complexe composé de la MP et de l'entité virale diffère d'un virus à l'autre.

### ***Les virus nécessitant plusieurs protéines de mouvement***

Un grand nombre de virus filamenteux de plante tel que les potyvirus et les clostérovirus font partie de cette catégorie de virus n'ayant aucune protéine dont le seul rôle est d'assurer leur mouvement intercellulaire. Les différentes protéines de ces virus sont multifonctionnelles et parmi leur arsenal de fonctions se trouve le mouvement. Ces protéines forment alors un dispositif de transport qui est fixé à l'une des extrémités de la particule virale tout en étant associé à l'ARN (13, 109, 159, 227). Dans le cas des potyvirus, ce sont les protéines CP, HC-Pro, CI et VPg qui semblent conduire le virus d'une cellule infectée à une autre. Il a été montré que CP et HC-Pro augmentent la SEL des PDs, les traversent, et facilitent le mouvement intercellulaire de l'ARN viral (130, 188). Plusieurs travaux dont des études ultrastructurales et génétiques ont aussi montré l'implication de CI lors du mouvement intercellulaire des potyvirus (35, 180, 183, 184). La protéine VPg quant à elle a un effet potentialisateur sur le mouvement et une mutation de cette protéine affecte considérablement ce dernier (57, 147, 219).

À la différence des autres virus filamenteux, la particule virale des clostérovirus est exceptionnellement longue. Elle est composée d'un corps principal et d'une queue protéique assurant son mouvement (3, 159). Cette queue se trouve à l'une des extrémités de la particule virale et est composée d'une protéine de capsid mineure (CPm), de la protéine HsP-70h homologue de la chaperonne moléculaire cellulaire HsP70, et des protéines p64 et p20(159). Les protéines CPm, HsP70h et p64 sont requises lors de l'assemblage du virion et de son mouvement intercellulaire (3, 160). Comme il a été mentionné pour le virus de la betterave jaune (BYV), p20 ne participe ni à l'étape d'assemblage ni à celle du mouvement intercellulaire, mais est nécessaire lors du mouvement systémique. p20 permet le transport longue distance du virion à travers le système vasculaire de la plante (170).

### ***Les virus formant des tubules.***

Cette autre stratégie de mouvement est celle des comovirus (virus de la mosaïque du niébé, CPMV) et des népovirus (virus du court-noué de la vigne, GVFV). Ce type de virus aux particules virales sphériques code pour une seule protéine de mouvement responsable de la formation d'une structure tubulaire d'environ 30 nm de diamètre traversant la paroi cellulaire et les PDs (165, 233). C'est la protéine de 48 kDa qui assume ce rôle dans le cas du CPMV. Des études moléculaires ont mis en évidence les différents domaines fonctionnels de cette protéine. Elle contient un domaine dit de formation du tubule qui est essentiel pour la localisation de la protéine aux plasmodesmes sous forme de dimère ou de multimère et un domaine C-terminal impliqué lors de l'entrée du virion dans le tubule (24). Le mouvement intercellulaire des comovirus et des népovirus peut alors se faire à travers le tubule ou avec le tubule à travers les PDs (165).

### ***Complémentarité entre les MP***

En dépit de la diversité frappante des systèmes de transport des virus et l'absence de similitude de mode de fonctionnement entre les MP des différents groupes, il existe quand même un phénomène de complémentarité entre les MP (14). La complémentarité entre MP a été mise en évidence soit par des infections mixtes de virus (l'un déficient en MP et l'autre parfaitement fonctionnel) (12, 14), soit en utilisant des virus recombinants dont les génomes ont été modifiés et contiennent le gène codant pour une protéine de mouvement hétérologue. Ce même effet de complémentarité et de réitération de la capacité de mouvement d'un virus a aussi été mis en évidence lors de l'infection de plantes transgéniques exprimant la MP d'un virus auxiliaire (12).

## **Facteurs de l'hôte impliqués dans le mouvement intercellulaire des phytovirus à ARN positifs**

Suite aux informations grandissantes sur les MP et leur mode de fonctionnement, il est devenu évident que les virus utilisent un mécanisme de transport actif pour circuler dans les plantes et rejoindre les PD. Ce qui ne peut se faire sans l'action des facteurs de l'hôte. Bien que les MP soient au cœur du mouvement intercellulaire viral, leur action dépend entièrement de la machinerie de transport de la cellule hôte. Cette machinerie de transport comprend entre autres le cytosquelette, les moteurs de myosines et le système sécrétoire.

Le cytosquelette est un élément capital des voies de transport intracellulaire impliqué dans le mouvement des virus autant dans le règne animal que végétal. L'implication du cytosquelette lors du mouvement intercellulaire viral a déjà été mentionnée il y a plusieurs années (2, 141). Dans la grande majorité des cas, les structures dans lesquelles se répliquent les virus de plante, quelles soient d'origine membranaire (ER ou les peroxysomes) (116) ou virale (corps d'inclusion du CaMV) ont été montrées en association avec des composants cellulaires comme le cytosquelette et le ER (45, 82). Cependant, le rôle exact des microfilaments et des microtubules lors du l'établissement de l'infection reste à clarifier.

Dans le règne animal, les microfilaments et les microtubules sont impliqués tout le long du processus infectieux allant de l'internalisation à l'assemblage du virion (76, 174). Chez les plantes, les PDs sont constitués entre autres d'actine et de myosine (249) et il a été montré qu'une altération des microfilaments d'actine pouvait augmenter leurs SEL (52). Le mouvement du TMV a fait l'objet de nombreuses études. Récemment une étude a montré que la MP du virus de la mosaïque du concombre (CMV) et celle du TMV a la capacité de briser les microfilaments (213) ce qui pourrait expliquer comment la MP du TMV modifie la SEL des PDs. Plusieurs données permettent de dire que l'action de la MP du TMV dépend des microfilaments d'actine et des myosines (83, 106, 126, 251) et que le passage du TMV d'une cellule à une autre dépend du cytosquelette. Il est important de noter que le mouvement intercellulaire dépendant des microfilaments d'actine et des myosines bien qu'étend très répandu parmi les virus (82, 168, 213), n'est aucunement lié au genre auquel le virus appartient. Le virus d'éclaircissement des nervures du navet (TVCV) par exemple qui est du même genre que le TMV ne requière pas l'action des microfilaments pour assurer son mouvement intercellulaire (83). Aussi, malgré le fait que l'action de la MP du TMV semble dépendre du cytosquelette, l'inhibition des microfilaments

d'actine n'empêche pas le TMV de se déplacer d'une cellule à l'autre (90). On peut donc dire que la diffusion passive et le mécanisme de transport actif dépendant du cytosquelette sont mutuellement non exclusifs et que l'implication ou non du cytosquelette doit être déterminée au cas par cas selon le virus.

Le système de transport basé sur l'utilisation des microfilaments d'actine et des microtubules implique de facto les protéines motrices. Ces protéines (dynéine/dynactine et kinésine pour les microtubules et myosines pour les microfilaments) ont plusieurs fonctions. Elles régissent en autres le transport des organites cellulaires, et la contraction musculaire chez les cellules animales. Les myosines sont codées par une grande famille de gènes contenant plus de 18 différentes classes (64). Chez les plantes, elles sont regroupées en deux grandes classes : la classe VIII et la classe XI (176). Le génome d'Arabidopsis, par exemple, code pour 17 myosines (13 classes XI et 4 classes VIII) (176). Les myosines de la classe XI sont impliquées dans la morphogénèse et la croissance de certains types de cellules et dans le mouvement des organites cellulaires (17, 152, 161, 169, 208). Par contre, celles de la classe VIII semblent être impliquées lors du trafic des protéines vers les PDs et lors de l'endocytose dans la plante (70, 193). Les protéines dynéines, dynactines et kinésines ont été impliquées dans le mouvement intercellulaire de plusieurs virus appartenant au règne animal (76, 174). Dans le cas des virus de plantes, il a été mentionné que parmi la grande famille des myosines, certaines sont importantes autant pour le mouvement intracellulaire que intercellulaire viral. Dans le cas du GFLV et du TMV, l'inactivation des myosines de la classe XI (XI-K et XI-2 GFLV et XI-2 pour TMV) a eu pour effet la suppression du mouvement intercellulaire viral (5, 83). Il a aussi été montré que la localisation de la protéine Hsp70 des clostérovirus aux PDs dépend des myosines de la classe VIII (3). Encore plus récent, la localisation de la MP des Tenuivirus aux PDs dépend elle aussi des myosines de la classe VIII (254).

Un autre facteur important lors du mouvement intercellulaire viral est le système de sécrétion de la plante. Son rôle lors du mouvement intercellulaire viral n'est plus à démontrer pour bon nombre de virus (5, 67, 83, 84) incluant les virus formant des tubules tel que le népovirus GFLV(4) et le virus de la tache nécrotique de melon (MNSV) (67).



## État des connaissances sur le mouvement du TuMV

Comme nous l'avons mentionné plus haut, plusieurs protéines chez les potyvirus semblent participer au transport de l'entité virale d'une cellule à une autre. Cependant, les facteurs de l'hôte nécessaires au bon accomplissement de cette étape du cycle de réplication commencent à peine à être définis. Les protéines CP, CI et HC-Pro sont impliquées dans le mouvement intercellulaire (35, 53, 232). Des expériences de biologie moléculaire ont montré que CP possède différentes propriétés nécessaires à la fois pour l'assemblage du virion, le mouvement intercellulaire et le mouvement intracellulaire viral (232). La mutation génétique de la région centrale de CP a eu pour effet d'empêcher le mouvement intercellulaire viral, ce qui a été aussi le cas lors de la délétion de la région C-terminale de HC-Pro (188). CP et CI ont été montrés en association avec les PDs (183, 184). Récemment il a été mentionné que la localisation de CI aux PDs dépend de la protéine virale P3N-PIPO (248) et que P3N-PIPO quant à elle rejoint les PDs en interagissant avec la protéine cellulaire PCaP1 (237). Hors du contexte infectieux, la localisation des protéines P3N-PIPO et CI aux PDs dépend du système sécrétoire, mais ne requiert pas l'action du cytosquelette d'actine et de myosine. Encore plus récemment, Grangeon et al. (74) ont montré que contrairement à sa réplication, le mouvement intercellulaire du TuMV dépend du système sécrétoire de la plante.

Jusqu'à lors les études réalisées sur le mouvement intercellulaire viral se sont concentrées sur les différentes protéines au cœur de ce processus. Notamment les MP et leurs auxiliaires. Dans ces différents travaux, ces protéines étaient modifiées et l'effet de ces modifications sur l'infection virale servait d'indicateur pour l'analyse du mouvement du virus. Dans l'optique de savoir ce qui se passe en temps réel, d'observer et d'analyser le mouvement du virus, nous avons construit un clone infectieux viral qui nous a permis d'effectuer *in vivo* l'étude quantitative du mouvement intercellulaire du TuMV et de mettre en évidence les différents facteurs cellulaires participant à cette étape de son cycle de réplication.

Le troisième chapitre décrit la construction d'un clone infectieux du TuMV permettant de différencier l'infection primaire résultant de l'agroinfiltration de l'infection secondaire résultant du mouvement intercellulaire virale. Ce clone a été utilisé pour identifier les différents acteurs de la machinerie de transport cellulaire impliqués dans le mouvement intercellulaire du TuMV. Nous montrons alors que le TuMV a besoin d'un système de sécrétion fonctionnel, de certaines

composantes de l'appareil de Golgi, des microfilaments et de la protéine motrice myosine XI-2 pour pouvoir se déplacer d'une cellule à l'autre.

Les résultats présents dans ce chapitre sont le sujet du manuscrit soumis à PLOS Pathogens - D-13-00235.

J'ai écrit le manuscrit, et réalisé l'ensemble des expériences ayant mené aux résultats qui y sont présentés.

Romain Grangeon (Institut national de la recherche scientifique (INRS), Québec, Canada) a été d'une grande aide lors de l'acquisition des images en microscopie confocale.

Rick S. Nelson et Huanquan Zheng ont offert une partie du matériel nécessaire à la réalisation des expériences et ont contribué à la rédaction du manuscrit.

Jean-François Laliberté a corrigé de nombreuses versions du manuscrit et supervisé l'ensemble du travail, allant de la conception de l'expérimentation à la soumission du manuscrit.

## **Chapitre 3: Contribution of host intracellular transport machineries to intercellular movement of Turnip mosaic virus**

Maxime Agbeci<sup>1</sup>, Romain Grangeon<sup>1</sup>, Rick S. Nelson<sup>2</sup>, Huanquan Zheng<sup>3</sup> and  
Jean-François Laliberté<sup>1\*</sup>

1. INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies  
Laval, Québec H7V 1B7, Canada
2. Plant Biology Division, Samuel Roberts Noble Foundation, Inc., Ardmore, OK 73401,  
USA
3. Department of Biology, McGill University, 1205 Dr. Penfield Avenue, Montréal, Québec,  
H3A 1B1, Canada

Author for correspondence:

Jean-François Laliberté  
Institut national de la recherche scientifique  
Institut Armand-Frappier  
531 boulevard des Prairies  
Laval, Québec,  
Canada H7V 1B7  
Tel : 1.450.687.5010  
Fax : 1.450.686.5501  
Email : jean-francois.laliberte@iaf.inrs.ca

## Résumé

Dans cette étude la contribution des différents mécanismes de transport de la cellule hôte dans le mouvement intercellulaire du virus de la mosaïque du navet (TuMV) a été investiguée. Dans le but de différencier les premières cellules infectées des cellules infectées suite au mouvement intercellulaire viral, nous avons inséré dans un vecteur binaire pCambia à la fois la séquence codante pour le clone infectieux du TuMV couplé à la protéine 6K2-mCherry et le gène codant pour une protéine GFP (GFP-HDEL) ciblée au réticulum endoplasmique (ER). Les deux gènes étant livrés dans la même cellule, les premières cellules infectées suite à l'agroinfiltration exprimaient les deux fluorochromes. Les foyers d'infection primaire étaient alors verts et rouges. Quatre à six jours suivant l'agroinfiltration, en plus de ces cellules vertes et rouges, on pouvait observer des cellules exprimant le fluorochrome rouge seulement, signifiant que le virus se déplaçait de cellule en cellule. Afin de déterminer si la voie de sécrétion était importante pour le mouvement intercellulaire du TuMV nous avons utilisé des inhibiteurs chimiques et protéiques qui affectent différentes étapes de la machinerie de transport cellulaire. Le traitement par la Brefeldin A ou la Concanamycin A et l'expression de mutants dominants négatifs des protéines ARF1 ou RAB-E1d ont réduit de manière drastique le mouvement intercellulaire viral sans pour autant affecter sa réplication dans les foyers d'infection primaire. Un test d'interférence pharmacologique utilisant la Tyrphostin A23 et la Wortmannin a montré que l'inhibition de l'endocytose n'avait aucun effet sur le mouvement intercellulaire du TuMV. De plus, le manque de colocalisation entre FM4-64, Ara7 (AtRabF2b) et le complexe de réplication virale induit par la protéine 6K<sub>2</sub> ont confirmé que l'endocytose n'était pas impliquée dans ce processus. Contrairement aux microtubules, la dépolymérisation des microfilaments a aussi eu un effet drastique sur le mouvement intercellulaire du TuMV et un fait intéressant à noter est que l'usage de l'interférence ARN induite par un virus a montré que ce mouvement qui dépend des microfilaments était soutenu par l'action de la myosine XI-2, mais pas par les myosines VIII et XI-F.

Nous proposons alors que lors du mouvement intercellulaire du TuMV, le complexe viral passe par des étapes de maturation progressive tout au long de la voie de sécrétion où le trafic post-Golgi, le réseau d'actine et de myosines sont importants pour qu'il puisse rejoindre les PDs et passer d'une cellule à une autre.

## ABSTRACT

The contribution of different transport machineries of the host cell in the intercellular movement of *Turnip mosaic virus* (TuMV) was investigated. To discriminate between primary infected from secondary infected cells associated with viral intercellular movement, a gene cassette expressing GFP-HDEL was inserted adjacent to a TuMV infectious cassette expressing 6K<sub>2</sub>-mCherry, both within the T-DNA borders of the binary vector pCambia. Since both gene cassettes were delivered to the same cell, primary infection foci emitted both green and red fluorescence. Between 4 and 6 days after agroinfection, additional cells emitting red fluorescence alone were readily observed, indicating TuMV intercellular spread. To determine if the secretory pathway was important for TuMV intercellular movement, chemical and protein inhibitors that block both early and late secretory pathways were used. Treatment with Brefeldin A or Concanamycin A and expression of ARF1 or RAB-E1d dominant-negative mutants drastically reduced cell-to-cell movement of the virus but did not hamper virus replication in primary infected cells. A pharmacological interference assay using Tyrphostin A23 and Wortmannin showed that endocytosis in TuMV intercellular movement is not important. Lack of co-localization with the FM4-64 and Ara7 (AtRabF2b) and TuMV-induced 6K<sub>2</sub>-tagged vesicles further indicates that these endocytic pathways are not important for TuMV intercellular spread. Microfilament, but not microtubule, depolymerizing drugs also blocked intercellular movement of TuMV. Interestingly, virus-induced gene silencing showed that sustained movement relied on myosin XI-2, but not on myosin VIIIs and XI-F. We propose that intercellular TuMV movement requires a progressive viral complex maturation along the secretory pathway where post-Golgi trafficking and the actomyosin network are important for proper Pd targeting and delivery into neighbouring cells.

## **AUTHORS' SUMMARY**

Plant viruses move from the initially infected cell to neighbouring cells during local movement and then over long distances through vascular tissues to establish a systemic infection in the plant. Transport between cells involves moving a viral RNA-protein complex through plasmodesmata (Pds) that requires viral and host factors. Virus intercellular movement is normally assessed by assays that cannot always differentiate between reduced viral RNA replication and intercellular movement. By using a dual gene cassette construct encoding fluorescent proteins that can differentiate between primary infected cells from cells infected after intercellular transport, we provide evidence that Turnip mosaic virus (TuMV) needs a functional secretory pathway where post-Golgi traffic and the actomyosin network are important for proper Pd targeting. Interestingly, disruption of the host transport machinery had no impact on TuMV accumulation in initially infected cells. These results support the idea that virus replication activities can be influenced separately from those involved in other virus activities such as movement, although aspects of both are likely coordinated.

## INTRODUCTION

Plant viruses move from the initially infected cell to neighbouring cells during local movement and then over long distances through vascular tissues to establish a systemic infection in the plant. Transport of viruses between cells involves intracellular movement of viral complexes from the site of replication to plasmodesmata (Pds) and moving through Pds. Pds are tunnels in the cell wall that connect the cytoplasm, the endoplasmic reticulum (ER) and the plasma membrane between adjoining cells (23, 136, 137). Pds regulate protein, short interfering RNA and messenger RNA trafficking (132, 153). The normal size exclusion limit (SEL) of Pd (1 kD for passive movement) is too small to allow passive transport of a virus complex so viruses encode movement proteins (MP) that facilitate intracellular movement of a viral complex and its interaction with Pd to allow intercellular movement of the virus (27, 130, 149, 199, 230, 235). No sequence homology has been found among the various MP that have been described and each protein has different functional characteristics. For instance, some MP induce tubule formation through PDs that allow viral particle passage from one cell to another (93, 105, 150, 233, 246). Other MP increase the SEL of PDs (65, 213, 250) that opens the way for a protein-viral RNA complex to move into non-infected cells (106). Moreover, viruses require differing numbers of proteins for intercellular movement, while other viruses need the concerted action of several MP (reviewed in (235)) and others have no classically-defined MP (e.g. potyviruses) (reviewed in (81, 235)).

Although MP are at the core of virus intra- and intercellular movement, it is clear that host factors, in particular the cytoskeleton, myosin motors and the secretory pathway are required. The cytoskeleton and myosins are essential components for organelle trafficking in plant cells (239) and they have been shown to be involved in vertebrate virus intracellular movement (221). In the case of *Tobacco mosaic virus* (TMV), microtubules and microfilaments may be necessary to anchor and release, or propel the movement of the virus replication complex (VRC) within the ER (reviewed in (149, 158, 199)). However, the related tobamovirus, *Turnip vein-clearing virus* (TVCV), seems not to require intact microtubules or microfilaments for its spread (reviewed in (84)). Involvement of microfilaments in MP or virus movement has also been shown for other plant viruses (45, 47, 67, 82, 117, 168, 253). In addition to microfilaments, myosin motors are also required for movement (5, 16, 83, 246, 254).

Viral RNA replication takes place in factories, which are virus-induced organelles that are very often derived from the ER (reviewed in (116, 157)) or in some instances the Golgi (75, 225), although peroxisomes (139) and chloroplasts (167) can also be modified into viral factories. Many MP are membrane-associated proteins and a link between viral replication and movement has been proposed (75, 226). This link is supported by the observation that the early secretory pathway is required for MP and viral trafficking of some viruses to Pd (7, 47, 67, 74, 117, 238, 247, 254). However, there are notable exceptions. For example, Pd targeting of the tubule-forming MP of *Cowpea mosaic virus* (CPMV) is not affected by the disruption of either protein transport between the ER and Golgi or the cytoskeleton (166). Similarly, the targeting of the triple gene block protein 3 (TGBp3) of *Poa semilatifolia virus* to Pd does not require a functional cytoskeleton or early secretory pathway (198). In addition to these studies that are focused on the early secretory pathway, recent studies also suggest that endocytic transport pathway may also be involved in viral movement. For example, the movement related TGB2 protein of potato mop top virus (PMTV) can also be found in endocytic vesicles marked by FM4-64 and Ara7, a Rab-F protein localized to the PVC/MVB (87). In addition, the MP of TMV and *Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) physically interact with the clathrin-associated SNARE-interacting protein synaptotagmin (123). Down-regulation of synaptotagmin inhibits endocytosis and intercellular spread of TMV and CaLCuV (123). However, it is worth mentioning that the above investigations on how the endomembrane system is involved in viral replication and movement are mainly focused on the early secretory and endocytic pathways. Whether or not the late secretory pathway is involved in viral spread is virtually unknown.

Although no dedicated MP has been identified for potyviruses, many viral proteins with other known functions have been reported to participate in viral transport. For instance, the coat protein (CP) and cylindrical inclusion (CI) protein are required for intercellular movement (35, 53, 54) and are associated with Pd (183, 186). Recently, the targeting of CI to Pd was shown to be mediated by P3N-PIPO (248), which itself is targeted to the plasma membrane through an interaction with the host protein PCaP1 (237). P3N-PIPO is a recently identified protein, which is embedded in the P3 coding region as a plus 2 frame shift sequence (41). In the absence of viral infection, the targeting of P3N-PIPO and CI to Pd requires an early secretory pathway but the actomyosin motility system does not appear to be involved (248). However, the contribution of these host intracellular transport machineries on virus movement as opposed to the movement of ectopically expressed viral proteins has not been investigated.



In this study, by using a dual gene cassette construct that can differentiate between primary infected cells from cells infected after intercellular virus movement, we provide in vivo quantitative evidence that TuMV requires both early and late secretory pathways, but not the endocytic pathway to move from one cell to another. We also investigated the role of microfilament myosin motor proteins for sustained TuMV intercellular movement and determined that myosin XI-2 was required for this activity.

## RESULTS

### **An *in vivo* quantitative assay for TuMV intercellular movement**

Virus intercellular movement is normally assessed by measuring the diameter or area increases as a function of time of infection foci induced by a recombinant virus encoding a fluorescent reporter protein (5, 83, 106, 248). However, these assays cannot always differentiate between modified viral RNA replication and intercellular movement. In order to discriminate primary infected from secondary infected cells and thus to analyze virus intercellular movement, we introduced a gene cassette encoding the ER-localized GFP-HDEL under the control of the *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) 35S promoter adjacent to a TuMV infectious cassette expressing 6K<sub>2</sub>-mCherry, both flanked by the T-DNA borders in the binary vector pCambia (Fig. 1A) (74). Since both gene cassettes are delivered to the same cells and GFP-HDEL does not move between cells (123), primary infected cells should display concomitant green and red fluorescence. At three days post-agroinfiltration, all transfected cells did display both green and red fluorescence when observed under the confocal microscope at low magnification (Fig. 1B), indicating no virus movement was taking place in this time frame. At higher magnification, *N. benthamiana* cells displayed the expected green polygonal ER pattern and virus-induced 6K<sub>2</sub>-tagged red vesicles (Fig. 1C). Four to six days post infiltration, in addition to cells emitting red and green fluorescence, cells emitting only red fluorescence were observed, indicating TuMV intercellular movement (Fig. 1D). Interestingly, the secondary infection front was not uniform - virus propagation created foci of infection with large numbers of intervening epidermal cells left uninfected. This is particularly evident when tile scanning was performed (Fig. 1E). Tile scanning involves merging adjoining images of the sample (the "tiles") digitally to obtain a larger field of view. Areas for mCherry-only expressing foci were quantified and it was determined that the increase of the area of secondary infected cells started 4 days post agroinfiltration and reached a plateau 6 days post infiltration (Fig. 1F). These foci contained 10-20 epidermal cells after 4 days and 40-50 cells after 5 days. The presence of red-only fluorescence foci was not due to the diffusion of 6K<sub>2</sub>-mCherry from agroinfected cells because replacement of the TuMV gene cassette by the cDNA encoding 6K<sub>2</sub>-mCherry in the above plasmid did not produce red-only fluorescent foci (Fig. S1).

## Intercellular movement of TuMV requires both the early and late secretory pathways

Because the early secretory pathway has been shown to be important for the motility and transport of viral proteins of potyviruses (245, 247), we first used chemical inhibitors that block different stages of the secretory pathway to access their role in the intercellular movement of TuMV. In tobacco, Brefeldin A (BFA) is an inhibitor that interferes with protein transport in the ER-Golgi interface apparatus (228). Concanamycin A (CMA) inhibits protein transport around the trans-Golgi network (TGN) (66) by inhibiting the function of TGN-localized proton-ATPases, which leads to the acidification of the TGN lumen (50). *N. benthamiana* leaves were treated with DMSO, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  BFA or 0.5  $\mu\text{M}$  CMA 4 h before pCambiaTunos/6KmCherry/GFP-HDEL agroinfiltration. Four days post-infection, confocal observation showed that DMSO had no inhibitory effect on TuMV movement (Fig. 2A). On the other hand, BFA and CMA treatments drastically reduced cell-to-cell movement (Fig. 2B-C). The same effect on movement was observed when drug treatment was done 3 days after agroinfiltration and 20 hrs before confocal observation (Fig. S2). Area for mCherry-only expressing foci from twenty leaf samples for each treatment were measured and the analysis confirmed the inhibitory effect of BFA and CMA on TuMV intercellular movement (Fig. 2D). In principle the BFA and CMA effect on intercellular movement could be caused by a reduction in virus replication in the primary infected cells. To access whether or not BFA and CMA inhibited the replication of TuMV that might influence the intercellular movement of the virus, we quantified mCherry fluorescence intensity over GFP fluorescence intensity in primary infection foci for all treatments. Fig. 2E shows that there was no significant difference in the ratio of red over green fluorescence for all tested conditions at 4 dpi, indicating that viral replication in the primary infected cells was not affected by drug treatments. The level of green fluorescence with DMSO was similar to the level of fluorescence in the BFA- and CMA-treated primary cells, indicating that production of GFP was not affected by the treatments (data not shown).

Protein inhibitors were then used to further analyze and to confirm the role of the secretory pathway in TuMV intercellular transport. The ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) is a small GTPase regulating the recruitment of COPI coatomer proteins. A dominant negative mutant of ARF1 [ARF1(NI)] impaired in GTP/GDP binding has been shown to affect the transport of soluble markers from the ER to Golgi, and cause a re-absorbance of Golgi membrane proteins into the ER (210). RAB-E1d is a small Rab GTPase acting at a post-Golgi trafficking pathway

and the dominant negative mutant RAB-E1d(NI) inhibits trafficking from the Golgi apparatus to the plasma membrane (256). These two dominant-negative mutants were co-expressed with pCambiaTunos/6KmCherry/GFP-HDEL. Four days post-agroinfiltration, confocal observation of red-only foci showed that the two mutant proteins drastically reduced intercellular movement of TuMV (Fig. 3A-C). Area measurements for mCherry-only expressing patches confirmed the inhibitory effect of both ARF1(NI) and RAB-E1d(NI) on TuMV intercellular movement (Fig. 3D). Expression of these two mutant proteins did not hamper virus replication in primary infected cells as measured by red over green fluorescence ratios in the dual expressing regions of the infected leaves (Fig. 3E).

We therefore conclude that inhibition of both early and late secretory pathways block TuMV intercellular movement but do not affect viral replication in primary infected cells. The last assertion is in line with the prior observation that BFA treatment did not affect the production of TuMV-induced 6K<sub>2</sub>-tagged perinuclear structures and peripheral vesicles (74).

### **Cell-to-cell transport of TuMV is independent of the endocytic pathway**

Because the endocytic transport pathway has been shown to be involved in intercellular movement of TMV and CaLCuV (123), we examined if endocytosis was involved in TuMV intercellular movement. To this end, we first used a pharmacological interference assay with Tyrphostin A23, A51 and Wortmannin. In mammalian cells, Tyrphostin A23 inhibits the recruitment of endocytic cargo into clathrin-coated vesicles formed at the plasma membrane by preventing the interaction between the clathrin-binding AP-2 adaptor complex  $\mu$ 2 subunit and the sorting motif within the cytoplasmic domain of plasma membrane proteins (18). Tyrphostin A51 is a structural analog of Tyrphostin A23 but has no inhibitory effect and is routinely used as negative control (18). Tyrphostin A23 also works in plant cells (10) and it has been shown that the drug inhibits endocytosis of some plasma membrane proteins (29). Wortmannin is a phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor that inhibits in mammalian cells receptor sorting and/or vesicle budding required for delivery of endocytosed material to "mixing" endosomes (209). In plant cells, it has been shown that the drug inhibits endocytosis of FM4-64 (an amphiphilic styryl dye used to monitor endocytosis) (28) and morphogenesis of MVB/PVCs (10, 59) but it does not affect protein transport from the TGN to the plasma membrane (172, 173). *N. benthamiana* leaves were infiltrated either with Tyrphostin A23, Tyrphostin A51, Wortmannin or DMSO 4 hrs prior to agroinfiltration with *A. tumefaciens* Agl1 containing pCambiaTunos/6KmCherry/GFP-

HDEL. The drug concentrations used have been shown to block endocytotic pathway in plants (10, 59) and an inhibition of endocytosis of FM4-64 in the presence of Wortmannin confirmed this to occur in our system (Fig. S3). Four days after agroinfiltration, TuMV movement was examined by confocal microscopy. Fig. 4 shows TuMV propagation in the presence of the different drugs and none of the inhibitors affected the sustained intercellular movement of the virus. These data then show that endocytic pathway is not involved in TuMV sustained movement.

We also investigated the association of TuMV-induced 6K<sub>2</sub>-tagged vesicles with Ara7 (AtRAB-F2b) and FM4-64. Intracellular trafficking of 6K<sub>2</sub>-tagged vesicles has been shown to be dependent on the secretory pathway and microfilaments (45, 74, 247) and these 6K<sub>2</sub> vesicles are thought to be the vehicle for viral RNA delivery to Pds. Ara7 is a Ras-related protein similar to Rab5 and Rab22 of mammals and to Ypt51/Ypt52/Ypt53 in yeast, and marks prevacuolar compartments and is involved in endocytic and vacuolar trafficking in plant cells (78, 114). Co-expression of Ara7 and pCambiaTunos/6KmCherry in *N. benthamiana* leaves cells shows that there was no colocalization between Ara7 motile dots and 6K<sub>2</sub>-tagged vesicles (Fig. 5A). Moreover, a 40-min dipping of *N. benthamiana* leaves in FM4-64 at concentration of 1µg/µl allowed the internalization of the dye into endocytic vesicles from the plasma membrane but 6K<sub>2</sub>-tagged vesicles were never associated with FM4-64-labeled vesicles (Fig. 5B). Lack of colocalization with the FM4-64 and Ara7 and TuMV-induced 6K<sub>2</sub>-tagged vesicles further indicates that these endocytic pathways are not important for TuMV local cellular spread.

### **Intercellular movement of TuMV depends on myosin XI-2 motors**

Many viruses and individual virus proteins require the actomyosin system for their intracellular and/or sustained intercellular movement (45, 47, 67, 82, 117, 126, 168, 253). However, a recent study showed that RNA viruses might have evolved differently in their requirements for actin and the associated myosin motors (83). We first tested the effect of latrunculin B (LatB), cytochalasin D (CytD), oryzalin and trifluralin on the intercellular spread of TuMV. LatB and CytD inhibit maintenance of microfilaments (44) while oryzalin and trifluralin are agents that destabilize microtubules (134). Leaves were infiltrated with 5 µM LatB, 10 µM CytD, 10 µM oryzalin, 20 µM trifluralin or DMSO 4 h before agroinfection. The disruption of actin by LatB or CytD was

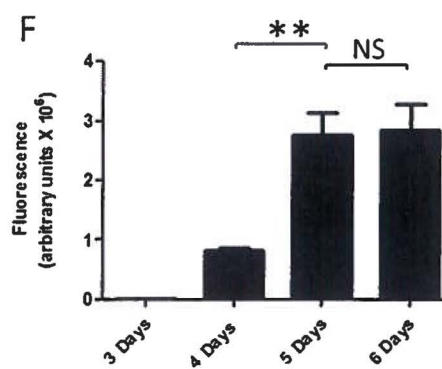
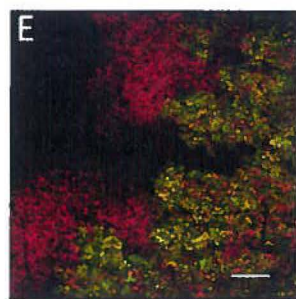
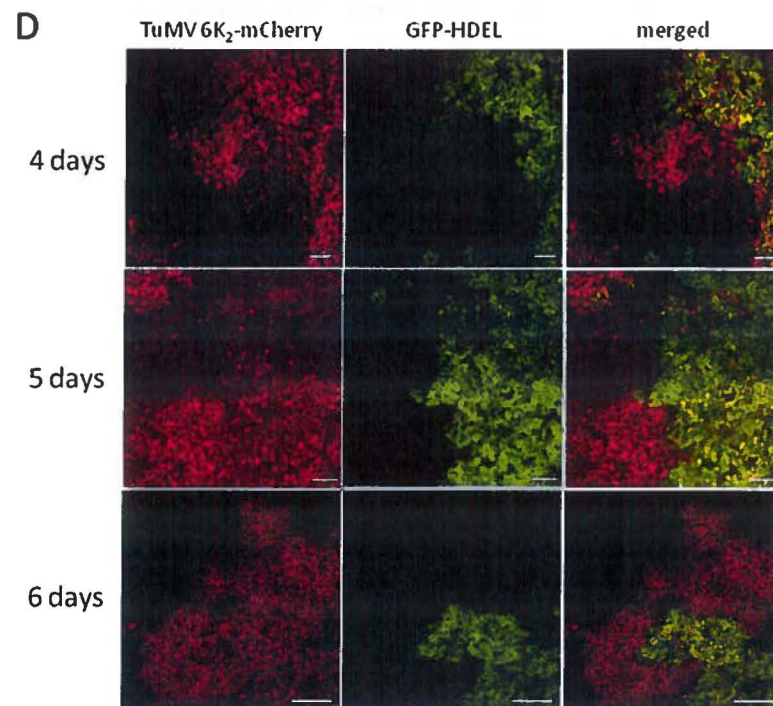
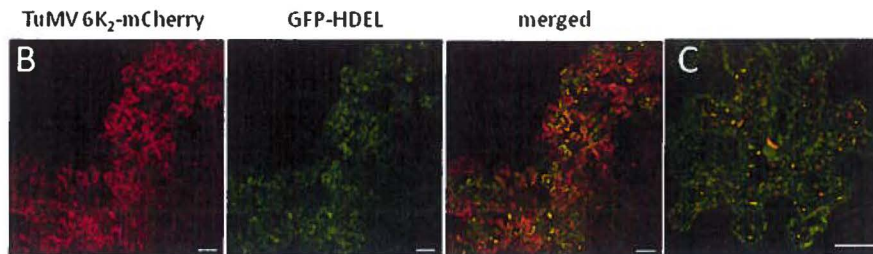
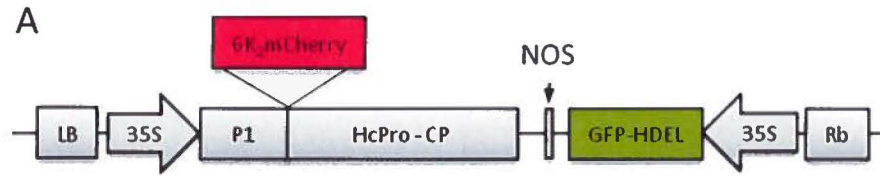
confirmed by confocal microscopy observation of microfilaments labeled with the actin-binding domain 2 of *A. thaliana* fimbrin fused to GFP (GFP-ABD2-GFP) (242) (data not shown). TuMV intercellular movement was assessed by imaging *N. benthamiana* leaves 4 days post agroinfiltration with pCambiaTunos/6KmCherry/GFP-HDEL. While oryzalin and trifluralin had no effect (Fig. 6B, C), a significant inhibition of TuMV intercellular movement was observed with LatB and CytD (Fig. 6D, E). Areas for mCherry-only expressing foci (n=15 individual foci) were quantified and the data indicated greater spread for leaves treated with DMSO, oryzalin and trifluralin compared with those treated with LatB and CytD (Fig. 6F). The ratio of red to green fluorescence in dual expressing cells was unchanged between treatments indicating that virus replication was unaffected by these microfilament antagonists (Fig. 6G). These results indicate that an intact microfilament network was important for sustained TuMV intercellular movement, but not for replication.

It is the contractile association of actin with myosin and other cytoplasmic proteins that gives microfilaments their ability to promote organelle movement (177). Because sustained TuMV intercellular movement is microfilament dependent, we were interested to determine the role of individual myosin motor proteins in this process. To this end, we used *Tobacco rattle virus*-mediated virus-induced gene silencing (TRV-VIGS) to silence individual myosin genes. This approach was successfully used to determine the role of myosins on intercellular movement of TMV, *Potato virus X* (PVX), *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), and *Turnip vein-clearing virus* (TVCV) (83). *N. benthamiana* leaves were first infected with TRV constructs and 15 days later upper leaves were infiltrated with agrobacterium strain containing pCambiaTunos/6KmCherry/GFP-HDEL. Intercellular movement was quantified 5 days post infiltration with TuMV and GFP reporter. Quantitative RT-PCR confirmed that the transcriptional level of the target myosin genes was decreased in plants infected by the TRV silencing construct containing the corresponding genes (Fig. 7A). We then monitored TuMV intercellular movement by measuring the areas of foci expressing mCherry-only (n=10 individual foci) (Fig. 7B). Quantification indicated that there was no significant difference in TuMV intercellular movement among myosin VIII-1, VIII-2, XI-F-silenced plants and those inoculated with TRV with no insert. However, silencing of myosin XI-2 reduced TuMV intercellular movement by a factor of 10 compared to the control. To be sure this effect on virus movement was specific to myosin XI-2, we analyzed the effect of silencing myosin XI-2 on the other myosins in this study (Fig. 7C). Silencing myosin XI-2 had no significant effect on the transcript level of the other tested myosins

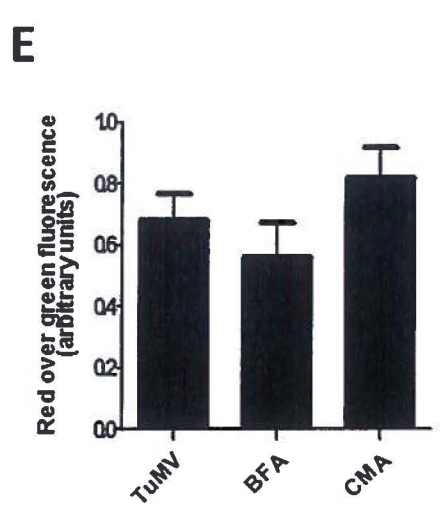
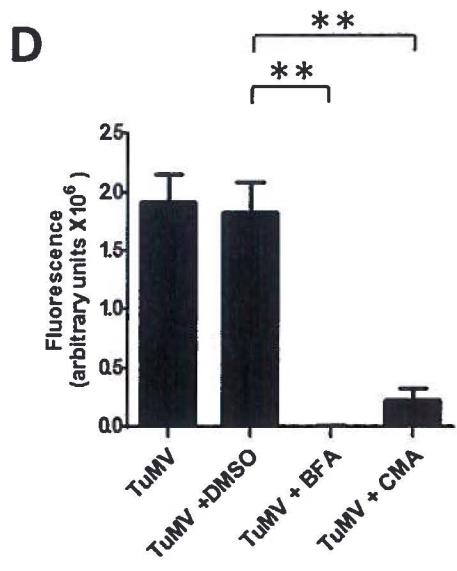
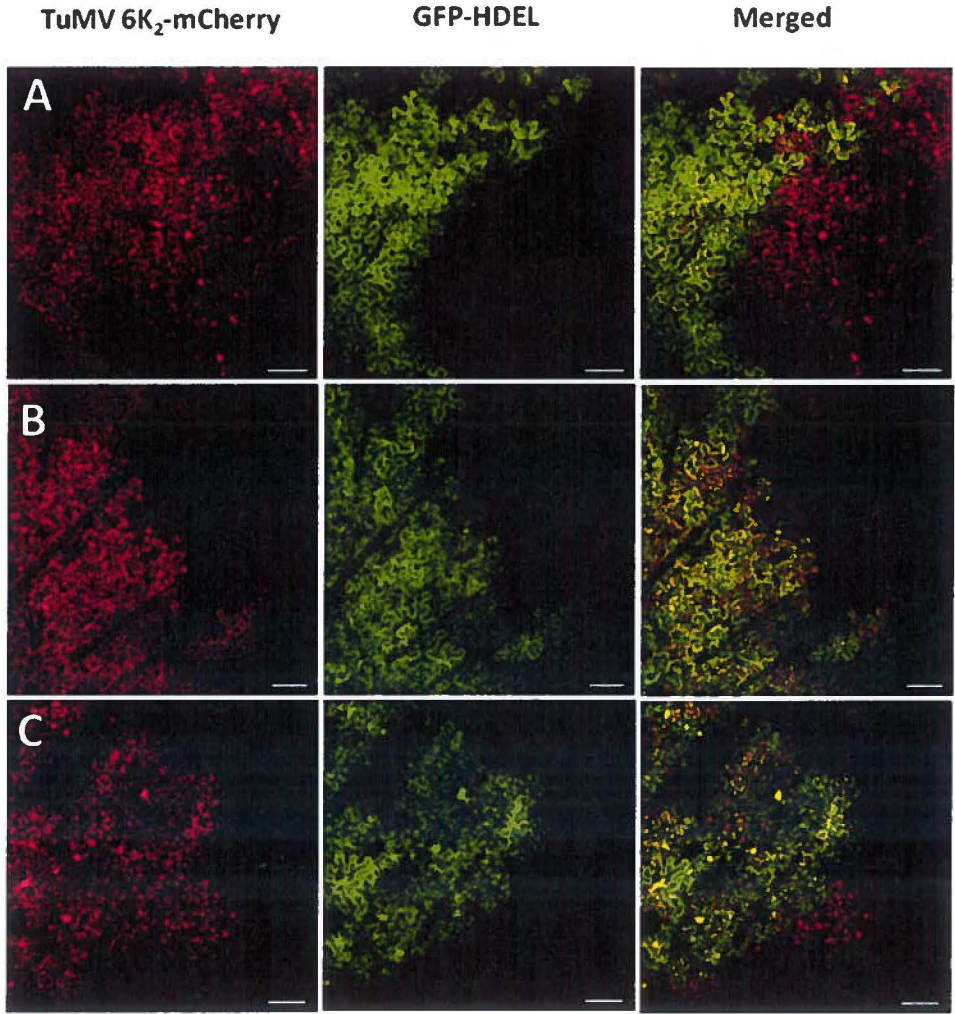
and therefore, results presented here indicate that myosin XI-2, but not XI-F, or VIII-1 and VIII-2, is required for sustained intercellular movement of TuMV.

**Figure 1 : TuMV intercellular movement time course.** (A) Schematic representation of the plasmid pCambiaTuMV-6K2mCherry/GFP-HDEL used to discriminate primary infected cells from secondary infected cells after agroinfiltration. (B) Single-section confocal microscope images at low magnification of *N. benthamiana* leaves agroinfiltrated 3 days before with *A. tumefaciens* strain Ag1 containing the above plasmid. Left panels, red fluorescence channel imaging TuMV producing 6K<sub>2</sub>-mCherry; middle panels, green fluorescence channel imaging GFP-HDEL; and right panels, merged images. Bars = 200  $\mu$ m. (C) Three-dimensional rendering of 35 1- $\mu$ m-thick confocal image sections that overlap by 0.5  $\mu$ m, at a high magnification showing the distribution of TuMV-induced 6K<sub>2</sub>-mCherry-tagged structures and GFP-HDEL labeled ER. Bars = 20  $\mu$ m. (D) Same as in (B) but images were taken at the indicated time on the left after agroinfiltration. Bars = 200  $\mu$ m. (E) Three-dimension confocal microscopy images of leaf epidermal cells of *N. benthamiana* expressing the pCambiaTuMV-6K<sub>2</sub>mCherry/GFP-HDEL at 5 days after agro-infiltration. The image was created by tiling 12 small three -dimensional images together using a Zeiss LSM 780. Bar = 200  $\mu$ m. (F) Average surface area of red-only fluorescent foci was calculated and expressed in fluorescence units for the indicated time after agroinfiltration. Bars represent means of one experiment and standard errors for 10 replicates per treatment. Experiments were repeated at least 3 times. One-way analysis of variance calculation followed by Tukey's Multiple Comparison Test allowed analysis of differences between means: = NS, non significant(NS), \*\*, 0.001<P value <0.01.

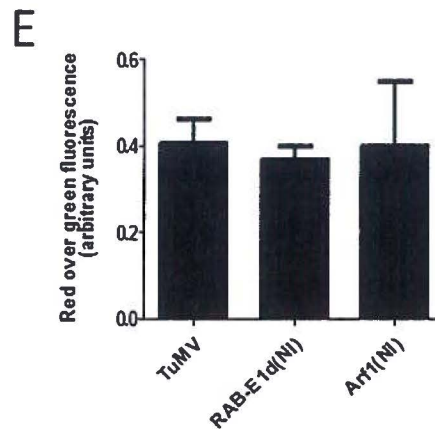
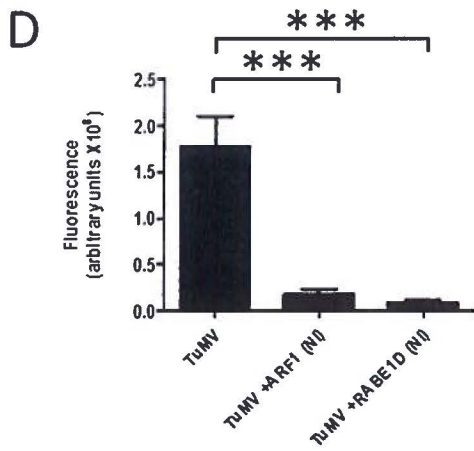
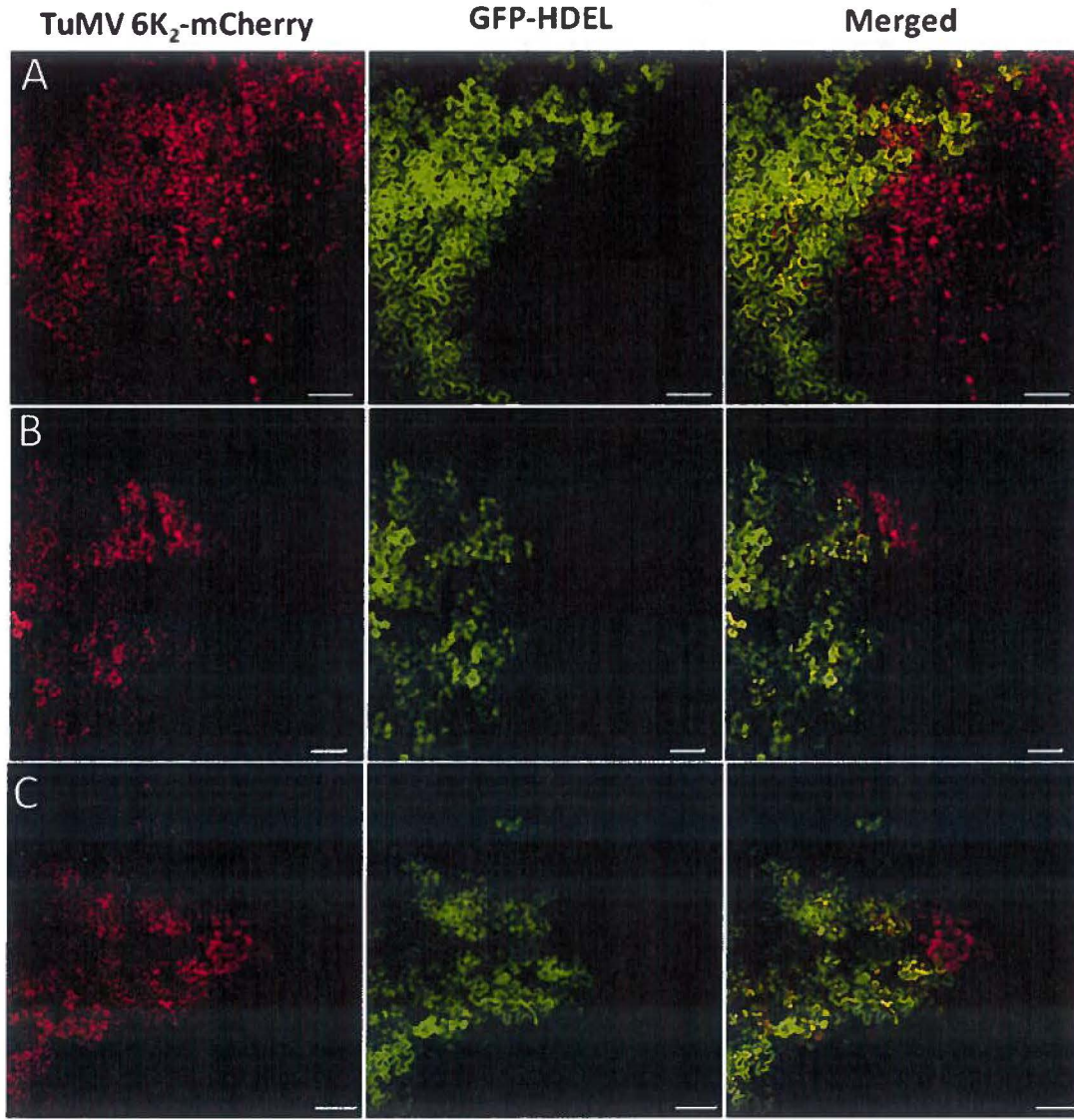




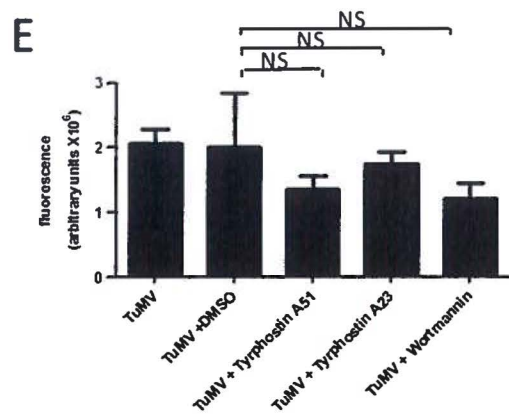
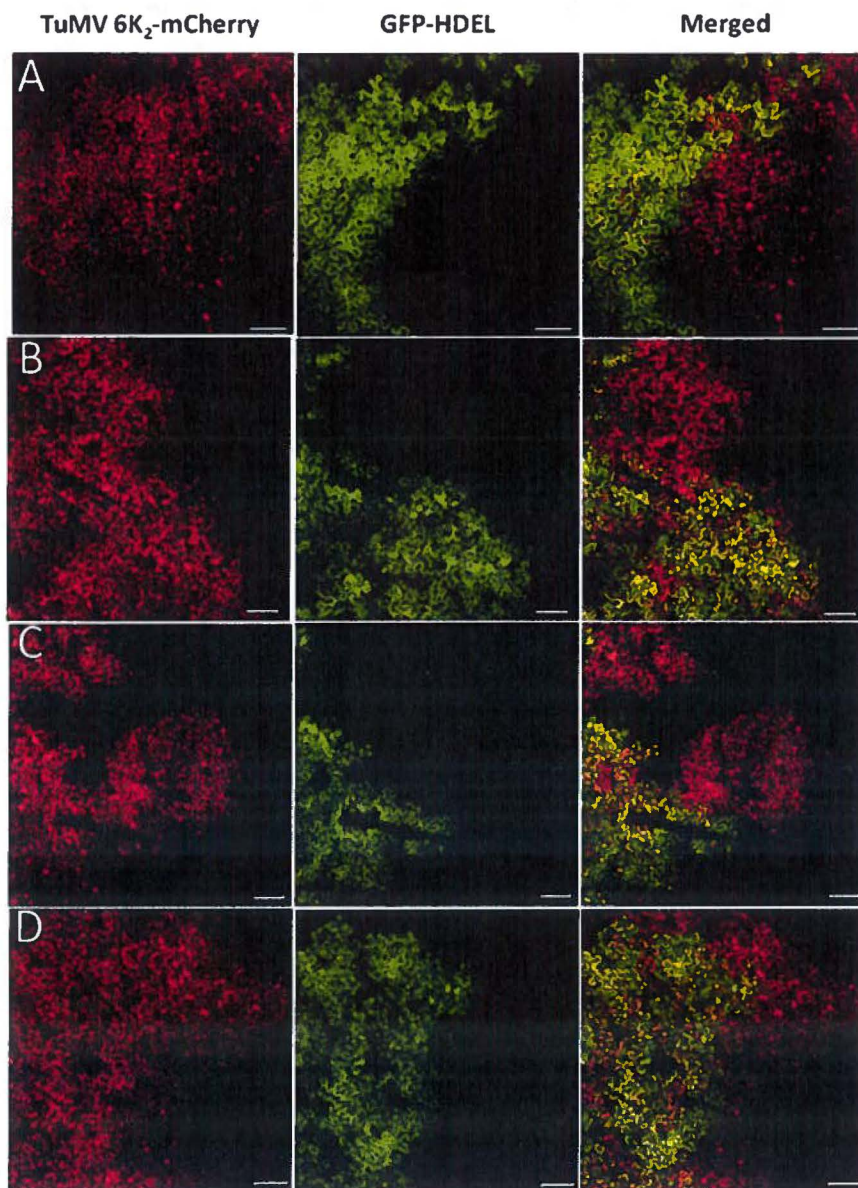
**Figure 2 : The secretory pathway is required for sustained intercellular movement.** *N. benthamiana* leaves were infiltrated with DMSO (A) , 10 µg/ml BFA (B) and 0.5 µM CMA (C) 4 hours before agroinfiltration with *A. tumefaciens* containing pCambiaTuMVmCherry/GFP-HDEL. All images were taken at 4 dpi with a LSM 510 Meta confocal microscope. Scale bar = 200 µm. (D) Surface area of red-only fluorescent foci was calculated and expressed in fluorescence units. (E) Fluorescence intensity ratio of red over green foci was calculated and expressed in fluorescence units. Bars represent means of one experiment and standard errors for 20 replicates per treatment. Experiments were repeated 3 times. One-way analysis of variance calculation followed by Tukey's Multiple Comparison Test allowed analysis of differences between means : = \*\* 0.001 < P value < 0.01 .



**Figure 3 : Inhibition of TuMV sustained intercellular movement by dominant negative mutants of secretory pathway factors.** *N. benthamiana* leaves were agroinfiltrated with *A. tumefaciens* containing plasmids expressing TuMVmCherry/GFP-HDEL alone (A) or with dominant negative mutant ARF1(NI) (B) or with RAB-E1d (NI) (C). All images were taken at 4 dpi with a LSM 510 Meta confocal microscope (Zeiss). Scale Bar = 200  $\mu$ m. (D) Surface area of red-only fluorescent foci was calculated and expressed in fluorescence units. (E) Fluorescence intensity ratio of red over green foci was calculated and expressed in fluorescence units. Bars represent means of one experiment and standard errors for 20 replicates per treatment. Experiments were repeated 3 times. One-way analysis of variance calculation followed by Tukey's Multiple Comparison Test allowed analysis of differences between means:= \*\*\* P value <0.0001.



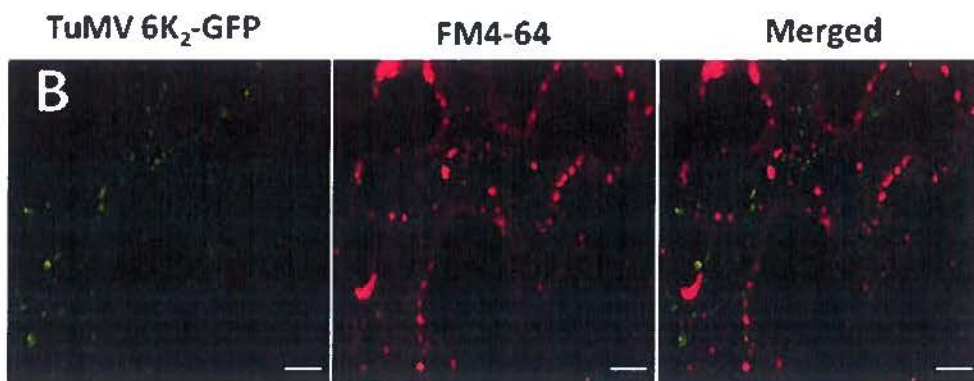
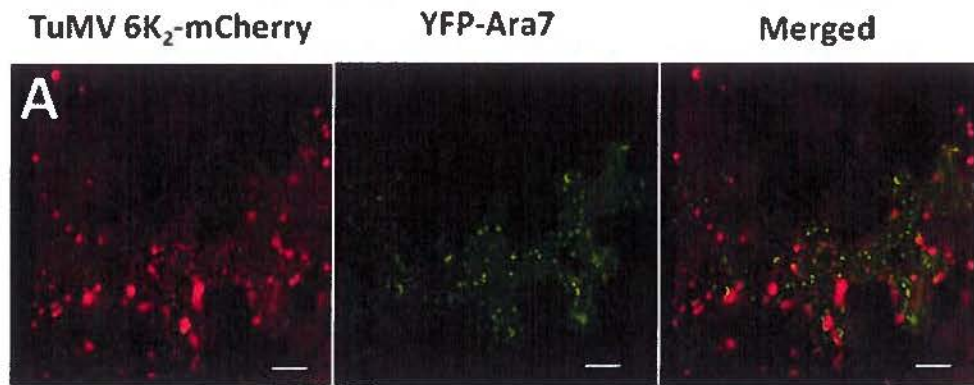
**Figure 4 : TuMV sustained intercellular movement does not depend on the endocytic pathway.** *N. benthamiana* leaves were infiltrated with DMSO (A), 20  $\mu$ M Wortmannin (B), 30  $\mu$ M Tyrphostin A51 (C) and 30  $\mu$ M Tyrphostin A23 (D) 4 hours before agroinfiltration with *A. tumefaciens* containing pCambiaTuMVmCherry/GFP-HDEL. Images were taken at 4 dpi with a LSM 510 Meta confocal microscope (Zeiss). Scale bar = 200  $\mu$ m. (E) Surface area of red-only fluorescent foci was calculated and expressed in fluorescence units. Bars represent means of one experiment and standard errors for 15 replicates per treatment. Experiments were repeated 3 times. One-way analysis of variance calculation followed by Tukey's Multiple Comparison Test allowed analysis of differences between means: = NS, non significant (NS).



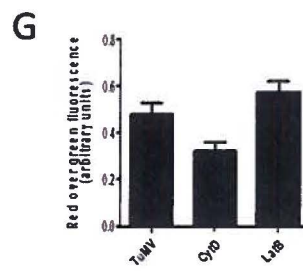
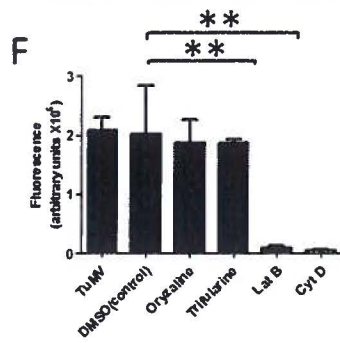
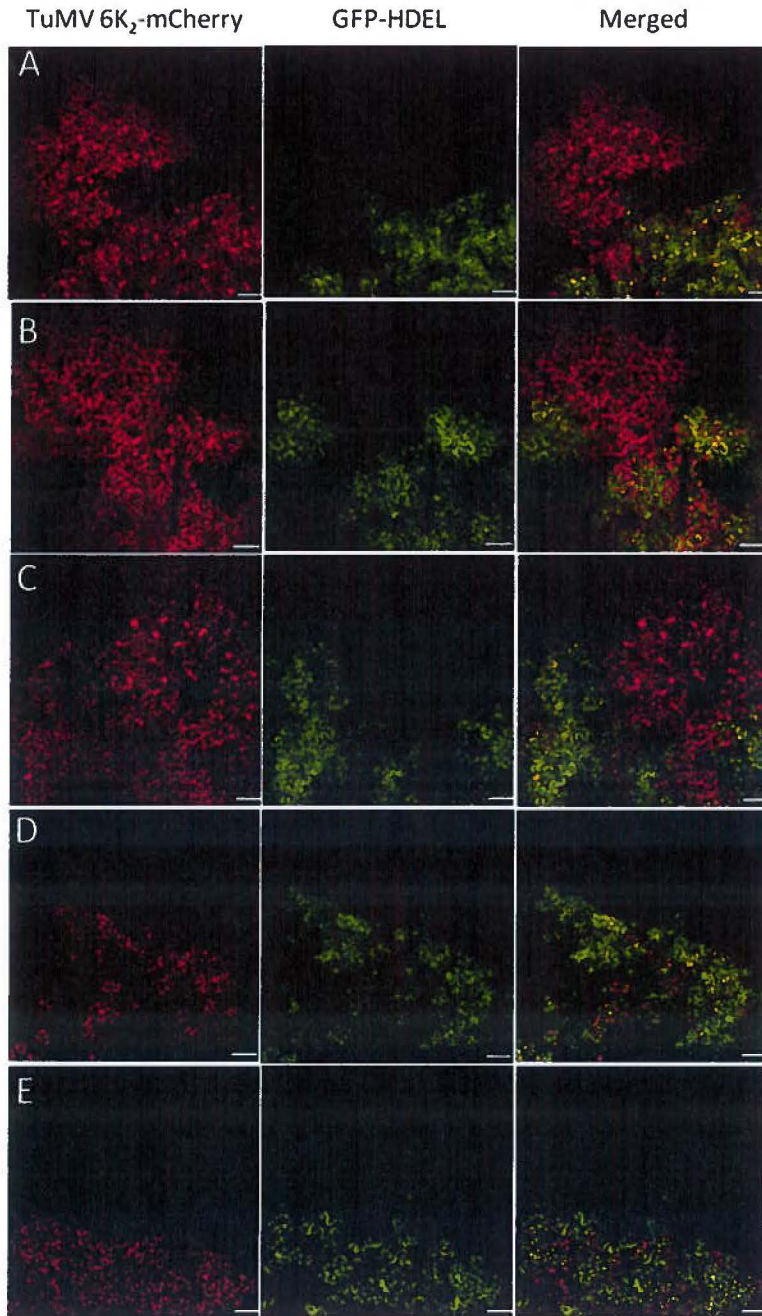
**Figure 5 : TuMV 6K<sub>2</sub>-tagged vesicles do not colocalize with endocytic markers.**

Three-dimensional rendering of 22 1- $\mu\text{m}$ -thick confocal images that overlap by 0.5  $\mu\text{m}$  of *N. benthamiana* agroinfiltrated leaves. (A) shows the distribution of TuMV-induced 6K<sub>2</sub>-mCherry-tagged structures and YFP labeled Ara7 dots. Left panels; red fluorescence channel imaging TuMV producing 6K<sub>2</sub>-mCherry, middle panel; green fluorescence channel imaging YFP-RabF2b, and right panel; merged images. (B) shows the distribution of TuMV-induced 6K<sub>2</sub>:GFP-tagged structures and FM4-64 labeled vesicles. Left panel shows green fluorescence channel from TuMV producing 6K<sub>2</sub>:GFP, middle panel red fluorescence channel from FM4-64, and right merged panels. Images were taken at 4 dpi with a Zeiss LSM 780 confocal microscope. Scale bar = 20  $\mu\text{m}$ .



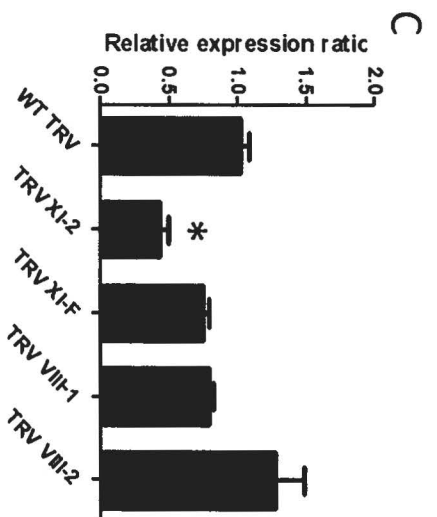
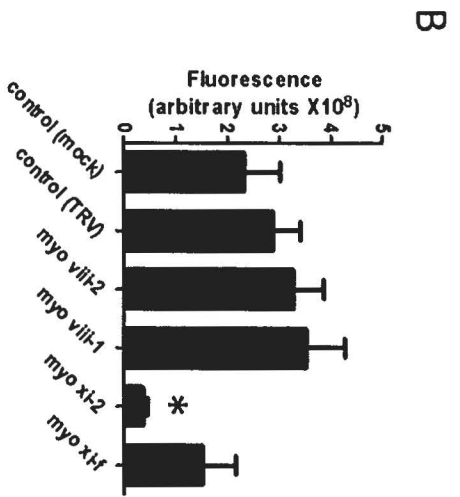
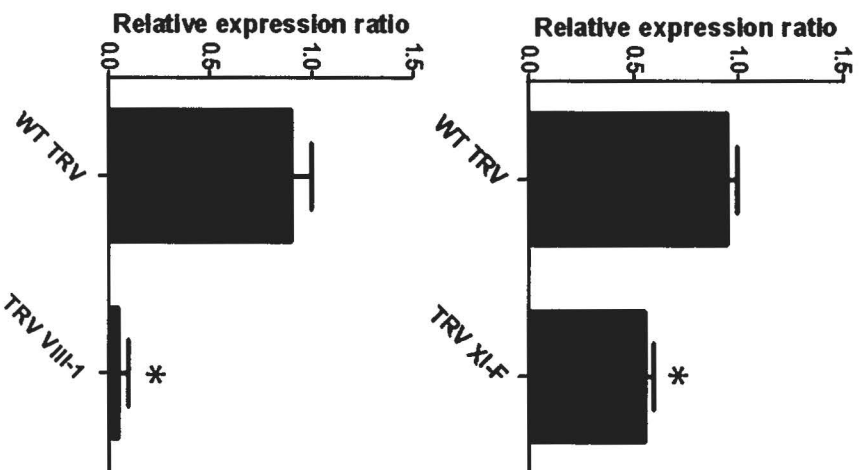
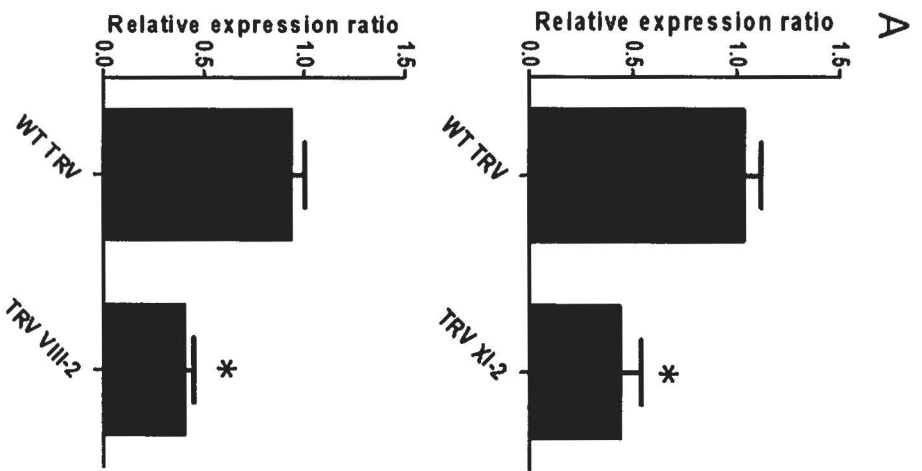


**Figure 6 : Microfilament network is required for TuMV sustained intercellular movement.** *N. benthamiana* leaves were infiltrated with DMSO (A), 10  $\mu$ M Oryzalin (B), 20  $\mu$ M Trifluralin (C), 5  $\mu$ M LatB (D), and 10  $\mu$ M CytD (E) 4 hours before agroinfiltration with *A. tumefaciens* containing pCambiaTuMVmCherry/GFP-HDEL. Images were taken at 4 dpi with a LSM 510 Meta confocal microscope (Zeiss). Scale bars = 200  $\mu$ m.) (F) Surface area of red-only fluorescent foci was calculated and expressed in fluorescence units. (G) Fluorescence intensity ratio of red over green foci was calculated and expressed in fluorescence units. Bars represent means of one experiment and standard errors for 20 replicates per treatment. Experiments were repeated 3 times. One-way analysis of variance calculation followed by Tukey's Multiple Comparison Test allowed analysis of differences between means: = NS, non significant(NS),\*\* 0.001<P value <0.01

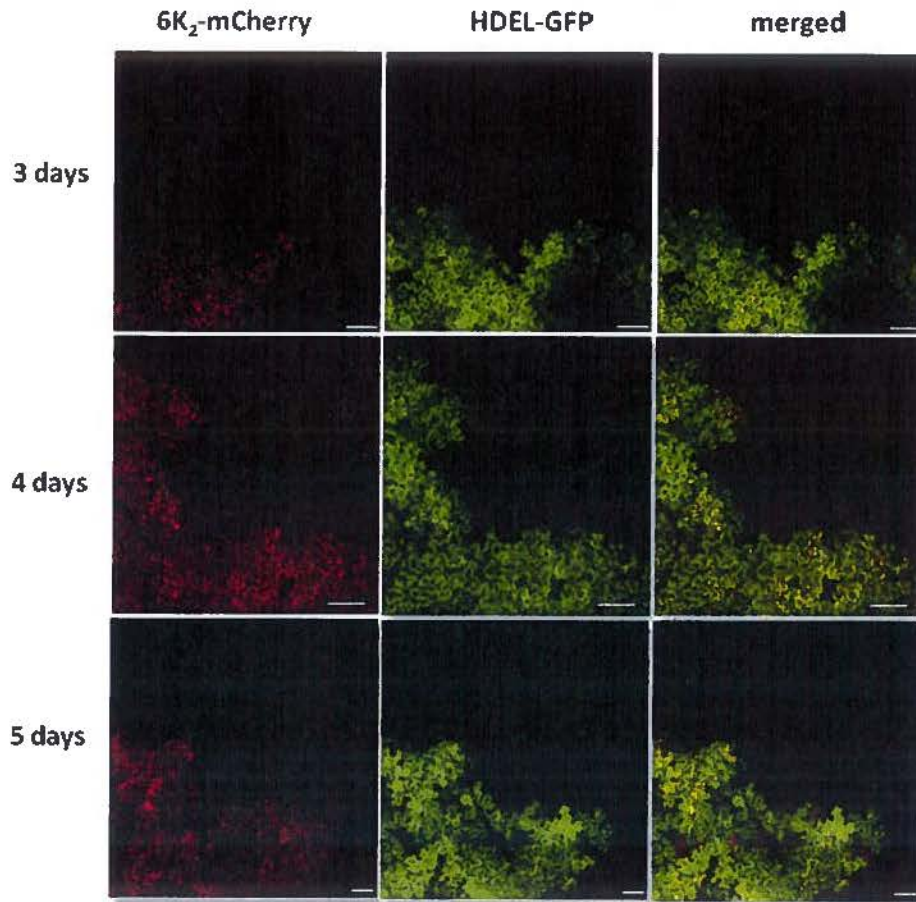


**Figure 7 : Myosin XI-2 is implicated in TuMV sustained intercellular movement.** (A) Quantitative RT-PCR was used to determine the relative expression ratio of target genes (myosin VIII-1, myosin VIII-2, myosin XI-2, and myosin XI-F) in lines treated with the indicated TRV silencing constructs versus a TRV control not expressing a myosin fragment. (B) *N. benthamiana* leaves silenced for individual myosin genes (myosin VIII-1, myosin VIII-2, myosin XI-2, and myosin XI-F) were agroinfiltrated with pCambiaTuMVmCherry/GFP-HDEL, and surface area of red-only fluorescent foci was calculated and expressed in fluorescence units 5 dpi. Wild-type TRV (TRV) or buffer (Mock) were used as controls. Bars represent means of one experiment and standard errors for 10 replicates per treatment. Experiments were repeated 3 times. One-way analysis of variance calculation followed by Tukey's Multiple Comparison Test allowed analysis of differences between means: = NS, non significant(NS), \*,  $P < 0.05$ .

(C) Level of expression of non-target myosins in *N. benthamiana* leaves silenced for myosin XI-2. The internal loading control for each sample was Actin-2. Expression analysis was performed on extracts from systemic leaves at 20 dpi with TRV constructs. Bars represent means of one experiment and standard errors for three replicates per treatment. One-way analysis of variance calculation followed by Tukey's Multiple Comparison Test allowed analysis of differences between means: = NS, non significant(NS), \*,  $P < 0.05$ . The experiment was repeated twice for each TRV silencing construct.

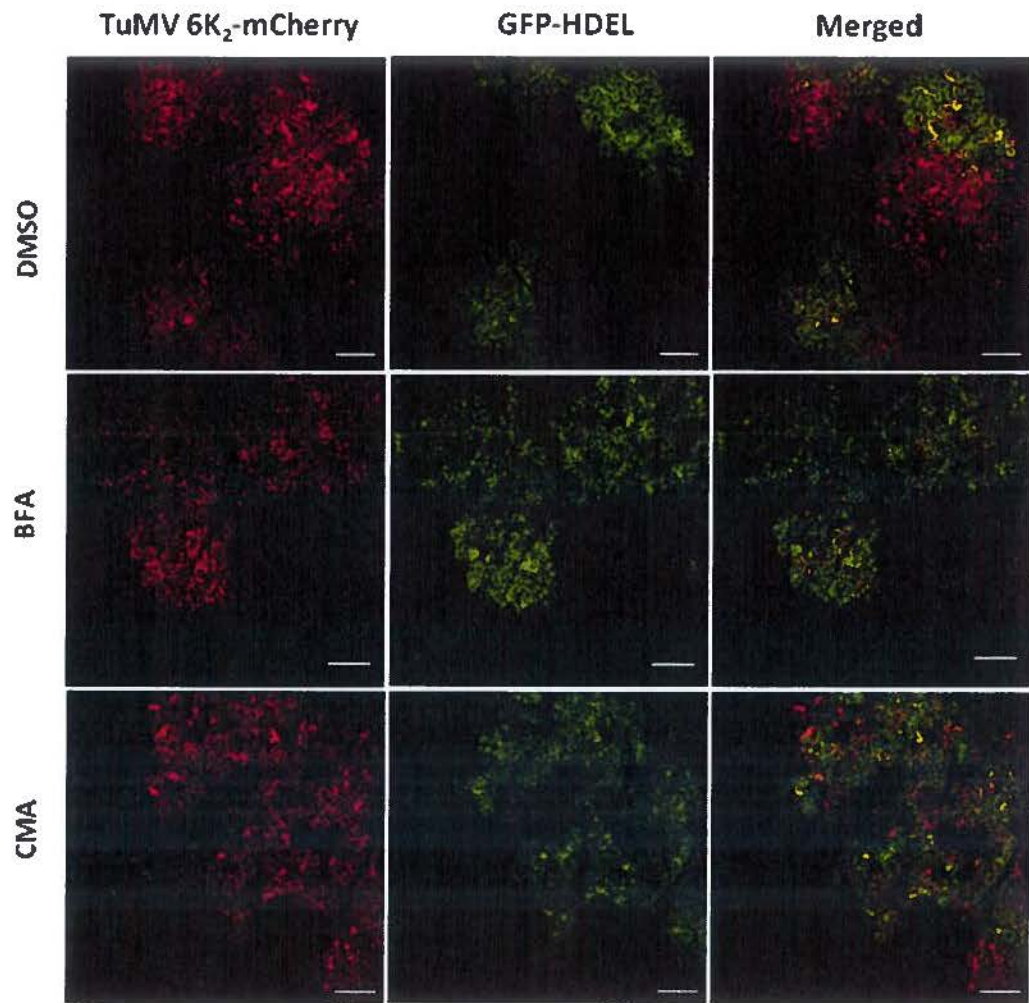


**Figure S1: Single-section confocal microscopy images at low magnification of *N. benthamiana* leaves agroinfiltrated with *A. tumefaciens* containing pCambia6K<sub>2</sub>mCherry/GFP-HDEL.** Images were taken at 3, 4, and 5 days post-agroinfiltration. The left panels show fluorescence emitted by the red channel from 6K<sub>2</sub>-mCherry-tagged vesicles, the middle panels show fluorescence emitted by the green channel from GFP-HDEL and the right are merged panels. Bar = 200  $\mu$ m.



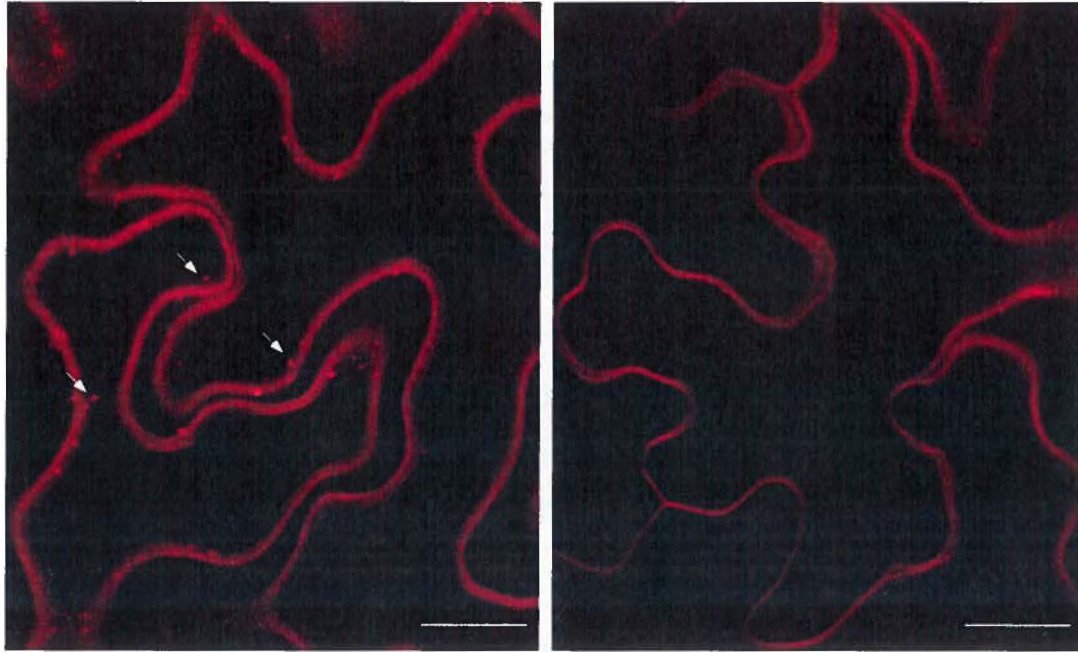
**Figure S2 : *N. benthamiana* leaves were infiltrated with DMSO, 10 µg/ml BFA and 0,5 µM CMA 3 days after being agroinfiltrated with *A. tumefaciens* containing pCambiaTuMVmCherry/GFP-HDEL and 20 hours before confocal observation.** The left panels show fluorescence emitted by the red channel from 6K<sub>2</sub>-mCherry-tagged vesicles, the middle panels show fluorescence emitted by the green channel from GFP-HDEL and the right are merged panels. Bar = 200 µm.





FM4-64

FM4-64 + wortmannin



**Figure S3.** Single-section confocal microscopy images show FM4-64-labeled endocytic vesicles (arrows, left panel) and inhibition of FM4-64-labeled endocytic vesicle formation by 20  $\mu$ M wortmannin treatment 4h prior staining (right panel). Bar = 20  $\mu$ m.

## Discussion

Intercellular movement of plant viruses requires intracellular trafficking of a viral RNA-protein complex from the site of viral RNA synthesis to Pd. Once this complex has reached Pd, it is then believed to transit through this organelle to enter a non-infected cell. In addition, the remaining components of the virus complex in the first infected cell must be properly metabolized to avoid stress responses that may over time limit intercellular transport (84). Past studies on sustained intercellular movement of some viruses have shown that viruses may use different trafficking pathways to move from one cell to another (149, 199). In this study, by discriminating agroinfiltrated primary-infected cells from cells infected by intercellular virus movement (Fig. 1), we were able to assess the contribution of the secretory pathway and the cytoskeleton for sustained TuMV intercellular movement. Our investigation indicated that TuMV intercellular movement depended on both the early and late secretory pathways and the actomyosin network. It is important to note in this study that disruption of either early or late secretory pathway had no impact on TuMV accumulation in initially infected cells. Previously, we have shown that in TuMV infected cells treated with BFA the recruitment of endomembrane organelles such as the ER and Golgi into the 6K<sub>2</sub> perinuclear structures and the formation of small peripheral 6K<sub>2</sub>-tagged vesicles were not affected (74). Breakdown of actin filaments also does not interrupt the formation of 6K<sub>2</sub>-tagged vesicles (45). Similarly, disruption of the early secretory trafficking by BFA does not modify the accumulation of Melon necrotic spot virus (MNSV) despite its negative impact on intercellular virus movement (67). Coronavirus-induced remodeling of the ER and viral replication, albeit reduced, equally takes place in the presence of BFA (111). These results support the idea that for some viruses replication activities can be influenced separately from those involved in other virus activities such as movement, although aspects of both are likely coordinated (226).

The secretory pathway is made up of distinct organelles that begins with cargo loading in the ER, transiting through the Golgi apparatus and sorting at the TGN for cargo downloading either at the plasma membrane or vacuoles (157). This pathway is modified during TuMV infection. First, protein secretion is inhibited during infection (45). Furthermore, replication leads to the formation of a large perinuclear structure (which is an amalgamation of ER, Golgi and COPII coatomers containing viral RNA and replication proteins), and motile peripheral vesicles (74). The perinuclear structure and peripheral vesicles are functionally linked, the latter having their origin in the perinuclear structure. It is believed that TuMV RNA translation and synthesis are

taking place in the perinuclear structure followed by packaging of a protein-viral RNA complex in motile vesicles for Pd targeting. A similar scenario has also been observed for PVX (225). A link between viral replication and movement has therefore been proposed (75, 157, 226) and that viral replication takes place in a remodeled structure (viral factory) involving at least the ER and Golgi, and that viral intracellular trafficking also requires the ER and Golgi. In the present study, we show that the early secretory pathway is indeed involved in viral replication and movement of TuMV (Fig. 2), as is the case for several viruses (7, 67, 95, 247). In addition, our data show that TuMV sustained intercellular transport is also dependent on post-Golgi traffic in the late secretory pathway as demonstrated by inhibition of cell-to-cell movement of TuMV following CMA treatment or co-expression of RAB-E1d(NI) (Fig. 3). Inhibition of endocytosis by either Tyrphostin A23 or Wortmannin does not appear to influence TuMV intercellular movement (Fig. 4). In addition, we revealed that there is no colocalization of 6K<sub>2</sub>-tagged peripheral vesicles with Ara7, a small Rab GTPase that marks the prevacuolar compartment, an organelle that lies in the endocytic trafficking pathway, and internalized FM4-64 that labels various endosomes. Therefore, we think that, in opposition to TMV and CaLCuV (123) and perhaps Potato mop-top virus (87), intercellular movement of TuMV can be achieved without a functional endocytosis. The role of endocytosis in TMV movement has been proposed to be involved in the turnover of viral proteins in Pd after viruses move out or to fine tune of the amount and position of viral proteins in Pd before viruses move out (123). Why endocytosis may not be involved in TuMV movement? Perhaps TuMV does not have a dedicated MP but a group of viral proteins for Pd modification and endocytosis would not be needed for proper conformation of the viral complex for Pd modification.

Intercellular movement is contingent on intracellular movement of the viral RNA-protein complex from the site of replication to Pd. In the case of TuMV, peripheral 6K<sub>2</sub>-tagged vesicles were shown to be motile, to contain viral RNA (45) and to be targeted to Pd (Grangeon et al., in preparation). Hence, these 6K<sub>2</sub> vesicles are the likely vehicles for intracellular movement of the viral RNA to Pd. It is interesting to note that, although a disruption of protein transport by either BFA or expression of dominant negative mutants of ARF1 and RAB-E1d affected TuMV intercellular movement, the formation of 6K<sub>2</sub>-tagged vesicles appeared normal (this study and (74)). A closer inspection of the vesicles revealed that there was an increased co-localization with Sec24 upon BFA treatment (74), indicating that the transit of 6K<sub>2</sub> vesicles through the secretory pathway involves recruiting and then shedding off of COPII coatomers to and from the peripheral 6K<sub>2</sub>-tagged vesicles. One can then hypothesize that intracellular movement of TuMV

involves the transport of the 6K2 tagged viral RNA complex along the classic secretory pathway composed of the ER, Golgi, TGN and plasma membrane to Pd and that key components responsible for such a transport in the 6K2 vesicles undergo a series of changes and/or modifications during their transit in the secretory pathway for proper Pd targeting and hence intercellular movement.

TuMV 6K<sub>2</sub>-tagged vesicles have been shown to be associated with and to move along microfilaments (45). Alignment of viral proteins and viral RNA-protein complexes with the actin cytoskeleton has been reported in other viruses (82, 90, 117, 126, 225, 251). Here we demonstrated that the intercellular movement of TuMV appears to depend on intact microfilaments, but not microtubules (Fig. 6). Because the formation of 6K<sub>2</sub> vesicles is not affected when actin filaments are disrupted (45) and that the actomyosin system is the major driving force for vesicle and organelle motility in plant cells (39) we therefore think that when actin filaments are severed, these 6K<sub>2</sub> complexes may not move properly along the secretory pathway to reach Pd and then enter neighboring cells. Alternatively, it has been recognized in case of TMV infection that the remaining viral components after successful cell-to-cell spread of the virus from the first infected cell need to be mobilized for degradation to avoid stress responses that may over time limit intercellular transport (84). Such mobility may involve the cytoskeleton. Therefore, it is also possible that in the absence of a functional actin network, the complexes left in the originally infected cell may not be properly mobilized and degraded, and hence intercellular movement of TuMV may be reduced

Different myosin motor proteins are required by different viruses for intracellular or intercellular movement (5, 16, 83, 254). In plant cells, myosins are classified into two classes: Myosin VIII and myosin XI (39). Among the four myosins tested in this study, myosin XI-2 was the principal driver for TuMV transport between the cells but not myosin VIIIs and XI-K. Interestingly, myosin XI-K was involved in the recruitment of 6K<sub>2</sub> vesicles to chloroplasts (245). Therefore, it seems that different aspects of TuMV physiology requires different myosins. Additionally, myosin VIIIs are localized in the cell periphery and cell wall (178) and are involved mainly in endocytosis (193). Therefore the data that silencing VIIIs does not affect cell-to-cell movement of TuMV is in line with the data that endocytosis is not involved in TuMV movement. Moreover, it is worth noting that viral components necessary for intercellular movement and the virus genome may not be targeted en bloc to Pd and may use different trafficking systems. For instance, the actinomyosin system is not required for delivery of P3N-PIPO and CI to Pd (248). In support of

this hypothesis, host proteins can also use different routes to reach Pds. Targeting of the Plasmodesmata Located Protein 1 (PDLP1) to Pd requires both the ER-Golgi secretory pathway and the actomyosin motility system (224) while the targeting of the plasmodesmata callose binding 1 (PDCB1) protein was shown not to depend on myosin motors (5). Perhaps, P3N-PIPO and CI need to be targeted to Pd prior to the moving viral RNA-protein complex comes into the vicinity of Pd in order to receive and anchor the complex to this organelle.

In conclusion, we show in this study that the classic secretory pathway and the actomyosin system are both important for the sustained intercellular movement of TuMV. These host components are likely required by the virus to aid its movement out of the initially infected cell. Further work is necessary to identify host proteins within the secretory pathway and the actomyosin network that may interact with the virus proteins and influence virus movement.

## **Materials and Methods**

### **Fluorescent proteins and molecular clones**

TuMV infectious clone pCambiaTunos/6KmCherry was as described (45, 223). ARA7/RabF2b was as described (78). The introduction of the 35S-GFP-HDEL gene cassette into pCambiaTunos/6KmCherry was completed as follows: pBIN/20-ER-gk (146) was digested with *AseI* and ligated with similarly digested pCambiaTunos/6KmCherry. Kanamycin-resistant *Escherichia coli* colonies were screened for pCambiaTunos/6KmCherry/GFP-HDEL.

### **Protein expression in plants**

Transient expression studies were performed by agroinfiltration on three-week-old *N. benthamiana* plants. Plasmids were introduced by electroporation into *Agrobacterium tumefaciens* AGL1 and selected on LB ampicillin-kanamycin plates. The pellet of an overnight culture was gently suspended in water supplemented with 10 mM MgCl<sub>2</sub> and 150 μM acetosyringone and left at room temperature for 3 h. The solution was then diluted to an OD<sub>600</sub> of 0.6 for pCambiaTunos/6KmCherry/GFP-HDEL; 0.1 for pARF1(Ni), pRAB-E1d(NI) and pYFP-RAB-F2<sup>b</sup> ; 1.5 for PTRV1 and PTRV2. For co-expression, 1:1 mixture of the two AGL1 bacteria

containing the plasmids of interest were agroinfiltrated. Plants were kept for 3-20 days post-agroinfiltration (dpa) in a growth chamber until observation.

### **FM4-64 staining**

Small pieces of *N. benthamiana* leaves were cut and dipped in 1 µg/µl of FM4-64 (Molecular Probes). Leaves were incubated at room temperature for 40-45 minutes and observed by confocal laser microscopy.

### **Inhibitor treatment**

Stock solutions of latrunculin B (LatB: 2.5 mM Calbiochem), cytochalasin D (CytD; 20 mM Calbiochem), trifluralin (20 mM Chem-Service) and oryzalin (10 mM [ChemService]) were prepared in dimethyl sulfoxide (DMSO) and diluted to the desired concentration in water prior to their infiltration into 3-week-old *N. benthamiana* leaves. The final concentration of Brefeldin A (BFA), CMA, Tyrphostin A23, Tyrphostin A51 and Wortmannin were 10 µg/ml, 0.5 µM, 30 µM, 30 µM, and 20 µM, respectively. *N. benthamiana* leaves were agroinfiltrated with the inhibitors 4 hours before pCambiaTunos/6KmCherry/GFP-HDEL agroinfiltration. The leaves were observed by confocal microscopy after a 96-hour incubation period.

### **VIGS and Quantitative RT-PCR**

pTRV2 with myosin fragments was as described (83). Virus-induced gene silencing (VIGS) studies were conducted as described previously (73, 129). vTRV infections were established in *N. benthamiana* by co-agroinfiltration of pTRV1 and pTRV2. To confirm silencing of specific myosin transcripts, RNA was isolated from 20 day-old TRV-infected systemic leaves (two plants/construct) using the RNeasy plant mini kit (Qiagen). DNase-treated RNA (4 µg) was used to generate cDNA with iScript™cDNA Synthesis Kit. After a 15-fold dilution of the cDNA, 2 µL of solution was used for quantitative RT-PCR through a Rotor Gene 3000 real-time DNA detection system (Corbett Research). The following primers were used to detect

*N. benthamiana* myosins: VIII-1: 5'-GCCCCGAGAGAGCAATGGA-3' and 5'-CCTCAGCTAATCGGCTTATAACACT-3'; VIII-2: 5'-ACTCCTATTGAATTTGCCAGCAA-3' and 5'-CTGCACATAAACTGCCATTATTCC-3'; XI-2: 5'-CAACTCCTACCCGCAAACCA-3' and 5'-TCCCATTGTCATTCTCCCAA-3'; XI-F: 5'-GCACAGGGTTTTTCGCTCAA-3' and 5'-CCCTCAATTCCGCTGTATCC-3'. Transcript levels were adjusted for loading differences after comparison with Actin-Binding Domain 2 (ABD2) transcript internal control values and were calculated using the Delta-Delta CT METHOD. *N. benthamiana* leaves (x number of leaves above the original TRV-inoculated leaf(ves) were agroinfiltrated with pCambiaTunos/6KmCherry/GFP-HDEL 16 days after TRV infection. The leaves were observed 4 days later by confocal microscopy.

### **Confocal microscopy**

Agroinfiltrated leaf sections were mounted on a depression microscope slide, aligning the leaf tissue in the well. Cells were observed using a 10X objective, 20X, 40X and 63X oil immersion objective on a LSM 510 Metaconfocal microscope (Zeiss) or on a LSM 780 Metaconfocal microscope (Zeiss). For LSM 510 Metaconfocal microscope experiments, argon and HeNe lasers were used to excite fluorescent proteins and for a LSM 780 Metaconfocal multiline argon and DPSS 561 were used. Data from both green and red channels were collected at the same time.

After acquisition, images were processed using Metamorph and/or ImageJ to quantify the average intensity of fluorescence, Carl Zeiss LSM Image Browser, and/or Adobe Photoshop software for post-capture imaging processes.

### **Statistical Analyses:**

Graphpad Prism One-way analysis of variance (1 way ANOVA) was used to assess the overall statistical differences between the means of different groups. Following 1 way ANOVA, Tukey's Multiple Comparison Test was also used to assess whether the mean of two particular groups were different from each other. P value summary ( $P < 0.05$ ) shows statistically significant differences between different treatments.



## **ACKNOWLEDGMENTS**

We thank M. Desrosiers, J. Tremblay and J. Lacoste for helping with confocal microscopy. This study was supported by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada and from Le Fonds de recherche du Québec – Nature et technologies to HZ and JFL.

## Chapitre 4 : Discussion générale

L'objectif principal de ce projet était de déterminer les différentes composantes de la machinerie de transport cellulaire impliquées dans le mouvement intercellulaire du TuMV. Pour ce faire, nous avons construit un clone du TuMV permettant d'analyser son mouvement dans diverses conditions, notamment en inhibant les voies de sécrétion précoces et tardives, la voie endocytaire et le cytosquelette d'actine et de myosine. Les données issues de cette recherche et les informations trouvées dans la littérature ont été utilisées pour construire un modèle hypothétique du mouvement intercellulaire du TuMV.

### Mode de propagation du TuMV

Diverses études ont été menées sur le mouvement intercellulaire viral dans la plante. Mais les techniques utilisées par ces dernières peuvent susciter différentes questions. De manières générales, ces études observent l'effet d'un traitement ou d'une condition particulière sur le mouvement intercellulaire viral en déterminant la taille et le nombre des foyers d'infection du virus recombinant qui est couplé à une protéine fluorescente. La différence observée entre l'échantillon contrôle et l'échantillon traité est par la suite interprétée comme étant le résultat direct du traitement sur le mouvement intercellulaire viral. La limitation de cette technique vient du fait qu'elle ne permet pas de dissocier le mouvement intercellulaire viral de la réplication et de la synthèse d'ARN. Selon les conditions, une diminution en taille et en nombre de foyers d'infection pourrait aussi bien être dû à un défaut de synthèse d'ARN viral, une faible réplication, ou à une incapacité de se déplacer pour rejoindre les PDs et les traverser. En construisant le clone viral pCambiaTuMVmCherry/GFP-HDEL, nous avons donc trouvé un moyen de pallier à cela et nous nous sommes alors concentrés uniquement sur l'aspect mouvement du cycle d'infection viral. De plus, contrairement aux autres études qui d'habitude n'ont que la MP comme indicateur de mouvement viral, ici nous avons été en mesure d'étudier le mouvement du virus en temps réel.

Le mouvement intercellulaire du TuMV commence 3 jours après l'infection de la plante. La plage de cellule infectée grandie de jour en jour. Elle est passée de 10 à 20 cellules après 4 jours et à environ 50 cellules après 5 jours. Trois jours après le début de la propagation viral, soit au

sixième jour, le virus semble avoir arrêté ou ralenti sa propagation, du moins dans les cellules épithéliales. À ce stade-ci, nous pouvons supposer que le virus a atteint les cellules du mésophile, d'où il va atteindre les tissus vasculaires et par la suite se propager dans toute la plante. Il a d'ailleurs été mentionné que l'infection virale se propage des cellules épithéliales vers les cellules du mésophile en l'espace de 4 à 10 jours (51, 135). Certains travaux ont déterminé que le taux moyen de propagation est de 6 cellules par jours pour le TMV (175) et de 8 cellules par jours pour le virus de la mosaïque du navet jaune (TyMV) (86). Ce qui concorde avec la pensée générale voulant que les cellules soient infectées les unes après les autres laissant au virus le temps de s'établir complètement dans chacune d'elle. Pour ce qui est du TuMV, la rapidité avec laquelle le virus se propage ne nous permet pas de lui attribuer un taux de propagation journalier, mais par contre de supposer un autre mode de propagation.

Nous supposons alors que plutôt que de s'établir complètement dans les cellules les unes après les autres (figure 6), l'entité virale du TuMV est capable de rejoindre plusieurs cellules en même temps à partir du principal foyer d'infection (figure 7). Afin de confirmer cette hypothèse, il serait intéressant de pouvoir observer pendant plusieurs heures (4 à 12h) une feuille 3 jours après l'avoir agroinfiltrée avec le clone viral pCambiaTuMVmCherry/GFP-HDEL. Une reconstitution des images acquises pourrait nous permettre de voir si le virus bouge suivant un front progressif ou s'il apparaît de façon spontanée dans plusieurs cellules en même temps.

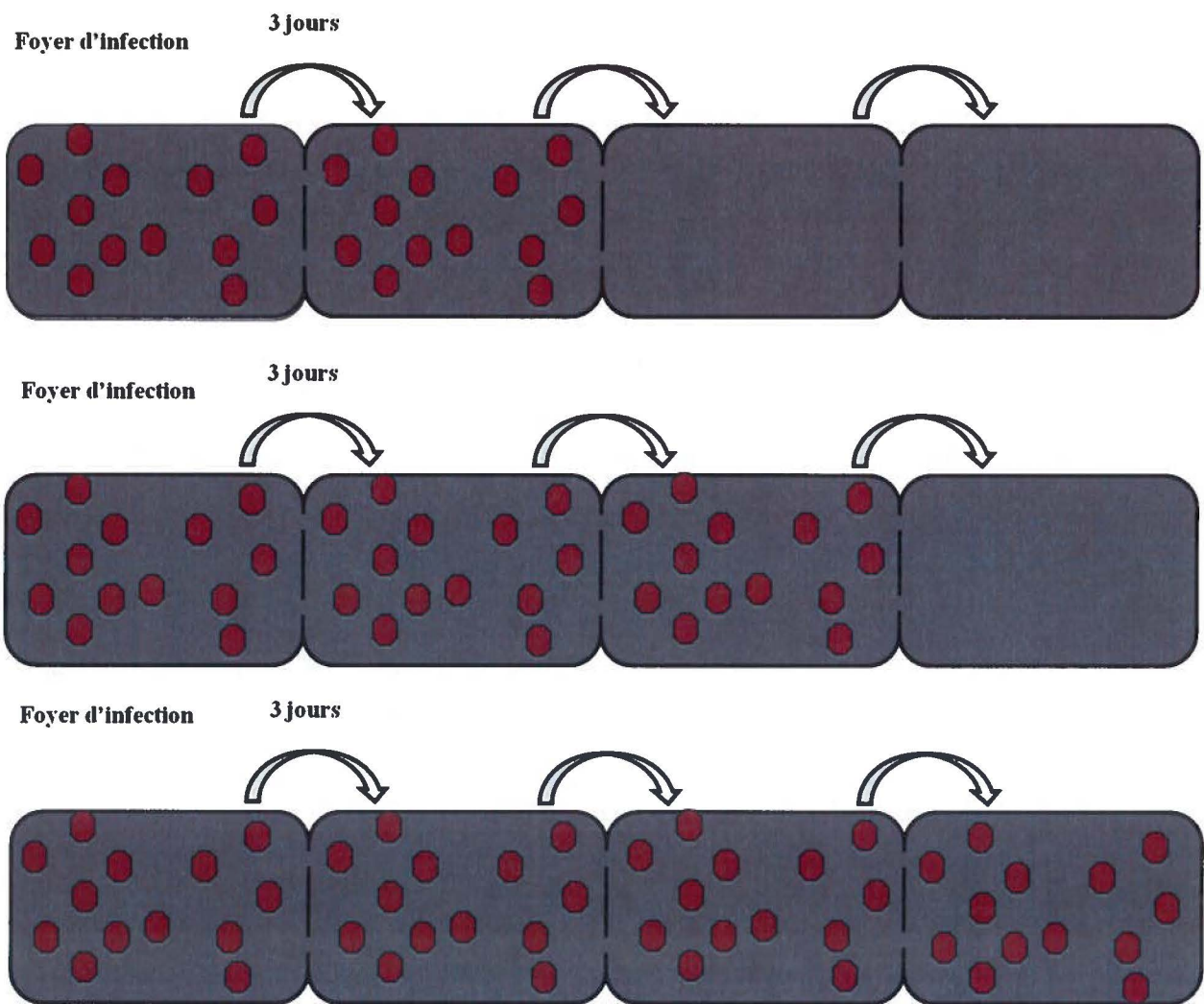


Figure 6 : Modèle conventionnel pour la propagation virale

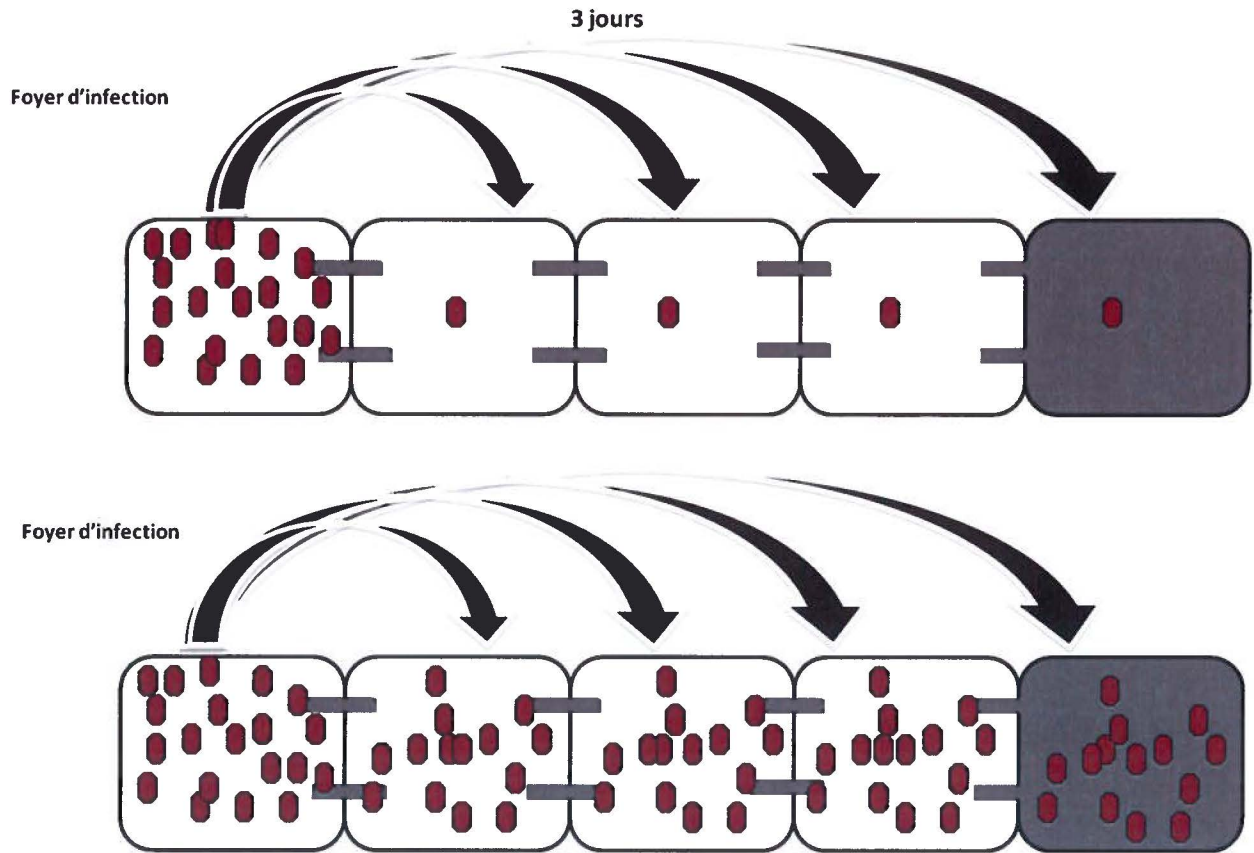


Figure 7 : Modèle pour la propagation virale du TuMV

## **Le TuMV et la machinerie de transport cellulaire**

Le mouvement intercellulaire est une étape cruciale du processus infectieux viral. Tout comme la plupart des étapes du cycle de réplication virale, celle-ci ne peut se faire sans la participation des facteurs de l'hôte. La machinerie de transport cellulaire est composée en outre du système sécrétoire, de la voie endocytaire et du cytosquelette. Les virus n'ont pas les mêmes modes de fonctionnement et ils utilisent différentes composantes de cette machinerie cellulaire et mécanismes pour transporter leur entité virale de cellule en cellule (199).

Le système de sécrétion de la plante se divise en plusieurs étapes. Les protéines destinées à utiliser cette voie de biosynthèse/sécrétion intègrent de façon co-translationnelle la lumière du réticulum endoplasmique (ER). Dans ce compartiment, les protéines vont subir diverses modifications. Elles sont par la suite regroupées dans des régions spécialisées du ER, aussi appelées sites de sortie (ERES pour Endoplasmic Reticulum Exit Sites). Les protéines présentes dans les ERES sont ensuite acheminées vers le compartiment intermédiaire ERGIC (Endoplasmic Reticulum/Golgi Intermediate Compartment), compartiment de triage entre les protéines qui retournent vers le ER et celles qui continuent leur route vers le Golgi. En traversant les différentes citernes du Golgi (dans l'ordre du transport antérograde, cis, médian, et trans-Golgi), les protéines passent par un processus de maturation. Certaines protéines retourneront vers le ER par transport rétrograde à partir des saccules du Golgi, mais la plupart atteindront à ce stade le réseau trans-golgien (RTG ou TGN pour Trans-Golgi Network). Le TGN permet le triage des protéines à un stade tardif du transport et est impliqué dans la spécification de l'adressage des protéines vers la voie lysosomale ou vers des domaines spécialisés de la membrane plasmique tel que les PDs.

Toutes ces étapes sont séparées en deux phases : une précoce et une tardive. La phase précoce comprend les étapes allant du ER au Golgi, et la phase tardive toutes les étapes commençant au TGN (192).

Alors que certaines données laissaient penser que certains virus pourraient se passer du système sécrétoire (166, 198, 215), de récentes études ont montré que pour bon nombre de virus, cette voie est nécessaire pour que leurs protéines de mouvement puissent rejoindre les PDs (40, 67, 87, 117, 238, 248). Le point commun de ces études est qu'elles se sont toutes focalisées sur la phase précoce du système de sécrétion de la plante. Dans le but de déterminer l'importance du système de sécrétion dans le mouvement intercellulaire du TuMV, nous nous

sommes intéressés autant à sa phase précoce qu'à sa phase tardive. Nous avons utilisé différentes stratégies qui ont mené à l'inhibition du transport antérograde et rétrograde entre le ER et l'appareil de Golgi et aussi bloqué le trafic partant du TGN et du Golgi vers la membrane plasmique. Toutes ces modifications de la voie de sécrétion ont eu un effet drastique sur le mouvement du TuMV sans pour autant affecter sa capacité de se répliquer. Nos résultats nous ont permis de conclure que toutes les étapes du système de sécrétion, qu'elles soient précoces ou tardives sont nécessaires au TuMV pour assumer son mouvement. Ces résultats concordent aussi avec une étude précédente qui a montré que la protéine des PDs PDLP1, et les protéines virales P3NPIPO et CI responsables entre autres du bon déroulement du mouvement intercellulaire des potyvirus rejoignent les PDs en passant par le système de sécrétion de la plante (248).

Dans le règne animal, la méthode virale de choix pour passer d'une cellule infectée à une autre, est l'endocytose (88). Pour les virus des plantes, il est considéré que le mouvement intercellulaire se fait par l'entremise des PDs sous l'action de la MP (35, 121, 132, 136, 248) mais l'implication de l'endocytose lors de ce processus est controversée (195). *Watts et al* (244) réfutent l'implication de l'endocytose lors de l'infection virale. Par contre, suite à ses observations de protoplastes infectés en microscopie électronique Takebe et Otsuki (154, 216) soutiennent l'hypothèse contraire selon laquelle la particule virale entre dans les protoplastes par endocytose. Récemment une étude a montré que les MP TGB2 et TGB3 du Potato mop-top virus (PMTV) sont toutes les deux recrutés dans des endosomes marqués au FM4-64 desquels elles pourraient se rendre soit aux PDs, soit vers la vacuole (87). Une autre étude portant sur *le Cabbage leaf curl virus* (CaLCuV) et le TMV à quand à elle montré que l'inhibition de la synaptotagmin (SYTA) qui est un régulateur de l'endocytose, induit l'arrêt du mouvement intercellulaire de leur MP (123). Dans tous les cas, ceci suppose que la voie endocytaire pourrait jouer un rôle crucial dans le mouvement intercellulaire de ces virus, mais en est-il de même en condition d'infection?

Nous avons alors regardé l'effet de l'inhibition de la voie endocytaire lors du mouvement intercellulaire du TuMV. Pour ce faire, nous avons empêché l'action de la clathrine menant à l'internalisation de protéines dans des compartiments d'endocytose, et bloqué la morphogénèse des complexes multivésiculaires et des compartiments prévacuolaires. Aucune de ces perturbations n'ayant eu d'effet sur le mouvement intercellulaire du TuMV, nous avons regardé la distribution cellulaire des complexes de réplication du virus par rapport à certains

compartiments endocytaires. Qu'ils aient été formés par la protéine Rab, AtRabF2b (Ara7) ou marqués par le colorant membranaire FM4-64, la distribution cellulaire des compartiments endocytaires était totalement différente de celle des complexes de réplication du virus.

Le fait que la perturbation de la voie endocytairre n'ait aucun effet sur le mouvement du TuMV laisse supposer soit que les protéines virales et les facteurs de l'hôte qui doivent se rendre aux PD pour assurer le mouvement du virus ne s'y rendent pas en étant internalisé dans des vésicules, soit que l'entité virale ne peut passer d'une cellule à l'autre via un processus d'endocytose/exocytose - du moins pas dans le cas de l'endocytose dépendante de la clathrine.

On aurait aussi pu supposer qu'une partie des protéines virales et cellulaires soit dégradée dans les lysosomes, et que l'inhibition de la formation des compartiments prévacuolaires et des complexes multivesiculaires empêcherait cette dégradation et augmenterait de ce fait même la propagation virale. Ce n'a pas été le cas. Nous pouvons alors conclure que la voie endocytairre n'est pas impliquée lors du mouvement intercellulaire du TuMV.

L'importance du cytosquelette lors du mouvement intercellulaire viral a déjà été soulignée pour plusieurs virus (5, 83, 87, 101, 112, 126). Au cours de ces études, les protéines virales ont été montrées en association avec les microfilaments d'actines ou les microtubules. Cotton et al ont montré que les vésicules du TuMV s'alignent avec les microfilaments d'actine et bougent le long de ces derniers à l'intérieur de la cellule (45). De plus, l'absence d'un cytosquelette d'actine fonctionnel n'a pas empêché la formation des vésicules virales du TuMV. Donc, contrairement au cas des poliovirus, le rôle des microfilaments lors du cycle de réplication du TuMV n'est pas d'aider à la formation et à la maturation des vésicules de réplication (58). Le but de cette association entre le cytosquelette d'actine et les vésicules virales du TuMV était méconnu jusqu'à tout récemment. Selon *Wei, Huang et al* le mouvement intracellulaire des vésicules du TuMV le long des microfilaments leurs permet de rejoindre les chloroplastes (245). Dans nos travaux, nous avons constaté que contrairement aux microtubules, la dépolymérisation des microfilaments d'actine a stoppé la propagation virale en empêchant le mouvement intercellulaire. Nous supposons alors que les vésicules de réplifications du TuMV quittent leur site de réplication principale en se déplaçant le long des microfilaments pour rejoindre les PDs et les traverser.

Toute entité se déplaçant le long des microfilaments a besoin de protéines motrices. Ces protéines motrices sont les myosines. Chez les plantes, il existe différents types de myosines appartenant soit à la classe VIII soit à la classe XI. Bien que le rôle de ces protéines soit



redondant, certaines d'entre elles sont impliquées dans des processus spécifiques tel le trafic entre certaines organelles et la croissance des racines (17, 161). Il existe plusieurs exemples de virus de plantes nécessitant l'action des myosines pour assurer leur propagation et dont le mouvement nécessite l'action d'une myosine en particulier (5, 16, 83, 254). Nous nous sommes intéressés à 4 myosines en particulier. Les myosines VIII-1, VIII-2, XI-2 et XI-K. Parmi ces 4 myosines, seule la myosine XI-2 s'est avérée être la principale protéine motrice impliquée dans le mouvement intercellulaire du TuMV. Cependant, selon une étude précédente la myosine XI-K est responsable du mouvement intracellulaire des vésicules de réplication de TuMV vers les chloroplastes (245). On peut donc croire que le choix d'une myosine au détriment d'une autre par le virus dépend de l'étape du cycle de réplication et de la destination finale de l'entité virale.

À la différence des autres études, nos expériences ont été réalisées avec le virus entier et non avec quelques protéines virales seulement. Nous savons alors que pour se déplacer d'une cellule infectée à une autre et ainsi établir son infection, le TuMV a besoin du système de sécrétion, des microfilaments d'actine et de la myosine XI-2. Concordant avec nos résultats, une étude récente a mentionné que les myosines de la classe XI sont impliquées dans le trafic des vésicules sécrétées vers la membrane plasmique et/ou les PDS (5). Il y est aussi démontré que les myosines XI-K et XI-2, mais pas XI-F, ni VIII-1, VIII-2 et VIII-B sont requises pour permettre à la protéine PDLP1 de rejoindre les PDS (5). Considérant le rôle des myosines XI-2 et XI-K dans le transport du ER (229) et le fait que les protéines P3N-PIPO et CI rejoignent les PDs sans l'implication des myosines (248), nous pensons que la myosine XI-2 facilite le mouvement du TuMV en transportant sa vésicule de réplication et la protéine PDLP1 du ER aux PDs.

P3N-PIPO et CI rejoignent les plasmodesmes en utilisant le système sécrétoire, mais ne nécessite pas l'action des microfilaments d'actine et de myosine. PDLP1 quant à elle a besoin autant du système sécrétoire de la plante, que de l'actine et des myosines. Nous pensons alors que toutes les protéines participant au mouvement intercellulaire du TuMV ne sont pas transportées en bloc, mais rejoignent les PDs suivant différents itinéraires. Ces différents itinéraires constitueraient alors les différentes ramifications de la principale voie allant du ER à l'appareil de Golgi et à la membrane plasmique.

Sur la base des données présentées dans ce travail et d'autres études, nous proposons le modèle suivant pour décrire le mouvement intercellulaire du TuMV (figure 8). Les vésicules de réplication du TuMV bourgeonnent au niveau du ERES, à partir d'une structure globulaire virale perinucléaire (74). À partir du ERES, les vésicules vont migrer le long des microfilaments

d'actine pour rejoindre la membrane plasmique et les PDs. La force nécessaire à la traction le long des microfilaments est générée par la myosine XI-2. Vu que le transport de la protéine PDLP1 dépend aussi de la myosine XI-2 elle rejoint probablement les PDs en étant associée au complexe de réplication viral. Les protéines P3N-PIPO et CI quant à elles rejoignent les PDs en utilisant une autre voie qui pourrait être soit celle empruntée par la plupart des protéines, c'est-à-dire la voie de sécrétion habituelle allant de ER à la membrane plasmique en passant par l'appareil de Golgi, soit la diffusion passive.

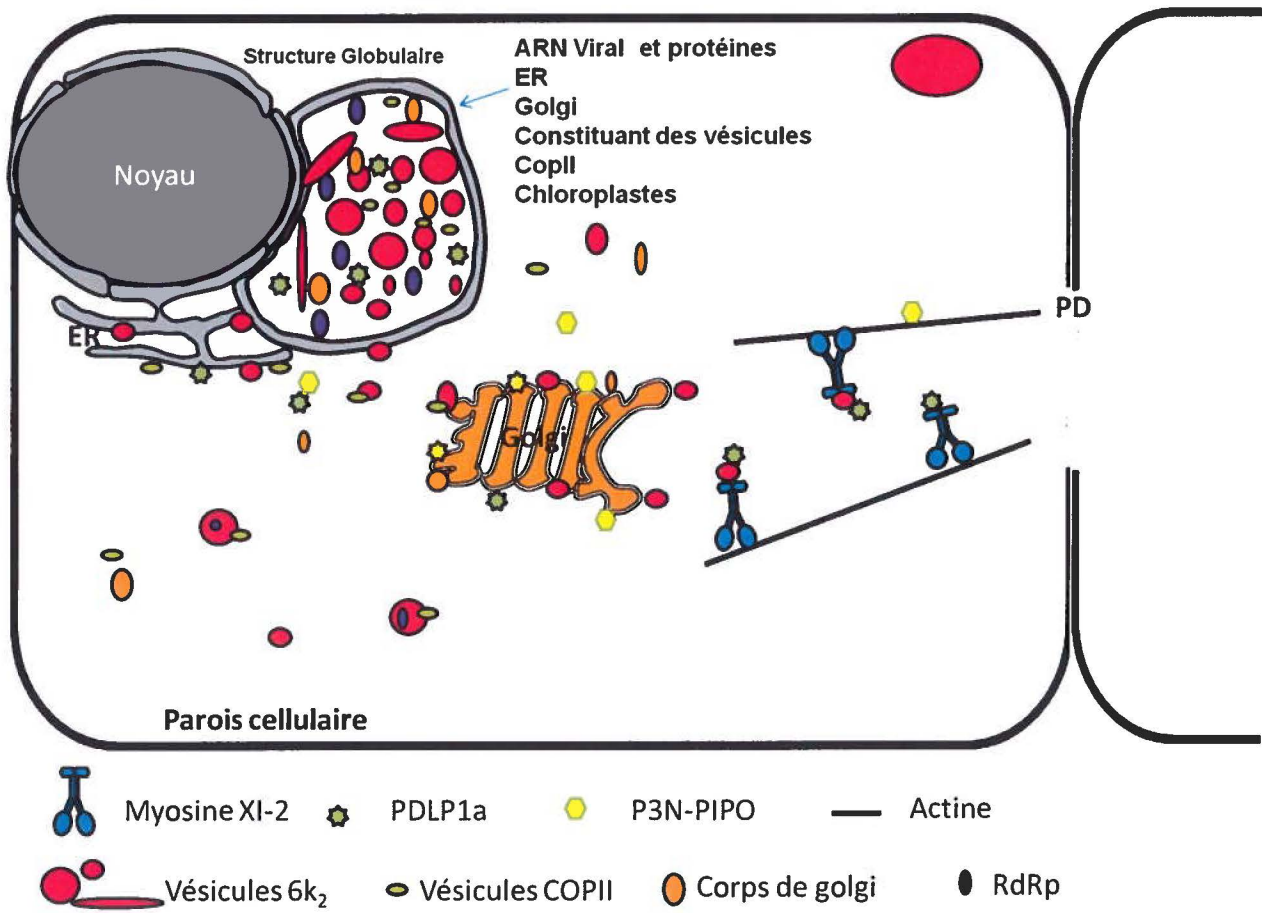


Figure 8 : Modèle hypothétique du mouvement intercellulaire du TuMV.

## Conclusion et perspective.

Bien que les virus fassent preuve de génie en développant différentes stratégies leur permettant d'outrepasser le système de défense de la plante et infecter ainsi cette dernière, il n'en demeure pas moins qu'en tant que parasites, ils sont limités par l'équipement cellulaire à leur disposition.

L'une de ses stratégies consistant à pouvoir se déplacer de cellule en cellule, nous avons montré dans cette étude que le TuMV exploite à la fois le système de sécrétion, le cytosquelette d'actine et de myosine de la plante pour pouvoir la coloniser cellule après cellule. Ces facteurs lui sont indispensables, et sans ces derniers, le TuMV devient presque totalement prisonnier des cellules dans lesquelles il a été inoculé. Nos données nous ont alors permis de proposer un modèle hypothétique de la stratégie de mouvement utilisée par le TuMV.

En plus de la création d'un nouvel outil pour l'étude du mouvement intercellulaire viral, ce projet apporte des renseignements importants pour la compréhension de la pathogenèse virale, et sur le fonctionnement de différents processus cellulaires.

De plus, nos résultats ont une signification pratique pour ceux qui œuvrent dans le domaine de l'agriculture et qui sont constamment à la recherche de nouvelles stratégies de lutte. Cette nouvelle stratégie consisterait à créer des plantes résistantes à certains pathogènes. Cette résistance serait acquise par la diminution de facteurs de la cellule hôte qui serait nécessaire au bon développement du virus (par exemple myosine XI-2), mais n'affecterait pas ou très peu le développement de la plante.

Cependant, d'autres études devront être menées afin de pouvoir identifier parmi les protéines virales, et les protéines cellulaires celles qui interagissent entre elles le long du réseau d'actine et de myosine et de la voie de sécrétion.

## References

1. Ahlquist, P., A. O. Noueir, W.-M. Lee, D. B. Kushner, and B. T. Dye. 2003. Host Factors in Positive-Strand RNA Virus Genome Replication. *Journal of virology* 77:8181-8186.
2. al., H. e. 1995.
3. Alzhanova, D. V., A. J. Napuli, R. Creamer, and V. V. Dolja. 2001. Cell-to-cell movement and assembly of a plant closterovirus: roles for the capsid proteins and Hsp70 homolog. *EMBO J* 20:6997-7007.
4. Amari, K., E. Boutant, C. Hofmann, C. Schmitt-Keichinger, L. Fernandez-Calvino, P. Didier, A. Lerich, J. Mutterer, C. L. Thomas, M. Heinlein, Y. Mély, A. J. Maule, and C. Ritzenthaler. 2010. A Family of Plasmodesmal Proteins with Receptor-Like Properties for Plant Viral Movement Proteins. *PLoS Pathog* 6:e1001119.
5. Amari, K., A. Lerich, C. Schmitt-Keichinger, V. V. Dolja, and C. Ritzenthaler. 2011. Tubule-Guided Cell-to-Cell Movement of a Plant Virus Requires Class XI Myosin Motors. *PLoS Pathog* 7:e1002327.
6. Anandalakshmi, R., G. J. Pruss, X. Ge, R. Marathe, A. C. Mallory, T. H. Smith, and V. B. Vance. 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:13079-13084.
7. Andika, I. B., S. Zheng, Z. Tan, L. Sun, H. Kondo, X. Zhou, and J. Chen. 2013. Endoplasmic reticulum export and vesicle formation of the movement protein of Chinese wheat mosaic virus are regulated by two transmembrane domains and depend on the secretory pathway. *Virology* 435:493-503.
8. Andreev, I. A., S. Hyon Kim, N. O. Kalinina, D. V. Rakitina, A. G. Fitzgerald, P. Palukaitis, and M. E. Taliany. 2004. Molecular Interactions Between a Plant Virus Movement Protein and RNA: Force Spectroscopy Investigation. *Journal of Molecular Biology* 339:1041-1047.
9. Andrew MQ King, E. L., Michael J. Adams , Eric B. Carstens. 2011. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*.
10. Aniento, F., and D. G. Robinson. 2005. Testing for endocytosis in plants. *Protoplasma* 226:3-11.
11. Atabekov, J. G., and Y. L. Dorokhov. 1984. Plant Virus-Specific Transport Function And Resistance Of Plants To Viruses, p. 313-364. *In* A. L. Max and M. Karl (ed.), *Advances in Virus Research*, vol. Volume 29. Academic Press.
12. Atabekov, J. G., S. I. Malysenko, S. Morozov Yu, M. E. Taliany, A. G. Solovyev, A. A. Agranovsky, and N. A. Shapka. 1999. Identification and study of tobacco mosaic virus movement function by complementation tests. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 354:629-635.
13. Atabekov, J. G., N. P. Rodionova, O. V. Karpova, S. V. Kozlovsky, and V. Y. Poljakov. 2000. The Movement Protein-Triggered in Situ Conversion of Potato Virus X Virion RNA from a Nontranslatable into a Translatable Form. *Virology* 271:259-263.

14. Atabekov, J. G., and M. E. Taliansky. 1990. Expression of a Plant Virus-Coded Transport Function by Different Viral Genomes, p. 201-248. *In* F. A. M. Karl Maramorosch and S. Aaron J (ed.), *Advances in Virus Research*, vol. Volume 38. Academic Press.
15. Atreya, P. L., J. J. Lopez-Moya, M. Chu, C. D. Atreya, and T. P. Pirone. 1995. Mutational analysis of the coat protein N-terminal amino acids involved in potyvirus transmission by aphids. *Journal of General Virology* 76:265-270.
16. Avisar, D., A. I. Prokhnevsky, and V. V. Dolja. 2008. Class VIII myosins are required for plasmodesmatal localization of a closterovirus Hsp70 homolog. *Journal of virology* 82:2836-2843.
17. Avisar, D., A. I. Prokhnevsky, K. S. Makarova, E. V. Koonin, and V. V. Dolja. 2008. Myosin XI-K Is Required for Rapid Trafficking of Golgi Stacks, Peroxisomes, and Mitochondria in Leaf Cells of *Nicotiana benthamiana*. *Plant Physiology* 146:1098-1108.
18. Banbury, D. N., J. D. Oakley, R. B. Sessions, and G. Banting. 2003. Tyrphostin A23 Inhibits Internalization of the Transferrin Receptor by Perturbing the Interaction between Tyrosine Motifs and the Medium Chain Subunit of the AP-2 Adaptor Complex. *Journal of Biological Chemistry* 278:12022-12028.
19. Beauchemin, C., N. Boutet, and J. F. Laliberté. 2007. Visualization of the interaction between the precursors of VPg, the viral protein linked to the genome of Turnip mosaic virus, and the translation eukaryotic initiation factor iso 4E in planta. *Journal of virology* 81:775-782.
20. Beauchemin, C., and J. F. Laliberté. 2007. The poly(A) binding protein is internalized in virus-induced vesicles or redistributed to the nucleolus during turnip mosaic virus infection. *Journal of virology* 81:10905-10913.
21. Beck, D. L., P. J. Guilford, D. M. Voot, M. T. Andersen, and R. L. S. Forster. 1991. Triple gene block proteins of white clover mosaic potexvirus are required for transport. *Virology* 183:695-702.
22. Benitez-Alfonso, Y., M. Cilia, A. S. Roman, C. Thomas, A. Maule, S. Hearn, and D. Jackson. 2009. Control of Arabidopsis meristem development by thioredoxin-dependent regulation of intercellular transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:3615-3620.
23. Benitez-Alfonso, Y., C. Faulkner, C. Ritzenthaler, and A. J. Maule. 2010. Plasmodesmata: gateways to local and systemic virus infection. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 23:1403-1412.
24. Bertens, P., J. Wellink, R. Goldbach, and A. van Kammen. 2000. Mutational Analysis of the Cowpea Mosaic Virus Movement Protein. *Virology* 267:199-208.
25. Blanc, S., E. D. Ammar, S. Garcia-Lampasona, V. V. Dolja, C. Llave, J. Baker, and T. P. Pirone. 1998. Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *Journal of General Virology* 79:3119-3122.
26. Bleykasten, C., D. Gilmer, H. Guilley, K. E. Richards, and G. Jonard. 1996. Beet necrotic yellow vein virus 42 kDa triple gene block protein binds nucleic acid in vitro. *Journal of General Virology* 77:889-897.

27. Boevink, P., and K. J. Oparka. 2005. Virus-Host Interactions during Movement Processes. *Plant Physiology* 138:1815-1821.
28. Bolte, S., C. Talbot, Y. Boutte, O. Catrice, N. D. Read, and B. Satiat-Jeunemaitre. 2004. FM-dyes as experimental probes for dissecting vesicle trafficking in living plant cells. *Journal of microscopy* 214:159-173.
29. Boutte, Y., M. Frescatada-Rosa, S. Men, C. M. Chow, K. Ebine, A. Gustavsson, L. Johansson, T. Ueda, I. Moore, G. Jurgens, and M. Grebe. 2010. Endocytosis restricts Arabidopsis KNOLLE syntaxin to the cell division plane during late cytokinesis. *The EMBO journal* 29:546-558.
30. Boyko, V., J. A. Ashby, E. Suslova, J. Ferralli, O. Sterthaus, C. M. Deom, and M. Heinlein. 2002. Intramolecular Complementing Mutations in Tobacco Mosaic Virus Movement Protein Confirm a Role for Microtubule Association in Viral RNA Transport. *Journal of virology* 76:3974-3980.
31. Boyko, V., J. van der Laak, J. Ferralli, E. Suslova, M.-O. Kwon, and M. Heinlein. 2000. Cellular Targets of Functional and Dysfunctional Mutants of Tobacco Mosaic Virus Movement Protein Fused to Green Fluorescent Protein. *Journal of virology* 74:11339-11346.
32. Brakke, M. K., E. M. Ball, and W. G. Langenberg. 1988. A Non-capsid Protein Associated with Unencapsidated Virus RNA in Barley Infected with Barley Stripe Mosaic Virus. *Journal of General Virology* 69:481-491.
33. Brian W.J. Mahy , M. H. V. v. R. 2009. Desk Encyclopedia of Plant and Fungal Virology, 1 ed. Academic Press, Elsevier.
34. Cann, A. J. 2005. Principles of molecular virology, 4th ed. elsevier Academic Press.
35. Carrington, J. C., P. E. Jensen, and M. C. Schaad. 1998. Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *The Plant Journal* 14:393-400.
36. Carrington, J. C., K. D. Kasschau, S. K. Mahajan, and M. C. Schaad. 1996. Cell-to-Cell and Long-Distance Transport of Viruses in Plants. *The Plant Cell Online* 8:1669-1681.
37. Chapman, S., G. Hills, J. Watts, and D. Baulcombe. 1992. Mutational analysis of the coat protein gene of potato virus X: effects on virion morphology and viral pathogenicity. *Virology* 191:223-230.
38. Chen, C., Y. Zhang, L. Zhu, and M. Yuan. 2010. The actin cytoskeleton is involved in the regulation of the plasmodesmal size exclusion limit. *Plant Signaling & Behavior* 5:1663-1665.
39. Chen, J., C. Doyle, X. Qi, and H. Zheng. 2012. The Endoplasmic Reticulum: A Social Network in Plant CellsF. *Journal of integrative plant biology* 54:840-850.
40. Chen, J., G. Stefano, F. Brandizzi, and H. Zheng. 2011. Arabidopsis RHD3 mediates the generation of the tubular ER network and is required for Golgi distribution and motility in plant cells. *Journal of Cell Science* 124:2241-2252.
41. Chung, B. Y., W. A. Miller, J. F. Atkins, and A. E. Firth. 2008. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:5897-5902.

42. Citovsky, V., D. Knorr, G. Schuster, and P. Zambryski. 1990. The P30 movement protein of tobacco mosaic virus is a single-strand nucleic acid binding protein. *Cell* 60:637-647.
43. Citovsky, V., M. L. Wong, A. L. Shaw, B. V. Prasad, and P. Zambryski. 1992. Visualization and characterization of tobacco mosaic virus movement protein binding to single-stranded nucleic acids. *The Plant Cell Online* 4:397-411.
44. Collings, D. A., A. W. Lill, R. Himmelspach, and G. O. Wasteneys. 2006. Hypersensitivity to cytoskeletal antagonists demonstrates microtubule-microfilament cross-talk in the control of root elongation in *Arabidopsis thaliana*. *The New phytologist* 170:275-290.
45. Cotton, S., R. Grangeon, K. Thivierge, I. Mathieu, C. Ide, T. Wei, A. Wang, and J. F. Laliberte. 2009. Turnip mosaic virus RNA replication complex vesicles are mobile, align with microfilaments, and are each derived from a single viral genome. *Journal of virology* 83:10460-10471.
46. Cowan, G. H., F. Lioliopoulou, A. Ziegler, and L. Torrance. 2002. Subcellular Localisation, Protein Interactions, and RNA Binding of Potato mop-top virus Triple Gene Block Proteins. *Virology* 298:106-115.
47. Cui, X., T. Wei, R. V. Chowda-Reddy, G. Sun, and A. Wang. 2010. The Tobacco etch virus P3 protein forms mobile inclusions via the early secretory pathway and traffics along actin microfilaments. *Virology* 397:56-63.
48. Dawson, W. O., P. Bublick, and G. L. Grantham. 1988. Modifications of the tobacco mosaic virus coat protein gene affecting replication, movement, and symptomatology. *Phytopathology* 78:783-789.
49. Deom, C. M., M. J. Oliver, and R. N. Beachy. 1987. The 30-kilodalton gene product of tobacco mosaic virus potentiates virus movement. *Science (New York, N.Y.)* 237:389-394.
50. Dettmer, J., A. Hong-Hermesdorf, Y. D. Stierhof, and K. Schumacher. 2006. Vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase activity is required for endocytic and secretory trafficking in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 18:715-730.
51. Dijkstra, J. 1962. On the early stages of infection by tobacco mosaic virus in *Nicotiana glutinosa* L. *Virology* 18:142-143.
52. Ding, B., M.-O. Kwon, and L. Warnberg. 1996. Evidence that actin filaments are involved in controlling the permeability of plasmodesmata in tobacco mesophyll. *The Plant Journal* 10:157-164.
53. Dolja, V. V., R. Haldeman-Cahill, A. E. Montgomery, K. A. Vandenbosch, and J. C. Carrington. 1995. Capsid Protein Determinants Involved in Cell-to-Cell and Long Distance Movement of Tobacco Etch Potyvirus. *Virology* 206:1007-1016.
54. Dolja, V. V., R. Haldeman, N. L. Robertson, W. G. Dougherty, and J. C. Carrington. 1994. Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *Embo Journal* 13:1482-1491.
55. Donald, R. G., D. M. Lawrence, and A. O. Jackson. 1997. The barley stripe mosaic virus 58-kilodalton beta(b) protein is a multifunctional RNA binding protein. *Journal of virology* 71:1538-1546.



56. Dufresne, P. J., K. Thivierge, S. Cotton, C. Beauchemin, C. Ide, E. Ubalijoro, J. F. Laliberté, and M. G. Fortin. 2008. Heat shock 70 protein interaction with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase within virus-induced membrane vesicles. *Virology* 374:217-227.
57. Dunoyer, P., C. Thomas, S. Harrison, F. Revers, and A. Maule. 2004. A Cysteine-Rich Plant Protein Potentiates Potyvirus Movement through an Interaction with the Virus Genome-Linked Protein VPg. *Journal of virology* 78:2301-2309.
58. Egger, D., and K. Bienz. 2005. Intracellular location and translocation of silent and active poliovirus replication complexes. *Journal of General Virology* 86:707-718.
59. Emans, N., S. Zimmermann, and R. Fischer. 2002. Uptake of a fluorescent marker in plant cells is sensitive to brefeldin A and wortmannin. *The Plant cell* 14:71-86.
60. Erhardt, M., E. Herzog, E. Lauber, C. Fritsch, H. Guilley, G. Jonard, K. Richards, and S. Bouzoubaa. 1999. Transgenic plants expressing the TGB1 protein of peanut clump virus complement movement of TGB1-defective peanut clump virus but not of TGB1-defective beet necrotic yellow vein virus. *Plant Cell Reports* 18:614-619.
61. Erhardt, M., M. Morant, C. Ritzenhaller, C. Stussi-Garaud, H. Guilley, K. Richards, G. Jonard, S. Bouzoubaa, and D. Gilmer. 2000. P42 Movement Protein of Beet necrotic yellow vein virus Is Targeted by the Movement Proteins P13 and P15 to Punctate Bodies Associated with Plasmodesmata. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:520-528.
62. Erhardt, M., C. Stussi-Garaud, H. Guilley, K. E. Richards, G. Jonard, and S. Bouzoubaa. 1999. The First Triple Gene Block Protein of Peanut Clump Virus Localizes to the Plasmodesmata during Virus Infection. *Virology* 264:220-229.
63. Forster, R. L., D. L. Beck, P. J. Guilford, D. M. Voot, C. J. Van Dolleweerd, and M. T. Andersen. 1992. The coat protein of white clover mosaic potexvirus has a role in facilitating cell-to-cell transport in plants. *Virology* 191:480-484.
64. Foth, B. J., M. C. Goedecke, and D. Soldati. 2006. New insights into myosin evolution and classification. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103:3681-3686.
65. Fujiwara, T., D. Giesman-Cookmeyer, B. Ding, S. A. Lommel, and W. J. Lucas. 1993. Cell-to-Cell Trafficking of Macromolecules through Plasmodesmata Potentiated by the Red Clover Necrotic Mosaic Virus Movement Protein. *The Plant Cell Online* 5:1783-1794.
66. Gendre, D., J. Oh, Y. Boutte, J. G. Best, L. Samuels, R. Nilsson, T. Uemura, A. Marchant, M. J. Bennett, M. Grebe, and R. P. Bhalerao. 2011. Conserved Arabidopsis ECHIDNA protein mediates trans-Golgi-network trafficking and cell elongation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:8048-8053.
67. Genovés, A., J. A. Navarro, and V. Pallás. 2010. The Intra- and Intercellular Movement of Melon necrotic spot virus (MNSV) Depends on an Active Secretory Pathway. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23:263-272.
68. Ghoshroy, S., R. Lartey, J. Sheng, and V. Citovsky. 1997. TRANSPORT OF PROTEINS AND NUCLEIC ACIDS THROUGH PLASMODESMATA. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:27-50.

69. Gilbertson, R. L., and W. J. Lucas. 1996. How do viruses traffic on the vascular highway ? *Trends in Plant Science* 1:250-251.
70. Golomb, L., M. Abu-Abied, E. Belausov, and E. Sadot. 2008. Different subcellular localizations and functions of Arabidopsis myosin VIII. *BMC Plant Biol* 8:3.
71. Gorbalenya, A. E., and E. V. Koonin. 1993. Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Current Opinion in Structural Biology* 3:419-429.
72. Gorbalenya, A. E., E. V. Koonin, A. P. Donchenko, and V. M. Blinov. 1989. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res* 17:4713-4730.
73. Gould, B., and E. Kramer. 2007. Virus-induced gene silencing as a tool for functional analyses in the emerging model plant *Aquilegia* (columbine, Ranunculaceae). *Plant Methods* 3:6.
74. Grangeon, R., M. Agbeci, J. Chen, G. Grondin, H. Zheng, and J.-F. Laliberté. 2012. Impact on the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus during Turnip mosaic virus infection. *Journal of virology*.
75. Grangeon, R., J. Jiang, and J. F. Laliberte. 2012. Host endomembrane recruitment for plant RNA virus replication. *Current opinion in virology* 2:677-684.
76. Greber, U. F., and M. Way. 2006. A Superhighway to Virus Infection. *Cell* 124:741-754.
77. Guseman, J. M., J. S. Lee, N. L. Bogenschutz, K. M. Peterson, R. E. Virata, B. Xie, M. M. Kanaoka, Z. Hong, and K. U. Torii. 2010. Dysregulation of cell-to-cell connectivity and stomatal patterning by loss-of-function mutation in Arabidopsis CHORUS (GLUCAN SYNTHASE-LIKE 8). *Development* 137:1731-1741.
78. Haas, T. J., M. K. Sliwinski, D. E. Martinez, M. Preuss, K. Ebine, T. Ueda, E. Nielsen, G. Odorizzi, and M. S. Otegui. 2007. The Arabidopsis AAA ATPase SKD1 is involved in multivesicular endosome function and interacts with its positive regulator LYST-INTERACTING PROTEIN5. *The Plant cell* 19:1295-1312.
79. Hajimorad, M. R., X. S. Ding, S. Flasiński, S. Mahajan, E. Graff, R. Haldeman-Cahill, J. C. Carrington, and B. G. Cassidy. 1996. Nla and Nlb of Peanut Stripe Potyvirus Are Present in the Nucleus of Infected Cells, but Do Not Form Inclusions. *Virology* 224:368-379.
80. Harries, P., and B. Ding. 2011. Cellular factors in plant virus movement: At the leading edge of macromolecular trafficking in plants. *Virology* 411:237-243.
81. Harries, P. A., K. Palanichelvam, S. Bhat, and R. S. Nelson. 2008. Tobacco mosaic virus 126-kDa protein increases the susceptibility of *Nicotiana tabacum* to other viruses and its dosage affects virus-induced gene silencing. *Molecular plant-microbe interactions : MPMI* 21:1539-1548.
82. Harries, P. A., K. Palanichelvam, W. Yu, J. E. Schoelz, and R. S. Nelson. 2009. The Cauliflower Mosaic Virus Protein P6 Forms Motile Inclusions That Traffic along Actin Microfilaments and Stabilize Microtubules. *Plant Physiology* 149:1005-1016.

83. Harries, P. A., J. W. Park, N. Sasaki, K. D. Ballard, A. J. Maule, and R. S. Nelson. 2009. Differing requirements for actin and myosin by plant viruses for sustained intercellular movement. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106:17594-17599.
84. Harries, P. A., J. E. Schoelz, and R. S. Nelson. 2010. Intracellular Transport of Viruses and Their Components: Utilizing the Cytoskeleton and Membrane Highways. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23:1381-1393.
85. Harvey Lodish, A. B., Paul Matsudaira, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Matthew P. Scott, S. Laurence Zipursky, James Darnell. 2005. *Biologie moléculaire de la cellule*, 3th ed.
86. Hatta, T., and R. E. F. Matthews. 1974. The sequence of early cytological changes in Chinese cabbage leaf cells following systemic infection with turnip yellow mosaic virus. *Virology* 59:383-396.
87. Haupt, S., G. H. Cowan, A. Ziegler, A. G. Roberts, K. J. Oparka, and L. Torrance. 2005. Two Plant-Viral Movement Proteins Traffic in the Endocytic Recycling Pathway. *The Plant Cell Online* 17:164-181.
88. Helenius, A., and M. Marsh. 2008. Endocytosis of Enveloped Animal Viruses, p. 59-76, *Ciba Foundation Symposium 92 - Membrane Recycling*. John Wiley & Sons, Ltd.
89. Herzog, E., O. Hemmer, S. Hauser, G. Meyer, S. Bouzoubaa, and C. Fritsch. 1998. Identification of Genes Involved in Replication and Movement of Peanut Clump Virus. *Virology* 248:312-322.
90. Hofmann, C., A. Niehl, A. Sambade, A. Steinmetz, and M. Heinlein. 2009. Inhibition of Tobacco Mosaic Virus Movement by Expression of an Actin-Binding Protein. *Plant Physiology* 149:1810-1823.
91. Holdaway-Clarke, T. L., N. A. Walker, P. K. Hepler, and R. L. Overall. 2000. Physiological elevations in cytoplasmic free calcium by cold or ion injection result in transient closure of higher plant plasmodesmata. *Planta* 210:329-335.
92. Howard, A. R., M. L. Hepler, H.-J. Ju, K. Krishnamurthy, M. E. Payton, and J. Verchot-Lubicz. 2004. Potato virus X TGBp1 induces plasmodesmata gating and moves between cells in several host species whereas CP moves only in *N. benthamiana* leaves. *Virology* 328:185-197.
93. Huang, Z., Y. Han, and S. H. Howell. 2000. Formation of surface tubules and fluorescent foci in *Arabidopsis thaliana* protoplasts expressing a fusion between the green fluorescent protein and the cauliflower mosaic virus movement protein. *Virology* 271:58-64.
94. Hull, R. 1989. The Movement of Viruses in Plants. *Annual Review of Phytopathology* 27:213-240.
95. Hyodo, K., A. Mine, T. Taniguchi, M. Kaido, K. Mise, H. Taniguchi, and T. Okuno. 2013. ADP Ribosylation Factor 1 Plays an Essential Role in the Replication of a Plant RNA Virus. *J Virol* 87:163-176.

96. Iglesias, V. A., and F. Meins. 2000. Movement of plant viruses is delayed in a  $\beta$ -1,3-glucanase-deficient mutant showing a reduced plasmodesmatal size exclusion limit and enhanced callose deposition. *The Plant Journal* 21:157-166.
97. Jackson, D. 2000. Opening up the communication channels: recent insights into plasmodesmal function. *Current Opinion in Plant Biology* 3:394-399.
98. Jenner, C. E., F. Sanchez, S. B. Nettleship, G. D. Foster, F. Ponz, and J. A. Walsh. 2000. The cylindrical inclusion gene of Turnip mosaic virus encodes a pathogenic determinant to the Brassica resistance gene TuRB01. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:1102-1108.
99. Jenner, C. E., X. W. Wang, K. Tomimura, K. Ohshima, F. Ponz, and J. A. Walsh. 2003. The dual role of the potyvirus P3 protein of turnip mosaic virus as a symptom and avirulence determinant in brassicas. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 16:777-784.
100. Jiang, J., and J.-F. Laliberté. 2011. The genome-linked protein VPg of plant viruses—a protein with many partners. *Current Opinion in Virology* 1:347-354.
101. Ju, H.-J., T. D. Samuels, Y.-S. Wang, E. Blancaflor, M. Payton, R. Mitra, K. Krishnamurthy, R. S. Nelson, and J. Verchot-Lubicz. 2005. The Potato Virus X TGBp2 Movement Protein Associates with Endoplasmic Reticulum-Derived Vesicles during Virus Infection. *Plant Physiology* 138:1877-1895.
102. Kalinina, N. O., D. A. Rakitina, N. E. Yelina, A. A. Zamyatnin, T. A. Stroganova, D. V. Klinov, V. V. Prokhorov, S. V. Ustinova, B. K. Chernov, J. Schiemann, A. G. Solovyev, and S. Y. Morozov. 2001. RNA-binding properties of the 63 kDa protein encoded by the triple gene block of poa semilatifolius hordeivirus. *Journal of General Virology* 82:2569-2578.
103. Kaplan, I. B., L. Zhang, and P. Palukaitis. 1998. Characterization of Cucumber Mosaic Virus. *Virology* 246:221-231.
104. Kasschau, K. D., S. Cronin, and J. C. Carrington. 1997. Genome Amplification and Long-Distance Movement Functions Associated with the Central Domain of Tobacco Etch Potyvirus Helper Component-Proteinase. *Virology* 228:251-262.
105. Kasteel, D. T., N. N. van der Wel, K. A. Jansen, R. W. Goldbach, and J. W. van Lent. 1997. Tubule-forming capacity of the movement proteins of alfalfa mosaic virus and brome mosaic virus. *The Journal of general virology* 78 2089-2093.
106. Kawakami, S., Y. Watanabe, and R. N. Beachy. 2004. Tobacco mosaic virus infection spreads cell to cell as intact replication complexes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:6291-6296.
107. Kim, S. H., N. O. Kalinina, I. Andreev, E. V. Ryabov, A. G. Fitzgerald, M. E. Taliensky, and P. Palukaitis. 2004. The C-terminal 33 amino acids of the cucumber mosaic virus 3a protein affect virus movement, RNA binding and inhibition of infection and translation. *Journal of General Virology* 85:221-230.

108. Kiselyova, O. I., I. V. Yaminsky, E. M. Karger, O. Y. Frolova, Y. L. Dorokhov, and J. G. Atabekov. 2001. Visualization by atomic force microscopy of tobacco mosaic virus movement protein–RNA complexes formed in vitro. *Journal of General Virology* 82:1503-1508.
109. Kiselyova, O. I., I. V. Yaminsky, O. V. Karpova, N. P. Rodionova, S. V. Kozlovsky, M. V. Arkhipenko, and J. G. Atabekov. 2003. AFM Study of Potato Virus X Disassembly Induced by Movement Protein. *Journal of Molecular Biology* 332:321-325.
110. Klein, P. G., R. R. Klein, E. Rodriguez-Cerezo, A. G. Hunt, and J. G. Shaw. 1994. Mutational Analysis of the Tobacco Vein Mottling Virus Genome. *Virology* 204:759-769.
111. Knoops, K., C. Swett-Tapia, S. H. van den Worm, A. J. Te Velhuis, A. J. Koster, A. M. Mommaas, E. J. Snijder, and M. Kikkert. 2010. Integrity of the early secretory pathway promotes, but is not required for, severe acute respiratory syndrome coronavirus RNA synthesis and virus-induced remodeling of endoplasmic reticulum membranes. *J Virol* 84:833-846.
112. Kobayashi, K., S. Tsuge, L. Stabolone, and T. Hohn. 2002. The cauliflower mosaic virus virion-associated protein is dispensable for viral replication in single cells. *Journal of virology* 76:9457-9464.
113. Koonin, E. V., and V. V. Dolja. 1993. Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 28:375-430.
114. Kotzer, A. M., F. Brandizzi, U. Neumann, N. Paris, I. Moore, and C. Hawes. 2004. AtRabF2b (Ara7) acts on the vacuolar trafficking pathway in tobacco leaf epidermal cells. *Journal of cell science* 117:6377-6389.
115. Kushner, D. B., B. D. Lindenbach, V. Z. Grdzlishvili, A. O. Noueiry, S. M. Paul, and P. Ahlquist. 2003. Systematic, genome-wide identification of host genes affecting replication of a positive-strand RNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:15764-15769.
116. Laliberté, J.-F., and H. Sanfaçon. 2010. Cellular Remodeling During Plant Virus Infection. *Annual Review of Phytopathology* 48:69-91.
117. Laporte, C., G. Vetter, A.-M. Loudes, D. G. Robinson, S. Hillmer, C. Stussi-Graud, and C. Ritzenthaler. 2003. Involvement of the Secretory Pathway and the Cytoskeleton in Intracellular Targeting and Tubule Assembly of Grapevine fanleaf virus Movement Protein in Tobacco BY-2 Cells. *The Plant Cell Online* 15:2058-2075.
118. Lauber, E., C. Bleykasten-Grosshans, M. Erhardt, S. Bouzoubaa, G. Jonard, K. E. Richards, and H. Guilley. 1998. Cell-to-Cell Movement of Beet Necrotic Yellow Vein Virus: I. Heterologous Complementation Experiments Provide Evidence for Specific Interactions Among the Triple Gene Block Proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11:618-625.
119. Lawrence, D. M., and A. O. Jackson. 2001. Requirements for cell-to-cell movement of Barley stripe mosaic virus in monocot and dicot hosts. *Mol Plant Pathol* 2:65-75.

120. Lazarowitz, S. G., and R. N. Beachy. 1999. Viral Movement Proteins as Probes for Intracellular and Intercellular Trafficking in Plants. *The Plant Cell Online* 11:535-548.
121. Lee, J.-Y., K.-i. Taoka, B.-C. Yoo, G. Ben-Nissan, D.-J. Kim, and W. J. Lucas. 2005. Plasmodesmal-Associated Protein Kinase in Tobacco and Arabidopsis Recognizes a Subset of Non-Cell-Autonomous Proteins. *The Plant Cell Online* 17:2817-2831.
122. Levy, A., M. Erlanger, M. Rosenthal, and B. L. Epel. 2007. A plasmodesmata-associated  $\beta$ -1,3-glucanase in Arabidopsis. *The Plant Journal* 49:669-682.
123. Lewis, J. D., and S. G. Lazarowitz. 2010. Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates endocytosis and virus movement protein cell-to-cell transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107:2491-2496.
124. Li, X. H., P. Valdez, R. E. Olvera, and J. C. Carrington. 1997. Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (N1b): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (N1a). *Journal of virology* 71:1598-1607.
125. Lim, H.-S., J. N. Bragg, U. Ganesan, S. Ruzin, D. Schichnes, M. Y. Lee, A. M. Vaira, K. H. Ryu, J. Hammond, and A. O. Jackson. 2009. Subcellular Localization of the Barley Stripe Mosaic Virus Triple Gene Block Proteins. *Journal of virology* 83:9432-9448.
126. Liu, J.-Z., E. B. Blancaflor, and R. S. Nelson. 2005. The Tobacco Mosaic Virus 126-Kilodalton Protein, a Constituent of the Virus Replication Complex, Alone or within the Complex Aligns with and Traffics along Microfilaments. *Plant Physiology* 138:1853-1865.
127. Lough, T. J., N. E. Netzler, S. J. Emerson, P. Sutherland, F. Carr, D. L. Beck, W. J. Lucas, and R. L. S. Forster. 2000. Cell-to-Cell Movement of Potexviruses: Evidence for a Ribonucleoprotein Complex Involving the Coat Protein and First Triple Gene Block Protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:962-974.
128. Lough, T. J., K. Shash, B. Xoconostle-Cázares, K. R. Hofstra, D. L. Beck, E. Balmori, R. L. S. Forster, and W. J. Lucas. 1998. Molecular Dissection of the Mechanism by Which Potexvirus Triple Gene Block Proteins Mediate Cell-to-Cell Transport of Infectious RNA. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11:801-814.
129. Lu, R., A. M. Martin-Hernandez, J. R. Peart, I. Malcuit, and D. C. Baulcombe. 2003. Virus-induced gene silencing in plants. *Methods* 30:296-303.
130. Lucas, W. J. 2006. Plant viral movement proteins: Agents for cell-to-cell trafficking of viral genomes. *Virology* 344:169-184.
131. Lucas, W. J. 1995. Plasmodesmata: intercellular channels for macromolecular transport in plants. *Current Opinion in Cell Biology* 7:673-680.
132. Lucas, W. J., B.-K. Ham, and J.-Y. Kim. 2009. Plasmodesmata – bridging the gap between neighboring plant cells. *Trends in Cell Biology* 19:495-503.
133. Maia, I. G., A.-L. Haenni, and F. Bernardi. 1996. Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. *Journal of General Virology* 77:1335-1341.
134. Marcus, A. I., R. C. Moore, and R. J. Cyr. 2001. The role of microtubules in guard cell function. *Plant Physiol* 125:387-395.

135. Matthews, R. E. F., E. T. Bolton, and H. R. Thompson. 1963. Kinetics of labelling of turnip yellow mosaic virus with P32 and S35. *Virology* 19:179-189.
136. Maule, A. J. 2008. Plasmodesmata: structure, function and biogenesis. *Current Opinion in Plant Biology* 11:680-686.
137. Maule, A. J., Y. Benitez-Alfonso, and C. Faulkner. 2011. Plasmodesmata – membrane tunnels with attitude. *Current Opinion in Plant Biology* 14:683-690.
138. Maule, A. J., and P. Palukaitis. 1991. Virus movement in infected plants. *Critical Reviews in Plant Sciences* 9:457-473.
139. McCartney, A. W., J. S. Greenwood, M. R. Fabian, K. A. White, and R. T. Mullen. 2005. Localization of the tomato bushy stunt virus replication protein p33 reveals a peroxisome-to-endoplasmic reticulum sorting pathway. *The Plant cell* 17:3513-3531.
140. McGeachy, K. D., and H. Barker. 2000. Potato mop-top virus RNA Can Move Long Distance in the Absence of Coat Protein: Evidence from Resistant, Transgenic Plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13:125-128.
141. McLean, B. G., J. Zupan, and P. C. Zambryski. 1995. Tobacco mosaic virus movement protein associates with the cytoskeleton in tobacco cells. *The Plant Cell Online* 7:2101-2114.
142. Morozov, S. Y., V. V. Dolja, and J. G. Atabekov. 1989. Probable reassortment of genomic elements among elongated RNA-containing plant viruses. *Journal of Molecular Evolution* 29:52-62.
143. Morozov, S. Y., L. I. Lukasheva, B. K. Chernov, K. G. Skryabin, and J. G. Atabekov. 1987. Nucleotide sequence of the open reading frames adjacent to the coat protein cistron in potato virus X genome. *FEBS Letters* 213:438-442.
144. Morozov, S. Y., and A. G. Solovyev. 2003. Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *Journal of General Virology* 84:1351-1366.
145. Nagy, P. D., R. Y. Wang, J. Pogany, A. Hafren, and K. Makinen. 2011. Emerging picture of host chaperone and cyclophilin roles in RNA virus replication. *Virology* 411:374-382.
146. Nelson, B. K., X. Cai, and A. Nebenführ. 2007. A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *The Plant Journal* 51:1126-1136.
147. Nicolas, O., S. W. Dunnington, L. F. Gotow, T. P. Pirone, and G. M. Hellmann. 1997. Variations in the VPg Protein Allow a Potyvirus to Overcome a Gene Resistance in Tobacco. *Virology* 237:452-459.
148. Nicolas, O., and J. F. Laliberte. 1992. The complete nucleotide sequence of turnip mosaic potyvirus RNA. *Journal of General Virology* 73:2785-2793.
149. Niehl, A., and M. Heinlein. 2011. Cellular pathways for viral transport through plasmodesmata. *Protoplasma* 248:75-99.

150. Nurkiyanova, K. M., E. V. Ryabov, N. O. Kalinina, Y. Fan, I. Andreev, A. G. Fitzgerald, P. Palukaitis, and M. Taliany. 2001. Umbravirus-encoded movement protein induces tubule formation on the surface of protoplasts and binds RNA incompletely and non-cooperatively. *The Journal of general virology* 82:2579-2588.
151. Oh, C.-S., and J. C. Carrington. 1989. Identification of essential residues in potyvirus proteinase HC-pro by site-directed mutagenesis. *Virology* 173:692-699.
152. Ojangu, E. L., K. Järve, H. Paves, and E. Truve. 2007. *Arabidopsis thaliana* myosin XIK is involved in root hair as well as trichome morphogenesis on stems and leaves. *Protoplasma* 230:193-202.
153. Oparka, K. J. 2004. Getting the message across: how do plant cells exchange macromolecular complexes? *Trends in Plant Science* 9:33-41.
154. Otsuki, Y., I. Takebe, Y. Honda, and C. Matsui. 1972. Ultrastructure of infection of tobacco mesophyll protoplasts by tobacco mosaic virus. *Virology* 49:188-194.
155. Ouko, M. O., A. Sambade, K. Brandner, A. Niehl, E. Peña, A. Ahad, M. Heinlein, and P. Nick. 2010. Tobacco mutants with reduced microtubule dynamics are less susceptible to TMV. *The Plant Journal* 62:829-839.
156. Palukaitis, P., and F. Garcia-Arenal. 2003. Cucumoviruses. *Adv Virus Res* 62:241-323.
157. Patarroyo, C., J.-F. Laliberté, and H. Zheng. 2013. Hijack it, Change it: How do Plant Viruses Utilize the Host Secretory Pathway for Efficient Viral Replication and Spread? *Frontiers in plant science* 3.
158. Pena, E. J., and M. Heinlein. 2012. RNA transport during TMV cell-to-cell movement. *Frontiers in plant science* 3:193.
159. Peremyslov, V. V., I. A. Andreev, A. I. Prokhnevsky, G. H. Duncan, M. E. Taliany, and V. V. Dolja. 2004. Complex molecular architecture of beet yellows virus particles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:5030-5035.
160. Peremyslov, V. V., Y. Hagiwara, and V. V. Dolja. 1999. HSP70 homolog functions in cell-to-cell movement of a plant virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:14771-14776.
161. Peremyslov, V. V., A. I. Prokhnevsky, D. Avisar, and V. V. Dolja. 2008. Two Class XI Myosins Function in Organelle Trafficking and Root Hair Development in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 146:1109-1116.
162. Petty, I. T., R. French, R. W. Jones, and A. O. Jackson. 1990. Identification of barley stripe mosaic virus genes involved in viral RNA replication and systemic movement. *EMBO J* 9:3453-3457.
163. Petty, I. T., and A. O. Jackson. 1990. Mutational analysis of barley stripe mosaic virus RNA beta. *Virology* 179:712-718.
164. Plante, D., C. Viel, S. Léonard, H. Tampo, J. F. Laliberté, and M. G. Fortin. 2004. Turnip mosaic virus VPg does not disrupt the translation initiation complex but interferes with cap binding. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 64:219-226.



165. Pouwels, J., J. E. Carette, J. Van Lent, and J. Wellink. 2002. Cowpea mosaic virus: effects on host cell processes. *Molecular Plant Pathology* 3:411-418.
166. Pouwels, J., G. N. M. Van Der Krogt, J. Van Lent, T. Bisseling, and J. Wellink. 2002. The Cytoskeleton and the Secretory Pathway Are Not Involved in Targeting the Cowpea Mosaic Virus Movement Protein to the Cell Periphery. *Virology* 297:48-56.
167. Prod'homme, D., S. Le Panse, G. Drugeon, and I. Jupin. 2001. Detection and subcellular localization of the turnip yellow mosaic virus 66K replication protein in infected cells. *Virology* 281:88-101.
168. Prokhnevsky, A. I., V. V. Peremyslov, and V. V. Dolja. 2005. Actin Cytoskeleton Is Involved in Targeting of a Viral Hsp70 Homolog to the Cell Periphery. *Journal of virology* 79:14421-14428.
169. Prokhnevsky, A. I., V. V. Peremyslov, and V. V. Dolja. 2008. Overlapping functions of the four class XI myosins in Arabidopsis growth, root hair elongation, and organelle motility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:19744-19749.
170. Prokhnevsky, A. I., V. V. Peremyslov, A. J. Napuli, and V. V. Dolja. 2002. Interaction between Long-Distance Transport Factor and Hsp70-Related Movement Protein of Beet Yellows Virus. *Journal of virology* 76:11003-11011.
171. Pruss, G., X. Ge, X. M. Shi, J. C. Carrington, and V. Bowman Vance. 1997. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *The Plant Cell Online* 9:859-868.
172. Qi, X., M. Kaneda, J. Chen, A. Geitmann, and H. Zheng. 2011. A specific role for Arabidopsis TRAPP II in post-Golgi trafficking that is crucial for cytokinesis and cell polarity. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 68:234-248.
173. Qi, X., and H. Zheng. 2012. Rab-A1c GTPase Defines a Population of the Trans-Golgi Network that Is Sensitive to Endosidin1 during Cytokinesis in Arabidopsis. *Mol Plant*.
174. Radtke, K., K. Döhner, and B. Sodeik. 2006. Viral interactions with the cytoskeleton: a hitchhiker's guide to the cell. *Cellular Microbiology* 8:387-400.
175. Rappaport, I., and S. G. Wildman. 1957. A kinetic study of local lesion growth on *Nicotiana glutinosa* resulting from tobacco mosaic virus infection. *Virology* 4:265-274.
176. Reddy, A., and I. Day. 2001. Analysis of the myosins encoded in the recently completed Arabidopsis thaliana genome sequence. *Genome Biology* 2:1-19.
177. Reddy, A. S. 2001. Molecular motors and their functions in plants. *International review of cytology* 204:97-178.
178. Reichelt, S., A. E. Knight, T. P. Hodge, F. Baluska, J. Samaj, D. Volkmann, and J. Kendrick-Jones. 1999. Characterization of the unconventional myosin VIII in plant cells and its localization at the post-cytokinetic cell wall. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 19:555-567.

179. Restrepo-Hartwig, M. A., and J. C. Carrington. 1992. Regulation of nuclear transport of a plant potyvirus protein by autoproteolysis. *Journal of virology* 66:5662-5666.
180. Revers, F., O. Le Gall, T. Candresse, and A. J. Maule. 1999. New Advances in Understanding the Molecular Biology of Plant/Potyvirus Interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12:367-376.
181. Riechmann, J. L., M. T. Cervera, and J. A. García. 1995. Processing of the plum pox virus polyprotein at the P3-6K1 junction is not required for virus viability. *Journal of General Virology* 76:951-956.
182. Riechmann, J. L., S. Laín, and J. A. García. 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology* 73:1-16.
183. Roberts, I. M., D. Wang, K. Findlay, and A. J. Maule. 1998. Ultrastructural and Temporal Observations of the Potyvirus Cylindrical Inclusions (CIs) Show That the CI Protein Acts Transiently in Aiding Virus Movement. *Virology* 245:173-181.
184. Rodri, amp, x, E. guez-Cerezo, K. Findlay, J. G. Shaw, G. P. Lomonossoff, S. G. Qiu, P. Linstead, M. Shanks, and C. Risco. 1997. The Coat and Cylindrical Inclusion Proteins of a Potyvirus Are Associated with Connections between Plant Cells. *Virology* 236:296-306.
185. Rodríguez-Cerezo, E., E. D. Ammar, T. P. Pirone, and J. G. Shaw. 1993. Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *Journal of General Virology* 74:1945-1949.
186. Rodríguez-Cerezo, E., K. Findlay, J. G. Shaw, G. P. Lomonossoff, S. G. Qiu, P. Linstead, M. Shanks, and C. Risco. 1997. The coat and cylindrical inclusion proteins of a potyvirus are associated with connections between plant cells. *Virology* 236:296-306.
187. Rohožková, J., and M. Navrátil. 2011. P1 peptidase – a mysterious protein of family Potyviridae. *Journal of Biosciences* 36:189-200.
188. Rojas, M. R., F. M. Zerbini, R. F. Allison, R. L. Gilbertson, and W. J. Lucas. 1997. Capsid Protein and Helper Component-Proteinase Function as Potyvirus Cell-to-Cell Movement Proteins. *Virology* 237:283-295.
189. Salánki, K., Á. Gellért, E. Huppert, G. Náray-Szabó, and E. Balázs. 2004. Compatibility of the movement protein and the coat protein of cucumoviruses is required for cell-to-cell movement. *Journal of General Virology* 85:1039-1048.
190. Sánchez-Navarro, J. A., and J. F. Bol. 2001. Role of the Alfalfa mosaic virus Movement Protein and Coat Protein in Virus Transport. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14:1051-1062.
191. Sánchez, F., D. Martínez-Herrera, I. Aguilar, and F. Ponz. 1998. Infectivity of turnip mosaic potyvirus cDNA clones and transcripts on the systemic host *Arabidopsis thaliana* and local lesion hosts. *Virus Research* 55:207-219.
192. Sanderfoot, A. A., and N. V. Raikhel. 1999. The Specificity of Vesicle Trafficking: Coat Proteins and SNAREs. *The Plant Cell Online* 11:629-641.

193. Sattarzadeh, A., R. Franzen, and E. Schmelzer. 2008. The Arabidopsis class VIII myosin ATM2 is involved in endocytosis. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 65:457-468.
194. Savenkov, E. I., A. Germundsson, A. A. Zamyatnin, M. Sandgren, and J. P. T. Valkonen. 2003. Potato mop-top virus: the coat protein-encoding RNA and the gene for cysteine-rich protein are dispensable for systemic virus movement in *Nicotiana benthamiana*. *Journal of General Virology* 84:1001-1005.
195. Saxton, M. J., and R. W. Breidenbach. 1988. Receptor-Mediated Endocytosis in Plants is Energetically Possible. *Plant Physiology* 86:993-995.
196. Schaad, M. C., R. Haldeman-Cahill, S. Cronin, and J. C. Carrington. 1996. Analysis of the VPg-proteinase (Nla) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *Journal of virology* 70:7039-7048.
197. Schaad, M. C., P. E. Jensen, and J. C. Carrington. 1997. Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J* 16:4049-4059.
198. Schepetilnikov, M. V., A. G. Solovyev, E. N. Gorshkova, J. Schiemann, A. I. Prokhnevsky, V. V. Dolja, and S. Y. Morozov. 2008. Intracellular Targeting of a Hordeiviral Membrane-Spanning Movement Protein: Sequence Requirements and Involvement of an Unconventional Mechanism. *Journal of virology* 82:1284-1293.
199. Schoelz, J. E., P. A. Harries, and R. S. Nelson. 2011. Intracellular Transport of Plant Viruses: Finding the Door out of the Cell. *Molecular Plant* 4:813-831.
200. Schwartz, M., J. Chen, W.-M. Lee, M. Janda, and P. Ahlquist. 2004. Alternate, virus-induced membrane rearrangements support positive-strand RNA virus genome replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101:11263-11268.
201. Shi, X. M., H. Miller, J. Verchot, J. C. Carrington, and V. B. Vance. 1997. Mutations in the Region Encoding the Central Domain of Helper Component-Proteinase (HC-Pro) Eliminate Potato Virus X/Potyviral Synergism. *Virology* 231:35-42.
202. Shukla, D. D., C. W. Ward, and A. A. Brunt. 1994. The Potyviridae.
203. Sit, T. L., and M. G. AbouHaidar. 1993. Infectious RNA transcripts derived from cloned cDNA of papaya mosaic virus: effect of mutations to the capsid and polymerase proteins. *Journal of General Virology* 74:1133-1140.
204. Skryabin, K. G., S. Y. Morozov, A. S. Kraev, M. N. Rozanov, B. K. Chernov, L. I. Lukasheva, and J. G. Atabekov. 1988. Conserved and variable elements in RNA genomes of potexviruses. *FEBS Letters* 240:33-40.
205. Solovyev, A. G., E. I. Savenkov, A. A. Agranovsky, and S. Y. Morozov. 1996. Comparisons of the Genomic Elements and Coding Regions in RNA $\beta$  Components of the Hordeiviruses Barley Stripe Mosaic Virus, *Lychnis Ringspot Virus*, and *Poa Semilatifolius Virus*. *Virology* 219:9-18.
206. Solovyev, A. G., E. I. Savenkov, V. Z. Grdzlishvili, N. O. Kalinina, S. Y. Morozov, J. Schiemann, and J. G. Atabekov. 1999. Movement of Hordeivirus Hybrids with Exchanges in the Triple Gene Block. *Virology* 253:278-287.

207. Soumounou, Y., and J. F. Laliberte. 1994. NUCLEIC ACID-BINDING PROPERTIES OF THE P1 PROTEIN OF TURNIP MOSAIC POTYVIRUS PRODUCED IN ESCHERICHIA-COLI. *Journal of General Virology* 75:2567-2573.
208. Sparkes, I. A., N. A. Teanby, and C. Hawes. 2008. Truncated myosin XI tail fusions inhibit peroxisome, Golgi, and mitochondrial movement in tobacco leaf epidermal cells: a genetic tool for the next generation. *Journal of Experimental Botany* 59:2499-2512.
209. Spiro, D. J., W. Boll, T. Kirchhausen, and M. Wessling-Resnick. 1996. Wortmannin alters the transferrin receptor endocytic pathway in vivo and in vitro. *Molecular Biology of the Cell* 7:355-367.
210. Stefano, G., L. Renna, L. Chatre, S. L. Hanton, P. Moreau, C. Hawes, and F. Brandizzi. 2006. In tobacco leaf epidermal cells, the integrity of protein export from the endoplasmic reticulum and of ER export sites depends on active COPI machinery. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 46:95-110.
211. Stonebloom, S., J. O. Brunkard, A. C. Cheung, K. Jiang, L. Feldman, and P. Zambryski. 2012. Redox States of Plastids and Mitochondria Differentially Regulate Intercellular Transport via Plasmodesmata. *Plant Physiology* 158:190-199.
212. Stonebloom, S., T. Burch-Smith, I. Kim, D. Meinke, M. Mindrinos, and P. Zambryski. 2009. Loss of the plant DEAD-box protein ISE1 leads to defective mitochondria and increased cell-to-cell transport via plasmodesmata. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:17229-17234.
213. Su, S., Z. Liu, C. Chen, Y. Zhang, X. Wang, L. Zhu, L. Miao, X.-C. Wang, and M. Yuan. 2010. Cucumber Mosaic Virus Movement Protein Severs Actin Filaments to Increase the Plasmodesmal Size Exclusion Limit in Tobacco. *The Plant Cell Online*.
214. Suehiro, N., T. Natsuaki, T. Watanabe, and S. Okuda. 2004. An important determinant of the ability of Turnip mosaic virus to infect Brassica spp. and/or Raphanus sativus is in its P3 protein. *Journal of General Virology* 85:2087-2098.
215. Tagami, Y., and Y. Watanabe. 2007. Effects of brefeldin A on the localization of Tobamovirus movement protein and cell-to-cell movement of the virus. *Virology* 361:133-140.
216. Takebe, I. 1983. Protoplasts in plant virus research. *International review of cytology* (no. suppl.16) p. 89-111:
- .
217. Taliansky, M., L. Torrance, and N. O. Kalinina. 2008. Role of Plant Virus Movement Proteins  
Plant Virology Protocols, p. 33-54. *In* G. D. Foster, I. E. Johansen, Y. Hong, and P. D. Nagy (ed.), vol. 451. Humana Press.
218. Taliansky, M. E., and D. J. Robinson. 2003. Molecular biology of umbraviruses: phantom warriors. *Journal of General Virology* 84:1951-1960.
219. Taliansky, M. E., and L. Torrance. 2001. *Plant Virus Movement*, eLS. John Wiley & Sons, Ltd.

220. Tan, Z., Y. Wada, J. Chen, and K. Ohshima. 2004. Inter- and intralineage recombinants are common in natural populations of Turnip mosaic virus. *Journal of General Virology* 85:2683-2696.
221. Taylor, M. P., O. O. Koyuncu, and L. W. Enquist. 2011. Subversion of the actin cytoskeleton during viral infection. *Nature reviews. Microbiology* 9:427-439.
222. Thivierge, K. 2010. Host proteins involved in Turnip mosaic virus life cycle. NR66495. McGill University (Canada), Canada.
223. Thivierge, K., S. Cotton, P. J. Dufresne, I. Mathieu, C. Beauchemin, C. Ide, M. G. Fortin, and J. F. Laliberté. 2008. Eukaryotic elongation factor 1A interacts with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase and VPg-Pro in virus-induced vesicles. *Virology* 377:216-225.
224. Thomas, C. L., E. M. Bayer, C. Ritzenhaller, L. Fernandez-Calvino, and A. J. Maule. 2008. Specific Targeting of a Plasmodesmal Protein Affecting Cell-to-Cell Communication. *PLoS Biol* 6:e7.
225. Tilsner, J., O. Linnik, K. M. Wright, K. Bell, A. G. Roberts, C. Lacomme, S. Santa Cruz, and K. J. Oparka. 2012. The TGB1 movement protein of Potato virus X reorganizes actin and endomembranes into the X-body, a viral replication factory. *Plant Physiol* 158:1359-1370.
226. Tilsner, J., and K. J. Oparka. 2012. Missing links? - The connection between replication and movement of plant RNA viruses. *Current opinion in virology* 2:699-705.
227. Torrance, L., I. A. Andreev, R. Gabrenaite-Verhovskaya, G. Cowan, K. Mäkinen, and M. E. Taliany. 2006. An Unusual Structure at One End of Potato Potyvirus Particles. *Journal of Molecular Biology* 357:1-8.
228. Tse, Y. C., S. K. Lam, and L. Jiang. 2007. Enigmatic brefeldin a. *Plant signaling & behavior* 2:199-202.
229. Ueda, H., E. Yokota, N. Kutsuna, T. Shimada, K. Tamura, T. Shimmen, S. Hasezawa, V. V. Dolja, and I. Hara-Nishimura. 2010. Myosin-dependent endoplasmic reticulum motility and F-actin organization in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
230. Ueki, S., and V. Citovsky. 2011. To Gate, or Not to Gate: Regulatory Mechanisms for Intercellular Protein Transport and Virus Movement in Plants. *Molecular Plant*.
231. Urcuqui-Inchima, S., A.-L. Haenni, and F. Bernardi. 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research* 74:157-175.
232. V V Dolja, R. H., N L Robertson, W G Dougherty, and J C Carrington. 1994. Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *The EMBO J* 13(6):1482-1491. .
233. van Lent, J., M. Storms, F. van der Meer, J. Wellink, and R. Goldbach. 1991. Tubular structures involved in movement of cowpea mosaic virus are also formed in infected cowpea protoplasts. *Journal of General Virology* 72:2615-2623.
234. Verchot-Lubicz, J. 2005. A New Cell-to-Cell Transport Model for Potexviruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 18:283-290.

235. Verchot-Lubicz, J., L. Torrance, A. G. Solovyev, S. Y. Morozov, A. O. Jackson, and D. Gilmer. 2010. Varied Movement Strategies Employed by Triple Gene Block- Encoding Viruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23:1231-1247.
236. Verchot, J., K. L. Herndon, and J. C. Carrington. 1992. Mutational analysis of the tobacco etch potyviral 35-kDa proteinase: Identification of essential residues and requirements for autoproteolysis. *Virology* 190:298-306.
237. Vijayapalani, P., M. Maeshima, N. Nagasaki-Takekuchi, and W. A. Miller. 2012. Interaction of the Trans-Frame Potyvirus Protein P3N-PIPO with Host Protein PCaP1 Facilitates Potyvirus Movement. *PLoS Pathog* 8:e1002639.
238. Vogel, F., D. Hofius, and U. Sonnewald. 2007. Intracellular Trafficking of Potato Leafroll Virus Movement Protein in Transgenic Arabidopsis. *Traffic* 8:1205-1214.
239. Wada, M., and N. Suetsugu. 2004. Plant organelle positioning. *Curr Opin Plant Biol* 7:626-631.
240. Walsh, J. A., and C. E. Jenner. 2002. Turnip mosaic virus and the quest for durable resistance. *Molecular Plant Pathology* 3:289-300.
241. Wang, R. Y., and K. Li. 2012. Host factors in the replication of positive-strand RNA viruses. *Chang Gung Medical Journal* 35:111-124.
242. Wang, Y.-S., C.-M. Yoo, and E. B. Blancaflor. 2008. Improved imaging of actin filaments in transgenic Arabidopsis plants expressing a green fluorescent protein fusion to the C- and N-termini of the fimbrin actin-binding domain 2. *New Phytologist* 177:525-536.
243. Watanabe, Y., T. Ogawa, and Y. Okada. 1992. In vivo phosphorylation of the 30-kDa protein of tobacco mosaic virus. *FEBS Letters* 313:181-184.
244. Watts, J. W., J. R. Dawson, and J. M. King. 2008. The Mechanism of Entry of Viruses into Plant Protoplasts, p. 56-71, Ciba Foundation Symposium 80 - Adhesion and Microorganism Pathogenicity. John Wiley & Sons, Ltd.
245. Wei, T., T.-S. Huang, J. McNeil, J.-F. Laliberté, J. Hong, R. S. Nelson, and A. Wang. 2010. Sequential Recruitment of the Endoplasmic Reticulum and Chloroplasts for Plant Potyvirus Replication. *Journal of virology* 84:799-809.
246. Wei, T., T. Shimizu, and T. Omura. 2008. Endomembranes and myosin mediate assembly into tubules of Pns10 of Rice dwarf virus and intercellular spreading of the virus in cultured insect vector cells. *Virology* 372:349-356.
247. Wei, T., and A. Wang. 2008. Biogenesis of Cytoplasmic Membranous Vesicles for Plant Potyvirus Replication Occurs at Endoplasmic Reticulum Exit Sites in a COPI- and COPII-Dependent Manner. *Journal of virology* 82:12252-12264.
248. Wei, T., C. Zhang, J. Hong, R. Xiong, K. D. Kasschau, X. Zhou, J. C. Carrington, and A. Wang. 2010. Formation of Complexes at Plasmodesmata for Potyvirus Intercellular Movement Is Mediated by the Viral Protein P3N-PIPO. *PLoS Pathog* 6:e1000962.
249. White, R. G., and D. A. Barton. 2011. The cytoskeleton in plasmodesmata: a role in intercellular transport? *Journal of Experimental Botany* 62:5249-5266.

250. Wolf, S., C. M. Deom, R. N. Beachy, and W. J. Lucas. 1989. Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. *Science (New York, N.Y.)* 246:377-379.
251. Wright, K. M., N. T. Wood, A. G. Roberts, S. Chapman, P. Boevink, K. M. MacKenzie, and K. J. Oparka. 2007. Targeting of TMV Movement Protein to Plasmodesmata Requires the Actin/ER Network; Evidence From FRAP. *Traffic* 8:21-31.
252. Xu, M., E. Cho, T. M. Burch-Smith, and P. C. Zambryski. 2012. Plasmodesmata formation and cell-to-cell transport are reduced in decreased size exclusion limit 1 during embryogenesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:5098-5103.
253. Xu, Y., and X. Zhou. 2012. Role of Rice Stripe Virus NSvc4 in Cell-to-Cell Movement and Symptom Development in *Nicotiana benthamiana*. *Front Plant Sci* 3:7.
254. Yuan, Z., H. Chen, Q. Chen, T. Omura, L. Xie, Z. Wu, and T. Wei. 2011. The early secretory pathway and an actin-myosin VIII motility system are required for plasmodesmatal localization of the NSvc4 protein of Rice stripe virus. *Virus Research* 159:62-68.
255. Zamyatnin, A. A., A. G. Solovyev, E. I. Savenkov, A. Germundsson, M. Sandgren, J. P. T. Valkonen, and S. Y. Morozov. 2004. Transient Coexpression of Individual Genes Encoded by the Triple Gene Block of Potato mop-top virus Reveals Requirements for TGBp1 Trafficking. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17:921-930.
256. Zheng, H., L. Camacho, E. Wee, H. Batoko, J. Legen, C. J. Leaver, R. Malho, P. J. Hussey, and I. Moore. 2005. A Rab-E GTPase mutant acts downstream of the Rab-D subclass in biosynthetic membrane traffic to the plasma membrane in tobacco leaf epidermis. *The Plant cell* 17:2020-2036.

## Annexe

### Autre publication

#### **Impact on the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus of turnip mosaic virus infection.**

Romain Grangeon<sup>1</sup>, Maxime Agbeci<sup>1</sup>, Jun Chen<sup>2</sup>, Gilles Grondin<sup>3</sup>, Huanquan Zheng<sup>2</sup> and Jean-François Laliberté<sup>1,#</sup>

1. INRS-Institut Armand-Frappier, Institut national de la recherche scientifique, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada H7V 1B7
2. Department of Biology, McGill University, 1205 Dr Penfield Avenue, Montréal, Québec, Canada H3A 1B1
3. Département de biologie, Université de Sherbrooke, 2500 Boulevard de l'Université, Sherbrooke, Québec, Canada J1K 2R1

# Author for correspondence (jean-francois.laliberte@iaf.inrs.ca)

Publié dans *Journal of Virology*. Sep 2012;86(17):9255-65. doi: 10.1128/JVI.01146-12. Epub 2012 Jun 20.