Université du Québec Institut National de la Recherche Scientifique Institut Armand-Frappier

Identification de facteurs de l'hôte dans l'épreuve de force moléculaire pour la formation et transport des usines de réplication du virus de la mosaïque du navet

par Daniel GARCIA CABANILLAS

Thèse présentée pour l'obtention du grade de Philosophiæ doctor (Ph.D.) en Immunologie et Virologie

Jury d'évaluation :

Président du jury et examinateur interne	Prof. Laurent Chatel-Chaix INRS – Institut Armand-Frappier
Examinateur externe	Prof. Peter Moffett Université de Sherbrooke
Examinateur externe	Prof. Armand Séguin Ressources naturelles Canada, Centre de foresterie des Laurentides
Directeur de Recherche	Prof. Jean-François Laliberté INRS – Institut Armand-Frappier

© Daniel Garcia Cabanillas, DGC 2018

"The mere formulation of a problem is far more often essential than its solution, which may be merely a matter of mathematical or experimental skill. To raise new questions, new possibilities, to regard old problems from a new angle requires creative imagination and marks real advances in science."

par ALBERT EINSTEIN - THE EVOLUTION OF PHYSICS, 1938 -

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à grandement remercier mon maître de thèse Pr. Jean-François Laliberté de m'avoir accueilli dans son laboratoire. Il m'a non seulement offert la possibilité de parfaire mon projet professionnel dans un laboratoire de référence mondiale en virologie végétale, mais aussi de m'ouvrir à de nouveaux horizons. Je ne serai jamais assez reconnaissant pour tout le soutien apporté au cours de ces années de thèse. Partir vers l'inconnu n'est jamais facile, mais dès mon arrivée au Québec, j'ai eu droit à un beau "bienvenu en terres d'Amériques" de la part de mon professeur. Il m'a permis de progresser en tant que jeune chercheur grâce à son encadrement, son savoir et de son savoir-faire. Ce grand adepte de la Loi de Murphy a su quotidiennement soutenir l'équipe de recherche que nous formions avec ces phrases de motivation "If it ends broken, don't fix it !", mais aussi " Une chose à la fois, lentement, mais sûrement". Toujours à l'écoute des soucis expérimentaux ou personnels et toujours ouvert aux nouvelles idées scientifiques, mon professeur a su m'aiguiller tout en me laissant m'exprimer, m'épanouir et gagner en autonomie. Ces années de doctorat m'ont permis d'appréhender la virologie et en particulier la virologie végétale sous un autre angle de vue en repoussant les façons de pensées dogmatiques, tout en essayant d'améliorer la compréhension des mécanismes liés à l'infection. Au fil de ces années de thèse j'ai pu aussi bien découvrir ce que c'est de vivre au grand froid, de voir de la neige au

quotidien, que de connaître les belles couleurs du Québec, sa complexité et son histoire grâce aux conseils et grandes connaissances en histoire de mon professeur. Une confiance mutuelle s'est établie au cours des années de thèse en incluant une dimension humaine dans la relation professeur/étudiant.

À mon arrivée dans le laboratoire j'ai était entouré d'une équipe internationale extraordinaire, c'est pourquoi je souhaite remercier tous mes collègues que j'ai côtoyés au cours de mon doctorat pour leur soutien et pour m'avoir fait découvrir leurs cultures respectives. Je voudrais remercier en particulier mes deux mentors Jun Jiang et Juan Wan qui ont su me transmettre le savoir-faire du laboratoire, ainsi qu'une partie de leur savoir. Les premières années de thèse ont transformé cette relation de collègues de travail, en une relation de profonde amitié qui m'a accompagnée tout au long des différents défis liés au doctorat. Nous avions la même envie de bien faire les choses, de donner le meilleur de nousmême pour accomplir nos projets scientifiques. Ils ont non seulement été des collègues de travail avec qui il faisait plaisir de venir travailler avec au quotidien, mais surtout ils sont devenus ma petite famille chinoise. De plus, bien que sa présence fut de courte durée dans notre équipe, je désire remercier ma collègue Fernanda Prieto Bruckner qui est devenue au fils du temps une amie, notamment pour ses conseils, son soutien et entraide au quotidien, ainsi que pour sa générosité brésilienne.

Je voudrais aussi dire un grand merci aux différents collègues et amis de l'institut que j'ai rencontrés au cours de ces années de thèse et souligner mon estime pour notamment Soumia Lahmidi, Arvin Nickzad, Slimane Dridi, Aymeric Fabie, Golara Golbaghi, Mehdi Haghdoost, Gabriel Ouellet et plus récemment Clément Mazeaud et Wesley Freppel. Leurs personnalités étonnantes et parfois déroutantes ont été d'un grand soutien moral pour aller de l'avant durant ces années de doctorat.

Je voudrais aussi avoir une pensée chaleureuse pour une partie du personnel de

l'institut, notamment la Professeure Maritza Jaramillo pour son soutien et sa bonne humeur permanente et une partie du personnel administratif qui m'a gentiment aidé et répondu avec professionnalisme à toutes mes demandes et questions, notamment l'incroyable réceptionniste Mme Josette Bourdages, la patiente secrétaire Mme Anne Philippon et le bibliothécaire Michel Courcelles. Je souhaite bien entendu remercier notre expert en microscopie confocale Jessy Tremblay, non seulement pour ses conseils en tous genre, mais surtout pour sa générosité, sa bonne humeur permanente, ainsi que son aide précieuse et indispensable depuis la microscopie, en passant par l'aide dans la chambre de culture jusqu'à son aide dans des soucis du quotidien. Je tiens à remercier un membre du personnel d'entretien, Mr Richard Chalifour dont la générosité, le grand charisme et ses mots de soutien durant les innombrables heures tardives de travail m'ont été d'un grand soutien moral.

Je voudrais aussi remercier les membres du jury de thèse d'une part d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse et d'autre part de leurs expertises respectives, ainsi que leurs précieux commentaires et conseils.

Je remercie aussi les divers collaborateurs qui ont participé dans les divers projets en apportant leurs expertises ou matériels, notamment le Pr. Hugo Germain, Pr. Peter Moffett, Pr. Huanquan Zheng, Pr. Roger Innes et remercie les organismes subventionnaires (Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG) of Canada et des Fonds Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) pour avoir financé les projets scientifiques menés dans ma thèse.

Enfin, je tiens à remercier les membres de ma famille et amis pour leur soutien constant malgré la distance et les divers décalages horaires. Bien que le travail effectué au cours de mon doctorat ait paru souvent très abstrait pour eux, je ne trouverai jamais assez de mots pour témoigner ma profonde gratitude envers mes parents et plus récemment à l'égard de mes beaux-parents qui tous ensemble m'ont permis d'arriver jusqu'à cette nouvelle étape de carrière et de vie.

Pour finir, je tiens à remercier mon épouse pour son inconditionnel soutien et énorme patience à toutes épreuves au travers des différentes années de thèse. Elle a été la première à croire en moi pour saisir l'opportunité de traverser l'Atlantique et faire une thèse au Québec. Malgré la distance, le décalage horaire et sa propre thèse, elle a été une force puissante et discrète qui a su manier avec brio soutien et motivation à mon égard tout au long de mon doctorat. Je la remercie aussi pour m'avoir transmis et distillé une partie de son immense savoir et savoir-faire dès les premières années de mon doctorat, afin de toujours viser l'excellence. Elle a toujours su avoir le mot juste pour témoigner son amour et soutien dans les situations difficiles pour m'aider à aller de l'avant, sortir de la zone de confort et progresser pour essayer d'aboutir du mieux possible les projets menés durant ma thèse. Je ne pourrais jamais écrire suffisamment de lignes pour lui témoigner mon immense gratitude pour ce qu'elle a réalisé jusqu'au bout durant ma thèse et les divers évènements qui l'ont accompagné. Sans elle, cette aventure aurait été bien plus difficile et largement moins belle.

Ainsi, je dédie mon mémoire de thèse à mes parents et à mon épouse.

Table des matières

RÉ	ÉSUM	1É GÉNÉRAL	vii
LI	LISTE DES FIGURES		
LISTE DES TABLES ×			xiii
LI	STE	DES ABRÉVIATIONS	xv
1	INT	RODUCTION	1
	1.1	Classification et pathologie des virus phytopathogènes	2
	1.2	Les potyvirus	4
	1.3	Réplication virale	8
	1.4	Mouvement intracellulaire	9
	1.5	Mouvement intercellulaire	9
	1.6	Mouvement systémique	15
	1.7	Cellule et physiologie d'une plante	24
	1.8	Remodelage cellulaire pour la réplication des virus à ARN+	26
	1.9	La protéine virale 6K $_2$ et les usines de réplication du TuMV $\ldots \ldots \ldots$	39
	1.10	La voie de sécrétion : compartiments cellulaires	41
	1.11	La voie de sécrétion : communication et acteurs moléculaires	44
	1.12	La voie de sécrétion : adressage des protéines	53
	1.13	Virus et protéines de la voie de sécrétion	59

1.14	Voies 1	non-conventionnelles de transport des protéines	62
1.15	Virus e	et voies non conventionnelles de transport	68
OB.	JECTIF	DU TRAVAIL	71
PUE	BLICAT	FION 1	73
3.1	Résum	é	75
3.2	Abstra	ct	76
3.3	Introdu	uction	77
3.4	Results	5	80
	3.4.1	Identification of a GxxxG motif within the TMD of $6K_2$	80
	3.4.2	$6K_2$ is re-localized to the Golgi apparatus when the GxxxG motif is	
		mutated	81
	3.4.3	Differential sensitivity of $6K_2$ and $6K_2GV$ to inhibitors of ER-Golgi	
		trafficking	82
	3.4.4	The GxxxG motif is important for virus replication	85
	3.4.5	Impairing ER-Golgi homeostasis enhances TuMV intercellular move-	
		ment	88
	3.4.6	ER- and Golgi-localized synaptotagmins act antagonistically to mo-	
		dulate TuMV movement	91
	3.4.7	The pre-vacuolar compartment SNARE Vti11 is essential for TuMV	
		infection	93
	3.4.8	Viral RNA is associated with multi-vesicular bodies	96
3.5	Discus	sion	97
3.6	Materi	als and Methods	101
	3.6.1	Molecular cloning	101
	3.6.2	Plant material, genotyping and infectivity assays	102
	1.14 1.15 OB. 3.1 3.2 3.3 3.4	1.14 Voies in 1.15 Virus end OBJECTIF 3.1 Résum 3.2 Abstra 3.3 Introdu 3.4 Results 3.4.1 3.4.2 3.4.2 3.4.3 3.4.3 3.4.3 3.4.4 3.4.5 3.4.5 3.4.6 3.4.6 3.4.7 3.4.8 3.4.3 3.4.3 3.4.6 3.4.6 3.4.6 3.4.7 3.4.7 3.6.1 3.6.1 3.6.1 3.6.1	 1.14 Voies non-conventionnelles de transport des protéines 1.15 Virus et voies non conventionnelles de transport OBJECTIF DU TRAVAIL PUBLICATION 1 3.1 Résumé 3.2 Abstract 3.3 Introduction 3.4 Results 3.4.1 Identification of a GxxxG motif within the TMD of 6K2 3.4.2 6K2 is re-localized to the Golgi apparatus when the GxxxG motif is mutated 3.4.3 Differential sensitivity of 6K2 and 6K2GV to inhibitors of ER-Golgi trafficking 3.4.4 The GxxxG motif is important for virus replication 3.4.5 Impairing ER-Golgi homeostasis enhances TuMV intercellular movement 3.4.6 ER- and Golgi-localized synaptotagmins act antagonistically to modulate TuMV movement 3.4.7 The pre-vacuolar compartment SNARE Vti11 is essential for TuMV infection 3.4.8 Viral RNA is associated with multi-vesicular bodies 3.6.1 Molecular cloning 3.6.2 Plant material, genotyping and infectivity assays

		3.6.3	Quantitative RT-PCR	103
		3.6.4	Protein domain and glycosylation site prediction	104
		3.6.5	Transient protein expression, inhibitor treatments and co-immuno	
			purification	104
		3.6.6	Confocal laser scanning microscopy	105
		3.6.7	TuMV intercellular movement assays under dominant-negative pro-	
			tein expression	106
		3.6.8	Graphical representation and statistical analysis	106
		3.6.9	Total protein extraction, cellular fractionation, deglycosylation assay	
			and immunoblot analysis	107
		3.6.10	Immunogold labeling	107
		3.6.11	Carboxyfluorescein Diacetate (CFDA) treatment	108
	3.7	Acknow	vledgements and Author Contributions	108
	3.8	Figures	s of Publication 1	111
	Réfé	rences		139
4	PUE	BLICAT	TION 2	151
	4.1	Résum	é	153
	4.2	Abstra	ct	154
	4.3	Introdu	uction	154
	4.4	Results	and Discussion	158
		4.4.1	Exosome-like vesicles are present in the apoplastic space of $TuMV\text{-}$	
			infected leaves	158
		4.4.2	$6K_2\text{-}tagged$ vesicles are present in the apoplastic space	159
		4.4.3	Proteomic analysis shows the presence of viral proteins and host	
			immune response-related proteins in extracellular vesicle enriched-	
			fractions	161

	4.5	Conclu	sion	164
	4.6	Materi	als and methods	164
		4.6.1	Plant material	164
		4.6.2	Extracellular vesicle purification	165
		4.6.3	Immunoblots and RT-PCR	165
		4.6.4	Confocal microscopy and transmission electron microscopy	166
		4.6.5	Mass Spectrometry	166
		4.6.6	Proteomics database searching	166
		4.6.7	Criteria for protein identification	167
		4.6.8	Protein categorization	167
	4.7	Acknow	wledgements and Author Contributions	168
	4.8	Figure	s of Publication 2	169
	Réfé	rences		189
E	Réfé	rences		189
5	Réfé DIS	rences	ON GÉNÉRALE	189 197
5	Réfé DIS 5.1	rences CUSSI Conclu	ON GÉNÉRALE	189 197 204
5	Réfé DIS 5.1 PEF	rences CUSSI Conclu RSPEC	ON GÉNÉRALE sion	189197204207
5	Réfé DIS 5.1 PEF 6.1	rences CUSSI Conclu RSPEC Identif	ON GÉNÉRALE sion TIVES ET PROJETS POTENTIELS cation des interacteurs impliqués dans le contournement de l'appareil	 189 197 204 207
5	Réfé DIS 5.1 PEF 6.1	rences CUSSI Conclu RSPEC Identif de Gol	ON GÉNÉRALE sion	 189 197 204 207
5	Réfé DIS 5.1 PEF 6.1	rences CUSSI Conclu RSPEC Identif de Gol Identif	ON GÉNÉRALE sion	 189 197 204 207 207
5	Réfé DIS 5.1 PEF 6.1 6.2	rences CUSSI Conclu RSPEC Identif de Gol Identif réplica	ON GÉNÉRALE sion	 189 197 204 207 207 208
5	Réfé DIS 5.1 6.1 6.2 6.3	rences CUSSI Conclu Conclu RSPEC Identif de Gol Identif réplica Précise	ON GÉNÉRALE sion	 189 197 204 207 207 208
5	Réfé DIS 5.1 PEF 6.1 6.2 6.3	rences CUSSI Conclu Conclu RSPEC Identif Identif réplica Précise TuMV	ON GÉNÉRALE sion	 189 197 204 207 207 208 208
5	Réfé DIS 5.1 6.1 6.2 6.3	rences CUSSI Conclu Conclu SPEC Identif de Gol Identif réplica Précise TuMV Caract	ON GÉNÉRALE sion	 189 197 204 207 207 208 208
5	Réfé DIS 5.1 PEF 6.1 6.2 6.3 6.4	rences CUSSI Conclu Conclu RSPEC Identif de Gol Identif réplica Précise TuMV Caract TuMV	ON GÉNÉRALE sion	 189 197 204 207 208 208 208 210

RÉFÉRENCES	213
Annexe A PUBLICATION 3	247
A.1 Résumé	249
A.2 Article	250
Annexe B PUBLICATION 4	301
Annexe C LISTE DES PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS ORALES	
OU PAR AFFICHES	303
C.1 Liste des publications	304
C.2 Communications orales	304
C 3 Communications par affiches	305

RÉSUMÉ GÉNÉRAL

Les virus à ARN positif (ARN+) induisent une réorganisation des membranes de certains organites de la cellule hôte pour former des compartiments de réplication virale. Ces compartiments sont formés dès les premières étapes de l'infection et prennent le nom d'usines de réplication virale. Les usines abritent tous les éléments nécessaires à la réplication virale. Le travail effectué au cours de ma thèse s'est concentré sur la compréhension des voies de transport empruntées par ces usines. Le modèle d'étude utilisé dans les travaux menés au cours de ma thèse a été le virus de la mosaïque du navet (*Turnip mosaic virus* (TuMV)) qui est un virus non enveloppé à ARN+ simple brin de plante (genre *Potyvirus*). Pour ce virus, le remodelage du réticulum endoplasmique (RE) par la protéine virale 6K₂ donne naissance à des usines virales très mobiles. Pour répondre à cet objectif global, j'ai travaillé sur trois études de recherche scientifique au cours de ma thèse.

La première partie de l'étude a eu pour but de déterminer d'une part si les usines de réplication virale du TuMV entraient dans la voie de sécrétion conventionnelle des protéines et d'autres par de connaître les trajectoires intracellulaires empruntées. L'étude de plusieurs mutants de la protéine 6K₂ qui ont été faits par mutagenèse dirigée et l'emploi de divers moyens de blocage du transport des protéines entre le RE et l'appareil de Golgi, ont permis de répondre à une première partie de l'objectif, en dévoilant l'existence de voies alternatives. La deuxième partie de l'objectif a eu pour but de déterminer les potentielles destinations cellulaires des usines virales, pour ce faire, des protéines SNARE (*Soluble N-éthylmaleimide-*

sensitive-factor Attachment protein REceptor) situées dans divers compartiments ont été utilisées. Pour répondre à la deuxième partie de l'objectif des analyses complémentaires ont été menées par microscopie confocale, par des techniques de biochimie, de biologie moléculaire et de génétique. Les approches suivies ont permis non seulement de caractériser le chemin intracellulaire emprunté par les usines de réplication virale, mais aussi d'identifier des protéines de l'hôte essentielles à l'infection virale. Cette partie sera développée dans le chapitre 3.

La deuxième partie de l'étude a eu pour objectif de dévoiler les différents types cellulaires colonisés par les usines de réplication du TuMV, avec une particulière attention sur les vaisseaux vasculaires de la plante. Pour ce faire, des observations de coupes histologiques ont été effectuées d'une part par microscopie électronique à transmission et d'autres part par microscopie confocale suite à un marquage par immunofluorescence. Les analyses de microscopie ont été combinées à des caractérisations biochimiques de sève. Cette partie sera exposée en détail dans l'Annexe A.

Enfin, une troisième partie de l'étude a voulu exploiter les informations découvertes dans les deux premières parties pour mieux comprendre l'origine des usines de réplication virale présentes dans les vaisseaux vasculaires en continuité avec le milieu extracellulaire. La stratégie menée a eu pour but de caractériser les vésicules extracellulaires par microscopie électronique à transmission, par microscopie confocale et par des analyses protéomiques. Cette partie sera plus amplement présentée dans le chapitre 4.

Ainsi, les résultats qui sont présentés tout au long de ma thèse, ont permis d'avoir une meilleure compréhension sur les routes cellulaires, vasculaires et extracellulaires empruntées par les usines virales du TuMV. De plus, les usines de réplication virale du TuMV interviennent dans quasiment toutes les étapes du cycle viral du TuMV. Dans ce contexte, les résultats obtenus durant ma thèse soulignent l'importance de l'attention qui devrait être portée à l'étude des usines de réplication virale du TuMV et par extension à celles d'autres virus à ARN+, afin d'identifier de nouvelles cibles de résistance ou de traitement.

LISTE DES FIGURES

1.1	Organisation du génome des <i>Potyvirus</i>	7
1.2	Mouvement intra- et intercellulaire du TuMV	9
1.3	Structure des plasmodesmes	10
1.4	Modèles des modifications des plasmodesmes durant l'infection virale	11
1.5	Détection des usines de réplication virale du TuMV et du PVX dans les tissus	
	vasculaires de l'hôte	19
1.6	Organisation d'une cellule de plante	24
1.7	Organisation des tissus d'une plante	26
1.8	Usines de réplication virale de virus à ARN+	29
1.9	Interactome et contenu en protéines des usines de réplication virale du TuMV	31
1.10	Remodelage cellulaire par le TuMV	39
1.11	Voie de sécrétion conventionnelle	42
1.12	Voie de sécrétion précoce des portéines	47
1.13	Structure et fonction des protéines SNARE	50
1.14	Structure des E-SYT	52
1.15	Interactome du complexe exocyste	53
1.16	Adressage et transport des protéines dans la voie de sécrétion conventionnelle	56
1.17	Adressage et transport des protéines dans le noyau	57
1.18	Adressage et transport des protéines vers les chloroplastes, peroxysomes et	
	mitochondrie	59

1.19	Etapes et facteurs impliqués durant la macro-autophagie	65
3.1	${\rm 6K}_2$ localization is altered when the GxxxG motif is mutated. $\ .\ .\ .$.	112
3.2	Differential sensitivity of $6K_2$ and $6K_2GV$ to inhibitors of ER-Golgi trafficking	.114
3.3	The GxxxG motif is important for virus replication	116
3.4	Impairing transport vesicle fusion with the Golgi apparatus enhances TuMV	
	intercellular movement.	118
3.5	Infection time course of SYT KO mutant plants and impact of truncated	
	SYT mutants on TuMV intercellular movement.	120
3.6	The pre-vacuolar compartment SNARE Vti11 is essential for TuMV infection.	122
3.7	Viral RNA is associated with multi-vesicular bodies	124
3.8	TuMV tug-of-war model for infection	125
3.9	Identification of a GxxxG motif within the TMD of $6K_2$	126
3.10	Sec22 overexpression impairs ER-Golgi pathway but not TuMV factories for-	
	mation	127
3.11	A. thaliana synaptotagmins cellular distribution.	129
3.12	TuMV intercellular movement initiation determination	131
3.13	SNARE and SYTs dominant negative forms expression	133
3.14	Symplasmic and phloem systemic transport of CFDA in A.thaliana wt and	
	<i>itt3</i> plants	135
3.15	Quantitative RT-PCR for virus replication evaluation during SNARE and	
	SYTs dominant negative forms expression	137
4.1	Extracellular vesicles are present in apoplast of TuMV-infected tissues	169
4.2	$6K_2$ -tagged vesicles isolated from the apoplastic fluid during TuMV infection.	171
4.3	TuMV 6K $_2$ and vRNA is detected in extracellular vesicle purified fractions.	171
4.4	Proteomic analysis of TuMV-infected extracellular vesicle purified fractions.	172

- 5.1 Test d'interaction entre les protéines 6K $_2$ et/ou VAP27. 199
- 6.1 Association de Vti11 et des usines virales avec un marqueur d'autophagosomes209

LISTE DES TABLES

1.1	Virus et leurs protéines de mouvement	12
1.1	Virus et leurs protéines de mouvement (suite)	13
1.2	Virus et facteurs de l'hôte importants dans le mouvement systémique de	
	plusieurs phytovirus	20
1.2	Virus et facteurs de l'hôte importants dans le mouvement systémique de	
	plusieurs phytovirus (suite)	21
1.3	Virus, compartiments et facteurs viraux impliqués dans la biogenèse des	
	usines virales	33
1.3	Virus, compartiments et facteurs viraux impliqués dans la biogenèse des	
	usines virales (suite)	34
1.3	Virus, compartiments et facteurs viraux impliqués dans la biogenèse des	
	usines virales (suite)	35
1.3	Virus, compartiments et facteurs viraux impliqués dans la biogenèse des	
	usines virales (suite)	36
3.1	Supplemental Table 1 · List of primers	138
0.1		100
4.1	Proteome of extracellular vesicles purified from TuMV-infected and Mock-	
	infected plants	173

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AMV Alfalfa mosaic virus	CVB3 Coxsakievirus B3
ARF1 ADP-ribosylation factor 1	CWMV Chinese wheat mosaic virus
ARN+ ARN positif	CyRSV Cymbidium ringspot virus
ARNm ARN messager	DENV Dengue virus
ARNmi micro ARN	
ARNsi ARN interférant	EBV Epstein-Barr virus
ATG autophagy-related protein	E-SYT Extended-synaptotagmin family
	EAV Equine arterivirus
BCTV Beet curly top virus	eIF4E eucaryotic initiation factor 4E
BFA Brefeldine A	EP endosome précoce
BMV Brome mosaic virus	ERES endoplasmic reticulum export site
CaMV Cauliflower mosaic virus	ESCRT endosomal sorting complex required
CIRV Carnation italian ringspot virus	for transport
CMV compartiments multivésiculaires	ET endosome tardif
CNV Cucumber necrosis virus	FHV Flock house virus
CPMV Cowpea mosaic virus CPV compartiments prévacuolaires ou PVC/MVB: pre-vacuolar compart- ment / multivesicular bodies CUPS compartment for unconventional pro-	 GFLV Grapevine fanleaf virus GFP Green fluorescent protein, protéine de fluorescence verte GRV Groundnut rosette virus
tein secretion	HAV Hepatitis A virus

HBV Hepatitis B virus	SLCV Squash leaf curl virus
HC-Pro Helper component proteinase	SMP mitochondrial-lipid binding protein
HCV Hepatitis C virus	domain-like
HEV Hepatitis E virus	SNAP soluble NSF
IPCV Peanut clump virus	SNARE Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-
IRES internal ribosome entry site	factor Attachment protein REceptor
INES Internal indosome entry site	SRP particule de reconnaissance du signal
LIYV Lettuce infectious yellows virus	ou Signal recognition particle
MNSV Melon necrotic spot virus	SYNV Sonchus yellow net virus
	SYT synaptotagmine
NES Nuclear export signal	
NLS Nuclear localization signal	TBEV Tick-borne encephalitis virus
NSF <i>N</i> -ethylaleimide-sensitive fusion protein	TBSV Tomato bushy stunt virus
NV Norwalk virus	TEV Tobacco etch virus
PE phosphatidylethanolamine	TGN Trans Golgi Network ou réseau du
PME pectine méthylestérase	trans-Golgi RTG
PPV Plum pox virus	TIC Translocon of the Inner membranes of
PSbMV Pea seed borne mosaic virus	the Chloroplasts
PTS Peroxysomal targeting sequence	TIM Translocase of the inner membrane
PV Poliovirus	TMD transmembrane domaine ou domaine
PVA Potato virus A	transmembranaire
PVX Potato virus X	TMV Tobacco mosaic virus
PYDV Potato yellow dwarf virus	TOC Translocon of the Outer membranes of
	the Chloroplasts
RCNMV Red clover necrotic mosaic virus	ToCV Tomato chlorosis virus
RE réticulum endoplasmique	TOM Translocase of the Outer Membrane
RER réticulum endoplasmique rugueux	ToMV Tomato mosaic virus
RTG réseau du trans Golgi	ToRSV Tomato ringspot virus
RUBV Rubella virus	TSWV Tomato spotted wilt virus
SARS-CoV Severe acute respiratory	TuMV Turnip mosaic virus
syndrome-associated coronavirus	TVCV Turnip vein-clearing virus

TYMV Turnip yellow mosaic virus	WNV West Nile virus
UPR Unfolded protein response	YFP <i>Green fluorescent protein</i> , protéine de fluorescence jaune
VIH ou HIV Human immunodeficiency virus	ZIKV Zika virus

CHAPITRE

INTRODUCTION

Les nombreuses avancées scientifiques débouchant sur le développement de vaccins contre les virus affectant l'humain ou de plantes résistantes pour les virus phytopathogènes sont importantes et en constante progression. Cependant, la prévalence actuelle des nombreuses maladies induites par ces agents pathogènes reste élevée. En effet, l'incidence annuelle des maladies liées aux infections par les virus à ARN+ tels que le virus de l'immunodéficience humaine (ou HIV *Human immunodeficiency virus* (VIH)), le virus de l'hépatite C (*Hepatitis C virus* (HCV)), le virus de la Dengue (*Dengue virus* (DENV)), le virus Zika (*Zika virus* (ZIKV)) pour l'humain ou les potyvirus pour les plantes, causent de nombreuses pertes en termes de santé humaine et d'environnement. De plus avec les changements climatiques, nous pouvons également nous attendre à une dissémination accrue des infections, ainsi qu'à l'apparition de nouveaux virus tout aussi dévastateurs. De ce fait, un effort important de recherche scientifique est effectué chaque année pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux infections virales et ainsi fournir de nouveaux outils pour mieux combattre les virus à ARN+.

Les virus requièrent par définition un organisme vivant pour le parasiter et accomplir leur cycle viral. De ce fait, il est important de connaître avant tout l'environnement de l'hôte dans lequel évoluent les virus. De plus, de nombreuses similitudes existent entre les virus à ARN+ infectant l'humain et les virus à ARN+ phytopathogènes lors de l'infection. Dans cette revue, nous nous concentrerons principalement sur les connaissances actuelles des virus à ARN+ et leurs similitudes d'action, avec un intérêt plus particulier sur les virus à ARN+ de plantes et les conséquences sur leurs plantes hôtes, tant au niveau cellulaire, moléculaire que physiologique. Du fait que les potyvirus représentent plus d'un tiers des virus de plante connus et que leur impact économique est important, nous mettrons l'emphase sur l'état des connaissances de ces derniers. Bien que des différences notables existent dans les mécanismes moléculaires de réplication entre les différents genres viraux de virus à ARN+, nous prendrons comme exemple la réplication du genre *Potyvirus* dont les mécanismes semblent être les mieux compris à ce jour parmi les virus de plante. Puis nous exposerons le contexte cellulaire et physiologique d'une plante afin de comprendre l'environnement dans lequel les virus évoluent. Ensuite, nous présenterons de manière plus détaillée les interactions cellulaires et moléculaires hôte/virus qui ont lieu durant la réorganisation des voies de transport des protéines et des compartiments d'une cellule de l'hôte lors de l'infection virale.

1.1 Classification et pathologie des virus phytopathogènes

Les virus sont par définition des agents pathogènes biotrophes obligatoires. Leurs particules virales, aussi appelées virions, sont constituées d'un ou plusieurs acides nucléiques et de protéines, avec ou sans enveloppe lipidique. En ce qui concerne leur nomenclature, ils sont hiérarchiquement classifiés de manière similaire aux organismes vivant (famille, genre, espèce, ...). D'autres classifications complémentaires telles que la classification de Baltimore regroupent les virus selon la nature de leur génome (ADN, ARN, simple/double brin), de leur polarité (positive ou sens, négative ou anti-sens, ambisens), et d'autres s'intéressent

plus particulièrement à l'architecture du génome (segmentation, mono/multipartite) et à la structure de la particule virale (symétrie, présence d'enveloppe lipidique, . . .). Il est important de noter que quelque soit la nature de l'organisme vivant hôte (animal, plante, champignon, bactérie, . . .), les virus partagent des caractéristiques identiques telles que décrites plus haut.

Dans le cas des virus de plante, le nom de chaque espèce virale (nomenclature internationale en anglais) contient le nom de la plante hôte dans lequel il a été découvert et reflète la plupart du temps une description plus ou moins imagée des symptômes les plus apparents de la plante hôte malade (HULL 2014). Par exemple, le *Turnip* (plante : navet) mosaic (symptôme) virus ou le Red clover (plante : trèfle des prés) necrotic mosaic (symptômes) virus qui littéralement veulent respectivement dire le virus de la mosaïque du navet (*Turnip mosaic virus* TuMV) et le virus de la mosaïque nécrotique du trèfle des prés (Red clover necrotic mosaic virus (RCNMV)). De plus, les symptômes peuvent être multiples et variés sur une même plante. Les symptômes macroscopiques peuvent affecter la couleur des feuilles pour aller de simples dépigmentations (chloroses) formant ou pas une mosaïque de zones plus ou moins décolorées, jusqu'à des tâches noires nécrotiques. La maladie se traduit dans beaucoup de cas par une modification de la morphologie (déformations) et de la taille (nanisme) de la plante. Une même plante peut être infectée par différents virus et un même virus peut infecter plus ou moins d'espèces en fonction de son spectre d'hôte, ce qui peut parfois expliquer la présence de multiples symptômes. L'infection virale peut affaiblir la plante hôte et conduire à un dépérissement qui parfois est accélérée par d'autres agents pathogènes opportunistes.

L'ensemble de ces symptômes conduit à un impact important en termes économiques (rendements), et environnemental, ce qui constitue un grand défi pour les années à venir du fait que quasiment aucun moyen de lutte efficace et direct sur les virus de plante n'existe à ce jour. Du fait de leur large représentation parmi les virus de plante et de leurs divers impacts (économiques, ...) les virus à ARN+ tel que les potyvirus constituent une menace agricole de grande envergure et sont les plus étudiés.

1.2 Les potyvirus

Le genre Potyvirus représente plus du tiers des virus de plante et leur cycle viral est l'un des mieux décrit à ce jour (IVANOV, ESKELIN et al. 2014; REVERS et GARCÍA 2015). Le génome est un fragment d'ARN simple brin d'environ 10 kb qui code pour une polyprotéine virale. Il présente une protéine VPg (Viral protein linked to the genome) qui est liée à l'extrémité 5', une extrémité 5' non codante (5'-UTR), la séquence codante, une séquence non codante en 3' (3'-UTR) et une queue poly A (adénine) (Figure 1.1). Cette structure génomique semblable à la structure d'un ARN messager (ARNm) de l'hôte, confère aux potyvirus un avantage lors des étapes de réplication/traduction. À la différence des ARNm de l'hôte, les génome ARN des potyvirus ne comporte pas de coiffe. Cependant, les potyvirus ont habilement résolu ce problème avec la protéine VPg qui mime le mode d'action de la coiffe présente sur les ARNm. Du fait de ces caractéristiques, les ARN viraux entrent en compétition avec les ARNm de l'hôte, notamment pour les étapes de traduction. Ils peuvent être directement reconnus par les facteurs et machineries de traduction de l'hôte. En effet, le génome des potyvirus contient des sites internes de liaison des ribosomes (*internal ribosome entry site* (IRES)) dans leur séquence permettant une traduction de l'ARNv encore plus rapide (SOUMOUNOU et LALIBERTÉ 1994; GALLIE 2001).

La polyprotéine virale produite suite aux étapes de traduction, subit des étapes de maturation par protéolyse en cis et trans (REVERS et GARCÍA 2015). Les divers clivages successifs effectués par des protéases virales permettent de libérer *in fine* environ une dizaine de protéines. Il est important de noter que les protéines codées par le génome viral sont souvent multifonctionnelles et interviennent dans plusieurs étapes du cycle viral (réplica-

tion, mouvement, ...). Tout d'abord, la protéine P1 est une protéase à sérine (VERCHOT, KOONIN et CARRINGTON 1991) qui intervient dans l'adaptation à l'hôte et constitue un facteur accessoire dans la multiplication virale. La protéine HC-Pro est une protéase à cystéine (CARRINGTON, FREED et SANDERS 1989) intervenant dans la transmission virale par les pucerons, dans la suppression de l'ARN *silencing* et l'accroissement de la production de particules virales. La protéine P3 s'associe aux membranes du RE (CUI, WEI et al. 2010; EIAMTANASATE, JURICEK et YAP 2007) et intervient aussi bien dans l'adaptation à l'hôte lors de l'infection (JENNER, WANG et al. 2003) que dans la réplication virale. La protéine P3N-PIPO (notée ci-après PIPO : *Pretty Interesting Potyviridae ORF*) issue d'un décalage de lecture du cadre ouvert de lecture normal (+2) par les ribosomes (CHUNG, MILLER et al. 2008; OLSPERT, CHUNG et al. 2015), intervient dans les étapes de mouvement du virus. La protéine $6K_1$ est une protéine soluble (JIANG, PATARROYO et al. 2015), parfois associée à des structures membranaires lors de l'infection (CUI et WANG 2016), mais peu caractérisée à ce jours. La protéine CI est une hélicase à ARN, intervernant non seulement dans la réplication et le mouvement viral, mais aussi dans la formation de corps d'inclusions en forme de moulin joliment visibles par microscopie électronique couplée à de la tomographie (WAN, BASU et al. 2015). La protéine $6K_2$ est une protéine associée aux membranes qui intervient dans la biogenèse des usines de réplication virale (JIANG, PATARROYO et al. 2015), dans le mouvement intercellulaire (AGBECI, GRANGEON et al. 2013; GRANGEON, JIANG et al. 2013) et systémique (WAN, CABANILLAS et al. 2015). La protéine $6K_2$ est initialement produite sous forme de polyprotéine associé aux protéines Nia-VPg et Nia-Pro qui subie des étapes de maturation successives (BEAUCHEMIN, BOUTET et LALIBERTÉ 2007). De plus amples détails complémentaires sur la protéine virale 6K₂ seront fournis dans les sections suivantes. La protéine VPg (Nia-Vpg) est une protéine intrinsèquement désordonnée (GRZELA, SZOLAJSKA et al. 2008; RANTALAINEN, ESKELIN et al. 2011) et intervient dans différentes étapes de réplication (LÉONARD, PLANTE et al. 2000), dans

la liaison à l'ARN viral, la traduction et le mouvement. La protéine Pro (Nia-Pro) est une protéase à cystéine et à des fonction de ADNase (ADAMS, ANTONIW et BEAUDOIN 2005). La protéine Nib aussi appelée RdRp (*RNA-dependent RNA polymerase*) est la polymérase virale ARN dépendante assurant la réplication du génome viral (HONG et HUNT 1996). Et finalement la protéine CP de capside (*Coat Protein*) intervient dans plusieurs étapes du cycle viral dont la transmission *via* les pucerons (LOPEZ-MOYA 2002) et vraisemblablement le mouvement, mais le rôle principal est de s'associer à l'ARN viral pour former une coque protectrice donnant naissance aux particules virales (encapsidation) (KENDALL, MCDO-NALD et al. 2008). Il est envisageable que le petit génome des potyvirus code pour de plus nombreuse protéines virales (e.g PISPO (*pretty interesting sweet potato potyvirus ORF*) dans la séquence codante pour P1 de certains virus infectant les patates douces (UNTI-VEROS, OLSPERT et al. 2016; MINGOT, VALLI et al. 2016)), mais ces dernières restent encore à être découvertes ou à être mieux caractérisées.

Le cycle viral d'un virus correspond à toutes les étapes nécessaires au virus pour se multiplier. Il comporte de grandes étapes qui sont similaires entre tous les virus de plante à ARN+. Nous décomposerons le cycle viral des potyvirus en une succession linéaire d'étapes, afin de mieux appréhender la complexité des mécanismes en jeu. Mais, il est important de noter que la plupart des étapes décrites a lieu de manière concomitante et dynamique dans le temps et l'espace. Α

Plante hôte



Figure 1.1 – Organisation du génome des Potyvirus. A, Représentation schématique d'un ARN messager. B, Représentation schématique du génome ARN des virus appartenant au genre viral Potyvirus et des étapes de production des protéines virales correspondant aux séquences codantes de l'ARN viral. VPg : protéine liée au génome, Poly (A) : séquences polyadénine. 6K₂ encadrée en vert est la protéine générant les usines de réplication virale.

1.3 Réplication virale

La première étape du cycle viral est l'entrée du virus dans quelques cellules de la plante. Cependant, cette effraction peut se révéler limitante pour le virus du fait de la nature même d'une cellule végétale qui présente une paroi pectocellulosique. La barrière naturelle constituée par la paroi peut être surmontée suite à une blessure créée par une rupture mécanique ou par l'entremise d'organismes extérieurs, tels que des insectes de type piqueur-suceurs (e.g pucerons). Une fois dans le cytosol de la cellule, les particules virales sont désassemblées et libèrent l'ARNv. L'ARNv étant de polarité positive, il est directement reconnaissable par la machinerie de traduction de l'hôte (ribosomes, facteurs d'initiation, ...) pour ainsi permettre la production de protéines virales. La synthèse a initialement lieu sous forme d'une polyprotéine qui va s'auto-maturer par protéolyse pour libérer une dizaine de protéines, parmi lesquelles l'ARN polymérase ARN dépendante (RNA polymerase RNA dependent, RdRp) (Figure 1.1). Une synthèse d'ARN complémentaire à l'ARNv a lieu (ARN négatif, ARN-) pour servir de matrice à la réplication. La réplication de l'ARNv, c'est-àdire la production de nombreuses copies de ce dernier se fait par le concours de protéines virales (RdRp, VPg, ...), le recrutement de nombreuses protéines essentielles de l'hôte (facteurs d'initiation de la traduction, ...) parmi lesquelles elF4E (*eucaryotic initiation factor* 4E (elF4E)), PABP (WITTMANN, CHATEL et al. 1997; LÉONARD, PLANTE et al. 2000; LEONARD, VIEL et al. 2004), ainsi que des ribonucléotides. Le complexe ribonucléoprotéique ainsi formé est qualifié de complexe de réplication virale. La multiplication du génome viral a lieu de manière protégée, en étroite association avec les membranes d'organites de l'hôte (cf. section 1.8). Une partie des ARN viraux nouvellement produits s'associent avec de nombreuses protéines de capside pour former de nouvelles particules virales.

1.4 Mouvement intracellulaire



Figure 1.2 – Mouvement intra- et intercellulaire du TuMV Représentation schématique de l'infection et mouvement intracellulaire du TuMV pour arriver jusqu'aux plasmo-desmes. 1, traduction de l'ARNv. 2, formation du complexe de réplication et remo-delage du RE. 3, export du complexe de réplication dans les usines de réplication virale. 4, usines virales individuelles et formation de la structure périnucléaire. 5, déplacement des usines virales le long des filaments d'actine et de myosine du cytos-quelette vers les plasmodesmes. 6, mouvement intercellulaire des usines virales. 7, entrée des usines virales dans une cellule voisine non infectée. Source : (LALIBERTÉ et ZHENG 2014).

1.5 Mouvement intercellulaire

Le virus est maintenant confronté à un nouvel obstacle, c'est-à-dire qu'il doit sortir des cellules initialement infectées pour coloniser les cellules avoisinantes et ainsi établir des foyers secondaires d'infection. Dans un premier temps, le virus va se déplacer à l'intérieur des cellules pour atteindre les plasmodesmes (Figure 1.2). Il a été montré pour de nombreux virus que le cytosquelette formé du réseau d'actine et de myosine joue un rôle essentiel dans leur mouvement intracellulaire, notamment la myosine XI pour le TuMV, le *Tobacco mosaic virus* (TMV), et le *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) (HARRIES, PARK et al. 2009; AMARI, LERICH et al. 2011; AGBECI, GRANGEON et al. 2013; AMARI, DI DONATO et al. 2014).



Figure 1.3 – Structure 3D des plasmodesmes. Reconstitution 3D d'acquisitions par tomographie en microscopie électronique de plasmodesmes d'Arabidopsis thaliana. A, Plasmodesme de type I avec son desmotubule formé de RE contraint entre les membranes plasmiques de deux cellules et étendu de part et d'autre des entrées du canal formé.
B-C, expansion du plasmodesme au cours de la maturation cellulaire laissant progressivement apparaître les filaments de protéines adaptatrices unissant le RE à la membrane plasmique à un stade précoce (B) et plus tardif (C).Jaune : membrane plasmique, bleu : desmotubule, rouge : filaments de protéines adaptatrices. Source : (NICOLAS, GRISON et al. 2017).

En conditions normales, les plasmodesmes constituent des canaux contraints par les parois de la cellule permettant de créer une continuité entre les cellules d'une plante (voie symplasmique) (LEE 2015). Les plasmodesmes présentent en leur sein une portion spécialisée du RE dénommée desmotubule et de nombreuses protéines adaptatrices (Figure 1.3). Ils agissent comme des filtres moléculaires au passage hautement régulé et par conséquent définissent une taille d'exclusion limite qui est variable selon le type de plasmodesme (linéaire, branché). En temps normal, seulement des molécules de petite taille sont capables
de passer de cellule à cellule [nutriments, hormones, molécules de signalisation, protéines de petites taille, ARN interférant (ARNsi) et micro ARN (ARNmi), ...]. Cependant, il a été montré que des structures bien plus grandes telles que des plastes (structures similaires aux chloroplastes) pouvaient aussi être transférées avec leur génome de 161 kb vers des cellules voisines (THYSSEN, SVAB et MALIGA 2012). Bien que les mécanismes sous-jacents ne soient pas encore élucidés, ceci ouvre la possibilité que des structures de taille conséquente puissent passer par les plasmodesmes.



Figure 1.4 – Modèles des modifications des plasmodesmes d'origine virale dans le mouvement intercellulaire de virus de plante. A, . Modèle de modification des plasmodesmes par les MP du TMV ne formant pas de tubule. Représentation schématique d'un plasmodesme avec le desmotubule central associé à des filaments d'actine, entouré des membranes plasmiques de deux cellules voisines et associé aux protéines adaptatrices PDLP1 tout en étant contraint entre les parois respectives. Augmentation de la taille d'exclusion limite (espace disponible) du plasmodesme permettant le passage du complexe de réplication suite au clivage des filaments d'actine entourant le desmotubule sont coupés par la MP du TMV et de la réduction des dépôts de calloses. B et C, modèle de modification des plasmodesmes par les MP de virus formant un tubule. B, modèle 1 : la formation des tubules de MP est assuré par une interaction des MP avec les protéines PDLP qui stabilisent la structure et permettent la suppression du desmotubule. Le canal formé par les MP permettrait le passage intercellulaire des particules virales. Le canal serait progressivement dissocié à l'une des extrémités et reconstitué à l'autre extrémité (flèches rouges). C, modèle 2 (alternatif) : le tubule permettrait le passage d'un complexe formé de l'ARNv et de la protéine de capside CP. Adaptée de : (RITZENTHALER 2011).

Par ailleurs, il a été observé depuis bien longtemps que les virus (génomes, protéines virales, ...) étaient capables de sortir des cellules initialement infectées *via* les plasmodesmes. La nature des formes virales qui passent par les plasmodesmes peut aller de la particule virale à des formes non encapsidées, telles que les vésicules de réplication en passant par différent types de complexes ribonucléoprotéiques (HEINLEIN 2015b; KUMAR, KUMAR et al. 2015) (Figure 1.4). Pour surmonter la barrière du plasmodesme, le virus requiert l'intervention de protéines virales pour les modifier, non seulement pour augmenter leur taille d'exclusion limite, mais aussi dans certains cas pour les restructurer (UEKI et CITOVSKY 2011) et ainsi faciliter le mouvement. Ces protéines sont souvent qualifiées de protéines de mouvement (*mouvement protein*, MP) (Table 1.1).

Famille	Genre viral	Virus	Protéine virale	Référence
Alphaflexiviri- dae	Potexvirus	Potato virus X (PVX)	TGBp1, TGBp2, TGBp3	(YANG, DING et al. 2000; FEDORKIN, SOLOVYEV et al. 2001)
Bromoviridae	Bromovirus	Brome mosaic virus (BMV)	MP	(Rao et Grantham 1995)
Caulimoviridae	Caulimovirus	<i>Cauliflower</i> <i>mosaic virus</i> (CaMV)	P1	(Citovsky, Knorr et Zambryski 1991)
Geminiviridae	Begomovirus	Squash leaf curl virus (SLCV)	BL1	(Pascal, Sanderfoot et al. 1994)
Closteroviridae	Crinivirus	Lettuce infectious yellows virus (LIYV)	p26	(STEWART, MEDINA et al. 2010)

Table 1.1 – Virus et leurs protéines de mouvement

Famille	Genre viral	Virus	Protéine virale	Référence
Bunyaviridae	Tospovirus	Tomato spotted wilt virus (TSWV)	Nsm	(SOELLICK, UHRIG et al. 2000)
Potyviridae	Potyvirus	Tobacco etch virus (TEV), Turnip mosaic virus TuMV	P3N-PIPO, CI (aide)	(WEI, ZHANG et al. 2010; VIJAYAPALANI, MAESHIMA et al. 2012)
	Comovirus	Cowpea mosaic virus (CPMV)	MP	(WELLINK, VAN LENT et al. 1993)
Secoviridae	Nepovirus	Tomato ringspot virus (ToRSV)	45K	(Sanfaçon, Wieczorek et Hans 1995)
		Grapevine fanleaf virus (GFLV)	P38	(Ritzenthaler, Pinck et Pinck 1995)
Tombusviridae	Dianthovirus	Red clover necrotic mosaic virus (RCNMV)	MP	(XIONG, KIM et al. 1993)
	Umbravirus	Groundnut rosette virus (GRV)	MP	(Ryabov, Robinson et Taliansky 1999)
Virgaviridae	Tobamovirus	Tobacco mosaic virus (TMV), <i>Tomato bushy stunt virus</i> (TBSV)	MP	(Ohno, Takamatsu et al. 1983 ; Turina, Omarov et al. 2003)

Table 1.1 - Virus et leurs protéines de mouvement (suite)

Cependant pour ce qui est des potyvirus, aucune protéine de mouvement n'a été clairement identifiée. Il semble plutôt qu'un ensemble de protéines soit impliqué. En effet, la protéine cylindrique d'inclusion (CI) et la protéine PIPO assistent le virus dans sa traversée des plasmodesmes (WEI, ZHANG et al. 2010; MOVAHED, PATARROYO et al. 2017). Il a récemment été montré que les protéines CI et PIPO étaient suffisantes pour assurer le passage de la protéine $6K_2$ d'une cellule à l'autre (MOVAHED, PATARROYO et al. 2017). Le TuMV et le Tobacco etch virus (TEV) ciblent les plasmodesmes avec la protéine CI et la protéine PIPO pour former de grandes inclusions coniques facilitant le passage des virus au travers des plasmodesmes (WEI, ZHANG et al. 2010; MOVAHED, PATARROYO et al. 2017). Dans le cas du TuMV, la protéine virale CI interagit avec la protéine virale $6K_2$ pour servir de point d'amarrage des structures membranaires générées par $6K_2$ (cf. section 1.8) au niveau des inclusions cytoplasmiques. Cette interaction semble être essentielle au transfert intercellulaire des structures induites par la protéine virale 6K₂ (MOVAHED, PATARROYO et al. 2017). La protéine CI fait aussi parti du complexe de réplication des potyvirus (COTTON, GRANGEON et al. 2009), ce qui souligne la multi-fonctionalité de cette protéine virale (SOREL, GARCIA et GERMAN-RETANA 2014). De plus, de nombreuses protéines de la plante sont prises en otage par les virus pour atteindre les plasmodesmes. En effet, il a été montré qu'une protéine PCaP1 liée à la membrane plasmique pouvait interagir avec PIPO au niveau des plasmodesmes et qu'elle était primordiale au mouvement intercellulaire du TuMV (VIJAYAPALANI, MAESHIMA et al. 2012). PDLP1 (*Plasmodesmata Membrane* Located Protein 1) est aussi une protéine du plasmodesme qui est recrutée par la protéine de mouvement du GFLV et est importante pour le mouvement intercellulaire de ce dernier (AMARI, LERICH et al. 2011).

Exploiter la voie symplasmique n'est pas sans encombre pour un virus, car la plante hôte met en place des mécanismes de défense pour circonscrire au plus vite ce dernier dans les cellules initialement infectées, notamment en modifiant les voies de sortie (plasmodesmes) (UEKI et CITOVSKY 2011). Il est important de noter que les plasmodesmes sont loin d'être de simples canaux béants délimités par les parois cellulaires. En effet, l'action concertée du desmotubule et de nombreuses protéines adaptatrices qui interviennent dans les contacts entre la membrane plasmique, le desmotubule et le cytosquelette, concourent à la régulation dynamique du passage de molécules entre cellules (Figure 1.3). Des dépôts de callose aident au contrôle des communications intercellulaires (CUI et LEE 2016). La callose est un homopolymère de glucose branché en liaison β -1,3 et β -1,6 qui est produit par la plante à partir d'UDP-glucose grâce à l'enzyme callose synthase. En cas de stress biotique induit par un virus, les dépôts de calloses vont venir comprimer la membrane plasmique avec la membrane du desmotubule, obturer le passage et contribuer au contrôle de la propagation de l'infection (IGLESIAS et MEINS 2000; BUCHER, TARINA et al. 2001). Ce type de fermeture peut être réversible suite à l'action d'une β -1,3 glucanase qui va découper la callose (LEVY, GUENOUNE-GELBART et EPEL 2007; LEVY, ERLANGER et al. 2007).

1.6 Mouvement systémique

Le virus passe de cellule en cellule par la voie symplasmique constituée du réseau intracellulaire interconnectant les cellules d'une plante pour atteindre les vaisseaux vasculaires de la plante. Les tissus vasculaires sont constitués du phloème et du xylème. Le phloème est constitué de tubes criblés et des cellules compagnes. Les cellules des tubes criblées interconnectées par des plateaux criblés sont dépourvues d'organites et dépendent des cellules adjacentes appelées cellules compagnes pour leur survie. Le phloème distribue la sève élaborée qui contient de nombreuses molécules en transit, telles que des sucres issus de la photosynthèse, des nutriments, des hormones, des protéines, des ARN et ceci depuis les tissus sources photosynthétiques vers les tissus puits (organes en croissance, racines, ...) (Hu, HAM et al. 2016). Les vaisseaux du xylème sont quant à eux constitués de cellules mortes où circule la sève brute qui transporte principalement de l'eau, des sels, des hormones, mais aussi quelques protéines (BERNONVILLE, ALBENNE et al. 2014; CARELLA, WILSON et al. 2016). Finalement, les vaisseaux du xylème sont en connexion avec le milieu extracellulaire de la plante (apoplaste) (LIGAT, LAUBER et al. 2011).

Une fois le virus rendu dans les tissus vasculaires, il va y être chargé et suivre le flux de sève élaborée du phloème pour atteindre les organes les plus distants de la plante (mouvement systémique) et à nouveau se multiplier (KEHR et BUHTZ 2007). Le processus de chargements et déchargements du phloème se font par des plasmodesmes particuliers branchés, dont la taille d'exclusion limite est bien plus grande que celle des plasmodesmes liant les autres cellules. Ils laissent passer des protéines d'au moins 67 kDa (OPARKA et CRUZ 2000). Il est généralement admis que les virus se déplacent uniquement *via* le phloème. Ainsi, le phloème semblerait être la voie de prédilection pour le transport systémique afin de coloniser la plante entière où les virus (i.e particules virales) sont chargés et déchargés au fur et à mesure de leurs avancées dans la plante. Cependant, il est primordial de noter que les investigations in situ visant à identifier l'entité virale se déplaçant dans les tissus vasculaires restent encore sommaires. Du fait de la complexité des analyses (e.g microscopie), la plupart des investigations menées sont indirectes. De récentes investigations rendent le dogme établi contestable. En effet, il a été mis en évidence récemment que le TuMV (*Potyvirus*) et le (PVX) Potexvirus exploitent non seulement le phloème mais aussi les vaisseaux du xylème lors de l'infection systémique (WAN, CABANILLAS et al. 2015). De plus, il est important de souligner que l'une des entités du TuMV retrouvées dans les vaisseaux du xylème et du phloème est le complexe de réplication entouré de membranes, autrement dit un complexe RNP dans des usines de réplication virale (Figure 1.5). Des particules virales du TuMV ont aussi été observées dans le xylème et sa sève. Des analyses ont aussi montré que le Potato mop-top virus (PMTV) se déplaçait systémiquement sous la forme de complexes RNP sans forcément requérir la forme particule virale (TORRANCE, LUKHOVITSKAYA et al. 2009). Prises ensemble, ces observations indiquent que des complexes viraux RNP sous forme d'usines de réplication virale ou pas, peuvent se déplacer systémiquement dans les vaisseaux vasculaires d'une plante.



Figure 1.5 – Détection des usines de réplication virale du TuMV et du PVX dans les tissus vasculaires de l'hôte. Images de microscopie confocale de coupes longitudinales de tiges de plantes Nicotiana benthamiana infectées avec TuMV/6K₂ :GFP (A, B, D) ou avec TuMV/6K₂ :mCherry (C, E). A, Reconstruction 3D et 2D de vaisseaux du xylème contenant des agrégats de $6K_2$:GFP. B, détection par immunohistofluorescence d'ARN double brin (rouge) dans des vaisseaux du xylème contenant 6K₂-GFP (vert). C, Marquage de lipides membranaires avec le chromophore $DioC_6(3)$ (rouge) d'une coupe 2D de vaisseaux du xylème contenant 6K₂-mCherry (vert). D, Détection par immuno-histofluorescence d'ARN double brin (rouge) dans des vaisseaux du phloème contenant 6K₂-GFP (vert). Les vaisseaux du phloème sont identifiés par une coloration des plateaux criblés au chromophore Aniline blue (D-F, magenta). E, Marquage de lipides membranaires avec le chromophore $DioC_6(3)$ (rouge) d'une coupe 2D de vaisseaux du phloème contenant 6K₂-mCherry (vert). Les ovales en pointillés indiquent la présence de vésicules induites par $6K_2$ dans des agrégats (D, E). Images de microscopie confocale 2D de coupes longitudinales de tiges de plantes Nicotiana benthamiana infectées avec PVX (F, G). F, Détection par immuno-histofluorescence d'ARN double brin (rouge) et marquage de lipides membranaires avec le chromophore $DioC_6(3)$ (vert) dans des vaisseaux du phloème infecté par PVX. Les têtes de flèches indiquent la présence de 6K2 :GFP dans des structures en anneau pouvant être des plastes P du phloème. G, détection par immunohistofluorescence d'ARN double brin (rouge) et marquage de lipides membranaires avec le chromophore $DioC_6(3)$ (vert) dans des vaisseaux du xylème infecté par PVX. Les parois du xyléme sont colorées au chromophore Fluorescent Brightener 28 et apparaissent en magenta dans les images (A-C, G). Adaptée de : (WAN, CABANILLAS et al. 2015).

Les quelques protéines virales impliquées dans le mouvement systémique des virus sont assez bien identifiées, en revanche peu de facteurs de plantes impliqués dans ce processus ont été identifiés. En effet, les MP de certains virus ont été montrées comme étant non seulement impliquées dans le mouvement intercellulaire, mais aussi systémique des virus, comme par exemple, les TGB (triple-gene-block, genre Hordeivirus) (WRIGHT, COWAN et al. 2010). Pour le genre *Potyvirus*, la protéine Helper component proteinase (HC-Pro), la protéine de capside et la protéine liée au génome viral (VPg) ont un rôle important dans le mouvement systémique (DOLJA, HALDEMAN et al. 1994; SCHAAD et CARRINGTON 1996; ANDREJEVA, PUURAND et al. 1999; RAJAMÄKI et VALKONEN 1999). En effet, il a été montré qu'une mutation dans le domaine central de la protéine HC-Pro du TEV altérait le mouvement systémique (CRONIN, VERCHOT et al. 1995). Il a aussi été mis en évidence que les parties N-terminale et C-terminale de la CP étaient impliquées dans le mouvement systémique du TEV (DOLJA, HALDEMAN-CAHILL et al. 1995). D'autre part, la substitution d'un groupe de cinq acides aminés dans le domaine central de la VPg se traduit par une perte du mouvement systémique du TEV (SCHAAD, LELLIS et CARRINGTON 1997). Des mutations dans la protéine 6K₂ associée aux membranes et essentielle à la formation des usines virales, se traduisent par une perte du mouvement systémique du virus Potato virus A (PVA) et du TuMV (SPETZ et VALKONEN 2004; JIANG, PATARROYO et al. 2015). De plus, quelques facteurs de l'hôte ont été identifiés comme étant nécessaires au mouvement systémique des phytovirus ou comme étant impliqués dans la restriction de leur propagation systémique des virus dans la plante (Table 1.2). Par exemple, les protéines PVIP, AtRH8 ont été identifiées comme étant impliquées dans le mouvement systémique de potyvirus (DUNOYER, THOMAS et al. 2004; HUANG, WEI et al. 2010). D'autres protéines sont produites dans la plante pour restreindre le mouvement systémique des potyvirus, tel que les protéines RTM. La protéine DCL4 (Dicer-like 4) appartenant à la voie de silencing des ARN semble être intervenir dans la restriction du Zucchini yellow mosaic virus (ZYMV) au feuilles initialement infectées (CORDERO, CERDÁN et al. 2017). Notons que la machinerie du silencing des ARN est l'un des moyens de prédilection que la plante exploite pour lutter contre les virus à ARN. Ainsi, de nombreuses protéines de plantes restent à être identifiées pour préciser et comprendre le mouvement systémique des virus.

Table 1.2 – Virus et facteurs de l'hôte importants dans le mouvement sys-témique de plusieurs phytovirus

Genre viral	Virus	Protéine/voie de l'hôte	Référence
Bromovirus	Brome mosaic virus (BMV)	HCP1	(OKINAKA, MISE et al. 2003)
Geminivirus	Beet curly top virus (BCTV)	SNF1, ADK (kinases)	(YANG, BALIJI et al. 2007)

Genre viral	Virus	Protéine/voie de l'hôte	Référence
Umbravirus	Groundnut rosette virus (GRV)	Fibrillarine	(Кім, Ryabov et al. 2007 ; Салетта, Кім et al. 2008)
	<i>Tomato mosaic virus</i> (ToMV)	IP-L	(LI, WU et al. 2005)
Tobamovirus	Turnip vein-clearing virus (TVCV)	IV)III - LD-clearing VCV)cdiGRPDesaic virus V)PMEDesaic virus V)Hsp70PMEPVIP	(UEKI et CITOVSKY 2002)
	Tobacco mosaic virus (TMV)		(CHEN et AHLQUIST 2000)
	Tobacco mosaic virus (TMV)	Hsp70	(CHEN, ZHOU et al. 2008)
	Pea seed borne mosaic virus (PSbMV)	PVIP	(DUNOYER, THOMAS et al. 2004)
Potyvirus	Tobacco etch virus (TEV)	RTM1, RTM2, RTM3	(MAHAJAN, CHISHOLM et al. 1998; WHITHAM, ANDERBERG et al. 2000; COSSON, SOFER et al. 2010)
	<i>Plum pox virus</i> (PPV), <i>Turnip mosaic virus</i> (TuMV)	AtRH8	(HUANG, WEI et al. 2010)
	Turnip mosaic virus (TuMV), Potato virus Y (PVY)	Voie IRE1/bZIP60	(GAGUANCELA, Zúñiga et al. 2016)
Potexvirus	Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV), Potato virus X (PVX)	et Bax Inhibitor 1	

Table 1.2 – Virus et facteurs de l'hôte importants dans le mouvement sys-
témique de plusieurs phytovirus (suite)

Le cycle viral se termine quand le virus sort de la plante et se propage dans l'environnement. Sortir de la plante hôte avant qu'elle ne meure n'est pas sans encombre et demeure une étape cruciale pour le virus. Au premier abord, la dissémination entre plantes peut paraitre infranchissable pour un virus, cependant elle peut avoir lieu de manière passive par simple contact au niveau de blessures mécaniques de la plante ou active par l'intermédiaire de nématodes, de champignons ou d'insectes (NG et FALK 2006). L'association à des insectes comme mode de dissémination a évolutivement été opté par de nombreux virus, pour franchir de manière efficace les longues distances qui séparent une plante d'une autre. Les insectes sont des vecteurs de transmission des maladies et sont souvent de type piqueurs/suceurs (e.g pucerons, cicadelles, aleurodes,...). Différents types de transmission virale existent et peuvent être circulantes ou non circulantes. Cette terminologie qualifie la capacité d'un virus à se déplacer dans l'insecte au-delà de la première zone de contact ou pas. Les virus non circulants sont soit non persistants (e.g genre *Potyvirus*) et restent brièvement dans le stylet de l'insecte, soit persistants (e.g famille *Closteroviridae*) et demeurent potentiellement transmissibles durant des jours. Les virus circulants peuvent être prolifératifs (e.g genre Sequivirus) ou pas (e.g famille des Luteoviridae, Nanoviridae). Lorsque le virus est dit prolifératif, l'insecte vecteur devient à son tour un hôte dans lequel le virus peut se multiplier avant d'être transmis. La dissémination d'un virus peut globalement se diviser en trois étapes, telles que le prélèvement dans une plante malade, le maintien à durée variable dans l'insecte vecteur et l'inoculation dans une plante saine. La première étape est déterminante pour initier le processus de propagation de la maladie au sein d'une nouvelle population de plantes saines. Pour cela, les virus ont habilement évolué pour déréguler les voies de biosynthèses primaires et secondaires de la plante hôte pour notamment la rendre plus attractive. En effet, des études menées par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse sur les composés volatils produits par des plantes infectées ont montré que les insectes piqueurs/suceurs étaient beaucoup plus attirés par celle-ci que par des plantes saines (WESTWOOD, LEWSEY et al. 2014; GROEN, JIANG et al. 2016). De manière similaire, les insectes pollinisateurs sont plus attirés par des plantes infectées par des virus que des plantes saines (DÁDER, THEN et al. 2017). Bien que les insectes pollinisateurs ne soient pas impliqués directement dans la transmission des virus, ils faciliteraient la survie de plantes sensibles (production de graines fertiles) au détriment de plantes plus résistantes. L'acquisition ou l'inoculation, notamment de particules virales par l'insecte a lieu lorsque il sonde certaines cellules ou se nourrit dans les tissus vasculaires (phloème) de la plante malade. En effet, une source potentielle de particules virales pour le TuMV pourrait être prélevée dans les vacuoles de cellules infectées lorsque l'insecte "goûterait" une plante infectée (WAN, CABANILLAS et al. 2015; BAK, CHEUNG et al. 2017). De plus certaines protéines virales entrent en jeu dans la transmission de particules virales virales vira les insectes, par exemple la protéine HC-Pro et VPg-Pro des potyvirus facilite l'interaction virus/vecteur (FERNANDEZ-CALVINO, GOYTIA et al. 2010; CASTEEL, YANG et al. 2014). Le virus arrivant dans une nouvelle plante hôte saine va pouvoir entreprendre un nouveau cycle d'infection.

1.7 Organisation d'une cellule végétale et physiologie d'une plante



Figure 1.6 – Organisation d'une cellule de plante. Représentation schématique des différents compartiments d'une cellule de plante. RE : réticulum endoplasmique. Tonoplaste : membrane de la vacuole. Apoplaste : espace extracellulaire. EP : endosome précoce. ET : endosome tardif. CPV/CMV : compartiment prévacuolaire/ compartiment multivesiculaire. Plasmodesme : canal spécialisé reliant le cytosol de deux cellules voisines.

Tous les virus à ARN+, et ceci quelque soit leur hôte, se répliquent en étroite association avec les membranes présentes dans les cellules de l'hôte. Ils remodèlent le système endomembranaire des cellules à leur avantage pour pouvoir accomplir leur réplication. Une description d'une cellule végétale est de ce fait nécessaire. Une cellule végétale (Figure 1.6) est une cellule eucaryote et représente l'unité de base constitutive d'une plante. Comme toute cellule eucaryote, les cellules végétales sont délimitées par une membrane plasmique et possèdent entre autre un noyau, un réticulum endoplasmique (RE) associé aux ribosomes dit réticulum endoplasmique rugueux (RER), l'appareil de Golgi, le réseau Trans-Golgien (réseau du trans Golgi (RTG)ou Trans Golgi Network ou réseau du trans-Golgi RTG (TGN)), des endosomes, des compartiments prévacuolaires ou PVC/MVB: pre-vacuolar compartment / multivesicular bodies (CPV), des peroxysomes et des mitochondries. Elles partagent notamment avec les cellules de champignons la présence d'une vacuole qui peut jouer le rôle de centre de dégradation ou de stockage. Dans le cas de la cellule animale, les lysosomes sont la contrepartie des vacuoles et seule la fonction lytique est exploitée. Les cellules végétales sont différentes des cellules animales et des champignons notamment par la présence de plastes (chloroplastes, chromoplastes, amyloplastes) et du fait qu'elles sont entourées d'une paroi pecto-cellulosique. La paroi constituée de cellulose, d'hémicellulose et de pectines forme un maillage conférant de la structure aux cellules et de la rigidité à la plante. Cependant, ce maillage présente des ouvertures permettant d'interconnecter deux cellules via les plasmodesmes. Ces derniers assurent une continuité contrôlée entre cellules qui est qualifiée de réseau symplasmique. L'espace extracellulaire entre les membranes plasmiques des cellules et les parois définit un autre continuum appelé réseau apoplastique (ou apoplaste). Enfin, l'ensemble des différentes cellules constituent les différents types de tissus d'une plante : épiderme, mésophile (parenchyme) et vaisseaux vasculaires (Figure 1.7). Ces derniers sont constitués du xylème et du phloème et assurent la redistribution à longue distance d'éléments nutritifs, de signalisation, de défense et d'eau. Ainsi, l'activité coordonnée de tous ces compartiments permet à la plante de poursuivre sa croissance et de faire face aux stress qu'ils soient d'origine biotiques ou abiotiques.



Figure 1.7 – Organistation des tissus d'une plante Représentation schématique des différents tissus et cellules constitutifs d'une plante. Adaptée de : Image d'internet.

1.8 Remodelage cellulaire pour la réplication des virus à ARN+

Le remodelage membranaire accomplit par les virus à ARN+ aboutit dans la formation de nouveaux compartiments qualifiés d'usines de réplication virale. Bien qu'actuellement qualifiés d'usines de réplication virale, ces structures peuvent avoir différentes appellations dans la littérature scientifique, telles que vésicules de réplication, sphérules, tubules, virosomes, viroplasmes, toile membranaire, pseudopodes, granules, inclusions. Cette vaste sémantique selon les virus est souvent le fruit de descriptions morphologiques des différentes structures membranaires virales, alors que la qualification d'usines de réplication virale de ces mêmes structures fait appel à un aspect plutôt fonctionnel. De ce fait, nous retiendrons le terme d'usine de réplication virale pour se référer à ces compartiments viraux. Les différentes études scientifiques menées jusqu'a présent ont permis d'avoir des connaissances de plus en plus fines sur la morphologie des usines virales, notamment grâce aux récents progrès en microscopie confocale et surtout en microscopie électronique combinée à la to-mographie. En effet, les compartiments viraux prennent différentes formes selon le type de virus à ARN+ et selon le type d'organite ciblé. Globalement, ces structures virales pourraient être divisées en deux groupes, c'est-à-dire celles correspondant à des invaginations de membranes semi-closes et celles formant des vésicules complètement closes. Les membranes de l'hôte subissent des déformations soit plutôt par courbure négative dans le cas des usines virales formées par invagination (e.g. *Flock house virus* (FHV), DENV, *Rubella virus* (RUBV), ZIKV, *Tomato bushy stunt virus Tomato bushy stunt virus* (TBSV)), soit par courbure positive dans le cas des usines virales formées par lovageonnement de vésicules (e.g. HCV, *Poliovirus* (PV), *Coxsackievirus B3 Coxsakievirus B3* (CVB3), *Equine arterivirus* (EAV), *Severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus* (SARS-CoV), TuMV, TMV) (Figure 1.8).



Figure 1.8 – Usines de réplication virale de virus à ARN+ Reconstitutions 3D d'acquisitions par tomographie en microscopie électronique d'usines de réplication virale de virus humain (A-D, F-J) ou phytopathogènes (E, K) à ARN+. Les panneaux de droite (A-E) illustrent les usines de réplication virale semi-closes formées par invagination et les panneaux de gauche (F-K) celles formant des vésicules par bourgeonnement.
A, FHV. B, DENV. C, RUBV. D, ZIKV, (Vi) : virion, (Ve) virions (Vi) : usines de réplication virale. E, TBSV. F, PV. G, CVB3. H, HCV. I. SARS-CoV. J, EAV. K, TuMV. Sources : (KOPEK, PERKINS et al. 2007; KNOOPS, KIKKERT et al. 2008; WELSCH, MILLER et al. 2009; FONTANA, LÓPEZ-IGLESIAS et al. 2010; LIMPENS, SCHAAR et al. 2011; BELOV, NAIR et al. 2012; KNOOPS, BÁRCENA et al. 2012; ROMERO-BREY, MERZ et al. 2012; WAN, CABANILLAS et al. 2015; CORTESE, GOELLNER et al. 2017; CASTRO, FERNÁNDEZ et al. 2017)

Par ailleurs, il est intéressant de noter que dans certains cas un même virus peut réorganiser des membranes d'organites différents pour former différent types d'usines virales. C'est entre autres le cas du TuMV qui exploite le RE pour la formation de tubules à simple membrane, de vésicules à double membrane, mais aussi des invaginations à la membrane externe des chloroplastes (WEI et WANG 2008; COTTON, GRANGEON et al. 2009; WEI, ZHANG et al. 2013). Le TBSV forme normalement des sphérules par invagination des membranes des peroxisomes (MCCARTNEY, GREENWOOD et al. 2005), mais peut aussi former ses usines virales à partir du RE (JONCZYK, PATHAK et al. 2007). Les usines du RUBV auraient pour origine le RE, l'appareil de Golgi, la mitochondrie et les lysosomes (FONTANA, LÓPEZ-IGLESIAS et al. 2010). D'autres quant à eux se cantonnent à un seul compartiment cellulaire, tel que la mitochondrie [FHV, Melon necrotic spot virus (MNSV), Carnation italian ringspot virus (CIRV)] (MILLER, SCHWARTZ et AHLQUIST 2001; HWANG, MC-CARTNEY et al. 2008; GÓMEZ-AIX, GARCÍA-GARCÍA et al. 2015), les chloroplastes *Turnip yellow mosaic virus* (TYMV), (COWAN, ROBERTS et al. 2012; PROD'HOMME, JAKUBIEC et al. 2003), voire même la vacuole (ToMV) (NISHIKIORI, DOHI et al. 2006). Mais pour une grande partie des virus à ARN+, le RE est utilisé comme compartiment de prédilection pour y nicher les usines virales, notamment le cas du HCV, du DENV, du ZIKV, du West Nile virus (WNV), du Tick-borne encephalitis virus (TBEV), ainsi que du TuMV, du TMV et du Brome mosaic virus (BMV) (Table 1.3) (CHEN et AHLQUIST 2000; COTTON, GRANGEON et al. 2009; GRANGEON, AGBECI et al. 2012; CHATEL-CHAIX et BARTENSCHLAGER 2014; CORTESE, GOELLNER et al. 2017; SUZUKI 2017; GIL-LESPIE, HOENEN et al. 2010; MIORIN, ROMERO-BREY et al. 2013). en outre, certains virus puisent dans les membranes d'organites préexistants pour former leurs usines virales, sans qu'il y ait synthèse accrue des composantes de l'organite, alors que d'autres induisent une prolifération de novo de membranes via la manipulation des voies de biosynthèse des lipides. En effet, le PV forme ses usines de réplication à partir du RE et de l'appareil de Golgi, mais la biogenèse de ces usines semble avoir lieu qu'à partir de membranes nouvellement produites (STRATING et KUPPEVELD 2017). En effet, le PV semblerait stimuler la prolifération de membranes, notamment en dérégulant les voies de biosynthèses des lipides pour activer la production de nouveaux lipides nécessaires à l'édification de ses usines virales (GRENINGER 2015). D'autres virus dérégulent l'expression d'enzymes clés de plusieurs voies de biosynthèse de lipides (DENV, BMV) (LEE et AHLQUIST 2003; ZHANG, ZHANG et al. 2016; JORDAN et RANDALL 2017; SOTO-ACOSTA, BAUTISTA-CARBAJAL et al. 2017). En revanche certains virus manipulent des voies de biosynthèse spécifiques, tel que la voie de biosynthèse des phospholipides (FHV) (CASTORENA, STAPLEFORD et MILLER 2010; SHARMA, SASVARI et NAGY 2011) ou la voie de production des phosphatidilinositols par le HCV pour former leurs usines virales (MAEHAMA, FUKASAWA et al. 2013; REGHELLIN, DONNICI et al. 2014; CHO, LEE et al. 2015).

En ce qui concerne l'aspect fonctionnel des usines de réplication virale, elles constituent un microenvironnement propice à la production virale. En effet, les membranes des usines virales forment une barrière physique mettant le complexe de réplication à l'abri des systèmes de défense de l'hôte et ainsi pouvoir accomplir de manière efficace et coordonnée toutes les étapes de la réplication (KOVALEV, INABA et al. 2017).



Figure 1.9 – Interactome et contenu en protéines des usines de réplication virale du TuMV. Ligne bleu : interaction entre protéines virales, ligne verte : interaction entre une protéine virale et de la plante hôte, ligne orange : interaction entre une protéine virale et ARN viral (ARNv). flèches blanche : auto-interaction. Adaptée de : (JIANG et LALIBERTÉ 2011)

Les usines permettent de concentrer localement les ARNv, des ribonucléotides, des protéines virales et de nombreuses protéines de l'hôte prises en otage pour la réplication virale (LALIBERTÉ et SANFAÇON 2010; LALIBERTÉ et ZHENG 2014). Par exemple, le TuMV recrute dans ses usines virales de nombreux facteurs viraux (e.g VPg, RdRp, P1) et de l'hôte permettant l'édification d'un complexe de réplication (Figure 1.9) (COTTON, GRANGEON et al. 2009). En effet des protéines impliqués dans l'initiation (e.g elF4E, elF4G, PABP) et l'élongation (e.g eEF1A) de la traduction, ou la stabilisation de protéines (e.g Hsp70-3), agissent de concert avec les protéines virales et l'ARNv pour la réplication du TuMV au sein des usines virales (BEAUCHEMIN et LALIBERTÉ 2007; BEAUCHEMIN et LALIBERTÉ 2007; DUFRESNE, THIVIERGE et al. 2008; THIVIERGE, COTTON et al. 2008; COTTON, GRANGEON et al. 2009; HUANG, WEI et al. 2010). Le TBSV quant

à lui recrute dans ses usines virales du peroxisome des facteurs viraux tels que la protéine associée aux membranes p33, la polymérase p92 (RdRp) et de nombreux facteur de l'hôte parmi lesquels la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH, voie de la glycolyse) et des facteurs de traduction (e.g eEF1A) (NAGY 2016).

Les facteurs viraux nécessaires à la biogenèse des usines virales sont assez bien identifiés pour de nombreux virus, toutefois pour d'autres, seuls le compartiment ciblé a été identifié et les protéines responsables restent encore à être déterminées (Table 1.3, ND : protéine non déterminée). Une à trois protéines transmembranaires ou associées aux membranes via des hélices amphipatiques ou par des ancrages par lipidification (palmitoylation, prénylation, ...) sont nécessaires pour induire le remodelage du système endomembranaire de la cellule hôte. Par exemple, la protéine transmembranaire NS4B du HCV serait suffisante pour induire le remodelage du RE (BRIGGS, GOMES et al. 2015). Cependant, les protéines non-structurales NS4A et NS5A sous forme libre ou de précurseur (e.g. NS5A ou NS4 :NS5A) participeraient elles aussi au processus de formation de la toile membranaire et des vésicules double membrane (DAVID, YAFFE et al. 2015; BISWAS, TREADAWAY et TELLINGHUISEN 2016; ROMERO-BREY, MERZ et al. 2012; ROMERO-BREY, BERGER et al. 2015). En ce qui concerne les potyvirus, la protéine $6K_2$ est suffisante pour induire le remodelage membranaire (RESTREPO-HARTWIG et CARRINGTON 1994; BEAUCHEMIN et LALIBERTÉ 2007 ; WEI et WANG 2008). La protéine p33 du TBSV induit le remodelage des peroxysomes pour former ses usines virales (MCCARTNEY, GREENWOOD et al. 2005). Les protéines 130K et 180K du TMV bien que ne possédant pas de domaines transmembranaires sont responsables du remodelage du RE donnant naissance à ses usines virales (HEINLEIN 2015a).

Famille	Genre viral	Virus	Protéine virale	Compartiment ciblé ou créé	Référence
Alphaflexiviridae	Potexvirus	Potato virus X (PVX)	TGB2p, TGB3p	RE	(TILSNER, LINNIK et al. 2012; TILSNER, LINNIK et al. 2013)
Bromoviridae	Bromovirus	Brome mosaic virus (BMV)	1a	RE	(Restrepo-Hartwig et Ahlquist 1996)
Diemermaae	Alfamovirus	Alfalfa mosaic virus (AMV)	ND	RE	(VAN DER HEIJDEN, CARETTE et al . 2001)
Potyviridae	Potyvirus	Tobacco etch virus (TEV), Turnip mosaic virus (TuMV)	6K ₂ , 6K ₂ - VPg-Pro	RE, chloroplaste	(Restrepo-Hartwig et Carrington 1994; Beauchemin et Laliberté 2007; Wei, Zhang et al. 2013)
Secoviridae	Comovirus	Cowpea mosaic virus (CPMV)	32K (Co-Pro), 68K (NTB- VPg)	RE	(CARETTE, LENT et al. 2002)
	NepovirusTomato ringspotX2Virus (ToRSV)NTB-		X2, NTB-VPg	RE	(HAN et SANFAÇON 2003)
		Grapevine fanleaf virus (GFLV)	ND	RE	(Ritzenthaler, Pinck et Pinck 1995)

Table 1.3 - Virus, compartiments et facteurs viraux impliqués dans la biogenèse des usines virales

 $\overset{\omega}{\omega}$

Table 1.3 – Virus,	compartiments et	facteurs v	riraux ir	mpliqués	dans la	biogenèse	des	usines	virales	(suite)

Famille	Genre viral	Virus	Protéine virale	Compartiment ciblé ou créé	Référence
Caulimoviridae	Caulimovirus	Cauliflower mosaic virus (CaMV)	P2, P6	inclusions	(CECCHINI, GONG et al . 1997)
	Carnation Italian ringspot virusmitochond(CIRV)p36		mitochondrie	(HWANG, MCCARTNEY et al. 2008)	
Tombusviridae	Tombusvirus	Cymbidium ringspot virus (CyRSV)		peroxisome	(Navarro, Rubino et Russo 2004)
		Cucumber necrosis virus (CNV)	р33	peroxisome	(Rochon, Singh et al. 2014)
		Tomato bushy stunt virus (TBSV)			(McCartney, Greenwood et al. 2005)
	Carmovirus	Melon necrotic spot virus (MNSV)	p29	mitochondrie	(GÓMEZ-AIX, GARCÍA-GARCÍA et al . 2015)
	Dianthovirus	Red clover necrotic mosaic virus (RCNMV)	p27	RE	(KUSUMANEGARA, MINE et al. 2012)

34

Famille	Genre viral	Virus	Protéine virale	Compartiment ciblé ou créé	Référence
	Tobamovirus	Tobacco mosaic virus (TMV)	126-kDa	RE	(REIS FIGUEIRA, GOLEM et al. 2002)
Virgaviridae	resumevirus	Tomato mosaic virus (ToMV)	120 1120	RE, vacuole	(Komoda, Naito et Ishikawa 2004)
	Pecluvirus P		ND	RE	(DUNOYER, RITZENTHALER et al . 2002)
	Flavivirus		NS4A	RE	(MILLER, KASTNER et al. 2007)
Flaviviridae		West Nile virus (WNV) Zika virus (ZIKV)		RE	(GILLESPIE, HOENEN et al. 2010)
				RE	(Cortese, Goellner et al. 2017)
	Tick-borne encephalitis virus (WNV)		ND	RE	(MIORIN, ROMERO-BREY et al . 2013)
	Hepacivirus	Hepatitis C virus (HCV)	NS4B, NS3 , NS5A	RE	(Egger, Wölk et al. 2002 ; Romero-Brey, Merz et al. 2012)

Table 1.3 - Virus, compartiments et facteurs viraux impliqués dans la biogenèse des usines virales (suite)

35

Table 1.3 – Virus,	compartiments et	facteurs	viraux	impliqués	dans la	biogenèse	des u	isines	virales ((suite)

Famille	Genre viral	Virus	Protéine virale	Compartiment ciblé ou créé	Référence
Tymoviridae	Tymovirus	Turnip yellow mosaic virus (TYMV)	66K	chloroplaste	(PROD'HOMME, JAKUBIEC et al. 2003)
Bunyaviridae	Tospovirus	Tomato spotted wilt virus (TSWV)	Gn, Gc et Nsm	RE et vacuole	(FENG, XUE et al. 2016)
Picornaviridae	Enterovirus	Poliovirus (PV)	2BC, 3A	RE, Golgi	(CHO, TETERINA et al. 1994; SUHY, GIDDINGS et KIRKEGAARD 2000)
Nodaviridae	Alphanodavirus	Flock house virus (FHV)	Protéine A	mitochondrie	(КОРЕК, SETTLES et al . 2010)
Rhabdoviridae	Nucleorhabdovirus	Potato yellow dwarf virus (PYDV)	ND	RE	(GOODIN, YELTON et al. 2005)
		Sonchus yellow net virus (SYNV)	ND	noyau	
Togaviridae	Rubivirus	<i>Rubella virus</i> (RUBV)	P150, P90	RE, Golgi, mitochondrie, lysosomes	(KUJALA, AHOLA et al. 1999; Fontana, Tzeng et al. 2007)

36

Ainsi, ces protéines associées aux membranes constituent de bons marqueurs pour repérer les usines virales *in vivo*. Par exemple, des observations par microscopie de la protéine 6K₂ du TuMV ont montré que différentes structures subcellulaires étaient formées durant l'infection (Figure 1.10). En effet, une structure globulaire périnucléaire constituée de membranes du RE, de chloroplastes, d'usines virales et de l'appareil du Golgi amalgamées, d'usines virales individuelles ou regroupées et d'un anneau sur le pourtour des chloroplastes qui correspondent aux multiples invaginations juxtaposées ont été observées par microscopie confocale (GRANGEON, AGBECI et al. 2012) et électronique (WAN, BASU et al. 2015).



Figure 1.10 – Remodelage cellulaire par le TuMV. Identification des différents compartiments cellulaires remodelés pour former la structure membranaire périnucléaire d'une cellule infectée par le TuMV. Reconstruction 3D d'acquisitions effectuées par microscopie confocale (A, B). A, expression d'un marqueur du RE GFP-HDEL (vert) dans une cellule épidermique saine, ou B, dans une cellule infectée par TuMV-6K₂ :mCherry (rouge). L'astérisque indique la position du noyau entouré de la structure périnucléaire et la tête de flèche indique la présence d'une usine de réplication virale sur un faisceau transvacuolaire du RE. Images 2D de microscopie confocale de cellules épidermiques infectées par TuMV/6K₂ :mCherry en présence de différentes marqueurs cellulaires (C-K). C-E, coexpression avec un marqueur du trans-Golgi ST-GFP. F-G, coexpression avec un marqueur du cis-Golgi ERD2-GFP.
H, coexpression avec un marqueur des *endoplasmic reticulum export site* (ERES) Sec24-YFP. I-K, expression avec l'autofluorescence issue des chloroplastes. Les astérisques indiquent la position du noyau. Les barres d'échèle représentent 10µm. Source : (GRANGEON, AGBECI et al. 2012).

La protéine virale 6K₂ et les usines de réplication du TuMV

La protéine virale 6K₂ est une protéine de petite masse moléculaire (6 kDa) codée par l'ARN viral des potyvirus. Elle est progressivement libérée lors de la maturation protéolytique subit par la polyprotéine virale pour donner une forme fusionnée (6K₂-VPg-Pro) ou libre (6K₂) (BEAUCHEMIN, BOUTET et LALIBERTÉ 2007) (Figure 1.1). La protéine 6K₂ fait l'objet d'un intérêt grandissant du fait qu'elle seule induit une restructuration des membranes cellulaires durant l'infection pour la biogenèse des usines de réplication virale. Elle s'associée aux membranes en conditions d'infection ou d'expression ectopique (COTTON, GRANGEON et al. 2009; JIANG, PATARROYO et al. 2015) pour produire des vésicules. L'édification de ces usines de réplication est essentielle pour permettre la réplication protégée du génome viral *via* le recrutement de protéines virales (i.e RdRp, VPg,...) et de l'hôte avec qui des interactions plus ou moins directes ont lieu dans le complexe de réplication (Figure 1.9). Elle constitue de ce fait un bon marqueur pour étudier les usines de réplication virale in vivo (COTTON, GRANGEON et al. 2009). Un remodelage complet du système endomembranaire de la cellule hôte n'a lieu qu'en conditions d'infection. Des observations menées sur des cellules épidermiques par microscopie confocale on permis de mieux comprendre la distribution spatio-temporelle des usines virales du TuMV qui se retrouvent d'une part au niveau d'une structure globulaire périnucléaire formée d'un amalgame de RE, appareil de Golgi, chloroplastes et des vésicules elles même, et d'autres part de vésicules individuelles, associées en petit paquets et associées au pourtour des chloroplastes (Figure 1.10). La structure globulaire périnucléaire est en relation dynamique avec les vésicules individuelles qui s'y associent ou dissocient (GRANGEON, AGBECI et al. 2012) (Figure 1.2). Des observations plus pointues et complémentaires ont été menées par microscopie électronique couplée ou pas à la tomographie pour mieux comprendre la nature des structures observées par microscopie confocale (WAN, BASU et al. 2015). Les analyses ultrastructurelles ont révélé que les réarrangements membranaires étaient établis de manière progressive au cours du temps et que les usines virales étaient de nature diverse. En effet, le TuMV induisait la formation de vésicules tubulaires à simple membranes, de vésicules à double membranes individuelles ou regroupées parfois à proximité de particules virales, ainsi que des structures vésiculaires intermédiaires (Figure 1.8). Des expériences d'immunofluohistochimie sur des coupes transversales et longitudinales de feuilles ou de tiges ont permis de mettre en évidence que les usines de réplication du TuMV se retrouvaient dans tous les types cellulaires, en incluant les vaisseaux vasculaires du xylème et du phloème (WAN, CABANILLAS et al. 2015) (Figure 1.5). D'un point de vue fonctionnel, les usines virales prennent naissance dans le RE d'où elles sortent en interagissant avec le coatomère COPII Sec24A (JIANG, PATARROYO et al. 2015). Le devenir intracellulaire reste a être mieux caractérisé. Les usines virales sont des entités dynamiques qui se déplacent le long des filaments transvacuolaires du réticulum endoplasmique à l'aide du cytosquelette d'actine et de myosine (COTTON, GRANGEON et al. 2009). Certaines d'entre elles atteignent les plasmodesmes et entreprennent le passage de cellule à cellule (mouvement intercellulaire) en utilisant le cytosquelette (GRANGEON, JIANG et al. 2013; AGBECI, GRANGEON et al. 2013). Ce mouvement intercellulaire se perpétue vraisemblablement jusqu'à atteindre les vaisseaux du phloème. Par ailleurs, bien que les usines virales aient été retrouvées dans les vaisseaux du xylème et que l'implication de ce dernier dans l'infection systémique ait été démontrée (WAN, CABANILLAS et al. 2015), des interrogations sur leur origine et sur les mécanismes physiologiques ou moléculaires impliqués dans ces processus subsistent.

1.10 La voie de sécrétion : compartiments cellulaires

Le remodelage cellulaire observé lors des infections virales ne peut être étudié et compris que par une bonne connaissance des voies de sécrétion d'une cellule (PATARROYO, LALIBERTÉ et ZHENG 2013). La voie de sécrétion conventionnelle des protéines dans la plante (Figure 1.11) se définie par la mise en jeu chronologique de plusieurs organites en commençant par le RE, puis par l'appareil de Golgi pour atteindre d'autres compartiments cellulaires tels que le RTG, les CPV, les endosomes, la vacuole et la membrane plasmique.

Le RE est un organite qui part de l'enveloppe nucléaire pour déployer un vaste réseau de tubules (RE trans-vacuolaire, triples jonctions) dans la cellule pour atteindre des points d'ancrage à la membrane plasmique (RE du cortex) ou d'autres organites [pour une mise à jour des connaissances voir (BRANDIZZI 2017)]. Ce réseau est très dynamique et en constante réorganisation. Le RE est en aussi en continuité avec les desmotubules des plasmodesmes qui régulent les échanges entre deux cellules. Le RE est le principal lieu de synthèse protéique de la cellule grâce aux ribosomes situés aux translocons dans la membrane du RE. Le translocon est un complexe protéique assistant la translocation co-

ou post-traductionnelle des protéines. Les protéines ainsi produites peuvent être exportées vers d'autres compartiments (e.g appareil de Golgi) ou revenir dans le RE. L'exportation des protéines solubles ou membranaires vers l'appareil de Golgi se fait à un endroit spécialisé nommé site d'export du RE (ERES, *ER export sites*).



Figure 1.11 – Voie de sécrétion conventionnelle Représentation schématique de la voie de sécrétion et des échanges dans cellule de plante. RE, réticulum endoplasmique. Golgi, appareil de Golgi. RTG, réseau du trans-Golgi. ET, endosomes tardifs. EP, endosomes précoces. CPV/CMV, compartiment prévacuolaire/ compartiment multivesiculaire. Flèche bleue : import ou retour. Flèche rouge : export.

L'appareil de Golgi est un organite constitué d'un empilement de saccules (dictyosomes) qui subissent une maturation depuis la face cis proche du RE vers la face trans. Dans les citernes de l'appareil de Golgi ont lieu des modifications de protéines, notamment l'ajout sucres (N- et O-glycosylation). Dans une cellule végétale, les appareils de Golgi sont très mobiles et se déplacent de manière synchrone le long du RE (BOEVINK, OPARKA et al. 1998). Par ailleurs, l'ensemble des protéines exploitant la voie de sécrétion conventionnelle passe par l'appareil de Golgi. Le rôle charnière de l'appareil de Golgi dans cette voie permet de conceptuellement la subdiviser en voie précoce et en voie tardive de sécrétion (post-Golgi). Dans ces voies entrent en jeu de nombreux compartiments et acteurs moléculaires que nous allons introduire dans la prochaine section. Tout d'abord, la voie précoce de sécrétion comprend les échanges qui ont lieu entre le RE et l'appareil de Golgi, c'est-à-dire depuis l'export des protéines à partir du RE jusqu'à leur entrée dans l'appareil du Golgi (transport antérograde) et leur potentiel retour (transport rétrograde). Une fois que la protéine en transit sort de l'appareil de Golgi, elle se retrouve dans la voie tardive de sécrétion pouvant mener à plusieurs compartiments subcellulaires (FORESTI et DENECKE 2008). En étroite proximité avec l'appareil de Golgi se trouve le RTG. Le RTG est une structure très dynamique dans sa fonction, dans le temps et dans l'espace de la cellule. Il constitue une importante plateforme de tri des protéines qui redirige sélectivement les protéines vers d'autres compartiments ou par défaut vers le milieu extracellulaire. Le RTG se trouve au carrefour de la voie endosomale, de la voie menant vers la vacuole, de la voie d'endocytose et de la membrane plasmique.

Les endosomes sont des compartiments de stockage temporaire et surtout de tri en constant remodelage (LAMONTAGNE et HEESE 2017). Ils subissent différentes étapes de maturation. De ce fait, différents types d'endosomes coexistent dans une même cellule, notamment les endosome précoce (EP), les endosome tardif (ET) et des endosomes de recyclage. Les endosomes précoces prennent naissance au RTG. Ils reçoivent du matériel en provenance du milieu extracellulaire *via* des vésicules de la voie d'endocytose, de l'appareil de Golgi et de la vacuole. Les endosomes jouent un rôle important dans le maintien de la vacuole, de la membrane plasmique, de la paroi et dans la voie de l'endocytose. Les endosomes au stade précoce peuvent devenir des endosomes tardifs par auto-maturation en changeant leur contenu et leur structure (e.g taille, invaginations) ou par échange de protéines entre endosomes précoces au moyen de vésicules. Les endosomes tardifs forment des compartiments multivésiculaires dits pré-vacuolaires qui peuvent par la suite devenir des compartiments pré-vacuolaires tardifs. La formation des vésicules interne des endosomes tardifs requiert l'action de protéines de tri requises pour le transport *endosomal sorting complex required for transport* (ESCRT) (GAO, ZHUANG et al. 2017).

Les compartiments pré-vacuolaires sont des organites multi-vésiculaires assurant notamment la connexion entre le RTG et la vacuole (CUI et LEE 2016). Leur contenu est souvent destiné à la dégradation dans la vacuole lytique ou à des fins productives dans la vacuole de stockage. La plupart des protéines à destination de la vacuole présentent des séquences d'adressage ce qui permet leur ciblage. Dans ce processus l'action coordonnée de protéines GTPases spécifiques et l'interaction avec des récepteurs joue un rôle essentiel. Divers compartiments pré-vacuolaires coexistent dans une cellule en termes d'origine et de contenu, notamment en protéines. En fonction des différents partenaires mis en jeu dans les compartiments pré-vacuolaires plusieurs routes sont exploitées pour atteindre la vacuole ou d'autres destinations.

1.11 La voie de sécrétion : communication et acteurs moléculaires

Les divers compartiments impliqués dans la voie de sécrétion sont en relation mutuelle par contacts directs ou par l'entremise de vésicules de transport. Les vésicules de transport sont des structures plus ou moins sphériques présentant une lumière et une membrane extérieure (bicouche lipidique). Les vésicules assurent notamment des échanges de protéines et de lipides entre les compartiments pour jouer un rôle dans le maintien de l'intégrité des différents organites. Elles permettent d'ajuster l'activité des différents compartiments en fonction de l'activité de la cellule. Ces étapes de communication entre organites s'effectuent entre compartiments donneurs et receveurs par la mise en jeu du cytosquelette et de nombreuses catégories de protéines, notamment les coatomères (COPI et COPII), les *Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor* (SNARE), les GTPase Rab, les synaptotagmine (SYT) et les facteurs d'ancrage appelés exocyste.

Les coatomères COPII sont des protéines séquentiellement recrutées pour former les vésicules depuis le RE (Figure 1.12A) (BRANDIZZI et BARLOWE 2013). Elles forment un manteau autour des vésicules de transport. Dans ce processus de recrutement, le facteur d'échange de nucléotide guanine Sar1 (Secretion-Associated Ras-related protein 1) passe d'une conformation inactive (Sar1/GDP) à une conformation active (Sar1/GTP). La forme active induit le recrutement du complexe Sec23/Sec24 qui à son tour recrute les protéines à transporter (protéines cargo). D'autres protéines COPII telles que Sec13/Sec31 stimulent l'activité de Sec23, ce qui induit le bourgeonnement des vésicules depuis les ERES. Les vésicules ainsi produites peuvent à leur tour arriver jusqu'à l'appareil de Golgi. Pour rétablir l'équilibre et éviter que le RE se retrouve sans protéines COPII et engendrer un blocage de la voie de sécrétion, il existe des coatomères COPI (COPIa et COPIb) (Figure 1.12B, C-G). Les vésicules contenant les protéines COPIb assurent le transport rétrograde de la face trans de l'appareil de Golgi vers sa face cis. Le transport rétrograde de la face cis du Golgi vers le RE s'effectue au moyen de vésicules associées aux coatomères COPIa. Dans ce processus de retour le facteur d'échange de nucléotide guanine ADP-ribosylation factor 1 (ARF1) joue un rôle important dans le recrutement des protéines COPI (DONOHOE, KANG et al. 2013; YORIMITSU, SATO et TAKEUCHI 2014).


Figure 1.12 – Voie de sécrétion précoce des protéines. A, Représentation schématique de la voie antérograde de la voie de sécrétion précoce impliquant les coatomères COPII d'une cellule de plante. B, Représentation schématique de la voie rétrograde de la voie de sécrétion précoce impliquant les coatomères COPI. C-G, reconstructions 3D d'acquisitions par tomographie en microscopie électronique des différentes citernes (saccules) et vésicules COPIa/COPIb/COPII de l'appareil de Golgi d'une cellule de plante. Adaptées de : (DONOHOE, KANG et al. 2013; YORIMITSU, SATO et TAKEUCHI 2014).

Les communications entre organites par l'entremise de vésicules requièrent non seulement que les vésicules soient formées à partir d'un compartiment donneur, mais aussi qu'elles soient intégrées dans un compartiment receveur. Le transport des vésicules se fait par diffusion ou en utilisant le cytosquelette (microtubules, actine,...). Ces processus de réarrangements membranaires peuvent conceptuellement se décomposer en plusieurs étapes, telles que le bourgeonnement, le ciblage, l'amarrage, l'ancrage puis finalement la fusion. Toutes ces étapes se déroulent de manière progressive et coordonnée. Les petites GTPases (e.g Rab) jouent un rôle déterminant dans la spécificité de toutes les étapes menant à la fusion des vésicules avec le compartiment ciblé. L'étape d'amarrage est assistée par l'action de protéines adaptatrices, notamment par les synaptotagmines et des protéines exocystes. Les protéines SNARE sont des protéines membranaires ou associées aux membranes par prénylation ou palmitoyation (MCNEW, SØGAARD et al. 1997; VOGEL et ROCHE 1999). Les protéines SNARE ont souvent un long domaine N terminal qui contient le domaine SNARE et parfois un domaine supplémentaire appelé "longin" ou "brevin" (Figure 1.13) (SAITO et UEDA 2009; UEMURA et UEDA 2014). Elles interviennent dans le processus de fusion entre deux membranes. Elles sont classifiées en plusieurs catégories selon les résidus conservés asparagine (Q) ou arginine (R). Les protéines SNARE forment souvent un complexe entre quatre protéines Qa, Qb, Qc et R (UNGAR et HUGHSON 2003), ce qui confère une spécificité dans l'étape de fusion. La fusion des membranes entre la vésicule faisant la navette et le compartiment ciblé s'achève par une dissociation du complexe SNARE faisant intervenir de l'ATPase *N-ethylaleimide-sensitive fusion protein* (NSF) et de protéines *soluble NSF* (SNAP) (ZHAO et BRUNGER 2016). Elles sont distribuées et restreintes dans différents compartiments de la cellule (RE, appareil de Golgi, TGN, CPV ou PVC/MVB, vacuole, endosomes, membrane plasmique). Leur domaine N-terminal leur confère la spécificité du compartiment ciblé et de résidence (UEMURA, SATO et TAKEYASU 2005). Des SNARE situées dans le RE et/ou l'appareil de Golgi sont recrutées dans les vésicules navigant entre le RE et l'appareil de Golgi lors de la formation des vésicules COPII. Les vésicules post-Golgi sont recrutées spécifiquement entre les compartiments d'origine et de destination (Golgi/RTG, RTG/endosome, RTG/membrane plasmique, RTG/CPV, CPV/vacuole).

Les GTPases Rab sont des protéines cytosoliques aux nombreuses isoformes (NIEL-SEN, CHEUNG et UEDA 2008). Elles sont inactives quand elles sont liées au GDP. Lors de l'amorçage du processus d'amarrage des vésicules, elles sont spécifiquement recrutées et s'ancrent dans la membrane de la vésicule par prénylation. Elles sont activées par un facteur d'échange de nucléotide guanine spécifique pour se retrouver liées au GTP. Suite à leur activation, les Rabs liées au GTP se trouvent en mesure d'interagir avec les protéines adaptatrices pour effectuer l'amarrage des vésicules sur la membrane de destination.



Figure 1.13 – Structure et fonction des protéines SNARE. A, représentation schématique des divers domaines des protéines SNARE de plante. Ha-Hb-Hc (rose), domaines régulateurs. Qa (vert foncé), Qb (vert clair), Qc (rouge), R (bleu), domaines SNARE. LD (orange), domaines longin. TM (turquoise), domaine transmembranaire. VAMP727 présente une insertion de quelques acides aminés dans le domaine LD (bleu foncé) par rapport aux autres R SNARE. B, model du mécanisme de fusion accompli par les protéines SNARE. 1, Qa SNARE sur la membrane receveuse est inactivée par les domaines régulateurs. 2, Qa SNARE sur la membrane receveuse est activée. 3, l'assemblage du complexe SNARE en trans s'amorce entre 3 SNARE (Qa, Qb, Qc) en cis et 1 R SNARE en trans de part et d'autre du fragment membranaire à fusionner. 4, Les complexes SNARE deviennent progressivement des complexes en cis. Les membranes des 2 compartiments se rapprochent pour fusionner. Le compartiment donneur transfert son contenu dans le compartiment receveur. Les complexes SNARE sont désassemblés et chaque composante sont recyclées pour une prochaine utilisation. Adaptée de : (SAITO et UEDA 2009).

Parmi les protéines adaptatrices (ou complexes de protéines adaptatrices), les synaptotagmines sont impliquées dans le rapprochement de membranes entre compartiments (Figure 1.14) (SAHEKI et DE CAMILLI 2017). Elles ont un domaine transmembranaire situé à l'extrémité N terminale, un domaine variable ainsi que deux domaines en tandem liant le calcium (domaines C2) situés vers l'extrémité C terminale. Des analyses bioinformatiques basées sur la similitude de domaines ont révélé que certaines synaptotagmines chez l'humain (ou tricalbines ; protéines similaires chez la levure) comportaient des domaines C2 supplémentaires (3 ou 5), ainsi qu'un domaine variable liant les lipides appelé *mitochondriallipid binding protein domain-like* (SMP). Du fait de leur forte similitude avec la description classique des synaptotagmines, les protéines comportant toutes ces caractéristiques et présentant plusieurs domaines C2 ont été considérés comme formant une famille étendue des synaptotagmines (Extended-synaptotagmin family (E-SYT). Les plantes possèdent des protéines similaires notamment la protéine SYTF dans Arabidopsis thaliana (A. thaliana). Elles sont des senseurs de calcium et sont capables de se lier aux lipides membranaires. Ces propriétés leur permettent notamment d'établir de jonctions entre le RE et la membrane plasmique et de réguler le transport des vésicules.



Figure 1.14 – Structure des E-SYT. A, représentation schématique des différents domaines prédis in silico pour les synaptotagmines d'A. thaliana . B, représentation schématique des différents domaines prédits des synaptotagmines chez l'humain et des tricalbines chez la levure. C2A-E, domaines C2 liant le calcium. SMP, domaine liant les lipides. transmembrane domaine ou domaine transmembranaire (TMD). C, modélisation 3D de synaptotagmines SYT1 et E-SYT1 chez l'humain montrant leur fonction d'adaptateur permettant l'amarrage et l'ancrage entre deux membranes (e.g membrane plasmique et/ou vésicule ou RE) en absence et en présence d'ions calcium (Ca2+) avant une éventuelle fusion (vésicule/compartiment). Source : (Garcia Cabanillas et al., soumis) (PÉREZ-LARA et JAHN 2015; SAHEKI et DE CAMILLI 2017).

Les protéines exocystes forment un complexe entre huit sous-unités (Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 et Exo84) (Figure 1.15) (SYNEK, SEKERES et ZARSKY 2014). *A. thaliana* possède au moins 23 protéines paralogues de Exo70 qui sont exprimées dans divers tissus et compartiments cellulaires tels que le cytosol, les endosomes, le RTG et les CPV (VUKAŠINOVIĆ et ŽÁRSKÝ 2016). Certains membres du complexe retrouvés chez la levure et les animaux ont été montrés comme étant capables d'interagir avec des protéines Rab/Rho (Sec4 et Rab11 respectivement). Ce type d'interaction joue un rôle pivot dans l'ancrage, la reconnaissance et la progression vers l'étape de fusion.



Figure 1.15 – Interactome du complexe exocyste. Représentation schématique des sous-unités d'un complexe exocyste et GTPases (Rab/Rho) basé sur celui de la levure Saccharomyces cerevisiae.

1.12 La voie de sécrétion : adressage des protéines

L'action synchronisée des différentes protéines de la voie de sécrétion assure un tri et un ciblage spécifique des vésicules d'un organite donné vers d'autres destinations cellulaires, délivrant ainsi leur contenu. De même, le transport des protéines dans la voie de sécrétion conventionnelle est souvent déterminé par la présence d'une séquence d'adressage spécifique reconnue par des récepteurs spécifiques (e.g coatomères COPII) (Figure 1.16). La synthèse des protéines a principalement lieu dans le cytosol au niveau des ribosomes libres ou liés à la membrane du RE. Lors de la synthèse de protéines non liée au RE, un ou plusieurs ribosomes (polysomes) peuvent se lier à l'ARNm pour entamer les étapes de traduction. L'association des ribosomes cytosoliques avec le RE à lieu de manière co-traductionnelle via l'association du peptide signal naissent avec un complexe d'adressage universellement conservé, le complexe SRP (particule de reconnaissance du signal ou Signal recognition *particle* (SRP)) qui par la suite interagit avec un récepteur du SRP situé dans le RE à proximité du translocon (AKOPIAN, SHEN et al. 2013). Ce même processus peut avoir lieu de manière co-traductionnelle (sauf dans les chloroplastes) avec d'autres compartiments cellulaires. Plusieurs voies se présentent aux protéines nouvellement synthétisées en fonction de leur séquence primaire, notamment pour être libérées dans le cytosol, rester dans le RE ou entrer dans la voie de sécrétion. Dans le cas des protéines solubles produites à partir du RER, les protéines contiennent une séquence signal dans l'extrémité N terminale qui est reconnu par le translocon, puis clivé par une peptidase de signal sous l'assistance de protéines chaperones (SHAO et HEGDE 2011). De leur côté, les protéines contenant un ou plusieurs domaines transmembranaires présentent des séguences de résidus d'acide aminé de départ de transfert et d'arrêt de transfert constituées des divers domaines transmembranaires. Ces séquences permettre de guider et d'orienter les insertions des domaines transmembranaires dans la membrane du RE au fur et à mesure que la traduction progresse. Dans le cas des protéines avec un domaine transmembranaire, la séquence de départ de transfert située en position N terminale est clivé par une peptidase permettant de libérer cette extrémité, ce qui n'est pas le cas pour les protéines à plusieurs domaines transmembranaires où la séquence de départ est plus interne et est maintenue (RUSCH et KENDALL 1995; EICHLER et IRI-HIMOVITCH 2003). Toutes ces étapes font preuve d'un important contrôle de qualité. Les protéines chaperones assistent le bon repliement des nouvelles protéines afin d'éviter d'induire un stress dit de UPR (Unfolded protein response (UPR)) (FANATA, LEE et LEE 2013; WAN et JIANG 2016). Si un mauvais repliement survient dans le RE, un système de dégradation et de recyclage des protéines mal repliées est déclenché durant l'UPR, notamment par l'intervention du protéasome afin de maintenir une certaine homéostasie dans le RE. Une protéine non soluble entre quasi automatiquement par défaut dans la voie de sécrétion. Cependant, certaines protéines doivent rester dans le RE pour assurer l'ensemble des activités essentielles de ce compartiment. De ce fait, les protéines résidentes du RE contiennent des séquences d'adressage qui leur permettent d'être reconnues par le récepteur ERD2 situé dans la face cis de l'appareil de Golgi (PASTOR-CANTIZANO, BERNAT-SILVESTRE et al. 2017). Les séquences d'adressage de retour sont riches en acides aminés basiques et sont souvent en position C terminale de la protéine, notamment les séquences K/HDEL pour les protéines du lumen du RE ou KKXX (X : acide aminé quelconque) pour les protéines membranaires du RE (GAO, CAI et al. 2014).



Figure 1.16 – Adressage et transport des protéines dans la voie de sécrétion conventionnelle. A, retour vers le réticulum endoplasmique (RE) via les SS spécifiques de rétention. B, export du RE vers l'appareil de Golgi (Golgi) et vers la voie de sécrétion conventionnelle via les séquences signal (SS) spécifiques. C, adressage vers le réseau du trans Golgi (RTG). D, adressage vers la membrane plasmique (Mb P) de protéines membranaire via des SS ou sans. E, adressage vers le milieu extérieur (ext) de la cellule (protéine soluble). F, adressage vers les endosomes précoces (EP). G, adressage vers les endosomes tardifs. H, adressage vers les compartiments prévacuolaires (CPV) / compartiments multivésiculaires (CMV). I, adressage vers la vacuole. J, adressage des protéines produites par les ribosomes libres vers la voie de sécrétion conventionnelle via les SS. K, protéines cytosoliques produites par les ribosomes libres. Flèche bleue : import ou retour. Flèche rouge : export.

De plus, il existe aussi des séquences d'adressage pour le transport vers la plupart des compartiments cellulaires tels que le noyau, l'appareil de Golgi, les mitochondries, les peroxysomes et les chloroplastes. Les séquences d'adressage au noyau sont classées en deux catégories, notamment les séquences d'import (ou *Nuclear localization signal* (NLS)) reconnues par de nombreuses protéines appelées importines et des séquences d'export (ou *Nuclear export signal* (NES)) reconnues par des exportines (MERKLE 2001; MEIER et SOMERS 2011). Les étapes d'import/export des protéines nucléaires sont finement contrôlées par de petites GTPase Ran (Figure 1.17).



Figure 1.17 – Adressage et transport des protéines dans le noyau. A, import vers le noyau via les séquences de localisation nucléaire (NLS). B, export du noyau via les séquences d'export nucléaire (NES). Flèche bleue : import. Flèche rouge : export.

Le domaine transmembranaire des protéines de l'appareil de Golgi semblerait jouer un rôle important dans leur rétention. Les protéines à destination des peroxysomes présentent des séquences de ciblage dénommées *Peroxysomal targeting sequence* (PTS) (*Peroxysomal targeting sequence*) (BAKER, HOGG et WARRINER 2016). Bien que les mitochondries et les chloroplastes aient une origine endosymbiotique et fonctionnent de manière quasi autonome (ADN génomique, plastoribosomes, mitoribosomes,...), au cours de l'évolution une partie des protéines nécessaires à leur bon fonctionnement est synthétisée par la machinerie de traduction de la cellule. De ce fait, les protéines codées par l'ADN génomique de la cellule et à destination des mitochondries ou chloroplastes contiennent des séquences d'adressage spécifiques reconnues par des transporteurs spécifiques (respectivement Translocase of the inner membrane (TIM), Translocase of the Outer Membrane (TOM) et Translocon of the Inner membranes of the Chloroplasts (TIC), Translocon of the Outer membranes of the *Chloroplasts* (TOC) (KESSLER et SCHNELL 2009; MURCHA, KMIEC et al. 2014) (Figure 1.18). Les séquences d'adressage aux mitochondries sont qualifiées de pré-séquences en position N terminales. Les séquences d'adressage des chloroplastes prennent le nom de peptide de transit (Figure 1.18). A nouveau, ces processus requièrent l'intervention d'une part de peptidases pour éliminer les séquences d'adressage au fur et à mesure que les protéines atteignent leur destination et d'autre part de protéines chaperonnes pour assurer un bon repliement de la protéine et qu'elle soit fonctionnelle. Il est primordial de noter que tous ces systèmes d'import/export des protéines entre organites doivent être hautement contrôlés et précis pour maintenir l'intégrité et la fonctionnalité de la cellule. Ainsi, il est communément accepté qu'une protéine ne possédant pas ces séquences d'adressage pour la retenir dans un compartiment spécifique se retrouve sécrétée (protéines solubles) ou à la membrane plasmique (protéines membranaires) par défaut. Cependant, cette vision est assez réductrice, car un certain nombre de protéines atteignent spécifiquement leur compartiment de destination sans pour autant arborer de séquences d'adressage (cf. section 1.12).



Figure 1.18 – Adressage et transport des protéines vers les chloroplastes, peroxysomes et mitochondrie. A, adressage vers le chloroplaste via les peptides de transit (PT).
B, adressage vers le peroxysome via les PTS (*Peroxysomal targeting sequence*).
C, adressage vers la mitochondrie via les préséquences en position N terminale (preSNter). Flèche rouge : export.

1.13 Virus et protéines de la voie de sécrétion

Sachant le rôle essentiel des protéines virales associées aux membranes dans la biogenèse des usines virales, bien peu d'éléments sont connues sur l'intervention de protéines de l'hôte dans ce processus. Cependant, si nous nous attardons sur les processus de remodelage membranaire de l'hôte tels que décris plus haut (**cf.** section 1.9), nous constatons rapidement que quel que soit l'étape dans ces processus de haute complexité, de nombreuses protéines entrent en jeu. De plus, il est intéressant de noter que bon nombre de ces protéines sont des composantes de la voie de sécrétion conventionnelle.

La voie de sécrétion conventionnelle des protéines étant la principale voie de production et de maturation des protéines, de nombreux virus y transitent dans une plus ou moins grande mesure au cours de leur cycle viral. En effet, le RCNMV se réplique en étroite association avec le RE qu'il remodèle au travers de la protéine 27 (KUSUMANEGARA, MINE et al. 2012). De plus, tout blocage de la voie précoce de sécrétion se traduit par une absence de formation des usines virales et une baisse drastique de sa réplication. De plus la protéine p27 du RCNMV s'associe à la protéine ARF1 (COPI) de la voie rétrograde de sécrétion (Golgi-RE) (HYODO, MINE et al. 2013). Similairement, la protéine 37K du *Chinese wheat mosaic virus* (CWMV), la protéine 7b du MNSV, la glycoprotéine NSvc2 du *Rice stripe tenuivirus* (RSV) et 6K₂ du TEV requiert une voie de sécrétion intacte pour accomplir une biogenèse normale de ses usines virales (WEI et WANG 2008; GENOVÉS, NAVARRO et PALLÁS 2010; YUAN, CHEN et al. 2011; ANDIKA, ZHENG et al. 2013). De plus, le TMV relocalise la protéine ARL8 de la famille des protéines liant le GTP tel que ARF, SAR de la voie de sécrétion, ainsi que des protéines potentiellement du tonoplaste (TOM1, TOM2A) vers ses usines virales pour accomplir une réplication efficace de son génome (NISHIKIORI, MORI et al. 2011).

En outre, le TBSV recrute des protéines ESCRTI, ESCRTIII et une ATPase de tri vacuolaire (Vps4) pour aider à la courbure des membranes formant les usines virales dans les peroxysomes (BARAJAS, JIANG et NAGY 2009; BARAJAS, CASTRO MARTÍN et al. 2014; KOVALEV, CASTRO MARTÍN et al. 2016; KOVALEV, INABA et al. 2017). Le remodelage induit par le BMV requiert entre autre un recrutement de protéines structurant le RE appelées réticulons (DIAZ, WANG et AHLQUIST 2010). De plus, un réticulon est aussi pris en otage par la protéine 2C de l'enterovirus 71 (TANG, YANG et al. 2007). D'autres protéines telles que les SNAREs ou leurs partenaires de la voie de sécrétion sont aussi recrutées dans usines virales ou par des protéines virales. Notamment, la protéine associée aux vésicules VAP27 et la Qc SNARE SYP71 forment un complexe avec la protéine virale 6K₂ du TuMV (WEI, ZHANG et al. 2013). Et la réduction d'expression de SYP71 révèle son importance dans la réplication du TuMV. La SNARE GOS12 (Golgi) s'associe avec la

protéine virale P3N-PIPO du Soybean mosaic virus (SMV), mais son implication dans son cycle viral reste à être déterminée (SONG, ZHI et al. 2016). Par ailleurs, les virus à ARN+ non seulement exploitent de nombreux compartiments de la voie de sécrétion pour y édifier leurs usines virales, mais aussi pour parfaire des étapes de maturation post-traductionnelles de bon nombre de leurs protéines virales, notamment la glycosylation (N- et/ou O-glycosylation). Divers virus à ARN+ enveloppés tel que le DENV, HCV requièrent des modifications de leurs protéines structurales par glycosylation et/ou protéolyse (e.g furine pour les flavivirus) au niveau du RE, de l'appareil de Golgi et du RTG pour parfaire leurs étapes de réplication et acquérir leurs infectivité (BEYENE, BASU et al. 2004; SOMNUKE, HAUHART et al. 2011; YU, ZHANG et al. 2008; YU, HOLDAWAY et al. 2009; ROBY, SETOH et al. 2015). Les ajouts de sucres nécessaires à la formation des glycoprotéines virales jouent un rôle essentiel au niveau structural et fonctionnel des protéines elles-mêmes, c'est-à-dire dans leurs stabilités et maintien du repliement. Les glycosylations sont primordiales dans différentes étapes du cycle viral, telles que la production de particules virales infectieuses, leur sortie des cellules infectées et leur entrée dans des cellules saines. Par exemple, le HCV réorganise le RE pour former ses usines virales d'une part, mais aussi pour produire ses particules virales (SUZUKI2017). Les particules virales du HCV sortent du RE dans des vésicules de type COPII et continuent vers l'appareil de Golgi pour entrer dans la voie de sécrétion conventionnelle en s'associant avec des lipoprotéines à très faible densité du RE et du Golgi. Des analyses des sites de glycosylation des protéines de l'enveloppe (E1, E2) réduisent la stabilité de ces dernières et affectent l'infection du HCV. En outre, certaines protéines de virus non enveloppés sont aussi glycosylées et une altération de ces modifications se traduit par une infection plus réduite. Notamment, des analyses par spectrométrie de masse ont permis d'identifier que la protéine de capside du PPV (Potyvirus) présentait des modifications par O-glycosylation, dénotant ainsi de son passage dans la voie de sécrétion et de son importance durant l'infection (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, CAMAFEITA et al. 2002; KIM, UDESHI et al. 2011).

1.14 Voies non-conventionnelles de transport des protéines

Ainsi, les virus à ARN+ exploitent la voie de sécrétion conventionnelle tant au niveau de ses compartiments que des leurs fonctions biologiques pour accomplir efficacement leur cycle viral. Cependant, nos connaissances de l'implication de la voie de sécrétion dans la biogenèse des usines virales sont fragmentaires. Elles se limitent surtout aux premiers évènements, c'est à dire à l'émergence des vésicules à partir du RE. De plus, du fait de l'association des usines virales avec des facteurs de la voie précoce de sécrétion (e.g. CO-PII), l'hypothèse logique qui s'en suivrait, serait à de penser que seule la voie de sécrétion conventionnelle est mobilisée par les virus. Cependant, il ne faudrait pas exclure l'existence d'autres voies qui pourraient être exploitées par les virus.

La majeure partie des protéines emploie la voie de sécrétion dite conventionnelle qui passe par l'appareil de Golgi. Cependant, l'avènement de la protéomique a indiqué que plusieurs protéines sécrétées dans le milieu extracellulaire ne possèdent pas de signal peptide (DRAKAKAKI et DANDEKAR 2013). L'absence d'un tel signal suggère alors que certaines protéines peuvent contourner l'appareil de Golgi pour se rendre à leur destination finale. Il existe donc des protéines qui ne possèdent pas de séquence d'adressage conventionnelle et qui atteignent leur compartiment de destination par d'autres voies. C'est le cas notamment de certaines protéines qui ont pour destination la membrane plasmique. Par conséquent, il semblerait raisonnable de penser que des voies non-conventionnelles de transport existent dans les cellules eucaryotes (DING, WANG et al. 2012; DE MARCHIS, BELLUCCI et POMPA 2013; DRAKAKAKI et DANDEKAR 2013; DING, ROBINSON et JIANG 2014; DAVIS, KANG et al. 2016; ROBINSON, DING et JIANG 2016; POMPA, DE MARCHIS et al. 2017). En effet, certaines protéines sont sécrétées dans l'espace extracellulaire par exocytose en exploitant la voie endosomale (OVEČKA, LANG et al. 2005). Cette exocytose peut mener à la libération de vésicules contenues dans les endosomes tardifs ou compartiments multi-vésiculaires dans l'espace extracellulaire (exosomes). Cependant certaines protéines solubles sont aussi exocytées *via* la voie endosomale, mais sans production de vésicules extracellulaires.

D'autres protéines atteignent l'espace extracellulaire en détournant la voie de la macroautophagie (notée ci-après autophagie) (Figure 1.19) (TEH et HOFIUS 2014; POMPA, DE MARCHIS et al. 2017). La voie de l'autophagie joue un rôle essentiel dans le maintien de l'équilibre cellulaire entre synthèse et dégradation. Elle intervient dans de nombreux processus cellulaire entre autres dans le développement, la mort cellulaire, le système immunitaire et le recyclage d'organites et de macromolécules. L'autophagie peut être induite par différents signaux, notamment par des stress qu'ils soient biotiques (e.g la bactérie Shigella *flexneri*) ou abiotiques (e.g *carences en azote, carbone*). Elle implique un recrutement de membrane nécessaire la formation progressive d'un tubule appelé phagophore à partir du site membranaire d'assemblage de ce dernier. La nucléation du phagophore requiert l'action de protéines ATG (autophagy related protein) notamment le complexe protéique Atg1/ATG13 kinase et de phosphotidylinositol 3-kinases (ZHUANG et JIANG 2014; LE BARS, MARION et al. 2014). Les PtdIns3K jouent un rôle clé dans le recrutement d'autres protéines de l'autophagie lors de la nucléation et sont la cible d'inhibiteurs chimiques [e.g. wortmannin (WILLEBRAND, JASCUR et al. 1996)]. Il s'en suit des étapes d'élongation du phagophore qui requièrent l'action coordonnée d'une cascade de protéines ATG, notamment de la protéine Atg8 ancrée à la membrane par conjugaison avec une phosphatidylethanolamine (PE) et du concours de la protéine transmembranaire ATG9. Cette maturation du phagophore culmine par sa fermeture pour former un autophagosome à double membrane.



Figure 1.19 – Etapes et facteurs impliqués durant la macro-autophagie Modèle des différentes étapes connues ou hypothétiques de la macroautophagie chez les plantes, les levures et les animaux. A, induction de la voie des autophagy-related protein (ATG) de la macro-autophagie suite à un stress biotique ou abiotique. Activation du complexe ATG1/ATG13 kinase par des processus de phosphorylation et déphosphorylation et recrutement d'autres facteurs (ATG101, FIP200). B, Recrutement de membranes par ATG9 vers le site de formation du phagophore. C, Nucléation du phagophore impliquant l'action de VPS34 pour ajouter des lipides (PIP3). D, Ancrage d'ATG8 à la membrane par conjugaison avec une *phosphatidylethanola*mine (PE) assisté par différentes protéines ATG. E, Une fois le phagophore fermé la structure devient un autophagosome et est transporté vers la vacuole sur les microtubules (MT) à l'aide de protéines FYCO (FYVE and coiled-coil domain-containing proteins) et de petites GTPases (e.g Rab7). F, Ancrage à la membrane de la vacuole (tonoplaste) et fusion de la membrane extérieur de l'autophagosome à l'aide de plusieurs SNARE. G, La vésicule interne de l'autophagosome est libérée dans la vacuole pour subir une dégradation de son contenu. Les protéines de plante orthologues de celles trouvées dans la levure sont en couleur et les protéines avant fait l'objet d'analyses génétiques pour comprendre les mécanismes impliqués dans la macroautophagie sont soulignées. Adaptée de : (LI et VIERSTRA 2012).

Généralement, les autophagosomes formés sont transportés vers la vacuole/lysosome sur des microtubules du cytosquelette à l'aide de protéines FYCO (*FYVE and coiled-coil domain-containing proteins*) et de petites GTPases (e.g Rab7) permettant d'activer le processus. Les ATG8 situés sur le pourtour extérieur des autophagosomes sont déconjugués par clivage de la liaison covalente avec la PE. Les autophagosomes fusionnent notamment par l'entremise de protéines SNARE pour libérer leur contenu qui sera recyclé dans la vacuole/lysosome. Bien qu'il s'agisse d'une voie de recyclage et de dégradation de protéine ou de compartiments cellulaires dans la vacuole/lysosome, certains éléments de cette voie (e.g protéines ATG) sont utilisés à des fins productives pour la cellule ou pour des pathogènes et ceci sans pour autant induire le processus d'autophagie conventionnel menant à la dégradation dans la vacuole. Quand les protéines ATG sont requises l'exocytose peut avoir lieu *via* la production d'autophagosomes de sécrétion. Des compartiments tubulaires dédiés à la sécrétion non conventionnelle (*compartment for unconventional protein secretion* (CUPS)) peuvent aussi être produits (BRUNS, MCCAFFERY et al. 2011). Bien qu'ayant une morphologie similaire aux phagophores, les CUPS ne fusionnent pas avec la vacuole/lysosome et libèrent des vésicules qui fusionnent avec des compartiments pré-vacuolaires. Cependant la formation des CUPS dans les plantes demande encore à être mise en évidence.

Les voies non conventionnelles mettent souvent en jeu le détournement de compartiments pré-vacuolaires (compartiments multivésiculaires/endosomes tardifs) et/ou des machineries de l'autophagie vers la libération de vésicules extracellulaires (FRANCIN-ALLAMI, SAUMONNEAU et al. 2011). Ces vésicules sont exocytés dans le milieu extracellulaire suite à la fusion de la membrane externe des compartiments multivesiculaires avec la membrane plasmique (RUTTER et INNES 2017). Elles sont qualifiées de microvesicules ou d'exosomes. Les exosomes peuvent non seulement contenir des protéines, des peptides, mais aussi des acides nucléiques tels que des ARN messagers (ARNm) ou des petits ARN tels que les micros ARN (miARN). Les exosomes font l'objet de nombreuses études du fait de leur implication dans le système immunitaire, dans les communications intercellulaires et dans la pathogenèse. Les mécanismes sous-jacents à la libération de la cellule émettrice et à l'intégration de la cellule de destination demandent encore à être élucidés. Tout récemment, il a été montré que certains virus animaux pouvaient se propager par l'entremise d'exosomes, activer l'infection dans des cellules distantes, ou induire des réponses inflammatoires du système immunitaire (RAMAKRISHNAIAH, THUMANN et al. 2013; ALENQUER et AMORIM 2015; LONGATTI, BOYD et CHISARI 2015; ANDERSON, KASHANCHI et JACOBSON 2016). Du fait de leur plus haute complexité d'extraction et de visualisation in situ chez les plantes les investigations menées sur ces structures sont à leurs prémices (RUTTER et INNES 2017).

Plusieurs manières existent pour déterminer si une protéine emprunte la voie conventionnelle de sécrétion ou pas, notamment *via* l'utilisation de l'inhibiteur chimique Brefeldine A (BFA). La BFA est une toxine d'origine fongique qui bloque le transit des protéines entre le RE et l'appareil de Golgi en ciblant de petites GTPases et le facteur d'échange de nucléotide guanine ARF1 (ADP-ribosylation factor 1) (NEBENFÜHR, RITZENTHALER et ROBINSON 2002; RITZENTHALER, NEBENFÜHR et al. 2002). La BFA est utilisée de manière standard pour déterminer si une protéine emprunte la voie conventionnelle de sécrétion ou pas. Néanmoins, d'autres approches complémentaires sont possibles, notamment par une approche enzymatique au travers de l'utilisation de la endoglycosidase (endoH) d'origine bactérienne (BATOKO, ZHENG et al. 2000; BAYER, BANNING et al. 2016). En effet, la plupart des protéines sont glycosylées dans le RE, où de nombreux résidus mannoses sont ajoutés sur des résidus asparagine (N- glycosylation). Les structures riches en mannoses présentes sur les glycoprotéines nouvellement produites et N-glycosylées constituent une base commune et nécessaire pour poursuivre des modifications dans l'appareil de Golgi par ajout de nouveaux sucres (e. g N-acétylglucoseamine GlcNAc) ou de modification des embranchements à l'aide de glycosydases. Les protéines n'ayant pas passé par l'appareil de Golgi et présentant uniquement la base riche en mannose sont un substrat pour l'enzyme endoH et sont par conséquent sensibles à endoH. En revanche, quand des sucres supplémentaires sont ajoutés sur les glycoprotéines entrant dans l'appareil de Golgi, elles ne constituent plus un substrat pour l'enzyme endoH et sont de ce fait résistantes. L'utilisation de ce test in vitro de sensibilité à l'enzyme endoH constitue un outil supplémentaire pour identifier un transport de protéines alternatif à la voie de sécrétion conventionnelle.

Par ailleurs, la meilleure connaissance des acteurs moléculaires intervenant dans la voie précoce de sécrétion a permis le développement de nouveaux outils permettant d'interrompre le transport de protéines entre le RE et l'appareil de Golgi. En effet, les petites GTPases ARF1, Rab et Sar1 jouent le rôle de régulateurs essentiels au bon transit des protéines (BATOKO, ZHENG et al. 2000; AGBECI, GRANGEON et al. 2013). Ces GTPase sont des interrupteurs moléculaires passant de manière cyclique entre une forme active et une forme inactive. Par exemple, des mutations dans la séquence codante pour le site de liaison au GTP/GDP permettant de mimer l'état actif en continue de la protéine Sar1 finissent par enrailler le système et conduire au blocage du transport des protéines de la voie de sécrétion. L'expression de la protéine constitutivement active dans les cellules étudiées va créer une inhibition compétitive du système existant et bloquer ou pas le transport de la protéine étudiée. L'expression des protéines modifiées est dite dominante et leur effet in vivo est négatif, de ce fait ces facteurs sont qualifiés de dominants négatifs. De manière similaire, une dernière approche vise à déstabiliser les processus de fusion qui ont lieu durant les transports vésiculaires entre le RE et l'appareil de Golgi en ciblant les protéines SNARE de l'appareil de Golgi. Les approches utilisant la BFA ou les dominants négatifs se sont rendue possibles par l'avènement des biotechnologies, de la découverte de protéines fluorescentes (e.g *Green fluorescent protein, protéine de fluorescence verte* (GFP)) et des avancées en microscopie confocale.

Ainsi, la combinaison de ces outils moléculaires permet de mieux comprendre la ou les voies de transport empruntées par une protéine, de déceler l'existence de potentielles voies alternatives.

1.15 Virus et voies non conventionnelles de transport

Bien que de nombreux virus exploitent la voie de sécrétion conventionnelle, d'autres en revanche la manipulent pour bloquer le système en piégeant notamment des protéines de la voie rétrograde COPI (ARF1). L'association de la protéine 3A du PV et du CVB3 avec un cofacteur (GBF1) de la GTPase ARF1, ce qui mène au désassemblage de l'appareil de Golgi et au blocage de la voie de sécrétion (WESSELS, DUIJSINGS et al. 2006; BELOV, FENG et al. 2008). D'autres virus à ARN+ tel que le Norwalk virus (NV) ou les Enterovirus vont eux aussi jusqu'à la destruction de l'appareil de Golgi pour effectuer leur cycle infection (FERNANDEZ-VEGA, SOSNOVTSEV et al. 2004; BESKE, REICHELT et al. 2007). Les virus à ARN+ infectant l'humain sont souvent classifiés comme étant lytiques ou non-lytiques, c'est-à-dire qu'ils sortent de la cellule par lyse de cette dernière ou pas. Il est communément admis que les virus non enveloppés infectant l'humain entrent exclusivement dans la catégorie des virus lytiques. Cependant une autre image commence à émerger parmi les virus à ARN+ non enveloppés. Certains d'entre eux tel que le virus de l'hépatite E *Hepatitis E virus* (HEV), le virus de l'hépatite A *Hepatitis A virus* (HAV) seraient capables d'établir des foyers secondaires d'infection sans induire la lyse des cellules initialement infectées tout en larguant leurs particules virales via des voies non conventionnelles de sécrétion (ALENQUER et AMO-RIM 2015; ANDERSON, KASHANCHI et JACOBSON 2016). Pour illustrer ce propos, nous prendrons pour exemple le HAV, car il demeure le mieux caractérisé (KIRKEGAARD 2017). En effet, les particules virales du HAV semblent se retrouver dans le milieu extracellulaire en association avec des vésicules, ce qui leur a value le nom de virus "quasi-enveloppé". Des analyses par spectrométrie de masse sur ces particules virales extracellulaires entourées d'une membrane ont révélé la présence de protéines de voies tardives de production des corps multivésiculaires et des exosomes dérivant d'autres types de corps multivésiculaires, en d'autres termes de protéines de voies non conventionnelles de sécrétion. D'autres virus non enveloppés tel que le poliovirus ou enveloppés tel que le VIH, ou des virus enveloppés à ADN tels que les virus de l'herpès semblerait aussi exploiter les exosomes pour infecter de nouvelles cellules de l'hôte (ANDERSON, KASHANCHI et JACOBSON 2016). Le HCV, Hepatitis B virus (HBV) ou le Epstein-Barr virus (EBV) semblent moduler la réponse immunitaire antivirale via la production d'exosomes à partir de cellules infectées. Ceci ouvre la possibilité que d'autres virus non enveloppés pourrait exploiter des voies similaires pour l'infection, mais ceci demande de plus amples investigations dans les années à venir pour les mettre en évidence, notamment en ce qui concerne les virus de plante.

CHAPITRE 2

OBJECTIF DU TRAVAIL

Nous avons menés récemment une étude détaillée de la protéine $6K_2$ afin de mieux connaitre ses caractéristiques pour comprendre sa fonction dans la biogenèse des usines virales du TuMV. Des analyses in silico de la séquence primaire de la protéine $6K_2$ ont révélé la présence d'un long domaine N-terminal soluble, d'un domaine transmembranaire et d'un court domaine C-terminal soluble. Des analyses biochimiques ont prouvé que la protéine $6K_2$ était associée aux membranes de la cellule. Une fine analyse du domaine N-terminal de la protéine $6K_2$ a permis d'identifier un motifs d'export du RE (JIANG, PATARROYO et al. 2015). Le motif d'export contient un résidu tryptophane essentiel à l'infection. L'export du RE a lieu par l'interaction du coatomère Sec24A (COPII) avec 6K₂ par l'entremise de son domaine N terminal. Cette découverte a soulevé de nouvelles interrogations et nous a amené à définir l'objectif de travail du projet de la présente thèse. Le principal objectif a été de déterminer le devenir des usines de réplication du TuMV une fois sorties du RE. Quelle voie de transport des protéines exploitent-elles? Quelles sont leurs potentielles destinations à l'échelle cellulaire et dans la plante entière? Ainsi, la première partie visera à décrypter le devenir intracellulaire des usines de réplication virale du TuMV. Une deuxième partie se concentrera sur le suivi de la propagation de l'infection dans différents types cellulaires à l'échelle de la plante entière. Enfin, nous exposerons dans une dernière partie le travail qui a visé à mieux comprendre l'origine de certaines usines virales de réplication situées dans les tissus vasculaires du xylème.

| CHAPITRE

PUBLICATION 1 : Unconventional replication vesicle trafficking route involving the pre-vacuolar compartment SNARE Vti11 for Turnip mosaic virus infection

Unconventional replication vesicle trafficking route involving the pre-vacuolar compartment SNARE Vti11 for Turnip mosaic virus infection

Daniel Garcia Cabanillas^{1*}, Jun Jiang^{1*}, Nooshin Movahed², Hugo Germain³, Yasuyuki Yamaji⁴, Huanquan Zheng² and Jean-François Laliberté¹

- 1. INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada
- Department of Biology, McGill University, 1205 Dr. Penfield Avenue, Montréal, Québec, H3A 1B1, Canada
- Department of Chemistry, Biochemistry and Physics, Université du Québec à Trois-Rivières, 3351 boul. des Forges, Trois-Rivières, Québec, G9A 5H7, Canada
- 4. Graduate School of Agriculture and Life Sciences, The University of Tokyo, Tokyo 1138657, Japan

*These authors contributed equally to this work

Corresponding author : Jean-François Laliberté

Tel : 1.450.687.5010, Fax : 1.450.686.5501, Email : jean-francois.laliberte@iaf.inrs.ca

Short title : Unconventional pathway for virus infection

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is : Jean-François Laliberté (jean-francois.laliberte@iaf.inrs.ca). **Contributions** : Le manuscrit a été soumis à *The Plant Cell*. Les travaux effectués dans cet article ont été effectués conjointement avec mon collègue Jun Jiang (contribution égale). J'ai élaboré et effectué les expériences (Figure 2D-I, Figure 3A, B, F, Figure 4A-F, Figure 5, Figure 6, Figure 8, Figure S2, Figure S3, Figure S4, Figure S5, Figure S6, Figure S7). Jun Jiang a construit les clones infectieux mutants et effectué les expériences (Figure 1, Figure 2A-C, Figure 3C-E, Figure 4G, Figure S1). Nooshin Movahed a réalisée les expériences de microscopie électronique (Figure 7). Une première version du manuscrit a été mutuellement rédigé par moi et Jun Jiang et le Pr. Jean-François Laliberté, ainsi que par le Pr. Hugo Germain, Pr. Huanquan Zheng ont aidé à l'améliorer.

3.1 Résumé

L'infection par les virus à ARN génère des structures membranaires qui abritent le complexe de réplication virale. Dans le cas du virus de la mosaïque du navet (*Turnip mosaic virus*, TuMV), la protéine virale 6K₂ joue un rôle essentiel dans la production de vésicules de réplication virale à partir du réticulum endoplasmique (RE). Nous démontrons ici d'une part que la protéine 6K₂ contient un motif GxxxG (G : glycine) dans son domaine transmembranaire prédit *in silico* et d'autre part que ce motif est déterminant pour l'infection menée par le TuMV. Le remplacement des résidus glycines du motif GxxxG par des résidus valines avait conduit à une inhibition drastique de la réplication virale du fait de la relocalisation de la protéine 6K₂ vers l'appareil de Golgi et la membrane plasmique. Ces résultats indiquent que le transit de la protéine 6K₂ au travers de l'appareil de Golgi constitue une voie sans issue pour l'infection virale. L'inhibition des processus de fusion ayant lieu lors du transport vésiculaire entre le RE et l'appareil de Golgi du fait de la surexpression de la protéine SNARE Sec22 s'était traduite par une accélération du mouvement intercellulaire du TuMV.

De même, l'expression de synaptotagmines de l'appareil du Golgi rendues non fonctionnelles s'était aussi traduite par une accélération du mouvement intercellulaire. De plus, nous avons montré que la protéine 6K₂ co-purifiait avec la protéine prévacuolaire SNARE Vti11. Des plantes d'*Arabidopsis thaliana* déficientes en Vti11 et soumises à l'infection se sont révélées être complètement résistantes au TuMV. Ces résultats indiquent que les vésicules de réplication du TuMV contournent l'appareil de Golgi pour suivre une voie non conventionnelle qui potentiellement utilise des compartiments prévaculaires ou corps multivésiculaires pour accomplir l'infection virale.

3.2 Abstract

Infection by RNA viruses leads to the generation of quasi-organelles that contain the viral replication complex. In the case of *Turnip mosaic virus* (TuMV), the viral membrane protein $6K_2$ plays a key role in the release of motile replication vesicles from the endoplasmic reticulum (ER). We demonstrate here that $6K_2$ contains a 6xxxG motif within its predicted trans-membrane domain that is vital for TuMV infection. Replacement of the glycine residues with valines within the motif inhibited virus production due to a relocation of the viral protein to the Golgi apparatus and the plasma membrane. This indicated that $6K_2$ transiting through the Golgi apparatus constitutes a dead-end avenue for virus infection. Impairing the fusion of transport vesicles between the ER and the Golgi apparatus by overexpression of the SNARE Sec22 protein resulted in enhanced intercellular virus movement. Likewise, expression of truncated, non-functional, Golgi-located synaptotagmin during infection enhanced TuMV intercellular movement. $6K_2$ co-purified with the pre-vacuolar compartment SNARE Vti11 and a loss-of-function *A. thaliana* line for Vti11 was completely resistant to TuMV infection. These results indicate that TuMV replication vesicles bypass the Golgi apparatus and take an unconventional pathway that potentially involves pre-vacuolar compartments/multi-vesicular

bodies for virus infection.

3.3 Introduction

Plant positive-sense (+) RNA viruses remodel the endomembrane system of infected cells for the production of viral factories (HARAK et LOHMANN 2015; LALIBERTÉ et SANFACON 2010; LALIBERTÉ et ZHENG 2014; ROMERO-BREY et BARTENSCHLAGER 2014). Viral factories may take the form of spherules, which result from the invagination of the outer membrane of organelles such as the endoplasmic reticulum (ER) (BMV), peroxisomes (*Tomato bushy stunt virus*, TBSV) or chloroplasts (*Turnip yellow mosaic virus*). For other plant RNA viruses, viral factories are associated with vesicles that are released from the ER (LALIBERTÉ et ZHENG 2014). Spherules and vesicles contain viral replication complexes (VRCs) that are made of the viral RNA-dependent RNA polymerase (vRdRp), replication-associated viral and host proteins, and viral RNA (vRNA) as well as its associated double-stranded RNA replicative form (COTTON, GRANGEON et al. 2009). Besides being involved in vRNA replication, vesicles are also involved in the movement of a vRNA-protein complex using myosin motors (AGBECI, GRANGEON et al. 2013; AMARI, DI DONATO et al. 2014; AMARI, LERICH et al. 2011; HARRIES, PARK et al. 2009) to reach plasmodesmata (GRANGEON, JIANG et al. 2013; TILSNER, LINNIK et al. 2013). At this point, the vRNA-protein complex enters the plasmodesmata leading to the infection of neighboring healthy cells (GRANGEON, JIANG et al. 2013; KAWAKAMI, WATANABE et BEACHY 2004). Plant viral genomes encode at least one membrane-associated protein that triggers the formation of spherules or vesicles (LALIBERTÉ et ZHENG 2014). These viral proteins are part of the VRCs and associate with membranes either through trans-membrane domains (TMDs) and/or amphipathic helices (LIU, WESTLER et al. 2009; ZHANG, ZHANG et al. 2005). Host membrane proteins may further mediate the association of VRCs with

cellular membranes (NISHIKIORI, MORI et al. 2011). Ectopic expression of these membraneassociated proteins very often produces spherules or vesicles similar to those produced during infection (BEAUCHEMIN et LALIBERTÉ 2007; SCHWARTZ, CHEN et al. 2002). These membrane-associated viral proteins contain functional domains for direct or indirect interactions with vRNA and viral replication proteins as well as host factors that lead to the assembly of the VRCs (DIAZ, ZHANG et al. 2015; KOVALEV, POGANY et NAGY 2012).

Interaction studies between membrane-associated viral proteins and host factors have emphasized the importance of protein trafficking components in the biogenesis of spherules or vesicles (HYODO et OKUNO 2016; LALIBERTÉ et ZHENG 2014; PATAR-ROYO, LALIBERTÉ et ZHENG 2013). Endosomal sorting complexes required for transport (ESCRT) factors, which are normally required for the formation of multi-vesicular bodies (MVBs) (SCHMIDT et TEIS 2012), are hijacked by TBSV and BMV most likely to facilitate membrane curvature and VRC assembly (BARAJAS, JIANG et NAGY 2009; BARAJAS, CASTRO MARTÍN et al. 2014; DIAZ, ZHANG et al. 2015). Host factors of the early secretory pathway were identified as being involved in the formation of the replication vesicles of Turnip mosaic virus (TuMV) and Red clover necrotic mosaic virus (RCNMV), such as COPII Sec24A and COPI ARF1, respectively (HYODO, MINE et al. 2013; JIANG, PATARROYO et al. 2015; WEI, ZHANG et al. 2013). Finally, soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptors (SNAREs) and synaptotagmins (SYTs) that normally work in concert to regulate fusion of transport vesicles with target membranes (RIZO, CHEN et ARAÇ 2006), such as the ER SNARE Syp71 (WEI, ZHANG et al. 2013) and SYTA (UCHIYAMA, SHIMADA-BELTRAN et al. 2014) were shown to be important for TuMV infection. SYTA knock down (KD) mutant also impaired *Turnip vein clearing virus* (TVCV) and Cabbage leaf curl virus (CaLCuV) movement and infection (LEVY, ZHENG et LAZA-ROWITZ 2015; LEWIS et LAZAROWITZ 2010; UCHIYAMA, SHIMADA-BELTRAN et al. 2014). However, it is not known if the conventional secretory pathway is required for the viral vesicles to reach plasmodesmata, or wheter an unconventional route is used.

TuMV is a (+) RNA virus in the family of *Potyviridae* (MAYO 1995). The 9.8 kb genome encodes at least 11 viral proteins, and among them are the membrane-associated P3 and 6K₂ proteins (EIAMTANASATE, JURICEK et YAP 2007; JIANG, PATARROYO et al. 2015; RESTREPO-HARTWIG et CARRINGTON 1994). 6K₂ is a 6kDa protein and, according to secondary structure predictions, is characterized by the presence of a 23 amino acid α helix TMD, as well as a 19 and an 11 amino acid N- and C-terminal tail, respectively (JIANG, PATARROYO et al. 2015). $6K_2$ is involved in the formation of vesicles (BEAUCHEMIN et LALIBERTÉ 2007; COTTON, GRANGEON et al. 2009; GRANGEON, AGBECI et al. 2012) that contain vRNA and viral proteins such as the vRdRp, the Cytoplasmic Inclusion (CI) helicase, and the viral protein linked to the genome fused to the viral proteinase (VPg-Pro) (COTTON, GRANGEON et al. 2009; GRANGEON, AGBECI et al. 2012; WAN, BASU et al. 2015), as well as host components such as translation factors (BEAUCHEMIN et LALIBERTÉ 2007; BEAUCHEMIN, BOUTET et LALIBERTÉ 2007; HUANG, WEI et al. 2010; THIVIERGE, COTTON et al. 2008). These vesicles are motile and thus support the vRNA intracellular, intercellular as well as systemic movement, leading to the infection of the whole plant (COTTON, GRANGEON et al. 2009; GRANGEON, JIANG et al. 2013; WAN, CABANILLAS et al. 2015). The molecular determinants of $6K_2$ for vesicle production and trafficking are largely unknown. Recently, we found that the N-terminal cytoplasmic tail of 6K₂ is required for the protein ER export and that it interacts with the COPII coatomer Sec24A (JIANG, PATARROYO et al. 2015). We report here that the predicted TMD of $6K_2$ contains a GxxxG motif (x being any amino acid) that is important for the production of replication vesicles. Mutating the glycine residues of this motif blocked the production of replication vesicles and delocalized $6K_2$ to Golgi bodies and the plasma membrane (PM), which prevented virus production. We also demonstrate that $6K_2$ vesicles bypass the Golgi apparatus and use a non-conventional pathway for effective virus infection. Indeed, impairing ER-Golgi trafficking did not inhibit $6K_2$ vesicle production, and on the contrary had an enhancing effect on virus cell-to-cell movement and whole plant systemic infection. Finally, we found that this Golgi bypass pathway involved the pre-vacuolar compartment (PVC) SNARE Vti11.-

3.4 Results

3.4.1 Identification of a GxxxG motif within the TMD of 6K₂

We have demonstrated that the N-terminal tail is involved in $6K_2$ ER exit by interacting with the COPII coatomer Sec24A (JIANG, PATARROYO et al. 2015). To further identify the role of the $6K_2$ TMD in replication vesicle biogenesis, we compared the amino acid sequence of predicted TMDs of different potyviruses. The comparison was performed with the Clustal W2 online server (LARKIN, BLACKSHIELDS et al. 2007). Glycine residues are found at position 30, 33, 34 and 35 of the TuMV $6K_2$, and this amino acid is frequently found at equivalent positions among potyviral $6K_2$ proteins (Supplemental Fig. 3.9 A). In particular, G34 is present in all the aligned sequences, and G35 is present in all except for the *Potato virus A* (PVA) $6K_2$ where it is replaced by an alanine residue. G30 is present in four out of the seven aligned sequences, or is replaced by comparable small amino acid residues (e.g. A or S) for *Potato virus Y* (PVY) and *Tobacco etch virus* (TEV). Helical wheel projection of the predicted $6K_2$ TMD of TuMV indicates that G30 and G34 are located on the same side of the predicted α -helix (Supplemental Fig. 3.9 B). This amino acid organization is characteristic of the GxxxG motif, which has been shown to mediate protein interactions between membrane proteins (TEESE et LANGOSCH 2015).

We carried out site-directed mutagenesis to substitute each glycine with a valine to test the importance of these residues in the formation of the $6K_2$ -induced vesicles. The

generated mutants were $6K_2G30V$, $6K_2G33V$, $6K_2G34V$ and $6K_2G35V$ and $6K_2G30V$ -G33V-G34V-G35V (this last mutant is designated as $6K_2GV$). These mutated $6K_2$ were fused to the N-terminal end of the green fluorescent protein (GFP) or mCherry and were produced by agrobacterium-mediated transient protein expression in *Nicotiana benthamiana* leaves. Expression of wild type (wt) $6K_2$:GFP induced the formation of punctae and aggregates of various sizes, ranging from 0.5 to 4.0 μ m in diameter (Fig. 3.1 A). The expression pattern for $6K_2G33V$ (Fig. 3.1 B) and $6K_2G35V$ (Fig. 3.1 C) was similar to that of wt $6K_2$ protein. However, expression of $6K_2G30V$ (Fig. 3.1 D), $6K_2G34V$ (Fig. 3.1 E) and $6K_2GV$ (Fig. 3.1 F) generated punctae of 2.0 μ m in diameter that were dispersed and evenly distributed. In all cases, faint retention in the ER of the $6K_2$ protein was observed. A cellular fractionation experiment indicated that $6K_2GV$ (Fig. 3.1 G, lower panel), like wt $6K_2$ (Fig. 3.1 G, top panel), was predominantly found in the 30 000 g membrane-associated pellet (P30 fraction), thereby confirming that $6K_2GV$ was still a membrane protein.

3.4.2 6K₂ is re-localized to the Golgi apparatus when the GxxxG motif is mutated

We then investigated the cellular distribution of the $6K_2GV$ mutant. The diameter and homogenous size of the punctate structures induced by $6K_2G30V$, $6K_2G34V$ and $6K_2GV$ were reminiscent of Golgi bodies. We consequently expressed $6K_2$:mCherry or $6K_2GV$:mCherry with ERD2 :GFP, a cis-Golgi marker that also faintly labels the ER (SAINT-JORE, EVINS et al. 2002). Only a portion of the wt $6K_2$ punctae overlapped with ERD2 :GFP (Fig. 3.1 H, arrows), while all $6K_2GV$ punctae localized with this marker (Fig. 3.1 I). Twenty cells were analyzed and we calculated that $51\pm6\%$ of $6K_2$ punctae localized with the cis-Golgi marker, while the value rose up to $96\pm4\%$ for $6K_2GV$ (Fig. 3.1 J). Furthermore, a strong continuous signal for $6K_2GV$:mCherry was visible at the cell periphery (Fig. 3.1 K), which was not the case for wt 6K₂ :mCherry (Fig. 3.1 L), indicating that 6K₂ may have reached the plasma membrane (PM) when the GxxxG motif was mutated. The PM marker AHA2 :GFP (CHEN, STEFANO et al. 2011) was expressed with 6K₂GV :mCherry or the cytoplasmic protein mCherry. The signal for 6K₂GV :mCherry was on the apoplastic side (Fig. 3.1 M), while mCherry was located on the cytoplasmic side of the PM marker (Fig. 3.1 N). Recalling the membranous nature of the mutated viral protein (Fig. 3.1 G, lower panel), 6K₂GV is likely PM localized, but we cannot exclude the possibility that the viral protein has also been secreted into the apoplast. The lack of PM labelling by 6K₂GV :GFP (Fig. 3.1 F) is explained by the pH sensitivity of GFP, which losses its fluorescence in the acidic apoplastic environment (DOHERTY, BAILEY et LEWIS 2010). This is not the case for mCherry (IVANOV, ESKELIN et al. 2014). These results indicate that mutating the GxxxG motif has modified 6K₂ from a vesicle-forming protein to a default membrane protein that now traffics through the conventional secretory pathway.

3.4.3 Differential sensitivity of 6K₂ and 6K₂GV to inhibitors of ER-Golgi trafficking

Brefeldin A (BFA) is a fungal toxin that is widely used to assess if the trafficking of the protein under observation follows the conventional Golgi-dependent secretory pathway (NEBENFÜHR, RITZENTHALER et ROBINSON 2002). Leaf tissues expressing the trans-Golgi marker ST :YFP (ZHENG, CAMACHO et al. 2005), $6K_2$:GFP or $6K_2GV$:GFP were consequently treated with 20 μ g/mL BFA 24h prior to confocal observation. As expected, the addition of BFA induced the collapse of the Golgi apparatus, as evidenced by the retention of ST :YFP in the ER (Fig. 3.2 A). Addition of BFA however did not block the formation of $6K_2$ -induced punctae, although some ER labeling was observed (Fig. 3.2 B). In contrast, BFA prevented $6K_2GV$ from reaching the Golgi apparatus, resulting in its complete ER
retention (Fig. 3.2 C). This experiment clearly shows that $6K_2$ and $6K_2GV$ have a differential sensitivity to BFA, confirming that the intracellular trafficking of $6K_2$ is relocated towards the ER-Golgi-PM conventional secretory pathway when the GxxxG motif is mutated.

Two dominant-negative mutant GTPases known to impair the secretory pathway were used to support the notion that 6K₂GV transits through the Golgi apparatus. The first mutant protein, a GFP fusion with the ADP-ribosylation factor 1 mutated in its GTP/GDP exchanging site (GFP :ARF1 NI), blocks the COPI machinery and leads to the re-absorbance of Golgi membrane proteins into the ER (STEFANO, RENNA et al. 2006). The second inhibitor used was Rab-D2A N123I, which is a dominant negative mutant of Rab-D2A that inhibits trafficking between the ER and Golgi (ZHENG, CAMACHO et al. 2005). Expression of GFP :ARF1 NI and Rab-D2A N123I lead to a clear retention of the Golgi marker Man49 :mCherry (SAINT-JORE-DUPAS, NEBENFÜHR et al. 2006) in the ER (Fig. 3.2 D). Similarly, 6K₂GV :mCherry remained in the ER when either of the two dominant negative mutants were expressed (Fig. 3.2 E). On the contrary, the localization pattern of 6K₂ :mCherry (e.g. production of heterogeneous sized punctae), either produced ectopically or during infection was not affected by the presence of the protein trafficking inhibitors (Fig. 3.2 F,G). These experiments confirmed that 6K₂GV enters the Golgi apparatus and follows the conventional secretory pathway, which is not the case for most of the wt 6K₂.

Proteins can undergo co- and post-translational modification, such as Nglycosylation. In silico glycosylation prediction indicates the presence of two putative Nglycosylation sites in $6K_2$ (Fig. 3.2 H). N-glycosylation initially takes place in the ER, but can further be modified in the Golgi apparatus. Normally, N-glycans are sensitive to removal by Peptide-N-Glycosidase F (PNGase F), but addition in the Golgi apparatus of fucose α (1-3)-linked to the glycan core blocks removal of the glycan by PNGase F (TRETTER, ALTMANN et MÄRZ 1991). Consequently, if a population of $6K_2$ effectively does not enter the Golgi apparatus, this population is expected to accumulate as a PNGase F-sensitive form. To test this hypothesis, we expressed $6K_2$:GFP in *N. benthamiana* leaves and incubated the cell-free extract with PNGase F. As controls, we expressed N-YFP :HDEL and N-ST :YFP, which are respectively a N-glycosylable form of the ER marker YFP :HDEL and Golgi marker ST :YFP (BATOKO, ZHENG et al. 2000). Immunoblot analysis showed, as expected, that N-YFP :HDEL and N-ST :YFP were respectively PNGase F-sentivive and PNGase F-resistant (Fig. 3.2 1). On the other hand, $6K_2$ was partially sensitive to PNGase F treatment. The deglycosylation assay demonstrates that $6K_2$ is glycosylated in the ER and that a subset of $6K_2$ enters the Golgi apparatus (upper resistant band) and that another subset bypasses this organelle (lower sensitive band) (Fig. 3.2 1). No N-glycosylation site was predicted to be found in GFP and lack of GFP modification indicates that it is the $6K_2$ moiety of the fusion protein that was glycosylated.

3.4.4 The GxxxG motif is important for virus replication

We next evaluated the impact of mutating the GxxxG motif of $6K_2$ on virus production. Mutations coding for 6K₂G30V, 6K₂G34V and 6K₂GV were introduced into the infectious clone pCambiaTuMV (JIANG, PATARROYO et al. 2015), and the resulting modifications were identified as pCambiaTuMV G30V , pCambiaTuMV G34V and pCambiaTuMV GV , respectively. pCambiaTuMVVNN, in which the vRdRp core motif GDD was changed to VNN, was used as a replication-defective virus control (LI et CARRINGTON 1995). The above viral constructs were used to inoculate plants by agrobacterium-mediated infiltration. Viral replication was assayed after 3,25 days post-infiltration (dpi) prior to any virus intercellular movement (Supplemental Fig. 3.12 A) by quantitative RT-PCR (RT-qPCR) (Fig. 3.3 A). A strong signal was observed following infiltration with pCambiaTuMV, whereas a weaker signal was obtained with the replication-deficient pCambiaTuMV^{VNN}. The signal from pCambiaTuMV VNN resulted from transcription of the TuMV VNN gene cassette without any vRNA amplification step. The signal following agro-inoculation with pCambiaTuMV^{GV}, pCambiaTuMV^{G34V} and pCambiaTuMV^{G30V} was close to the level obtained with pCambiaTuMV^{VNN}, indicating that the mutations severely affected virus replication. Although, comparison between pCambiaTuMV VNN and pCambiaTuMV G30V conditions highlighted that a slight but significant replication level was taking place for $TuMV^{G30V}$.

TuMV intercellular movement was followed by infiltrating leaves with pCambiaTuMV/6K₂ :GFP or pCambiaTuMV^{G30V}/6K₂G30V :GFP. In the first construct, the 6K₂ :GFP coding sequence was inserted between the P1 and HC-Pro cistron of TuMV, thus allowing the release of 6K₂ :GFP upon production of the viral polyprotein (COTTON, GRAN-GEON et al. 2009; GRANGEON, AGBECI et al. 2012). pCambiaTuMV^{G30V}/6K₂G30V :GFP contains G30V mutation in the 6K₂ cistron and also produces $6K_2G30V$:GFP from the same position on the viral polyprotein as for pCambiaTuMV/6K₂ :GFP. Either vector was expres-

sed along with the vector expressing mCherry :HDEL in order to distinguished primary infection foci from secondary infection foci. Primary infected cells express both mCherry and GFP, while secondary foci express GFP only. After 5 dpi, confocal microscopy observations on TuMV infection foci showed that a green-only fluorescence signal was found encircling an area of both red and green fluorescence, indicative of virus movement (Fig. 3.3 B). However, only slight green-only fluorescence was measured for leaves infiltrated with pCambiaTuMV^{G30V}/6K₂G30V :GFP, suggesting that this mutant is capable of slow movement. Movement was quantified and normalized for each focus of infection by measuring the surface area of green fluorescence divided by the surface area of red fluorescence. The ratios of the focus areas were graphically represented using Whisker and Box plots and statistically analyzed using the non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney Two Sample Rank test. Statistical comparison of both TuMV^{G30}V/6K₂G30V :GFP and pCambiaTuMV/6K₂ :GFP infection area ratio distributions indicated that intercellular movement was greatly diminished for the mutant virus, but not totally abolished.

Systemic virus accumulation was determined at 5 dpi by immunoblotting leaf tissues extracts with a rabbit serum raised against the TuMV capsid protein (CP) (MCCLINTOCK, LAMARRE et al. 1998). All infiltrated leaves showed accumulation of CP to varying levels (Fig. 3.3 C), but the viral protein was detected in upper non-inoculated leaf tissues only in pCambiaTuMV-infiltrated plants (Fig. 3.3 DI). CP was however detected in the pCambiaTuMV^{G30V} upper non-inoculated leaf tissues at 19 dpi (Fig. 3.3 DII). mRNA from pCambiaTuMV^{G30V}-systemically infected leaf tissues was isolated and reverse-transcribed. DNA sequencing of the $6K_2$ coding region indicated that virus production was the result of a reversion of the G>T mutation to a G nucleotide (GTA in $6K_2$ GV to GGA in $6K_2$ revertant), thereby reinstating the glycine residue at position 30 of $6K_2$ (Fig. 3.3 E). This reversion indicates that some viral replication is taking place as suggested in Fig. 3.3 A, albeit at a very low level.

TuMV infection induces the amalgamation of the ER, Golgi and chloroplasts into a large perinuclear globular structure, which is a hallmark for normal TuMV replication/infection at the cellular level (GRANGEON, AGBECI et 2012; WAN, BASU et al. 2015). We consequently expressed the ER maral. ker GFP :HDEL alone (Fig. 3.3 FI), or concomitantly with the agro-infiltration of pCambiaTuMV/6K₂ :mCherry (Fig. 3.3 FIII), pCambiaTuMV^{VNN}/6K₂ :mCherry (Fig. 3.3 FII), or pCambiaTuMV^{G30V}/6K₂G30V :mCherry (Fig. 3.3 FIV) to qualitatively evaluate TuMV replication based on the formation of ER amalgamates. Formation of perinuclear ER amalgamates was evaluated by confocal microscopy 5 days later. The expression pattern for GFP :HDEL, as shown in the bottom left insert of Fig. 3.3 FI, is characteristic of the ER surrounding the nucleus (BEAUCHEMIN et LALIBERTÉ 2007). Although agro-infiltration of pCambiaTuMV VNN /6K $_2$:mCherry led to the production of 6K $_2$:mCherry punctae, no ER amalgamation near the nucleus Fig. 3.3 FII, bottom left insert) was ever noted following the observation of 20 samples. The punctae observed in Fig. 3.3 FII are due to the expression of the gene cassette expression without any vRNA amplification. On the other hand, pCambiaTuMV/6K $_2$:mCherry always induced the formation of large perinuclear structures containing $6K_2$:mCherry and GFP :HDEL (n=20) (Fig. 3.3 FIII, left insert), thus confirming that formation of ER amalgamate can be used as a qualitative indicator of TuMV replication. Finally, expression of pCambiaTuMV G30V /6K $_2$ G30V :mCherry produced 6K $_2$ G30V :mCherry punctae, but did not induce any ER amalgamate formation (n=20) (Fig. 3.3 FIV, left insert). This result suggests that mutation of the GxxxG motif inhibits the formation of fully functional TuMV replication structures at the cellular level.

In conclusion, the low level of replication and systemic infection of the mutants highlight the importance of the GxxxG motif for TuMV infection. It also demonstrates that the Golgi apparatus is a dead-end for the virus when $6K_2$ transits through it.

3.4.5 Impairing ER-Golgi homeostasis enhances TuMV intercellular movement

We next investigated the impact of impaired fusion of transport vesicles with the Golgi apparatus on TuMV intercellular movement. Impairing fusion was achieved by transiently overexpressing the Sec22 SNARE protein, which induced the collapse of Golgi membrane proteins into the ER (CHATRE, BRANDIZZI et al. 2005). A link between Sec22 and $6K_2$ was first demonstrated by confocal microscopy localization experiments with fluorescent-tagged proteins. N. benthamiana leaves were agro-infiltrated to transiently co-express Sec22 :GFP with Man49 :mCherry, 6K2GV :mCherry, 6K2 :mCherry and TuMV/6K₂ :mCherry, respectively. Man49 :mCherry (Fig. 3.4 A) and $6K_2GV$:mCherry (Fig. 3.4 B) completely co-localized with Sec22 :GFP, whereas only a small proportion of 6K₂ :mCherry (Fig. 3.4 C, arrows) and 6K₂ :mCherry punctae produced during infection did (Fig. 3.4 D, arrows). In addition to these localization experiments, we tested if $6K_2$ could be purified along with Sec22 by performing co-immunopurification (co-IP) experiments. We performed different co-IPs using anti-GFP beads from total protein extracts containing multiple combinations. First, control co-IPs consisting of Sec22 :GFP with mCherry or GFP with $6K_2$:mCherry confirmed that mCherry did not bind the beads, nor did GFP interact with $6K_2$:mCherry. The interaction test for Sec22 :GFP with $6K_2$:mCherry revealed that Sec22 co-purified with $6K_2$ (Fig. 3.4 E). Hence, the above experiments indicated that Sec22 is able to interact with vesicles that contain $6K_2$.

To ascertain that Sec22 overexpression has a negative effect on ER-Golgi equilibrium in our experimental conditions, we expressed Sec22 :GFP with Man49 :mCherry, a Golgi marker known to transit from the ER to Golgi (SAINT-JORE-DUPAS, NEBENFÜHR et al. 2006), 6K₂GV :mCherry, 6K₂ :mCherry and 6K₂ :mCherry during infection, respectively. Sec22 :GFP overexpressing cells were recognizable by the ER retention network appearance of the protein (Supplemental Fig. 3.10). Under these overexpressing conditions, Man49 :mCherry was retained in the ER (Supplemental Fig. 3.10 A). Similarly, $6K_2GV$:mCherry showed an ER redistribution (Supplemental Fig. 3.10 B), but not agro-infiltrated $6K_2$:mCherry (Supplemental Fig. 3.10 C) or $6K_2$:mCherry produced during infection (Supplemental Fig. 3.10 D). This experiment thus confirmed that overexpression of Sec22 impairs transport vesicle fusion with the Golgi apparatus without affecting $6K_2$ replication vesicles.

We next tested TuMV intercellular movement under Sec22 overexpression conditions. TuMV intercellular movement was followed using a dual expression cassette for TuMV tagged with $6\ensuremath{\mathsf{K}}_2$:mCherry and for GFP-HDEL, both under the control of the CaMV 35S promoter and within the left and right border sequences of the transfer DNA (T-DNA) (designated pCambiaTuMV/6K₂ :mCherry//GFP-HDEL) (AGBECI, GRAN-GEON et al. 2013). With this dual expression cassette construct, primary infection foci can be distinguished from secondary infection foci. Primary infected cells express both $6K_2$:mCherry and GFP-HDEL, while secondary foci express $6K_2$:mCherry only. We thus expressed Sec22 :CFP (Supplemental Fig. 3.13 shows Sec22 overexpression) a day prior to pCambiaTuMV/6K₂ :mCherry//GFP-HDEL agro-inoculation. Five days after virus inoculation, confocal microscopy observations on TuMV infection foci showed that a red-only fluorescence signal was found encircling an area of both red and green fluorescence, indicative of virus movement (Fig. 3.4 F). However, the focus surface area of red-only fluorescence was greater for leaves overexpressing Sec22 :CFP than those that did not. Movement was quantified and normalized for each focus of infection by measuring the surface area of red fluorescence divided by the surface area of green fluorescence. The ratios of the focus areas were graphically represented using Whisker and Box plots and statistically analyzed using the non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney Two Sample Rank test. We found that under Sec22 overexpression conditions, TuMV intercellular movement was significantly faster than

in control conditions. TuMV replication was evaluated by RT-qPCR under Sec22 :CFP overexpression conditions (Supplemental Fig. 3.15). We did not see any appreciable difference in replication when compared to normal conditions.

To confirm the above observation, we tried to isolate Sec22 homozygous knock out (KO) *Arabidopsis thaliana* plants by screening two different T-DNA insertion lines, but we were not successful. As an alternative, we challenged a homozygous KO line for the Golgi SNARE BET11 (CHATRE, BRANDIZZI et al. 2005) with TuMV infection. Wt and *bet11* KO mutant plants were agro-inoculated with pCambiaTuMV/6K₂ :GFP, and every day the number of systemically infected plants were scored by GFP fluorescence observation. Three experiments were conducted and we consistently found that the number of TuMV-infected plants over time was higher for the Golgi SNARE KO plants (Fig. 3.4 G). Indeed, the time by which 50% of plants were infected (I50) was reached earlier for *bet11* (I50=9.5 dpi) than for wt plants (I50=10.5 dpi) (Fig. 3.4 G). Thus, these results indicate that impairing fusion of transport vesicles with the Golgi apparatus enhanced the susceptibility of *A. thaliana* to TuMV infection.

3.4.6 ER- and Golgi-localized synaptotagmins act antagonistically to modulate TuMV movement

SYTs are SNARE partners in the fusion process and are known to regulate transport vesicle trafficking (RIZO, CHEN et ARAÇ 2006). Hence, we decided to study their potential involvement in TuMV vesicles movement and to see if their action is in line with the observation that impairing transport vesicle fusion with the Golgi apparatus increases virus movement. The A. thaliana genome encodes at least six different SYT-like proteins (CRAXTON 2004) (Supplemental Fig. 3.11 A). A. thaliana SYTs have an N terminal TMD, a synaptotagmin-like mitochondrial lipid-binding (SMP) linker domain as well as two calciumbinding domains in tandem (C2), called C2A and C2B at the C terminal end (Supplemental Fig. 3.11 A). Mammals have a special category of SYTs that have additional C2 domains and are defined as extended-synaptotagmin-like (E-SYT) proteins (MIN, CHANG et SÜD-HOF 2007). Because of its domain similarity, we considered the sixth SYT-like protein, called SYTF as being an E-SYT (Supplemental Fig. 3.11 A). Since not all A. thaliana SYTs have been characterized, we wanted to know their subcellular distribution. We cloned the cDNA of SYTA, SYTB, SYTD, SYTE, SYTF, but not SYTC (mRNA was not detectable) and expressed the encoded proteins as GFP fusions in *N. benthamiana* by agro-infiltration. ER localization of SYTA has been reported by (LEWIS et LAZAROWITZ 2010), and our expression data confirmed this localization (data not shown). SYTE :GFP (Supplemental Fig. 3.11 B) and SYTD :GFP (Supplemental Fig. 3.11 C) were also located in the ER. In addition to its ER localization, SYTF expression revealed the presence of several punctate structures (Supplemental Fig. 3.11 D, arrows). These punctae co-localized with the Golgi marker Man49-mCherry (Supplemental Fig. 3.11 E, arrows). This indicated that SYTF was located both in the ER and the Golgi apparatus. We could not observe any expression for SYTB :GFP, although it has been reported to be located in the Golgi apparatus (WANG,

HAN et al. 2015; ZHANG, ZHANG et al. 2011).

We next challenged homozygous KD/KO *A. thaliana* for all SYTs to TuMV infection. syta-1 KD plants were obtained from (LEWIS et LAZAROWITZ 2010), while *sytb*, *sytc*, *sytd*, *syte* and *sytf* KO mutants were obtained from TAIR. Homozygous T-DNA insertion was verified by PCR. A.thaliana wt and the SYTs T-DNA insertion KD or KO plants were agro-inoculated with pCambiaTuMV/6K₂ :GFP, and the number of systemically infected plants was scored by GFP fluorescence observation every day. We observed that TuMV infection was delayed in *syta-1* KD mutant (I50= 12 dpi), as previously reported (UCHIYAMA, SHIMADA-BELTRAN et al. 2014), and in *syte* KO plants (I50= 13 dpi) as compared to wt (I50= 11 dpi) (Fig. 3.5 A,B). No effect on the rate of TuMV infection was observed in *sytc* and *sytd* KO plants (Fig. 3.5 C,D). In contrast, we found that the rate of TuMV infection was faster in *sytb* and *sytf* KO plants (I50= 8 dpi in both cases), as compared to wt plants (I50= 9 dpi) (Fig. 3.5 E,F). Two additional experiments were conducted, and similar outcomes were observed. These results indicate that SYTs located in the ER have a positive effect (e.g. SYTA and E) or no effect (e.g. SYTC and D), while those found in the Golgi (e.g. SYTB and SYTF) have a negative effect on TuMV infection.

The above observations were confirmed by expressing truncated forms of selected SYTs in infected cells. Removing the TMD or C2B domain from SYTA was shown to impair its function and localization in *N. benthamiana* protoplasts and leaf tissues (LEWIS et LAZAROWITZ 2010). Similarly, by deleting the TMD, C2B domain or C2C domain, we developed truncated forms of SYTA (SYTA Δ C2B), SYTE (SYTE Δ TMD) and SYTF (SYTF Δ C2C) tagged with CFP as indicated in Supplemental Fig. 3.11 A (white-dashed lines). The cellular distribution of the truncated SYTs fused with CFP was determined by confocal microscopy. SYTA Δ C2B :CFP was mislocalized to membrane patches similar to what has been previously described (LEWIS et LAZAROWITZ 2010) (Supplemental Fig.

3.13). SYTE Δ TMD :CFP had a soluble cytosolic distribution and SYTF Δ C2C :CFP was mis-localized to punctate structures (Supplemental Fig. 3.13). These truncated form were expressed one day before pCambiaTuMV/6K₂ :mCherry//GFP-HDEL agro-infiltration in order to competitively impair wt SYT function. Confocal microscopy observations for each tested SYT showed overall less red fluorescence when SYTA Δ C2B :CFP (Fig. 3.5 G) or SYTE Δ TMD :CFP (Fig. 3.5 H) were expressed in comparison to mock conditions, indicating that virus intercellular movement was delayed. In contrast, confocal microscopy observations showed more red fluorescence when SYTF Δ C2C :CFP was produced (Fig. 3.5 I), indicating that virus intercellular movement was faster. The surface area for red and green fluorescence of each focus of infection was quantified as mentioned above and the ratios showed that the difference in virus cell-to-cell movement between the tested conditions were statistically significant (Fig. 3.5 G-I). These experiments were repeated two more times, and similar data were obtained. Also, a quantitative estimate of TuMV replication was performed by RT-qPCR under the same SYTE Δ TMD :CFP and SYTF Δ C2C :CFP expression conditions (Supplemental Fig. 3.15).

Taken together, these results reveal that, on the one hand, SYTA and SYTE (both ER localized) are required for TuMV movement, and that, on the other hand, SYTB and SYTF (both Golgi localized) negatively regulate TuMV movement. They are also in line with the observation that impairing ER-Golgi homeostasis by overexpressing the Golgi SNARE Sec22 has a positive effect on TuMV infection.

3.4.7 The pre-vacuolar compartment SNARE Vti11 is essential for TuMV infection

The above results suggest that TuMV replication factories bypass the Golgi apparatus for infection. Possible destinations for this bypass could be PVCs/MVBs, endosomes,

the trans-Golgi network compartment (TGN) and/or the central vacuole. SNAREs are distributed in different compartments between which they shuttle (UEMURA, UEDA et al. 2004). This led us to perform co-localization experiments between selected GFP-tagged SNAREs associated with different compartments and 6K2 :mCherry produced during infection in order to get a glimpse of $6K_2$ vesicle destination. Among the 25 tested SNAREs (listed in Supplemental Table 3.1), we found that $6K_2$:mCherry partially co-localized (calculated 6 $\pm 2\%$ co-localization) with Vti11 :GFP during infection (Fig. 3.6 A). Vti11 was identified as being located in the PVC, shuttling from the TGN to the PVC and to the vacuole, and also forming a SNARE complex with other PVC SNAREs (EBINE, OKATANI et al. 2008; SANDERFOOT, KOVALEVA et al. 2001; UEMURA, UEDA et al. 2004; ZHENG, VON MOLLARD et al. 1999). We carried out co-IP experiments to verify a potential association between $6K_2$ and Vti11. We did different co-IPs using anti-GFP beads from total protein extracts containing multiple combinations (Fig. 3.6 B). First, control co-IPs consisting of Vti11 :GFP with mCherry or GFP with $6K_2$:mCherry were performed to confirm that neither mCherry was binding the beads, nor GFP was pulling down $6K_2$:mCherry. Co-purification of Vti11 :GFP with 6K2 :mCherry was positive. Consequently, these results suggest that Vti11 can associate with $6K_2$ vesicles.

We then tested if Vti11 was involved in TuMV infection. A homozygous Vti11 loss-of-function *A. thaliana* mutant line, called *itt3* for impaired tonoplast trafficking 3, was generated by ethylmethane sulfonate (EMS) mutagenesis (ZHENG, HAN et al. 2014). zig-1 is another Vti11-non-functional mutant plant that was isolated by (KATO, MORITA et al. 2002). Importantly, an allelism test between *itt3* and zig-1 mutants did not show any complementation (ZHENG, HAN et al. 2014), which supports that Vti11 function is specifically disrupted in the *itt3* mutant line. This line was obtained from TAIR. Genomic DNA analysis revealed that the *itt3* phenotype is the consequence of an early stop co-don in the Vti11 mRNA, just before its SNARE coil-coiled domain and its TMD (ZHENG,

HAN et al. 2014). To verify if the *itt3* mutant that we obtained was still producing the Vti11 mRNA and contained the indicated point substitution, we extracted total mRNA from wt and *itt3* mutant plants, performed an RT-PCR with primers specific for Vti11 coding region and cloned the resulting cDNA. We sequenced three independent amplified fragments and confirmed the presence of the C>T substitution, which introduces a premature stop codon (data not shown). We agro-inoculated Col-0 wt and *itt3* mutant plants with pCambiaTuMV/6K₂ :GFP. Infection kinetics showed that *itt3* mutant plants were completely resistant to TuMV infection, even four weeks after inoculation (Fig. 3.6 C,D). itt3 plants show a reduced rosette size and a characteristic zigzagged stem due to a loss of polarity. The lack of susceptibility to TuMV may then be a secondary effect due to a pleiotropic effect of the mutation, resulting in an abnormal development. To exclude this possibility, we infected *itt3* plants with *Plantago asiatica mosaic virus* (PIAMV), which belongs to the *Potexvirus* genus. A PIAMV infectious clone expressing GFP fused to the capsid viral protein (YAMAJI, MAEJIMA et al. 2012) was agro-inoculated in wt and *itt3* plants. After inoculation, we found that PIAMV was able to infect primary infiltrated leaves and to move systemically in both wt and itt3 mutant plants (Fig. 6E). Total protein extracts from wt and itt3 rosettes inoculated either with TuMV/6K2 :GFP or with PIAMV :GFP were made and immunoblot analysis was performed with an anti-GFP serum. The data showed that 6K2 :GFP was only produced in wt plants, but that the GFP fusion from PIAMV :GFP accumulated in both wt and *itt3* mutant plants (Fig. 3.6 F). We also verified if *itt3* symplasmic and phloem transport were unaltered by infiltrating one lower leaf with Carboxyfluorescein Diacetate (CFDA) and observing the dye movement in upper leaves (Supplemental Fig. 3.14). This physiological test revealed that despite *itt3* plants phenotype, there was no difference in symplasmic and phloem transport capability between wt and *itt3* plants. These results indicate that *itt3* plants are not generally impaired for virus infection, but that Vti11 is essential for TuMV infection.

Viral replication in wt and *itt3* plants was measured by RT-qPCR at 4 dpi, which is prior to any virus cell-to-cell movement (Supplemental Fig. 3.12 B). Fig. 3.6 G shows that there is very little, if no TuMV replication in *itt3* plants.

A truncated form of Vti11 without its TMD and tagged with CFP (Vti11 Δ TMD :CFP) was generated and expressed in *N. benthamiana* prior to pCambia/TuMV-6K₂ :mCherry//GFP-HDEL agro-infiltration (Supplemental Fig. 3.13). After five days following inoculation, confocal microscopy observations of TuMV infection foci showed overall less red fluorescence when Vti11 Δ TMD :CFP was expressed in comparison to mock conditions (Fig. 3.6 H), indicating that virus movement was delayed. TuMV intercellular movement was quantified as above and the data was graphically represented using Whisker and Box plots and statistically analyzed as described earlier. We found that TuMV intercellular movement was significantly decreased as compared to mock infiltrated plants. Also, a quantitative estimate of TuMV replication was performed by RT-qPCR under the same Vti11 Δ TMD :CFP expression conditions (Supplemental Fig.(Fig. 3.15).

These results suggest then that one destination route for TuMV replication factory Golgi bypass involves Vti11-tagged PVCs.

3.4.8 Viral RNA is associated with multi-vesicular bodies

To further confirm that TuMV replication factories associate with PVCs, we performed transmission electron microscopy analyses on immunogold-labeled leaf sections using the anti-dsRNA monoclonal antibody J2. This antibody is used to immuno-label ultrastructures containing viral RNA (WAN, BASU et al. 2015). Few dsRNA-specific gold particles were observed in Mock-infected samples, while a significant amount localized on MVBs from TuMV-infected leaves (Fig. 3.7 A,B). The number of gold particles per square micrometer found in MVBs is shown in Fig. 3.7 C, which confirms that MVBs from TuMV-infected samples were associated to significantly more gold particles as compared to mock-infected samples. PVCs appear as MVBs under the TEM (JIA, GAO et al. 2013), thus supporting the association of TuMV with these extra Golgi structures.

3.5 Discussion

The fate of viral vesicles immediately after their production once $6K_2$ exits from the ER is not known. In this study, we identified a GxxxG motif in the predicted TMD of the $6K_2$ viral protein (Supplemental Fig. 3.9) that modulates the intracellular trafficking of the viral vesicles. Normally, wt $6K_2$ induces the formation of vesicles and aggregates that show only partial localization with Golgi bodies (Fig. 3.1). However, when the glycine residues of the GxxxG motif were replaced with valine residues, the $6K_2GV$ mutant lost its capacity to form vesicles and the protein was redirected to the Golgi apparatus and the PM (Fig. 3.1). It has thus been converted into a default membrane protein trafficking through the conventional secretory pathway. One consequence of this rerouting is that virus replication and viral systemic movement were inhibited (Fig. 3.3). $6K_2$ transit through the Golgi apparatus is thus a dead-end avenue for virus production. The idea that the GxxxG motif prevents, albeit not completely, the viral protein from entering into the conventional ER-Golgi secretory pathway is supported by the differential sensitivity of wt $6K_2$ and $6K_2$ GV to BFA treatment and to dominant-negative GTPase mutant expression and the deglycosylation assay (Fig. 3.2). These treatments had no effect on the production of wt $6K_2$ vesicles, but barred $6K_2$ GV from leaving the ER. These observations thus indicate that the GxxxG motif somehow modulates the intracellular trafficking of $6K_2$. Although a proportion of $6K_2$ does traffic to the Golgi apparatus, there are still a sizable number of $6K_2$ vesicles that bypass the Golgi through an unconventional route because of this motif. This is in contrast to other TuMV/potyvirus proteins, which do not take such an unconventional pathway. For instance, P3N-PIPO and

the cylindrical inclusion (CI) viral proteins from TuMV may reach plasmodesmatas through the secretory pathway, where they are thought to anchor the VRC to this structure (WEI, ZHANG et al. 2010).

TMDs are major determinants of protein-protein interactions (LANGOSCH et AR-KIN 2009). The GxxxG motif has been implicated in homo- and heterotypic interactions for more than 20 different proteins (TEESE et LANGOSCH 2015). Structural studies indicate that the GxxxG motif induces membrane helix interactions because the short side chain of glycine (-H) maximizes interfacial interactions. Nevertheless, the sequence context is also important in providing interaction specificity. The GxxxG motif likely involves heterotypic interaction since $6K_2$ self-interaction was not abolished when the GxxxG motif was mutated (data not shown). Interaction candidates would be host factors involved in protein sorting somewhere downstream of COPII vesicle formation and prior to Golgi fusion (e.g. tethers, GTPases,...). However, little is known concerning what these proteins might be and how they would function in preventing proteins from entering the Golgi apparatus (TAN, CAI et al. 2013).

The observations revealing that 6K₂-induced replication vesicles are unaffected by the use of different ER to Golgi deregulating treatments (Fig. 3.2, Supplemental Fig. 3.10) in addition to their partial co-localization with Golgi markers, indicates that there may be a molecular tug-of-war between the conventional secretory pathway and an unconventional trafficking route for viral replication complex formation. Indeed, we observed an enhanced virus cell-to-cell movement when transport vesicle fusion with the Golgi apparatus was impaired by overexpression of the Golgi SNARE Sec22 (Fig. 3.4 A). This increase in viral movement when ER-Golgi homeostasis was impaired was corroborated by the reproducible increase in TuMV susceptibility of the Golgi SNARE BET11 KO *A. thaliana* plants (Fig. 3.4). Observations that further support this notion of tug-of-war was that SYTs localized in the Golgi apparatus (SYTB and SYTF) have an antiviral effect, while SYTs present in the ER (SYTA and SYTE) have a pro-viral function (Fig. 3.5). The pro-viral role of ER SYTs was previously reported where SYTA KD plants delayed systemic infection by TVCV, CaL-CuV and TuMV (LEVY, ZHENG et LAZAROWITZ 2015; LEWIS et LAZAROWITZ 2010; UCHIYAMA, SHIMADA-BELTRAN et al. 2014). Enhanced virus movement and increased virus susceptibility when ER-Golgi homeostasis is perturbed may be explained by the fact that less $6K_2$ vesicles fuse with the Golgi apparatus, with a concomitant increase in the number of $6K_2$ vesicles entering the unconventional trafficking pathway for infection.

The next question that was addressed in this investigation was what might be the destination(s) of the $6K_2$ vesicles once they enter this unconventional pathway. Plant cells contain multiple compartments that intercommunicate through transport vesicle fusions, and SNAREs are key players in this communication process. Our screening of SNAREs located in different compartments revealed that $6K_2$ vesicles appeared to contain Vti11 (Fig. 3.6). The biological significance of this 6K₂-Vti11 complex on infection was confirmed by the observation that loss-of-function A. thaliana plants for this SNARE were completely resistant to TuMV but not to an unrelated potexvirus (Fig. 3.6). Expression of a truncated form of Vti11 also confirmed a pro-viral function of this SNARE protein (Fig. 3.6). Vti11 transits from the TGN to PVCs and to the central vacuole, and interacts with other PVC SNAREs (EBINE, OKATANI et al. 2008; SANDERFOOT, KOVALEVA et al. 2001; UEMURA, UEDA et al. 2004; ZHENG, VON MOLLARD et al. 1999). PVCs, or MVBs, are organelles that play important roles in mediating protein trafficking to vacuoles (CUI et LEE 2016). The involvement of MVBs in viral infection has been discussed to explain the non-lytic spread of animal viruses (BIRD et KIRKEGAARD 2015). MVBs are the precursors of extracellular vesicles also known as exosomes (ALENQUER et AMORIM 2015) and exosome-mediated transmissions of human viruses have been reported (FENG, HENSLEY et al. 2013; LONGATTI, BOYD et CHISARI 2015; RAMAKRISHNAIAH, THUMANN et al. 2013) [and reviewed in (ANDERSON,

KASHANCHI et JACOBSON 2016)]. It is also important to note that the release of *Rice* dwarf virus from insect vector cells involves exosomes derived from MVBs (WEI, HIBINO et OMURA 2009). We observed by TEM that many MVBs produced during the infection process of TuMV were decorated with a significant number of gold particles coupled with an anti-dsRNA specific antibody (Fig. 3.7). These observations thus support the idea that TuMV replication vesicles may transit through PVCs. Information on the explicit involvement of PVCs/MVBs has not been reported for plant viruses. However, importance of the proteins from the ESCRT family for BMV and TBSV infection provides some indication for the involvement of PVCs/MVBs in plant virus infections. Furthermore, (RUTTER et INNES 2017) isolated extracellular vesicles from A. thaliana infected by Pseudomonas syringae and interestingly one protein that was identified as part of these extracellular vesicles was Vti11. Xylem vessels are dead tissues and are considered to represent the extracellular space of a plant. Xylem vessels originate from programmed-cell-death events of proto-xylem cells, and direct continuity between the apoplast and xylem vessel has been suggested (LIGAT, LAUBER et al. 2011). TuMV replication vesicles have been observed in xylem vessels (WAN, CABANILLAS et al. 2015). The question that now has to be answered is whether the $6K_2$ vesicles found in the xylem have any link with the apoplastic Vti11-associated extracellular vesicles.

Fig. 3.8 summarizes our observations and illustrates the proposed model of a molecular tug-of-war that takes place between the conventional secretory pathway and an unconventional Golgi bypass trafficking pathway for TuMV infection. Early in the infection process, vRNA is translated on ER-bound ribosomes (I) and the synthetized viral proteins, along with co-opted host proteins, are assembled as proto VRCs (II). Mediated by 6K₂, these proto VRCs exit the ER in a COPII dependent-manner as replication vesicles (III). At this step, replication vesicles are presented with two choices. In the first case, replication vesicles may fuse with the Golgi apparatus, but this constitutes a dead end for virus infection (IV). Alternatively, replication vesicles may bypass the Golgi apparatus and enter at least a PVC SNARE Vti11-dependent unconventional pathway (V) without excluding other Golgi-bypassing potential routes (VI). Ultimately following that unconventional pathway will result into the infection of the plant. The winning side of this molecular tug-of-war thus decides if infection takes place or not.

3.6 Materials and Methods

3.6.1 Molecular cloning

The coding sequence of GFP flanked by Xbal and BamHI restriction sites was amplified by PCR using the template pGreenPABP :GFP (BEAUCHEMIN et LA-LIBERTE 2007). The fragment was digested with Xbal and BamHI, and used to replace the mCherry coding-fragment in pCambia6K₂ :mCherry (JIANG, PATARROYO et al. 2015) for the construction of plasmid pCambia6K $_2$:GFP. Mutagenesis was performed using the QuickChange II XL site-directed mutagenesis kit (Agilent), according to the manufacturer's instructions. pCambia6K $_2$:GFP was used as template for the production of pCambia6K₂G30V :GFP, pCambia6K₂G33V :GFP, pCambia6K₂G34V :GFP, pCambia6K₂G35V :GFP, pCambia6K₂G33V-G34V-G35V :GFP and pCambia6K₂G30V-G33V-G34V-G35V :GFP. The GFP DNA fragment of pCambia6K₂G30V-G33V-G34V-G35V :GFP was replaced with the coding sequence of mCherry for the construction of pCambia6K₂G30V-G33V-G34V-G35V :mCherry. pCambiaTuMV (COTTON, GRAN-GEON et al. 2009) was used as the template for the production of pCambiaTuMV^{G30V}, pCambiaTuMV^{G34V} and pCambiaTuMV^{G33V-G34V-G35V}. Host factors used in this study are listed in Supplemental Table 3.1. Coding sequences were amplified with specific primers (Supplemental Table 3.1) by RT-PCR (iScript[™] select cDNA synthesis kit, Biorad) from A. *thaliana* ecotype Col-0 total mRNA extraction (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen) and cloned in a similar manner as described above. The markers GFP :HDEL, ERD2 :GFP, ST :YFP and AHA2-GFP were described in (CHEN, STEFANO et al. 2011; GRANGEON, AGBECI et al. 2012; SAINT-JORE, EVINS et al. 2002; ZHENG, CAMACHO et al. 2005). The mCherrycoding fragment was removed with BamHI and EcoR1 from pCambia6K₂ :mCherry (JIANG, PATARROYO et al. 2015), and replaced by CFP coding sequence to generate the plasmid pCambia/6K₂ :CFP. 6K₂ was subsequently replaced by the SYTs and SNARE-truncated coding sequences forms. All constructs were verified by sequencing.

3.6.2 Plant material, genotyping and infectivity assays

N. benthamiana and *A. thaliana* plants were grown at 25°C under a photoperiod of 16 h light/8 h dark. Control A.thaliana ecotype Col-0, SYTs T-DNA KO mutants *sytb* (SALK_108104C), *sytc* (SALK_124835C), *sytd* (SAIL_359_H05), *syte* (SALK_036961C), *sytf* (SALK_033634C), BET11 SNARE T-DNA KO *bet11* (SALK_150636C), Vti11 SNARE EMS KO *itt3* (CS68724) used in this study were obtained through TAIR (https://www. arabidopsis.org/) from the Arabidopsis Biological Resource Center, Ohio State University, USA. *syta-1* (Sail 775A08) knockdown mutant was obtained from the Lazarowtiz laboratory (LEWIS et LAZAROWITZ 2010). Genomic DNA was extracted with Plant DNAzol (Invitrogen) reagent following the manufacturer instructions and homozygous T-DNA insertion was verified by PCR. For *itt3* EMS mutants, total mRNAs were extracted as indicated by the manufacturer instructions (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen), RT-PCR was performed with Vti11 (At5g39510) specific primers (Supplemental Table 3.1) (iScript[™] select cDNA synthesis kit, Biorad), the resulting cDNA amplification was cloned into pCambiaGFP and the homozygous mutation was confirmed by sequencing. Infectivity assays were performed on A.thaliana wt and mutant plants by agroinfiltration with either pCambiaTuMV/6K₂ :GFP (GRANGEON, AGBECI et al. 2012) or PIAMV :GFP infectious clone (YAMAJI, MAEJIMA et al. 2012) and daily counting the number of systemically infected plants by observing GFP fluorescence under UV light.

3.6.3 Quantitative RT-PCR

Quantitative RT-PCRs were carried out following to MIQE guidelines (BUSTIN, BENES et al. 2009). Total mRNA was extracted as indicated by the manufacturer instructions (RNeasy Plant Mini Kit, Qiagen). After genomic DNA removal, RNA quality and purity verifications, total mRNA extracts were processed for RT as indicated by the manufacturer (iScript[™] reverse transcription supermix for RT-qPCR, Biorad) for each condition. qPCR were performed with SYBR Green PCR master mix kit (Applied biosystem), on CFX96 TM real-time PCR system thermal cycler (Biorad) and data analysis was done with CFX^{TM} manager software (Biorad). qPCR was done in the same conditions for cDNA samples, no-RT samples and no template control for all primers. Each pair of primers (Supplemental Table 3.1) specificity was validated (melt curve, gel) from pooled cDNA sample. Serial dilutions of pooled cDNA samples were done to generate standard curves, determine primers efficiency (between 90% and 110%) and select the optimal working dilution. Three reference genes such as L23, PP2A, F-BOX (LIU, SHI et al. 2012) for N.benthamiana and ubiquitin (COSSON, SCHURDI-LEVRAUD et al. 2012), transducin, actin 11 (transducin and actin11 primers were provided by Dr. V. Schurdi-Levraud) for A.thaliana were selected to verify their stability for each experiment. Reference gene stability was analyzed and validated by using the geNorm method (VANDESOMPELE, DE PRETER et al. 2002) in the qbase+ software (Biogazelle, Zwijnaarde, Belgium - www.gbaseplus.com). Consequently, the two most stable references genes in our conditions were PP2A and F-BOX for N.benthamiana experiments as well as ubiquitin and transducin for A.thaliana. Normalization ($\Delta\Delta$ Cq) was done respectively with the two validated reference genes to give a more robust qPCR data estimate of virus replication either in *N.benthamiana* or *A.thaliana*. Values were graphically represented on histograms as relative to TuMV^{VNN} control normalized value.

3.6.4 Protein domain and glycosylation site prediction

Prediction of SYTs and SNAREs transmembrane domains was performed with the following online softwares : HMMTOP (http://www.enzim.hu/hmmtop), PHO-BIUS (http://phobius.sbc.su.se/), SOSUI (http://harrier.nagahama-i-bio. ac.jp/sosui/sosui_submit.html), TMHMM (http://www.cbs.dtu.dk/services/ TMHMM-2.0/), TMpred (http://embnet.vital-it.ch/software/TMPRED_form.html). Complement of information for SYTs were (CRAXTON 2004; LEVY, ZHENG et LAZARO-WITZ 2015; MIN, CHANG et SÜDHOF 2007). Prediction of SMP and C2 domains were performed with Pfam online software (http://pfam.xfam.org/). The obtained information was used to create SYT and SNARE truncated forms of the proteins. 6K₂ and GFP primary sequences were subjected to in silico N-glycosylation sites prediction with NetNGlyc 1.0 online software (http://ttp://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/), and Oglycosylation sites prediction with the NetOGlyc 4.0 (STEENTOFT, VAKHRUSHEV et al. 2013) online software. 6K₂ presented only potential N-glycosylation modifications and was subjected to further analyses (see deglycosylation assay in Material and Methods).

3.6.5 Transient protein expression, inhibitor treatments and coimmuno purification

Agrobacterium-mediated transient protein expression was followed essentially as described by (COTTON, GRANGEON et al. 2009). Four weeks old *N. benthamiana* plants

were used for agroinfiltration, and were kept in the growth chamber until analysis. The OD₆₀₀ was adjusted to 0.03 for GFP :HDEL, to 0.1 for ERD2 :GFP, ST :YFP and AHA2 :GFP, to 0.3 for wt and mutated $6K_2$ fluorescent protein fusions, and for wt and mutated TuMV infectious clones. The OD₆₀₀ was adjusted to 0.01-0.015 for both secretory pathway inhibitors GFP-ARF1 NI and RAB-D2A N123I, as well as for Man49 :mCherry, $6K_2$ GV :mCherry, $6K_2$:mCherry and pCambiaTuMV/ $6K_2$:mCherry. Co-expression experiments with the secretory pathway inhibitors were done in presence of P19 (OD₆₀₀=0.01). For quantitative RT-PCR, infectious clones were infiltrated at an OD600 adjusted to OD600=0.01 (Fig. 3.3A, Fig. 3.6 G and Supplemental Fig. 3.15), pCambia (Mock) at OD600=0.01 (Fig. 3.3A, Fig. 3.6G) or OD600=0. 1 (Supplemental Fig. 3.15) and dominant negative SNAREs and SYTs at OD600=0. 1 with P19 (OD600=0. 2). For all co-expression combinations, an equal volume of agrobacterium suspensions was mixed thoroughly prior to agro-infiltration. Brefeldin A (Millipore Sigma) treatments were done at a final concentration of 20 μ g/mL 24h prior to confocal observations. Co-immunopurification experiments were carried out with anti-GFP-Trap[®] beads (ChromoTek[®]) as depicted in (JIANG, PATARROYO et al. 2015).

3.6.6 Confocal laser scanning microscopy

The agro-infiltrated leaf tissues were placed between slides and cover-slides. These samples were observed using 10x, 20x or 63x oil immersion objectives on a LSM780 confocal microscopy (Zeiss). GFP and YFP were excited at 488 nm, and the emission was captured between 500 nm to 535 nm. The mCherry signal was excited at 561 nm, and the emission was captured from 580 nm to 640 nm. For co-localization assay, different fluorescent signals were collected simultaneously. Image processing was performed with ZEN 2011 software and Image J (ImageJ, National Institutes of Health, USA). For 3D reconstructions, settings and image treatment were identical for all panels.

3.6.7 TuMV intercellular movement assays under dominantnegative protein expression

Four weeks old *N. benthamiana* plants were agro-infiltrated either with pCambiaSec22 :CFP or pCambiaVti11 Δ TMD :CFP or pCambiaSYTA Δ C2B :CFP or pCambiaSYTE Δ TMD :CFP or pCambiaSYTF Δ C2C :CFP (OD₆₀₀=0.1) with P19 (OD₆₀₀=0.2) one day prior to TuMV/6K₂ :mCherry/ /GFP-HDEL (AGBECI, GRANGEON et al. 2013) agro-infiltration (OD₆₀₀=0.1). For all co-expression combinations with P19, an equal volume of agrobacterium suspensions was mixed thoroughly prior to agro-infiltration. Infection foci were acquired at 4-5 days post infection (dpi) by confocal microscopy with a 10x objective. Their corresponding confocal images were formed of juxtaposed tiles (6x6x10 tiles stacks of 40 μ m-thick confocal images that overlap by 45 μ m). Image processing was done with ZEN 2011 software. Primary and secondary infection area foci were calculated with Image J imaging software (ImageJ, National Institutes of Health, USA).

3.6.8 Graphical representation and statistical analysis

All datasets were graphically represented, processed and statistically analyzed with Igor Pro software (Wavemetrics, Lake Oswego, OR, USA) (except when indicated). Values obtained during infectivity kinetics were plotted and curve fitting was done. Focus area ratio distributions were graphically represented on Whisker and Box plots and statistically analyzed using the non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney two sample rank test (P value<0.05) to show significant statistical differences between each treatments (see detailed information in the related figure legends). RT-qPCR data was statistically analyzed by performing Ttests analyses (P value<0.05). Co-localization quantifications were calculated by using the Pearson's correlation coefficient Rr values of ImageJ and graphically represented on a bar chart.

3.6.9 Total protein extraction, cellular fractionation, deglycosylation assay and immunoblot analysis

Total proteins extractions were performed as described in (BATOKO, ZHENG et al. 2000). Cellular fractionation experiment was performed as described by (THIVIERGE, COTTON et al. 2008). Deglycosylation assays were performed with the PNGase F glycosydase under denaturing conditions (New England Biolabs). Briefly, proteins extracts were performed as described above in the co-immunopurification section. Then, 40μ L of protein extracts were further processed mainly as described by the manufacturer protocol with a slight modification - reaction volumes were scaled up, the denaturing step was set to 75°C for 10 min and the digestion was performed during 3 hours at 37°C. For immunoblotting analyses, protein samples were run on 12% SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose membrane and rabbit antisera were used at the following dilutions either with anti-CP at 1 :2500 or anti-RFP (Thermo Fisher Scientific) at 1 :10000 or anti-GFP (Thermo Fisher Scientific) at 1 :10000. The secondary antibody was goat anti-rabbit IgG coupled to horseradish peroxidase.

3.6.10 Immunogold labeling

Immunogold labeling was performed as described in (WAN, BASU et al. 2015) with some adjustments indicated hereafter. Pieces of mock and TuMV- infected leaves were cut and fixed, washed, post-fixed in reduced osmium tetroxide (KOPEK, PERKINS et al. 2007), rinsed and dehydrated in a graded alcohol series. Samples were rinsed in 100% alcohol an additional time. Samples were then infiltrated with increasing concentrations of LR white

resin (50, 75 and 100%) mixed with acetone for a minimum of 8 h for each step at 4°C on a rotator and embedded in pure LR white resin. 90-100 nm sections were successively incubated in a Dulbecco's phosphate glycine buffer saline, in blocking solution, in a mouse monoclonal anti-dsRNA antibody J2 (stock solution is 1 mg/ml) (English and Scientific Consulting Bt.) diluted in DPBS-BCO (1 :40) solution, washed, incubated again in blocking buffer and finally sections were incubated in a goat anti-mouse secondary antibody, conjugated to 10 nm gold particles (Millipore Sigma), diluted in DPBS-BCO (1 :20) solution. After a washing step, grids were stained with uranyl acetate and Reynolds lead citrate. Quantification of the distribution of the gold particles per μ m2 and relative labeling distribution were performed on mock-infected and TuMV-infected sections according to (LUCOCQ, HABERMANN et al. 2004). Two different labeling experiments were considered and 100 gold particles were counted per experiment.

3.6.11 Carboxyfluorescein Diacetate (CFDA) treatment

CFDA physiological assay was performed similarly as described in (WAN, CABA-NILLAS et al. 2015). Two rosette leaves per A.thaliana wt and *itt3* plants were gently abraded over a small area (\approx 2x3 mm2) of the adaxial surface. 5µL of 60µg/mL of a CFDA suspension were deposited on the abraded area. The leaf surface was covered with a plastic film and fluorescence on leaves was acquired by confocal microscopy with the 10x objective under the 488nm excitation laser.

3.7 Acknowledgements and Author Contributions

This work was supported by grants from the Natural Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada and from Le Fonds Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) to H.Z. and J.F.L. We thank Dr. F. Prieto Bruckner and Dr. V. Schurdi-Levraud for their advice and technical support for RT-qPCR experiments. We thank J. Tremblay for his technical expertise and assistance for confocal microscopy and S. G. Lazarowitz (Cornell University) for the *A. thaliana* syta-1 seeds. We thank P. Moffett (Université de Sherbrooke) for valuable advice and for critically reading the manuscript.

Designed the research - D.G.C., J.J, J.-F.L.; performed research - D.G.C., J.J., N.M.; analyzed data - D.G.C., J.J, H.Z., J.-F.L.; contributed new analytic tools- H.G., Y.Y.; wrote the paper - D.G.C., J.J, H.Z, J.-F.L

3.8 Figures of Publication 1



Figure $3.1 - 6K_2$ localization is altered when the GxxxG motif is mutated. (A-F) Fluorescence imaging of N. benthamiana cells expressing wt 6K2 :GFP (A), 6K2G33V :GFP (B), 6K₂G35V :GFP (C), 6K₂G30V :GFP (D), 6K₂G34V :GFP (E) and 6K₂GV :GFP (F) at 3 dpi. These images are three-dimensional renderings stacks of 40 1- μ m-thick slices that overlap by 0.5 μ m. (G) Membrane-association of wt 6K₂ and 6K₂GV protein. S3, total protein fraction; S30, soluble protein fraction; P30, membrane protein fraction. Western blotting was performed with anti-GFP antibodies. Confocal images of N. benthamiana epidermal cells expressing $6K_2$:mCherry (H) or $6K_2GV$:mCherry (I) (middle panels) with the cis-Golgi marker ERD2 :GFP (left panels), and their coexpression is shown in the right panels (merge). Arrows in right panel of (H) indicate $6K_2$:mCherry co-localizing with the cis-Golgi marker. Co-localization statistical analysis between ERD2 :GFP and $6K_2$:mCherry ($6K_2$) or $6K_2GV$:mCherry ($6K_2GV$) was calculated using the Pearson's correlation coefficient Rr values of ImageJ (J). Cells expressing $6K_2GV$:mCherry (K) or $6K_2$:mCherry (L) with the bright field channel merged images are shown. The PM marker AHA2 :GFP was expressed with $6K_2GV$:mCherry (M) or with mCherry (N). Stars in (K-N) indicate the interior of the cells. All confocal images are single optical images (1μ m thick).



Figure 3.2 – Differential sensitivity of $6K_2$ and $6K_2GV$ to inhibitors of ER-Golgi trafficking. N. benthamiana epidermal leaf cells expressing trans-Golgi marker ST :YFP (A), $6K_2$:GFP (B) and $6K_2GV$:GFP (C) were treated with DMSO (left panels) or with 20 μ g/mL BFA (right panels) 24 h prior to confocal observation. Images are three-dimensional rendering stacks of 40 1- μ m-thick slices that overlap by 0.5 μ m. Confocal microscopy observation of N. benthamiana epidermal leaf cells expressing the Golgi marker Man49 :mCherry (D), $6K_2GV$:mCherry (E) and $6K_2$:mCherry ectopically (F) or during TuMV infection (G) alone (left panels) or in cells expressing Rab-D2A N123I (middle panels) or GFP :ARF1 NI (right panels). Images are threedimensional renderings of 40 1 μ m-thick slices that overlap by 0.5 μ m. Protein Nglycosylation sites are defined by an N-X-S/T motif (X being any amino acid residue except proline). (H) $6K_2$ in silico N-glycosylation predicted-sites on the asparagine in position 2 and 17 (red), respectively forming N-X-S and N-X-T motif (X-S/T in blue). (I) Immunoblot performed with anti-GFP serum on protein extracts from N. benthamiana leaves expressing N-YFP :HDEL, N-ST :YFP, GFP or 6K2 :GFP, treated with or without PNGase F. Black arrow indicates N-ST :YFP position.



Figure 3.3 - The GxxxG motif is important for virus production. (A) Viral replication evaluated by RT-qPCR from N.benthamiana leaves agroinfiltrated with pCambia (Mock), pCambiaTuMV VNN (VNN), pCambiaTuMV G30V (TuMVG30V), pCambiaTuMV^{G34V} (TuMVG34V), pCambiaTuMV^{GV} (TuMVGV), and pCambia-TuMV (TuMV) at 3,25 dpi. Values were graphically presented on a histogram. Statistical differences between samples were determined by T-test analyses (* P < 0.05). (B) TuMV/6K₂ :GFP (TuMV) or TuMV^{G30V}/6K₂G30V :GFP (TuMVG30V) was coagroinfiltrated with mCherry-HDEL and expression of GFP and mCherry fusions was acquired at 5 dpi. Panels are representative images of infection foci corresponding to the median value of each treatment. Datasets for TuMV and TuMVG30V treatments are graphically presented as Whisker and Box plot representing the datasets distribution from the 25th (lower box limit) to 75th percentile (upper box limit) with the 50th percentile (median value). The Whiskers represent the 10th and 90th percentiles and the empty circles (\bigcirc) indicate the outliers. The non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney two sample rank test was performed between the two treatments showing statistically significant differences (* P < 0.05). n represents the number of infection foci analysed. Total proteins from Mock-, pCambiaTuMV VNN -, pCambiaTuMV GV -, pCambiaTuMV G34V -, pCambiaTuMV G30V - and pCambiaTuMV-agroinfiltrated leaf tissues at 5 dpi (A), upper non-agroinfiltrated leaf tissues at 5 dpi, (C) agroinfiltrated leaf tissues, (DI) upper non-agroinfiltrated leaf tissues at 5 dpi and at 19 dpi (DII)were analyzed by immunoblot with a rabbit serum against TuMV CP. Coomassie blue staining (bottom panel in DI and DII) shows equal protein loading. The alignment of $6K_2$ nucleotide sequence of wt $6K_2$, mutated $6K_2G30V$ and its related revertant is shown (E). Stars indicate the conserved nucleotides among these sequences, and the different nucleotides are shadowed in light blue. The encoded amino acid residues of underlined nucleotides are shown. Confocal microscopy observation of N. bentha*miana* epidermal leaf cells expressing the ER marker GFP :HDEL alone (FI), or with pCambiaTuMVVNN/ $6K_2$:mCherry (FII), or pCambiaTuMV/ $6K_2$:mCherry (FIII) or pCambiaTuMVG30V/ $6K_2G30V$:mCherry (FIV). Images are three-dimensional renderings of 40 1- μ m-thick slices that overlap by 0.5 μ m. Arrows denote the position of the nucleus and bottom left inserts are single optical slices of the area denoted by the arrow showing the ER surrounding the nucleus.



INRS - Institut Armand-Frappier - 2018

Figure 3.4 – Impairing transport vesicle fusion with the Golgi apparatus enhances TuMV intercellular movement. Confocal microscopy observation of N. benthamiana epidermal leaf cells co-expressing Sec22 :GFP (A-D, middle panels) along with the Golgi marker Man49 :mCherry (A, left panel) or 6K2GV :mCherry (B, left panel) or $6K_2$:mCherry (C, left panel) or $6K_2$:mCherry during TuMV infection (D, left panel). Co-expression are shown in the right panels and colocalization pointed with arrows in C and D. Confocal images are single optical images of $1\mu m$ thick. (E) N. benthamiana leaves expressing combinations (upper table and pointed by arrows) of mCherry with Sec22 :GFP, 6K2 :mCherry with GFP, or 6K2 :mCherry with Sec22 :GFP were harvested 3 days after agroinfiltration. The cleared lysates (input) were subjected to immunopurification with anti-GFP-Trap beads and followed by Western blot analysis of input and immunopurified (co-IP) fractions using antibodies against GFP and RFP. Intermediate bands are degradation byproducts or nonspecific proteins recognized by the polyclonal GFP antiserum. (F) Sec22 :CFP was transiently expressed one day before $TuMV/6K_2$:mCherry//GFP-HDEL inoculation and expression of GFP and mCherry fusions was acquired at 5 dpi. Panels are representative images of infection foci corresponding to the median value of each treatment. Datasets for Mock and Sec22-overexpressed treatments are graphically presented as Whisker and Box plot representing the datasets distribution from the 25th (lower box limit) to 75th percentile (upper box limit) with the 50th percentile (median value). The Whiskers represent the 10th and 90th percentiles and the empty circles (\bigcirc) indicate the outliers. The non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney two sample rank test was performed between the two treatments showing statistically significant differences (* P < 0.05). n represents the number of infection foci analysed. (G) Time course of TuMV systemic infection of wt A. thaliana plants (\bigcirc) and BET11 KO mutant plants (\blacklozenge) after pCambiaTuMV/6K₂ :GFP agroinfiltration. Infection is scored by appearance of systemic GFP fluorescence.


Figure 3.5 – Infection time course of SYT KO mutant plants and impact of truncated SYT mutants on TuMV intercellular movement. Time course of TuMV systemic infection of wt A. thaliana plants (\bigcirc) and SYT KO mutant plants (\blacklozenge) after pCambiaTuMV/ $6K_2$:GFP agroinfiltration. Infection is scored by appearance of GFP systemic fluorescence. The tested SYT mutant are syta-1 (A), syte (B), sytc (C), sytd (D), sytb (E) and sytf (F). n represents the number of plants agroinoculated. pCambiaSYTA Δ C2B :CFP (G), pCambiaSYTE Δ TMD :CFP (H) and pCambiaSYTF Δ C2C :CFP (I) were agro-infiltrated in N. benthamiana leaves one day before $TuMV/6K_2$:mCherry//GFP-HDEL agro-inoculation. Expression of GFP and mCherry fusions was acquired at 5 dpi by confocal microscopy. Panels are representative images of infection foci corresponding to the median value for the indicated treatments. Datasets for mock and SYT truncated mutants are graphically presented as Whisker and Box plot representing the dataset distribution from the 25th (lower box limit) to 75th percentile (upper box limit) with the 50th percentile (median value). The Whiskers represent the 10th and 90th percentiles and the empty circles (\bigcirc) indicate the outliers. The non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney two sample rank test was performed between the two treatments showing statistically significant differences (* P < 0.05). n represents the number of infection foci analysed.



Figure 3.6 – The pre-vacuolar compartment SNARE Vti11 is essential for TuMV infection. (A) Confocal microscopy observation of N. benthamiana epidermal leaf cells expressing Vti11 :GFP (middle panel) and $6K_2$:mCherry produced during TuMV infection (left panel). Co-localization of Vti11 with 6K2 is indicated by arrows (right panel). Confocal images are single optical images of $1\mu m$ thick. (B) N. benthamiana leaves expressing combinations (upper table and pointed by arrows) of mCherry with Vti11 :GFP, $6K_2$:mCherry with GFP, or $6K_2$:mCherry with Vti11 :GFP were harvested 3 days after agroinfiltration. The cleared lysates (input) were subjected to immunopurification with anti GFP-Trap beads, followed by Western blot analysis of input and immunopurified (co-IP) fractions using antibodies against GFP and RFP. (C) wt or itt3 plants under UV light illumination 25 days after $TuMV/6K_2$:GFP agro-inoculation. (D) Time course of TuMV systemic infection of wt A. thaliana plants (\bigcirc) and itt3 loss-of-function mutant plants (\blacklozenge) after pCambiaTuMV/ $6K_2$:GFP agroinfiltration. Infection is scored by appearance of systemic GFP fluorescence. (E) wt or itt3 plants under UV light illumination 25 days after PIAMV :GFP agro-inoculation. (F) Total proteins extracts from $TuMV/6K_2$:GFPor PIAMV :GFP-inoculated wt or itt3 rosettes were analyzed by immunoblot with anti-GFP antibodies. (G) Viral replication evaluated by RT-qPCR from A.thaliana wt and *itt3* leaves agroinfiltrated with pCambia (Mock), pCambiaTuMV^{VNN} (VNN) and pCambiaTuMV (TuMV) at 4 dpi. Values were graphically presented on a histogram. Statistical differences between samples were determined by T-test analyses (* P<0.05). (H) Vti11 Δ TMD :CFP was transiently expressed one day before TuMV/6K₂ :mCherry//GFP-HDEL agro-inoculation. Expression of GFP and mCherry fusions was acquired at 5 dpi by confocal microscopy. Panels are representative images of infection foci corresponding to the median value for the indicated treatments. Datasets for mock and SYT truncated mutants treatments are graphically presented as Whisker and Box plot representing the dataset distribution from the 25th (lower box limit) to 75th percentile (upper box limit) with the 50th percentile (median value). The Whiskers represent the 10th and 90th percentiles and the empty circles (\bigcirc) indicate the outliers. The non-parametric Wilcoxon-Mann-Whitney two sample rank test was performed between the two treatments showing statistically significant differences (* P<0.05). n represents the number of infection foci analysed.









Figure 3.7 – Viral RNA is associated with multi-vesicular bodies. Immunogold labeling was carried out on of mock- and TuMV-infected *N. benthamiana* leaf tissue cross sections by using anti-dsRNA specific antibody. TEM representative images showing the presence of gold particles in mock-infected condition (A), and in TuMV-infected cells (B). The number of gold particles per square micrometer in MVBs from mock-infected versus TuMV-infected cells is graphically presented (C). Two different labeling experiments were considered for quantification and 200 gold particles were counted for each experiment. Chl : chloroplast; CW : cell wall; MVB : multi vesicular body; CI, cytoplasmic inclusion body; DMV : double-membrane vesicle; ER, endoplasmic reticulum; M, mitochondria; PM, plasma membrane; Cyt, cytosol; Vac, vacuole.



Figure 3.8 – TuMV tug-of-war model for infection

Α

PPV	ITRDATLML	GVI	GGG	AWMIFSYL-
PVA	LLIVG	<mark>G</mark> VC	VGA	AWMIGEYFF
PVY	LIIAG	AVF	IGG	IGLIYSWFT
SMV	FMNDAVVAI	FTI	VGG	GWMLWDYF-
LMV	-CKDLLIFC	GV <i>F</i>	IGG	TWMMFQ
TEV	ITRDIIIAL	SVI	IGG	GWMLATYF-
TuMV	ITRDVLVLC	GVI 30	GGG 33 34 35	LWMVIQHL-

В



Figure 3.9 – Identification of a GxxxG motif within the TMD of 6K₂.(A) Sequence alignment of the predicted TMD of different potyviral 6K₂ proteins. The conserved glycine residues are shadowed in light blue, with the corresponding amino acid position for TuMV indicated below. PPV, *Plum pox virus*; PVA, *Potato virus A*; PVY, *Potato virus Y*; SMV, *Soybean mosaic virus*; LMV, *Lettuce mosaic virus*; TEV, *Tobacco etch virus*; TuMV, *Turnip mosaic virus*. (B) Helical wheel projection of the predicted 6K₂ TMD of TuMV. The glycine residues located at position 30 and 34 are indicated with an arrow.



Figure 3.10 – Sec22 overexpression impairs ER-Golgi pathway but not TuMV factories formation.Confocal microscopy observation of *N. benthamiana* epidermal leaf cells expressing the Golgi marker Man49 :mCherry (A), 6K₂GV :mCherry (B) and 6K₂ :mCherry (C) or 6K₂ :mCherry during TuMV infection (D) alone (control panels) or in cells overexpressing Sec22 :GFP (right panels). Images are three-dimensional renderings of 40 1µm-thick slices that overlap by 0.5 µm.



Figure 3.11 – A. thaliana synaptotagmins cellular distribution. (A) Schematic scaled domain representation of SYTA/SYT1, SYTB/SYT2, SYTC/SYT3, SYTD/SYT4, SYTE/SYT5, SYTF/SYT6 showing their predicted trans-membrane domain (TMD), synaptotagmin-like mitochondrial lipid-binding protein domain (SMP), Calcium binding domains (C2). Confocal images of N.benthamiana epidermal cells transiently expressing pCambiaSYTE :GFP (B), pCambiaSYTD :GFP (C) and pCambiaSYTF :GFP (D). These images are three-dimensional renderings stacks of 40 1-μm-thick slices that overlap by 0.5 μm. Punctate structures observed during SYTF expression are denoted by white arrows. Expression of SYTF :GFP (E, upper panel) and Man49-mCherry Golgi marker (E, middle panel) and their co-expression (lower panel) is shown. Co-localization of SYTF punctae with Man49-mCherry is denoted by empty white arrows in lower panel.





В

Α

TuMV/6K2:mCherry // GFP-HDEL



Figure 3.12 - TuMV intercellular initiation determination. Time movement of TuMV intercellular movement after agroinfiltration of course pCambiaTuMV/6K₂ :mCherry//GFP-HDEL in *N.benthamiana* (A) and wt A.thaliana plants (B). Expression of GFP and mCherry fusions was acquired at 3dpi, 4dpi, 5dpi by confocal microscopy.



Figure 3.13 – SNARE and SYTs dominant negative forms expression. Representative expression of pCambia (Mock) (A), pCambiaSec22 :CFP being overexpressed (B), pCambiaSYTAΔC2B :CFP (C), pCambiaSYTFΔC2C :CFP (D), pCambiaSYTEΔTMD :CFP (E), pCambiaVti11ΔTMD :CFP (F) in *N. benthamiana* observed by confocal microscopy with the 10x objective (bigger panel) and 63x objective (zoom in, smaller panel) during the intercellular movement acquisitions.



Figure 3.14 – Symplasmic and phloem systemic transport of CFDA in A.thaliana wt and itt3 plants. Time course observation of the CFDA dye symplasmic and phloem vessels transport in A.thaliana wt (left panels) and itt3 (right panels) plants by confocal microscopy (fluorescence : upper panels, bright field : lower panels) with the 10x objective, (A, B) on initially inoculated rosette leaves and (C, D) on systemic leaves, 6 hours post inoculation. Fluorescence on systemic leaves was also acquired 24 hours post inoculation (E, F) to evaluate the CFDA dye transport through veins from source to sink organes.



Figure 3.15 – Quantitative RT-PCR for virus replication evaluation during SNARE and SYTs dominant negative forms expression. Viral replication evaluated by RT-qPCR at 3,25 dpi from *N.benthamiana* agroinfiltrated with pCambia (Mock), pCambiaSYTEΔTMD :CFP (A), pCambiaVti11ΔTMD :CFP (B), pCambiaSYTFΔC2C :CFP (B) and pCambiaSec22 :CFP (C) one day before buffer, pCambiaTuMV^{VNN} (VNN) or pCambiaTuMV (TuMV) agroinfiltration. Values were graphically presented on a histogram.

Table 3.1 - Supplemental Table 1: List of primers

Cloning					
Gene	Accession A.thaliana	Primer FW	Primer R		
SYTA	At2g20990.1	ggggtaccatgggctttttcagtacgatactagg	ggcgcgccagaggcagttcgccactcgagctcg		
SYTB	At1g20080	ggggtaccatgggaataatcagcacaatattggg	ggcgcgccagaagaatttctccactgaagctc		
SYTD	At5g11100	gctctagaatgggttttctctttggtttgttc	cgggatccagaggcgtctctgagcttaagcc		
SYTE	At1g05500	gctctagaatgggtttcatagtcggcgttg	cgggatccggaatcacgataaattgattgagcc		
SYTF	At3g18370	ggggtaccatgggtcggagaataaagagg	ggcgcgccagaatctcgagacggggcttgagctgg		
Sec22	At1g11890	gctctagaatggtgaaaatgacattgatagctcg	cgggatccccatagcttgttcttgacccagaaaagg		
MEMB11	At2g36900	gctctagaatggcgtctggtatc	gctctagagcgtgtccatcttat		
SYP31	At5g05760	gctctagaatgggctcgacgttca	gctctagaagccacaaagaagaggaa		
GOS11	At1g15880	gctctagaatggatgtgcctagct	cgggatcccttggttatccagt		
GOS12	At2g45200	cccaagcttatgacagaatcgagtc	cgggatccttttgagagccagta		
BET11	At3g58170	gctctagaatgaatcctagaaggg	cgggatccccgagtaagatagt		
BET12	At4g14455	gctctagaatgaactttcgaaggg	cgggatccccctttgatgtagttt		
VAMP714	At5g22360	gctctagaatggcgattgtctatgc	gctctagaagatctgcatgatggt		
SYP71	At3g09740	gctctagaatgactgtgatcgatattctgactag	cgggatcccttcagtacattgtataagtatgcagcg		
VAMP711	At4g32150	cccaagcttatggcgattctgtacgccctcgtggc	cgggatccaatgcaagatggtagagtaggtccgtggc		
VAMP713	At5g11150	gctctagaatggcgatcatatttgcgttggtggc	cgggatcccttgaaacaagaaggaagacttggccc		
VAMP721	At1g04750	gctctagaatggcgcaacaatcgttgatctacag	cgggatccacacttaaacccatggcaaactgagagc		
VAMP722	At2g33120	gctctagaatggcgcaacaatcgttgatctacagtttcg	cgggatcctttaccgcagttgaatcccccacaaattg		
VAMP724	At4g15780	gctctagaatgggtcaagaatcgtttatctatagc	cgggatccatccgtgcaattaaatccatgac		
VAMP725	At2g32670	gctctagaatggatcgcagcgtcgtccctatatc	cgggatccggtacacttgaatcccccgcaaacag		
VAMP727	At3g54300	gctctagaatgagtcaaaagggtttgatatatagc	cgggatcctgatgagcatttgaaacctccacaagc		
SYP61	At1g28490	getetagaatgtetteageteaagateeattetae	cgggatccggtcaagaagacaagaacgaatagg		
SYP41	At5g26980	gctctagaatggcgacgaggaatcgtacg	cgggatcccaagaatatttccttgagga		
SYP42	At4g02195	getetagaatgecgacgaggaategaacgacgg	cgggatccaaacaaaatattcttaagaattaaaag		
Vti11	At5g39510	gctctagaatgagtgacgtgtttgatggatatg	cgggatcccttggtgagtttgaagtacaagatgatg		
Vti12	At1g26670	ggggtaccatgagcgacgtatttgaagggtacg	ggcgcgccatgagaaagcttgtatgagatgatc		
SNAP30	At1g13890	gctctagaatgtttgggtttttcaaatctccgggg	cgggatcctttggaaagcaagtgacgtgcccgttg		
SNAP33	At5g61210	gctctagaatgtttggtttaaggaaatcaccggc	cgggatcccttttccaagcaaacggcgaccacg		
Ykt61	At5g58060.1	gctctagaatgaagatcaccgccttgctcg	cgggatcccagaatagtacagcatgaatttg		
SYP52	At1g79590	cccaagcttatggcctcttcttcggatccatgg	gctctagacaggtacttaaccagcagccaaattac		
			5 <u>5</u> <u>5</u>		
qPCR					
Gene	Accession A.thaliana	Primer FW	Primer R		
ubiquitin	At2g36060	cctacctttgaggggcttct	gaagtcgtgagacagcgttg		
transducin	At2g26060	tgatgatgggatggtcaag	tcagaaaaagtaaaacaacacagg		
actin 11	At3g12110.1	gccatcaatagtccacagga	tgcaacaaagtcgatgaaca		
Gene	Accession N.benthamiana	Primer FW	Primer R		
L23	TC19271	aaggatgccgtgaagaagatgt	gcatcgtagtcaggagtcaacc		
PP2A	TC21939	gaccctgatgttgatgttcgct	gagggatttgaagagagatttc		
F-BOX	Niben.v0.3. Ctg24993647	ggcactcacaaacgtctatttc	acctgggaggcatcctgcttat		
Virus		Primer FW	Primer R		
TuMV1		gcactgcgtggcgcaaataa	tcggtcgtatgcctctccgt		
	TuMV3	ccgaacataaacggaatgtgggtga	tggcgtggtcaatgagcggtt		

Références

- AGBECI, M., GRANGEON, R., NELSON, R. S., ZHENG, H. et LALIBERTÉ, J.-F. (2013). "Contribution of host intracellular transport machineries to intercellular movement of turnip mosaic virus". In : *PLoS pathogens* 9.10, e1003683.
- ALENQUER, M. et AMORIM, M. J. (2015). "Exosome biogenesis, regulation, and function in viral infection". In : *Viruses* 7.9, p. 5066–5083.
- AMARI, K., DI DONATO, M., DOLJA, V. V. et HEINLEIN, M. (2014). "Myosins VIII and XI play distinct roles in reproduction and transport of tobacco mosaic virus". In : *PLoS pathogens* 10.10, e1004448.
- AMARI, K., LERICH, A., SCHMITT-KEICHINGER, C., DOLJA, V. V. et RITZENTHALER,
 C. (2011). "Tubule-guided cell-to-cell movement of a plant virus requires class XI myosin motors". In : *PLoS pathogens* 7.10, e1002327.
- ANDERSON, M. R., KASHANCHI, F. et JACOBSON, S. (2016). "Exosomes in viral disease". In : *Neurotherapeutics* 13.3, p. 535–546.
- BARAJAS, D., CASTRO MARTÍN, I. F. de, POGANY, J., RISCO, C. et NAGY, P. D. (2014).
 "Noncanonical role for the host Vps4 AAA+ ATPase ESCRT protein in the formation of Tomato bushy stunt virus replicase". In : *PLoS pathogens* 10.4, e1004087.
- BARAJAS, D., JIANG, Y. et NAGY, P. D. (2009). "A unique role for the host ESCRT proteins in replication of Tomato bushy stunt virus". In : *PLoS pathogens* 5.12, e1000705.
- BATOKO, H., ZHENG, H.-Q., HAWES, C. et MOORE, I. (2000). "A Rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus and for normal Golgi movement in plants". In : *The Plant Cell* 12.11, p. 2201–2217.
- BEAUCHEMIN, C., BOUTET, N. et LALIBERTÉ, J.-F. (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". In : *Journal of virology* 81.2, p. 775–782.

- BEAUCHEMIN, C. et LALIBERTÉ, J.-F. (2007). "The poly (A) binding protein is internalized in virus-induced vesicles or redistributed to the nucleolus during turnip mosaic virus infection". In : *Journal of virology* 81.20, p. 10905–10913.
- BIRD, S. W. et KIRKEGAARD, K. (2015). "Escape of non-enveloped virus from intact cells". In : *Virology* 479, p. 444–449.
- BUSTIN, S. A., BENES, V., GARSON, J. A., HELLEMANS, J., HUGGETT, J., KUBISTA,
 M., MUELLER, R., NOLAN, T., PFAFFL, M. W., SHIPLEY, G. L. et al. (2009). "The
 MIQE guidelines : minimum information for publication of quantitative real-time PCR
 experiments". In : *Clinical chemistry* 55.4, p. 611–622.
- CHATRE, L., BRANDIZZI, F., HOCQUELLET, A., HAWES, C. et MOREAU, P. (2005). "Sec22 and Memb11 are v-SNAREs of the anterograde endoplasmic reticulum-Golgi pathway in tobacco leaf epidermal cells". In : *Plant Physiology* 139.3, p. 1244–1254.
- CHEN, J., STEFANO, G., BRANDIZZI, F. et ZHENG, H. (2011). "Arabidopsis RHD3 mediates the generation of the tubular ER network and is required for Golgi distribution and motility in plant cells". In : *J Cell Sci* 124.13, p. 2241–2252.
- COSSON, P., SCHURDI-LEVRAUD, V., LE, Q. H., SICARD, O., CABALLERO, M., ROUX, F., LE GALL, O., CANDRESSE, T. et REVERS, F. (2012). "The RTM resistance to potyviruses in Arabidopsis thaliana : natural variation of the RTM genes and evidence for the implication of additional genes". In : *PLoS One* 7.6, e39169.
- COTTON, S., GRANGEON, R., THIVIERGE, K., MATHIEU, I., IDE, C., WEI, T., WANG,
 A. et LALIBERTÉ, J.-F. (2009). "Turnip mosaic virus RNA replication complex vesicles are mobile, align with microfilaments, and are each derived from a single viral genome".
 In : Journal of virology 83.20, p. 10460–10471.

- CRAXTON, M. (2004). "Synaptotagmin gene content of the sequenced genomes". In : *BMC* genomics 5.1, p. 43.
- CUI, W. et LEE, J.-Y. (2016). "Arabidopsis callose synthases CalS1/8 regulate plasmodesmal permeability during stress". In : *Nature plants* 2, p. 16034.
- DIAZ, A., ZHANG, J., OLLWERTHER, A., WANG, X. et AHLQUIST, P. (2015). "Host ESCRT proteins are required for bromovirus RNA replication compartment assembly and function". In : *PLoS pathogens* 11.3, e1004742.
- DOHERTY, G. P., BAILEY, K. et LEWIS, P. J. (2010). "Stage-specific fluorescence intensity of GFP and mCherry during sporulation in Bacillus subtilis". In : *BMC Research notes* 3.1, p. 303.
- EBINE, K., OKATANI, Y., UEMURA, T., GOH, T., SHODA, K., NIIHAMA, M., MORITA,
 M. T., SPITZER, C., OTEGUI, M. S., NAKANO, A. et al. (2008). "A SNARE complex unique to seed plants is required for protein storage vacuole biogenesis and seed development of Arabidopsis thaliana". In : *The Plant Cell* 20.11, p. 3006–3021.
- EIAMTANASATE, S., JURICEK, M. et YAP, Y.-K. (2007). "C-terminal hydrophobic region leads PRSV P3 protein to endoplasmic reticulum". In : *Virus Genes* 35.3, p. 611–617.
- FENG, Z., HENSLEY, L., MCKNIGHT, K. L., HU, F., MADDEN, V., PING, L., JEONG, S.H., WALKER, C., LANFORD, R. E. et LEMON, S. M. (2013). "A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes". In : *Nature* 496.7445, p. 367–371.
- GRANGEON, R., AGBECI, M., CHEN, J., GRONDIN, G., ZHENG, H. et LALIBERTÉ, J.-F. (2012). "Impact on the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus of turnip mosaic virus infection". In : *Journal of virology* 86.17, p. 9255–9265.
- GRANGEON, R., JIANG, J., WAN, J., AGBECI, M., ZHENG, H. et LALIBERTÉ, J.-F.
 (2013). "6K2-induced vesicles can move cell to cell during turnip mosaic virus infection".
 In : Frontiers in microbiology 4.

- HARAK, C. et LOHMANN, V. (2015). "Ultrastructure of the replication sites of positivestrand RNA viruses". In : *Virology* 479, p. 418–433.
- HARRIES, P. A., PARK, J.-W., SASAKI, N., BALLARD, K. D., MAULE, A. J. et NELSON,
 R. S. (2009). "Differing requirements for actin and myosin by plant viruses for sustained intercellular movement". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.41, p. 17594–17599.
- HUANG, T.-S., WEI, T., LALIBERTÉ, J.-F. et WANG, A. (2010). "A host RNA helicaselike protein, AtRH8, interacts with the potyviral genome-linked protein, VPg, associates with the virus accumulation complex, and is essential for infection". In : *Plant physiology* 152.1, p. 255–266.
- HYODO, K., MINE, A., TANIGUCHI, T., KAIDO, M., MISE, K., TANIGUCHI, H. et OKUNO, T. (2013). "ADP ribosylation factor 1 plays an essential role in the replication of a plant RNA virus". In : *Journal of virology* 87.1, p. 163–176.
- HYODO, K. et OKUNO, T. (2016). "Pathogenesis mediated by proviral host factors involved in translation and replication of plant positive-strand RNA viruses". In : *Current opinion in virology* 17, p. 11–18.
- IVANOV, K., ESKELIN, K, LÕHMUS, A et MÄKINEN, K (2014). "Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection". In : *Journal of General Virology* 95.7, p. 1415– 1429.
- JIA, T., GAO, C., CUI, Y., WANG, J., DING, Y., CAI, Y., UEDA, T., NAKANO, A. et JIANG, L. (2013). "ARA7 (Q69L) expression in transgenic Arabidopsis cells induces the formation of enlarged multivesicular bodies". In : *Journal of experimental botany* 64.10, p. 2817–2829.
- JIANG, J., PATARROYO, C., CABANILLAS, D. G., ZHENG, H. et LALIBERTÉ, J.-F. (2015).
 "The vesicle-forming 6K2 protein of turnip mosaic virus interacts with the COPII coatomer Sec24a for viral systemic infection". In : *Journal of virology* 89.13, p. 6695–6710.

- KATO, T., MORITA, M. T., FUKAKI, H., YAMAUCHI, Y., UEHARA, M., NIIHAMA, M. et TASAKA, M. (2002). "SGR2, a phospholipase-like protein, and ZIG/SGR4, a SNARE, are involved in the shoot gravitropism of Arabidopsis". In : *The Plant Cell* 14.1, p. 33–46.
- KAWAKAMI, S., WATANABE, Y. et BEACHY, R. N. (2004). "Tobacco mosaic virus infection spreads cell to cell as intact replication complexes". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101.16, p. 6291–6296.
- KOPEK, B. G., PERKINS, G., MILLER, D. J., ELLISMAN, M. H. et AHLQUIST, P. (2007).
 "Three-dimensional analysis of a viral RNA replication complex reveals a virus-induced mini-organelle". In : *PLoS biology* 5.9, e220.
- KOVALEV, N., POGANY, J. et NAGY, P. D. (2012). "A co-opted DEAD-box RNA helicase enhances tombusvirus plus-strand synthesis". In : *PLoS pathogens* 8.2, e1002537.
- LALIBERTÉ, J.-F. et SANFAÇON, H. (2010). "Cellular remodeling during plant virus infection". In : Annual review of phytopathology 48, p. 69–91.
- LALIBERTÉ, J.-F. et ZHENG, H. (2014). "Viral manipulation of plant host membranes". In : Annual review of virology 1, p. 237–259.
- LANGOSCH, D. et ARKIN, I. T. (2009). "Interaction and conformational dynamics of membrane-spanning protein helices". In : *Protein Science* 18.7, p. 1343–1358.
- LARKIN, M. A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N., CHENNA, R, MCGETTIGAN, P. A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I. M., WILM, A., LOPEZ, R. et al. (2007). "Clustal W and Clustal X version 2.0". In : *bioinformatics* 23.21, p. 2947–2948.
- LEVY, A., ZHENG, J. Y. et LAZAROWITZ, S. G. (2015). "Synaptotagmin SYTA forms ER-plasma membrane junctions that are recruited to plasmodesmata for plant virus movement". In : *Current Biology* 25.15, p. 2018–2025.
- LEWIS, J. D. et LAZAROWITZ, S. G. (2010). "Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates endocytosis and virus movement protein cell-to-cell transport". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107.6, p. 2491–2496.

- LI, X. H. et CARRINGTON, J. C. (1995). "Complementation of tobacco etch potyvirus mutants by active RNA polymerase expressed in transgenic cells." In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92.2, p. 457–461.
- LIGAT, L., LAUBER, E., ALBENNE, C., CLEMENTE, H. S., VALOT, B., ZIVY, M., PONT-LEZICA, R., ARLAT, M. et JAMET, E. (2011). "Analysis of the xylem sap proteome of Brassica oleracea reveals a high content in secreted proteins". In : *Proteomics* 11.9, p. 1798–1813.
- LIU, D., SHI, L., HAN, C., YU, J., LI, D. et ZHANG, Y. (2012). "Validation of reference genes for gene expression studies in virus-infected Nicotiana benthamiana using quantitative real-time PCR". In : *PloS one* 7.9, e46451.
- LIU, L., WESTLER, W. M., DEN BOON, J. A., WANG, X., DIAZ, A., STEINBERG, H. A. et AHLQUIST, P. (2009). "An amphipathic α-helix controls multiple roles of brome mosaic virus protein 1a in RNA replication complex assembly and function". In : *PLoS pathogens* 5.3, e1000351.
- LONGATTI, A., BOYD, B. et CHISARI, F. V. (2015). "Virion-independent transfer of replication-competent hepatitis C virus RNA between permissive cells". In : *Journal of virology* 89.5, p. 2956–2961.
- LUCOCQ, J. M., HABERMANN, A., WATT, S., BACKER, J. M., MAYHEW, T. M. et GRIFFITHS, G. (2004). "A rapid method for assessing the distribution of gold labeling on thin sections". In : *Journal of Histochemistry & amp ; Cytochemistry* 52.8, p. 991–1000.

MAYO, M. (1995). "The Potyviridae." In : New Phytologist 131.2, p. 289–290.

MCCLINTOCK, K., LAMARRE, A., PARSONS, V., LALIBERTÉ, J.-F. et FORTIN, M. G. (1998). "Identification of a 37 kDa plant protein that interacts with the turnip mosaic potyvirus capsid protein using anti-idiotypic-antibodies". In : *Plant molecular biology* 37.2, p. 197–204.

- MIN, S.-W., CHANG, W.-P. et SÜDHOF, T. C. (2007). "E-Syts, a family of membranous Ca2+-sensor proteins with multiple C2 domains". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104.10, p. 3823–3828.
- NEBENFÜHR, A., RITZENTHALER, C. et ROBINSON, D. G. (2002). "Brefeldin A : deciphering an enigmatic inhibitor of secretion". In : *Plant physiology* 130.3, p. 1102–1108.
- NISHIKIORI, M., MORI, M., DOHI, K., OKAMURA, H., KATOH, E., NAITO, S., MESHI, T. et ISHIKAWA, M. (2011). "A host small GTP-binding protein ARL8 plays crucial roles in tobamovirus RNA replication". In : *PLoS pathogens* 7.12, e1002409.
- PATARROYO, C., LALIBERTÉ, J.-F. et ZHENG, H. (2013). "Hijack it, change it : how do plant viruses utilize the host secretory pathway for efficient viral replication and spread?" In : *Frontiers in plant science* 3, p. 308.
- RAMAKRISHNAIAH, V., THUMANN, C., FOFANA, I., HABERSETZER, F., PAN, Q., RUITER, P. E. de, WILLEMSEN, R., DEMMERS, J. A., RAJ, V. S., JENSTER, G. et al. (2013). "Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7. 5 cells". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.32, p. 13109–13113.
- RESTREPO-HARTWIG, M. A. et CARRINGTON, J. C. (1994). "The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication." In : *Journal of virology* 68.4, p. 2388–2397.
- RIZO, J., CHEN, X. et ARAÇ, D. (2006). "Unraveling the mechanisms of synaptotagmin and SNARE function in neurotransmitter release". In : *Trends in cell biology* 16.7, p. 339– 350.
- ROMERO-BREY, I. et BARTENSCHLAGER, R. (2014). "Membranous replication factories induced by plus-strand RNA viruses". In : *Viruses* 6.7, p. 2826–2857.
- RUTTER, B. et INNES, R. W. (2017). "Extracellular vesicles isolated from the leaf apoplast carry stress-response proteins". In : *Plant physiology*, pp–01253.

- SAINT-JORE-DUPAS, C., NEBENFÜHR, A., BOULAFLOUS, A., FOLLET-GUEYE, M.-L., PLASSON, C., HAWES, C., DRIOUICH, A., FAYE, L. et GOMORD, V. (2006). "Plant N-glycan processing enzymes employ different targeting mechanisms for their spatial arrangement along the secretory pathway". In : *The Plant Cell* 18.11, p. 3182–3200.
- SAINT-JORE, C. M., EVINS, J., BATOKO, H., BRANDIZZI, F., MOORE, I. et HAWES, C. (2002). "Redistribution of membrane proteins between the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum in plants is reversible and not dependent on cytoskeletal networks". In : *The Plant Journal* 29.5, p. 661–678.
- SANDERFOOT, A. A., KOVALEVA, V., BASSHAM, D. C. et RAIKHEL, N. V. (2001). "Interactions between syntaxins identify at least five SNARE complexes within the Golgi/prevacuolar system of the Arabidopsis cell". In : *Molecular Biology of the Cell* 12.12, p. 3733–3743.
- SCHMIDT, O. et TEIS, D. (2012). "The ESCRT machinery". In : Current Biology 22.4, R116–R120.
- SCHWARTZ, M., CHEN, J., JANDA, M., SULLIVAN, M., BOON, J. den et AHLQUIST, P. (2002). "A positive-strand RNA virus replication complex parallels form and function of retrovirus capsids". In : *Molecular cell* 9.3, p. 505–514.
- STEENTOFT, C., VAKHRUSHEV, S. Y., JOSHI, H. J., KONG, Y., VESTER-CHRISTENSEN,
 M. B., KATRINE, T, SCHJOLDAGER, B., LAVRSEN, K., DABELSTEEN, S., PEDERSEN,
 N. B. et al. (2013). "Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through SimpleCell technology". In : *The EMBO journal* 32.10, p. 1478–1488.
- STEFANO, G., RENNA, L., CHATRE, L., HANTON, S. L., MOREAU, P., HAWES, C. et BRANDIZZI, F. (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". In : *The Plant Journal* 46.1, p. 95–110.

- TRETTER, V., ALTMANN, F. et MÄRZ, L. (1991). "Peptide-N4-(N-acetyl- β -glucosaminyl) asparagine amidase F cannot release glycans with fucose attached $\alpha 1 \rightarrow$ 3 to the asparagine-linked N-acetylglucosamine residue". In : *The FEBS Journal* 199.3, p. 647–652.
- TAN, D., CAI, Y., WANG, J., ZHANG, J., MENON, S., CHOU, H.-T., FERRO-NOVICK, S., REINISCH, K. M. et WALZ, T. (2013). "The EM structure of the TRAPPIII complex leads to the identification of a requirement for COPII vesicles on the macroautophagy pathway".
 In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.48, p. 19432–19437.
- TEESE, M. G. et LANGOSCH, D. (2015). "Role of GxxxG motifs in transmembrane domain interactions". In : *Biochemistry* 54.33, p. 5125–5135.
- THIVIERGE, K., COTTON, S., DUFRESNE, P. J., MATHIEU, I., BEAUCHEMIN, C., IDE, C., FORTIN, M. G. et LALIBERTÉ, J.-F. (2008). "Eukaryotic elongation factor 1A interacts with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase and VPg-Pro in virus-induced vesicles". In : Virology 377.1, p. 216–225.
- TILSNER, J., LINNIK, O., LOUVEAUX, M., ROBERTS, I. M., CHAPMAN, S. N. et OPARKA, K. J. (2013). "Replication and trafficking of a plant virus are coupled at the entrances of plasmodesmata". In : *J Cell Biol* 201.7, p. 981–995.
- UCHIYAMA, A., SHIMADA-BELTRAN, H., LEVY, A., ZHENG, J. Y., JAVIA, P. A. et LAZA-ROWITZ, S. G. (2014). "The Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates the cell-to-cell movement of diverse plant viruses". In : *Frontiers in plant science* 5.
- UEMURA, T., UEDA, T., OHNIWA, R. L., NAKANO, A., TAKEYASU, K. et SATO, M. H.
 (2004). "Systematic analysis of SNARE molecules in Arabidopsis : dissection of the post-Golgi network in plant cells". In : *Cell structure and function* 29.2, p. 49–65.
- VANDESOMPELE, J., DE PRETER, K., PATTYN, F., POPPE, B., VAN ROY, N., DE PAEPE, A. et Speleman, F. (2002). "Accurate normalization of real-time quantitative

RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes". In : *Genome biology* 3.7, research0034–1.

- WAN, J., BASU, K., MUI, J., VALI, H., ZHENG, H. et LALIBERTÉ, J.-F. (2015). "Ultrastructural characterization of turnip mosaic virus-induced cellular rearrangements reveals membrane-bound viral particles accumulating in vacuoles". In : *Journal of virology* 89.24, p. 12441–12456.
- WAN, J., CABANILLAS, D. G., ZHENG, H. et LALIBERTÉ, J.-F. (2015). "Turnip mosaic virus moves systemically through both phloem and xylem as membrane-associated complexes". In : *Plant physiology* 167.4, p. 1374–1388.
- WANG, H., HAN, S., SIAO, W., SONG, C., XIANG, Y., WU, X., CHENG, P., LI, H., JÁSIK, J., MIČIETA, K. et al. (2015). "Arabidopsis Synaptotagmin 2 participates in pollen germination and tube growth and is delivered to plasma membrane via conventional secretion". In : *Molecular plant* 8.12, p. 1737–1750.
- WEI, T., HIBINO, H. et OMURA, T. (2009). "Release of Rice dwarf virus from insect vector cells involves secretory exosomes derived from multivesicular bodies". In : *Communicative* & amp ; integrative biology 2.4, p. 324–326.
- WEI, T., ZHANG, C., HONG, J., XIONG, R., KASSCHAU, K. D., ZHOU, X., CARRINGTON, J. C. et WANG, A. (2010). "Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO". In : *PLoS pathogens* 6.6, e1000962.
- WEI, T., ZHANG, C., HOU, X., SANFAÇON, H. et WANG, A. (2013). "The SNARE protein Syp71 is essential for turnip mosaic virus infection by mediating fusion of virus-induced vesicles with chloroplasts". In : *PLoS pathogens* 9.5, e1003378.
- YAMAJI, Y., MAEJIMA, K., KOMATSU, K., SHIRAISHI, T., OKANO, Y., HIMENO, M., SUGAWARA, K., NERIYA, Y., MINATO, N., MIURA, C. et al. (2012). "Lectin-mediated

resistance impairs plant virus infection at the cellular level". In : *The Plant Cell* 24.2, p. 778–793.

- ZHANG, H., ZHANG, L., GAO, B., FAN, H., JIN, J., BOTELLA, M. A., JIANG, L. et LIN, J. (2011). "Golgi apparatus-localized synaptotagmin 2 is required for unconventional secretion in Arabidopsis". In : *PLoS One* 6.11, e26477.
- ZHANG, S. C., ZHANG, G., YANG, L., CHISHOLM, J. et SANFAÇON, H. (2005). "Evidence that insertion of Tomato ringspot nepovirus NTB-VPg protein in endoplasmic reticulum membranes is directed by two domains : a C-terminal transmembrane helix and an Nterminal amphipathic helix". In : *Journal of virology* 79.18, p. 11752–11765.
- ZHENG, H., VON MOLLARD, G. F., KOVALEVA, V., STEVENS, T. H. et RAIKHEL, N. V. (1999). "The plant vesicle-associated SNARE AtVTI1a likely mediates vesicle transport from the trans-Golgi network to the prevacuolar compartment". In : *Molecular Biology of the Cell* 10.7, p. 2251–2264.
- ZHENG, H., CAMACHO, L., WEE, E., BATOKO, H., LEGEN, J., LEAVER, C. J., MALHO, R., HUSSEY, P. J. et MOORE, I. (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". In : *The Plant Cell* 17.7, p. 2020–2036.
- ZHENG, J., HAN, S. W., RODRIGUEZ-WELSH, M. F. et ROJAS-PIERCE, M. (2014).
 "Homotypic vacuole fusion requires VTI11 and is regulated by phosphoinositides". In : Molecular plant 7.6, p. 1026–1040.

| CHAPITRE

PUBLICATION 2 : Presence of membrane-associated Turnip mosaic virus components in the extracellular space during infection

Presence of membrane-associated Turnip mosaic virus components in the extracellular space during infection

Daniel Garcia Cabanillas¹*, Juan Wan¹*, Nooshin Movahed², Huanquan Zheng² and Jean-François Laliberté¹

- 1. INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, Québec, H7V 1B7, Canada
- Department of Biology, McGill University, 1205 Dr. Penfield Avenue, Montréal, Québec, H3A 1B1, Canada

Corresponding author : Jean-François Laliberté Tel : 1.450.687.5010, Fax : 1.450.686.5501, Email : jean-francois.laliberte@iaf.inrs.ca

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article is : Jean-François Laliberté (jean-francois.laliberte@iaf.inrs.ca).

Contributions : Le manuscrit est en préparation. J'ai élaboré et effectué la plupart des expériences (Figure 2, Figure 3, Figure 4). Ma collègue Juan Wan a effectué les expériences de microscopie électronique à transmition (Figure 1A,B) et a participé dans les extractions préliminaires de liquide extracellulaire de plante (Figure 4C). Ma collègue Nooshin Movahed a effectué les expériences de microscopie électronique à transmition et le comptage des CMV (Figure 1C,D). J'ai rédigé une première version du manuscrit et le Pr. Jean-François Laliberté a aidé à l'améliorer.

4.1 Résumé

Les vésicules extracellulaires sont produites dans un organisme durant une multitude de processus cellulaires, notamment dans la réponse immunitaire et les infections virales. Récemment, des publications ont mis l'accent sur l'importance des vésicules extracellulaires dans l'infection de plusieurs virus à ARN+. Les plantes produisent des vésicules extracellulaires pour contrecarrer des infections fongiques et sans doute aussi pour stimuler la réponse immunitaire durant les infections bactériennes. Cependant, en dépit des nombreuses similitudes existant entre les virus animaux et de plantes, aucune information n'est disponible en ce qui concerne leur rôle durant l'infection virale de plantes menées par le virus à ARN+. Le virus de la mosaïque du navet (Turnip mosaic virus, TuMV) est un virus a ARN+ qui produit des usines de réplication virale qui peuvent être retrouvées dans les vaisseaux du xylème. Les vaisseaux du xylème sont en continuité directe avec le milieu extracellulaire. Pour clarifier si le TuMV exploite le milieu extracellulaire durant l'infection, nous avons mené des observations de tissus de feuilles en condition saines et infectées par microscopie électronique à transmission que nous avons comparé. Les résultats obtenus ont révélé que des vésicules extracellulaires étaient libérées plus souvent dans l'apoplaste en condition d'infection par le TuMV. Pour caractériser plus en détail la nature des vésicules extracellulaires présentes dans l'apoplaste, nous avons mené des purifications à partir de plantes d'Arabidopsis thaliana infectées par le TuMV. Pour connaître le contenu de ces dernières, nous avons mené des études de protéomique. Nous avons trouvé que les vésicules extracellulaires produites durant l'infection contiennent des protéines virales et de l'hôte entre autre connues pour faire partie du complexe de réplication. Tous ces résultats suggèrent que les vésicules extracellulaires contenant des facteurs de réplication virale pourraient suivre une route extracellulaire durant l'infection menée par le TuMV.

4.2 Abstract

Extracellular vesicles are produced during a variety of cellular processes including in immune response and viral infection. Recently, the role of extracellular vesicles in positive (+) RNA virus infections has highlighted their importance in infection. Plants produce extracellular vesicles to thwart fungal infection, as well as to potentially trigger immune response during bacterial infection. However, in spite of the similarities between animal and plant viruses, no information is available about their role during +RNA viral infection of plants. Turnip mosaic virus (TuMV) is a +RNA virus that generates viral replication factories that can be found in xylem vessels that are in direct continuity with the extracellular space. To elucidate if TuMV exploits the extracellular space during infection, we first carried out comparative electron microscopy observations of infected and healthy tissues. These results highlighted that extracellular vesicles were released more often in the apoplast during TuMV infection. To further characterize the nature of the extracellular vesicle present in the apoplast, we purified them from TuMV-infected Arabidopsis thaliana plants. To assess their content, proteomic studies were performed. We found that extracellular vesicles produced during TuMV infection contain viral and host proteins, including some known to be part of viral replication complex. These results suggest that extracellular vesicles that contain viral replication components may follow an extracellular route during TuMV infection.

4.3 Introduction

Proteins found in the extracellular space of eukaryotic cells are either secreted by exocytosis or within extracellular vesicles. Extracellular vesicles are produced from cells in a wide variety of sizes and have been classified into at least three goups according to their size (GYÖRGY, SZABÓ et al. 2011; AKERS, GONDA et al. 2013; ABELS et BREAKEFIELD
2016; DREYER et BAUR 2016). The largest vesicles are known as apoptotic bodies, which have diameters of more than 1μ m. The other two classes are microvesicles (100-1000 nm in diameter) and exosomes (30-150 nm in diameter). Microvesicles are shed directly from the plasma membrane, while exosomes are released after the fusion of a multivesicular body (MVB) with the plasma membrane.

The importance of exosomes has long been neglected. They were often considered as sample processing artefacts or fragments of dying cells undergoing apoptosis. Increasing interest on those extracellular vesicles has revealed their implication in many biological processes. For instance, exosomes purified from different extracellular fluids such as blood, urine, amniotic fluid were shown to transport proteins and different types of RNAs such as mRNAs and miRNA (BERN 2017; CIREGIA, URBANI et PALMISANO 2017; FLESHNER et CRANE 2017; LAWSON, KOVACS et al. 2017; XU, CHEN et YANG 2017). These miRNAs have been shown to be involved in immunity and in disease like cancer (TURTURICI, TINNIRELLO et al. 2014). It was recently discovered that many +RNA viruses use exosomes in order to modulate the cell immune response (i.g HIV, HBV, HCV, EBV) (MASCIOPINTO, GIOVANI et al. 2004; CANITANO, VENTURI et al. 2013; ARENACCIO, CHIOZZINI et al. 2014; LONGATTI, BOYD et CHISARI 2015; AHSAN, SAMPEY et al. 2016; KOUWAKI, FUKUSHIMA et al. 2016; XU, CHEN et YANG 2017). Furthermore, non-enveloped viruses were long thought to exit cells exclusively by inducing their lysis. However, it was recently shown that some of them are able to transiently acquire a membrane envelope and generate secondary infection foci by transporting their viral RNA or their viral particles (i.g HAV, HEV, (BUKONG, MOMEN-HERAVI et al. 2014), PV) in extracellular vesicles trough long distances in the extracellular fluids (MASCIOPINTO, GIOVANI et al. 2004; CANITANO, VENTURI et al. 2013; FENG, HENSLEY et al. 2013; ARENACCIO, CHIOZZINI et al. 2014; BUKONG, MOMEN-HERAVI et al. 2014; LONGATTI, BOYD et CHISARI 2015; AHSAN, SAMPEY et al. 2016; YANG, HAN et al. 2017).

Information concerning plant cell-derived extracellular vesicles is rather limited, perhaps because of the difficulty in obtaining in large quantities extracellular fluid (apoplast) enriched in exosomes and microvesicles. Most of the available information about plant exosomes highlights the implication of the SNARE SYP121 (PEN1) and comes from plantfungi and more recently from plant-bacteria interactions studies (NIELSEN, FEECHAN et al. 2012). Accumulating evidence suggests that membrane structures carry specific materials to be delivered into the paramural space of the plant to accomplish still undiscovered functions (AN, HÜCKELHOVEN et al. 2006; REGENTE, CORTI-MONZÓN et al. 2009; WANG, DING et al. 2010).

The content of plant extracellular vesicles have not been analyzed, and their function is unknown. An improved extraction protocol has been described for obtaining apoplastic fluid from *Arabidopsis thaliana* (RUTTER et INNES 2017). Proteomic analyses of the extracellular vesicles obtained with this procedure indicated that they are enriched in proteins involved in biotic and a biotic stress response, suggesting that extracellular vesicles may have a role in plant immune responses. Despite the similarities between pathogenic +RNA viruses across kingdoms, there is no information linking plant extracellular vesicles with viruses. The only investigation on the subject is the release of *Rice dwarf virus* from insect vector cells involves secretory exosomes derived from multivesicular bodies (WEI, HIBINO et OMURA 2009).

Turnip mosaic virus (TuMV) is a positive sense RNA (+RNA) virus that belongs to the order *Picornavirales*. The 9.8 kb genome encodes a polyprotein that is proteolytically processed into at least 11 viral proteins. +RNA viruses reorganize the endomembrane system to generate quasi-organelles structures called viral factories (LALIBERTÉ et ZHENG 2014). In the case of TuMV, these factories are motile vesicles of ~100 nm in diameter that contain the TuMV genome as well as viral and host proteins involved in viral RNA (vRNA) replication (COTTON, GRANGEON et al. 2009). These vesicles are not only involved in vRNA replication but are vehicles for intra- and extracellular vRNA movement (GRANGEON, AGBECI et al. 2012; AGBECI, GRANGEON et al. 2013; GRANGEON, JIANG et al. 2013). They are even found in xylem vessels (WAN, CABANILLAS et al. 2015; WAN et LALIBERTÉ 2015), which are made of dead cells where water, solutes, hormones and proteins are distributed throughout the entire plant. Xylem vessels are in continuity with the extracellular space called the apoplast. Indeed, proteomic analyses have revealed that an important number of the proteins found in the xylem are also secreted into the apoplastic fluid (LIGAT, LAUBER et al. 2011). The observation of viral replication complexes in xylem vessels contrasts with the general belief that these complexes are found exclusively inside infected cells.

The membrane-associated viral protein 6K₂ plays a key role in the formation of potyviral replication vesicles (RESTREPO-HARTWIG et CARRINGTON 1994). It interacts with the COPII Sec24A protein, which allows the release of replication vesicles at endoplasmic reticulum exit sites (ERES) (JIANG, PATARROYO et al. 2015). 6K₂ also contains within its predicted transmembrane domain a motif that is involved in the Golgi bypass by the replication vesicles (Garcia Cabanillas et al., submitted). Finally, 6K₂ is found as a complex with the pre-vacuolar compartment SNARE Vti11 and a loss-of-function *A. thaliana* line for Vti11 are completely resistant to TuMV infection (Garcia Cabanillas et al., submitted). Of particular interest is the finding that Vti11 is associated with *A. thaliana* extracellular vesicles (RUTTER et INNES 2017).

In this investigation, we examined if TuMV components were found in the apoplast of infected plants and whether these could be linked to extracellular vesicles. TEM images showed that abundant MVBs and extracellular vesicles were being released at the plasma membrane/cell wall interface in TuMV-infected leaves. We collected the apoplastic fluid from TuMV-infected *A. thaliana* and concentrated extracellular vesicles by differential centrifugation. RT-PCR and Western blot and proteomic analyses revealed the presence of vRNA as well as viral proteins together with host factors, many of them involved in plant immune response. Our study thus suggests that extracellular vesicles may contain TuMV components for intercellular and systemic infection of plants.

4.4 Results and Discussion

4.4.1 Exosome-like vesicles are present in the apoplastic space of TuMV-infected leaves

Cross-sections of TuMV-infected *N. benthamiana* leaves were collected and observed by transmission electron microscopy (TEM). We observed in the apoplastic space of TuMV-infected leaves numerous electron-translucent vesicles (Figure 4.1 A, empty arrowheads). Additionally, we observed some electron-dense vesicles that appeared to pinch out from the plasma membrane into the apoplastic space (Figure 4.1 B, arrowheads). Because the appearance of extracellular vesicles also takes place in non-infected plants, we conducted a comparative TEM analysis between infected (Figure4.1 A) and mock-infected (Figure4.1 B) conditions to compare the morphology of the extracellular being produced in each condition. In both conditions we observed that different vesicles in size (\sim 100-200nm TuMV, \sim 50-150nm mock) and electron density were released on the outer space.

We quantified the occurrence of extracellular vesicle being released towards the apoplastic space from TEM images (n=150) during mock infection and TuMV infection Al-though exosome-like vesicles were observed in mock-infected leaves (Figure 4.1C), they were statistically found less frequently than in infected leaves (Figure 4.1D). Those results suggest that TuMV also invades the extracellular space during infection through the production of extracellular vesicles.

Studies have shown that extracellular vesicles situated at the plasma membranecell wall interface occur in various cell wall-associated processes and are similar to exosomes both in location and in structure (AN, BEL et HÜCKELHOVEN 2007). For instance, presence of extracellular bodies were reported for plants infected by Barley stripe mosaic virus (BSMV) (MCMULLEN, GARDNER et MYERS 1977). Extracellular vesicles may be released from the plasma membrane by at least two mechanisms. They could be released through an endosomal pathway where MVBs fuse with the PM, as shown for the pathogenic powdery mildew fungus (AN, EHLERS et al. 2006; AN, HÜCKELHOVEN et al. 2006) and BSMV (MCMULLEN, GARDNER et MYERS 1977). Alternatively, they could be secreted to the extracellular space through secretory autophagosomes or CUPS (Compartment for Unconventional Protein Secretion) compartments. The fact that TuMV replication vesicles are associated with the prevacuolar compartment (Garcia Cabanillas et al., submitted) would support MVB-PM route.

4.4.2 6K₂-tagged vesicles are present in the apoplastic space

We next verified if TuMV-related vesicles could be found in the apoplast. We infiltrated *Nicotiana benthamiana* leaves with *Agrobacterium tumefaciens* containing pCambia TuMV/6K₂ :mCherry (COTTON, GRANGEON et al. 2009; GRANGEON, AGBECI et al. 2012). This plasmid contains an infectious cDNA copy of the RNA genome of TuMV under the control of the cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter. Transcription of this plasmid leads to the infection of infiltrated leaves by TuMV two to three days later and replication vesicles are observed as red-fluorescing punctates under the confocal microscope (COTTON, GRANGEON et al. 2009).

We next collected extracellular vesicles from apoplastic fluid of *A. thaliana* according to (RUTTER et INNES 2017). To ensure that the detection of viral components was not

the result of contaminating broken cells, we first collected apoplastic fluid from transgenic plants expressing the intracellular Golgi marker GmManl49-sYFP (RUTTER et INNES 2017). We also confirmed by confocal microscopy that no chloroplast auto-fluorescence emission was observed in apoplastic extracts from each condition. We then carried out apoplastic fluid extraction from A. thaliana expressing PEN1-GFP, which is a marker for extracellular vesicles (RUTTER et INNES 2017). Green fluorescence punctates produced by PEN1-GFP were observed by confocal microscopy (Figure 4.2 B), which confirmed that extracellular vesicles could be collected during the extraction process without cellular contamination. We next agroinfiltrated A. thaliana Col-0 with A. tumefaciens either containing the control pCambia 1380 vector or pCambiaTuMV/6K₂ :GFP. Apoplastic fluid was collected 15 days post-infiltration from leaves and processed for extracellular vesicle purification. The collected membrane pellet was resuspended and the presence of $6K_2$:GFP-tagged extracellular vesicles was verified by confocal microscopy. Green fluorescence puctates of an average diameter of 300 nm were detected in apoplastic extracts from infected plants, as well as larger structures (\sim 5-20 μ m) formed of clumped vesicles were also observed (Figure 4.2 C). No green fluorescence was observed in mock-infected extracts (Figure 4.2 D), indicating that the observed signal in Figure 4.2C is not the result of auto-fluorescence. This data indicates that 6K₂-tagged extracellular vesicles are produced during infection.

We then performed a Western blot analysis with anti-GFP serum on purified extracellular vesicle extracts from both pCambia1380 (mock conditions) and pCambiaTuMV/ $6K_2$:GFP inoculated Col0 plants at 15dpi (Figure 4.3 A). The analysis confirmed that the green fluorescing punctates observed by confocal microscopy is the consequence of the presence of $6K_2$:GFP in the apoplastic fluid. Total RNA was also extracted from purified extracellular vesicles and subjected to RT-PCR using primers for $6K_2$ -coding sequence amplification. A fragment of 162 bp, which is the expected size for the RT-PCR amplification of $6K_2$, was detected only in apoplastic fluid from infected plants (Figure 4.3

4.4.3 Proteomic analysis shows the presence of viral proteins and host immune response-related proteins in extracellular vesicle enriched-fractions

We carried out a proteomic analysis on extracellular vesicle-enriched extracts from mock-infected and infected plants. We identified ~400 proteins from at least two tryptic peptide matches when compared to the entire *A. thaliana* proteome and a probability of identification superior to 95% (Table1). Comparison of mock-infected and TuMV-infected sample proteomes revealed that 94% of the proteins was present in both conditions. First, almost half of the viral proteins encoded by the TuMV genome were listed, confirming that TuMV components such as Nia-Vpg, HCPro, Cl, 6K₂, VPg, Pro and CP are associated with extracellular vesicles (Figure 4.4). We also noticed the presence host proteins known to be found in TuMV replication vesicles, such as the heat sock protein Hsc70-3 and the translation elongation factor eEF1A (DUFRESNE, THIVIERGE et al. 2008; THIVIERGE, COTTON et al. 2008). This corroborates with the idea that the 6K₂-tagged extracellular vesicles found in the apoplast contain TuMV replication complexes.

The extracellular vesicle proteomic data was processed for Gene ontology (GO). Protein classification was made for the extracellular vesicle proteome from non-infected and infected conditions in terms of different categories of biological processes through The Arabidopsis Information Resource Web site (www.arabidopsis.org) using the "GO Term Enrichment for Plants" bioinformatics tool (Figure 4.4). The bioinformatic analysis provides results in terms of percentages of the total proteome for each category. Protein distribution in each category was compared for both non-infected and infected conditions. For instance, we found that categories such as vesicle-mediated transport, cellular response to biotic and abiotic presented a higher percentage of proteins during TuMV infection in comparison to mock conditions (Figure 4.4 B). On the contrary, proteins related to metabolism, cell organization and regulation were less represented. For example, we identified proteins involved in plant defence, stress response, primary metabolism, membrane remodelling, vesicle trafficking translation and viral replication. Of particular interest, we found proteins involved in plant response to biotic stress such as S-AHH and *pectine méthylestérase* (PME). S-AHH is a key protein of the methyl cycle and has a methyltransferase activity that has an important role in virus silencing of the potyvirus *Potato virus* Y (PVY) and crinivirus Tomato chlorosis virus (ToCV) (CAÑIZARES, LOZANO-DURÁN et al. 2013). PME is a cell wall-associated protein required for cell-to-cell and systemic movement of Tobacco mosaic virus (CHEN et AHLQUIST 2000; CHEN et CITOVSKY 2003; LIONETTI, RAIOLA et al. 2014a; LIONETTI, RAIOLA et al. 2014b). We also identified the 14-3-3 protein, which is involved in plant signal transduction and immunity response and can be induced during TMV infection (WANG, WANG et al. 2016). These elements could be produced by the host to trigger its defense against viruses. We also identified abiotic stress proteins produced during ROS signalling such as catalases and lipoxygenase. Furthermore, proteins essential for endomembrane remodelling and inter-organelle vesicular exchanges were detected. For example the synaptotagmin A (SYTA) known to be involved ER-plasma membrane contacts and to be important for TuMV infection was found in TuMV extracts (UCHIYAMA, SHIMADA-BELTRAN et al. 2014). Also several Rab proteins such as RabG3E, RabG3D, Rab7, as well as the SNARE proteins SYP71 and SYP132 were detected in both samples with different exclusive spectrum counts (Table 4.1). SYP132 is a plasma membrane SNARE that was shown to participate in resistance again bacteria (KALDE, NÜHSE et al. 2007).

Since PEN1 was also found by one tryptic match in TuMV extracellular vesicle proteome, we decided to compare our total proteome to the extracellular vesicle proteome

characterized by RW. Innes laboratory (RUTTER et INNES 2017). Interestingly we found that about 41% of the proteins were in common for both proteomes. This suggests that some proteins might form part of a general mechanism where certain proteins are constantly recruited to extracellular vesicles for a broad range of pathogen infections (e.g TuMV and *Pseudomonsas syringae*).

Furthermore, a qualitative comparison of peptide abundance for individual proteins suggested that some proteins may be more repeatedly found in extracellular vesicles from TuMV-infected plants. For instance, we found GAPDH (glyceraldehyde-3-P dehydrogenase) and tetraspanin protein of the glycolysis pathway were present in TuMV extracellular extracts proteome. In addition to its original role in primary metabolism, its presence in viral factories and its importance during viral replication was previously shown for Tomato bushy stunt virus (WANG et NAGY 2008). Also increasing evidence on animal exosomes are pointing out that tetraspanin transmembrane proteins could be a hallmark of extracellular vesicles produced in different contexts (PEREZ-HERNANDEZ, GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ et al. 2013; GUIX, SANNERUD et al. 2017). It is likely that tetraspanins may also have an important role during the production of extracellular vesicles in plant. We also found a new translation factors seemingly more present in infected extracts, such as eIF5A and eIF3. eIF5A is a translation elongation factor and eIF5A knock-down soybean plants were shown to be more susceptible to Soybean mosaic virus (CHEN, ADAM ARSOVSKI et al. 2017). elF3 is a large translation initiation and reinitiation factor known to interact with eIF4G and eIF4G was previously shown to be a key partner of TuMV replication complex. Furthermore, eIF3 was shown to specifically be involved in *Cauliflower mosaic virus* (CaMV) translation reinitiation and could be a candidate for recessive resistance to RNA viruses that co-opt it for replication (BUREAU, LEH et al. 2004; RYABOVA, PARK et HOHN 2004). Putting our proteomic analyses in the context of the vast literature suggests that new partners of TuMV replication complex can likely emerge.

4.5 Conclusion

We report in this study that TuMV components are present in the apoplastic space, likely to be associated with extracellular vesicles. These extracellular viral components are found within viral replication complexes and may be involved in infection. Their presence in the extracellular space of plants cells may explain the the origin of the xylem-located TuMV factories and suggest that RNA molecules can be transported through the apoplast in a membrane envelope. Although studying exosomes can be challenging, the increasing research interest in the plant field is highlighting their potential implication in many biological processes during normal, stress and pathological conditions as found for its mammalian counterparts. The extracellular space in plants is generally believed to be an inert zone where only ions, hormones, and proteins in transit are found. Different pathogens including bacteria (*Pseudomonas seringae*) and seemingly viruses (TuMV) induce the formation of additional extracellular vesicles during infection but the underneath mechanisms of production and biological role need deeper investigation. It further suggests that all types of pathogens and host plants exploit the extracellular space during their infection cycle. Understanding the extracellular vesicles function constitutes an exciting avenue of investigation to unveil the complex implication of plants extracellular space in different biological contexts.

4.6 Materials and methods

4.6.1 Plant material

Wild type plants used in this study were *Arabidopsis thaliana* plant ecotype Col0. Transgenic plant lines used in this study are all Col-0 background and were obtained from Roger Innes laboratory : 35S :GFP-PEN1 transgenic plants (MEYER, PAJONK et al. 2009), 35S :GmMANI49-sYFP transgenic (GU et INNES 2012). Seeds were vernalized for 2 days at 4°C and plants were grown at 22°C with a photoperiod of 16h light and 8h dark.

4.6.2 Extracellular vesicle purification

Plants were grown for 5-6 weeks and inoculated with Agrobacterium tumefaciens containning either pCambia1380 vector for mock conditions or the infectious clone pCambiaTuMV/6K₂ :GFP before being harvested at 15 days post inoculation. The agrobacteria suspension was adjusted to an OD_{600} of 0.015. Vesicles were isolated from rosettes apoplastic wash performed with VIB solution as described in Rutter et al 2017. Briefly, infiltrated plants were centrifuged at 700g for 20 min at 4°C. The apoplastic wash was filtered through a 0.45 μ m membrane and centrifuged at 10,000g for 30 min and ultracentrifuged at 100,000g for 60 min at 2°C. The obtained pellet was resuspended in VIB solution for further analyses by mass spectrometry, western blot or RNA extraction.

4.6.3 Immunoblots and RT-PCR

Western blot analysis was performed as described in (JIANG, PATARROYO et al. 2015). Total RNAs extracted from purified extracellular vesicles were subjected to cDNA synthesis (iScriptTM, Bio-Rad) and 6K₂ was amplified by PCR according to the manufacturer procedure (pwo DNA polymerase, Millipore Sigma).

4.6.4 Confocal microscopy and transmission electron microscopy

To detect vesicle-associated GFP fluorescence from purified extracellular vesicles, a small volume of resuspended pellets were observed using Zeiss LSM780 inverted confocal microscope with a $63 \times$ oil immersion objective. GFP and YFP chromophores were excited at 488 nm, and the emission light was acquired from 495 nm to 550 nm wavelengths. Also, chloroplast autofluorescence was acquired from 630 nm to 680nm. TEM imaging was performed as described in (WAN, CABANILLAS et al. 2015)

4.6.5 Mass Spectrometry

EVs were isolated from *Arabidopsis thaliana* Col0 incolulated with pCambiaTuMV/6K₂ :GFP for infectious conditions or pCambia1380 for mock conditions. EV mebranes where disrupted and proteins denatured with the Protease Max^{TM} thermosensitive surfactant (Promega). Solubilized samples were processed for trypsin digestion and liquid chromatography-coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS²) similarly as described in (CLOUTIER, LAVALLÉE-ADAM et al. 2014).

4.6.6 Proteomics database searching

All MS² samples were analyzed using Mascot (Matrix Science, London, UK; version 2.5.1). Mascot was set up to search the NCBI_Arabidopsis_Thaliana_txid3702 database (unknown version, 73710 entries) assuming the digestion enzyme trypsin. Mascot was searched with a fragment ion mass tolerance of 0,60 Da and a parent ion tolerance of 10,0 PPM. O+18 of pyrrolysine and carbamidomethyl of cysteine were specified in Mascot as fixed modifications. Oxidation of methionine was specified in Mascot as a variable modification.

4.6.7 Criteria for protein identification

Scaffold software (Proteome Software Inc., Portland, OR) was used to validate MS² based peptide and protein identifications. Peptide identifications were accepted if they exceeded specific database search engine thresholds. Mascot identifications required at least ion scores must be greater than both the associated identity scores and 30, 30, 25 and 25 for singly, doubly, triply and quadruply charged peptides. Protein identifications were accepted if they contained at least 2 identified peptides (except for PEN1 where 1 peptide match identification was considered). Proteins that contained similar peptides and could not be differentiated based on MS² analysis alone were grouped to satisfy the principles of parsimony. Only proteins identified with a probability over 95% were considered for further analyses. Accession Numbers noted gi| database used for protein identification (Table 4.1) is available in the NCBI website (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/).

4.6.8 Protein categorization

All proteomes analyses were further processed for Gene ontology (GO) categorization in terms of biological processes by using the "GO Term Enrichment for Plants" bioinformatics tool available in The Arabidopsis Information Resource Web site (www. arabidopsis.org).

4.7 Acknowledgements and Author Contributions

This work was supported by grants from the Natural Science and Engineering Research Council (NSERC) of Canada and from Le Fonds Québécois de Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) to H.Z. and J.F.L. We thank J. Tremblay for his technical expertise and assistance for confocal microscopy and Roger W. Innes (Indiana University) for the *A. thaliana* 35S :GmManI49-sYFP and 35S :GFP-PEN1 seeds. Designed the research - D.G.C., J.W, J.-F.L.; performed research - D.G.C., J.W, N.M.; analyzed data - D.G.C., J.W, N.M., H.Z., J.-F.L.; wrote the paper - D.G.C., J.W., H.Z., J.-F.L

4.8 Figures of Publication 2



Figure 4.1 – Extracellular vesicles are present in apoplast of TuMV-infected tissues. Images of cross-sections of TuMV-infected *N. benthamiana* leaves were observed by TEM.
(A) shows the electron-translucent vesicles (empty arrowheads) located between plasma membrane and cell wall. (B) shows both electron-translucent (empty arrowheads) and electron-dense vesicles (arrowheads) located between plasma membrane and cell wall. V, vacuole; CL, chloroplast; M, mitochondria; CW, cell wall; PM, plasma membrane. TEM images of MVBs fusing with the plasma membrane and releasing different type of vesicles (electron translucent and electron dense) towards the cell wall in mock condition (C). Quantification of cells showing MVB fusing with the plasma membrane during mock and TuMV infection (n=150, T-test *P<0.05) (D). Images in A and B were taken from Wan et al Plant signal behavior.



35S: GFP-PEN1



10µп

Col-0 TuMV/6K₂:GFP



Col-0 Mock



Figure 4.2 – 6K₂-tagged vesicles isolated from the apoplastic fluid during TuMV infection.Purified extracellular membrane fraction from GmManI49-sYFP (A) and PEN1-GFP A. thaliana (B). Purified extracellular membrane fraction from Col0 A. thaliana plants inoculated with pCambiaTuMV/6K₂ :GFP (C) or pCambia1380 (Mock)(D) at 15dpi.



Figure 4.3 – TuMV 6K₂ and vRNA is detected in extracellular vesicle purified fractions. Western blot analysis with anti-GFP antibodies of extracellular vesicle purified fractions and total protein extractions from mock and TuMV infected *A. thaliana* Col0 wild type plants (A). Agarose gel of the RT-PCR performed on extracellular vesicle purified fractions from mock and TuMV infected conditions to amplify 6K₂ coding sequence (B).







Other biological regulations

Figure 4.4 – Proteomic analysis of TuMV-infected extracellular vesicle purified fractions. Proteome of purified EV from mockinoculated A. thaliana Col0 wild type plants (A) and proteome of purified extracellular vesicle from TuMV/6K₂ :GFPinoculated A. thaliana Col0 wild type plants (B) processed for GO classification. The outer portions of the pie chart in (B) correspond to protein categories more represented in (B) than in (A) and portions of the pie chart were percentages are written in thick bold correspond to categories less represented (B) than in (A) proteome.

Table 4.1 - Proteome of extracellular vesicles purified from TuMV-infected and Mock-infected plants

		Associate Number	Exc	Exclusive spe	ectrum counts
#	Identified Proteins (399)	Accession Number	IVIVV	TuMV-1	Mock-1
1	V-type proton ATPase catalytic subunit A	gi 15219234 (+4)	69 kDa	70	56
2	tubulin beta-2/beta-3 chain	gi 18424620 (+5)	51 kDa	48	54
3	Clathrin heavy chain 1	gi 122223702 (+2)	193 kDa	63	44
4	V-type proton ATPase subunit B3	gi 240254125 (+4)	54 kDa	67	41
5	Catalase-3	gi 21903384 (+3)	57 kDa	42	46
6	40S ribosomal protein Sa-1	gi 332197192 (+3)	32 kDa	17	31
7	elongation factor 1-alpha 2	gi 145323788 (+16)	41 kDa	18	21
8	60S ribosomal protein L7a-1	gi 330255770 (+1)	29 kDa	27	39
9	40S ribosomal protein S3-2	gi 15232352 (+2)	27 kDa	37	41
10	ATPase 2, plasma membrane-type	gi 114335 (+1)	104 kDa	34	38
11	Tubulin alpha-6 chain	gi 267070 (+1)	50 kDa	32	34
12	5-methyltetrahydropteroyltriglutamatehomocysteine methyltransferase	gi 145334507 (+3)	84 kDa	29	27
13	60S ribosomal protein L11-2	gi 18415161 (+10)	21 kDa	14	15
14	Actin-2	gi 25452790 (+3)	42 kDa	29	35
15	annexin 1	gi 332193704 (+1)	36 kDa	26	17
16	ATP synthase subunit beta-2	gi 18415911 (+8)	60 kDa	44	28
17	60S ribosomal protein L17-2	gi 27735241 (+1)	20 kDa	38	35
18	Sucrose-UDP glucosyltransferase 1	gi 226693619 (+19)	93 kDa	27	21
19	60S ribosomal protein L23	gi 19884121 (+5)	15 kDa	3	33
20	60S ribosomal protein L4-1	gi 17369604 (+3)	45 kDa	26	26
21	ATP citrate lyase subunit B 2	gi 332008431 (+1)	66 kDa	17	37
22	elongation factor EF-2-like protein LOS1	gi 30696056 (+1)	94 kDa	28	20
23	40S ribosomal protein S4-2	gi 18415395 (+6)	30 kDa	21	22
24	Aquaporin PIP1-2	gi 1175011 (+5)	31 kDa	31	17
25	Photosystem II CP47 reaction center protein	gi 6685792	56 kDa	18	13
26	adenosylhomocysteinase	gi 332657945 (+1)	53 kDa	27	20
27	14-3-3-like protein GF14 omega	gi 12230867 (+2)	29 kDa	30	21
28	40S ribosomal protein S15-1	gi 332189555 (+3)	17 kDa	14	27
29	plasma membrane intrinsic protein 3	gi 15236267 (+4)	30 kDa	22	22
30	60S ribosomal protein L5-2	gi 19884108 (+3)	34 kDa	16	25

ш	Identified Proteins (200)	A Number	B. #347	Exclusive spectrum counts		
#	Identified Proteins (399)	Accession Number	Accession Number	IVIVV	TuMV-1	Mock-1
31	Eukaryotic initiation factor 4A-1	gi 1170503 (+5)	47 kDa	17	23	
32	60S ribosomal protein L10a-2	gi 27923989 (+3)	24 kDa	15	21	
33	S-adenosylmethionine synthase 3	gi 186505986 (+3)	42 kDa	13	17	
34	Heat shock protein 90-2	gi 2495365 (+1)	80 kDa	19	19	
35	V-type proton ATPase subunit E1	gi 12643432 (+1)	26 kDa	23	11	
36	Actin-7	gi 1703108 (+1)	42 kDa	14	17	
37	Pyrophosphate-energized vacuolar membrane proton pump 1	gi 332191228 (+1)	81 kDa	21	13	
38	Calmodulin-6	gi 1168749 (+18)	17 kDa	21	22	
39	coatomer subunit alpha-2	gi 330252079 (+1)	136 kDa	15	15	
40	RecName: Full=Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37f	gi 12643245 (+4)	74 kDa	19	16	
41	40S ribosomal protein S3a-2	gi 19884297 (+1)	30 kDa	20	16	
42	myrosinase 2	gi 18420974 (+6)	63 kDa	18	12	
43	Polyubiquitin 12	gi 122213849 (+66)	26 kDa	17	17	
44	60S ribosomal protein L18-2	gi 21431838 (+3)	21 kDa	11	16	
45	Tubulin beta-6 chain	gi 267079 (+1)	51 kDa	19	17	
46	sucrose synthase 4	gi 22331535 (+2)	93 kDa	11	14	
47	60S ribosomal protein L9-1	gi 22096367 (+2)	22 kDa	19	18	
48	60S ribosomal protein L27-3	gi 145333113 (+3)	15 kDa	5	5	
49	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	gi 332190895 (+1)	37 kDa	13	9	
50	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37e	gi 12643273 (+3)	71 kDa	22	12	
51	Late embryogenesis abundant protein, group 2	gi 30689599 (+2)	36 kDa	15	16	
52	60S ribosomal protein L13a-4	gi 145334783 (+3)	24 kDa	7	16	
53	60S ribosomal protein L3-1	gi 27735225 (+15)	45 kDa	16	9	
54	patellin-1	gi 332197161 (+1)	64 kDa	16	13	
55	Aquaporin TIP2-1	gi 32363275 (+1)	25 kDa	16	12	
56	60S ribosomal protein L7-2	gi 330250326 (+1)	28 kDa	16	17	
57	Phospholipase D alpha 1	gi 13124800 (+1)	92 kDa	11	14	
58	ADP/ATP carrier protein 2	gi 15240640 (+4)	42 kDa	9	10	
59	Receptor for activated C kinase 1A	gi 21431762 (+1)	36 kDa	13	7	
60	non-specific phospholipase C3	gi 332640432 (+1)	59 kDa	17	14	

щ	Identified Proteins (200)	Accession Number	5.4147	Exclusive spectrum counts	
#	identified Proteins (399)	Accession Number	IVIVV	TuMV-1	Mock-1
61	60S acidic ribosomal protein P0-3	gi 12644551 (+1)	34 kDa	13	12
62	60S ribosomal protein L15-1	gi 3122673 (+3)	24 kDa	7	12
63	60S ribosomal protein L12-2	gi 15231814 (+2)	18 kDa	9	18
64	tubulin alpha-3	gi 332005364 (+3)	50 kDa	13	11
65	vacuolar proton ATPase A3	gi 18420373 (+2)	93 kDa	18	6
66	60S acidic ribosomal protein P1-3	gi 110287816 (+3)	11 kDa	9	16
67	annexin 2	gi 332010603 (+1)	36 kDa	14	11
68	Delta(24)-sterol reductase	gi 17380361 (+5)	65 kDa	12	14
69	40S ribosomal protein S13-2	gi 18411224 (+2)	17 kDa	9	12
70	dynamin-2B	gi 332195473 (+1)	100 kDa	9	13
71	Ribulose bisphosphate carboxylase large chain	gi 3914541 (+1)	53 kDa	6	9
72	V-type proton ATPase subunit d1	gi 12230764 (+1)	41 kDa	24	4
73	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	gi 14916970 (+1)	55 kDa	17	8
74	glycosyl hydrolase family protein	gi 22326920 (+3)	68 kDa	15	11
75	T-complex protein 1 subunit alpha	gi 135535 (+1)	59 kDa	15	9
76	40S ribosomal protein S9-1	gi 332004745 (+1)	23 kDa	7	12
77	40S ribosomal protein S8-1	gi 332005442 (+1)	25 kDa	13	13
78	NADP-dependent malic enzyme 2	gi 332004325 (+1)	64 kDa	12	8
79	V-type proton ATPase subunit C	gi 12585488 (+1)	43 kDa	16	8
80	40S ribosomal protein S5A	gi 15229897 (+8)	23 kDa	7	11
81	14-3-3-like protein GF14 kappa	gi 12643286 (+6)	28 kDa	7	8
82	Calnexin homolog 1	gi 231683 (+1)	60 kDa	9	6
83	HSP90-like protein GRP94	gi 332659461 (+3)	94 kDa	15	11
84	protein KINESIN LIGHT CHAIN-RELATED 1	gi 15236944 (+1)	66 kDa	9	14
85	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	gi 332006171 (+1)	60 kDa	15	10
86	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	gi 332640497 (+1)	59 kDa	8	11
87	40S ribosomal protein S2-4	gi 332646141 (+1)	30 kDa	9	7
88	40S ribosomal protein S14-2	gi 27734448 (+5)	16 kDa	9	12
89	40S ribosomal protein S19-1	gi 27923843 (+1)	16 kDa	10	13
90	Calreticulin-1	gi 11131540 (+3)	49 kDa	8	7

		Accession Number	D ALA/	Exclusive spectrum counts		
#	identified Proteins (399)	Accession Number	IVIVV	TuMV-1	Mock-1	
91	RAB GTPase homolog B1C	gi 332658457 (+1)	23 kDa	10	10	
92	ADP-ribosylation factor A1F	gi 30681825 (+17)	21 kDa	16	11	
93	26S protease regulatory subunit 6B homolog	gi 28558168 (+1)	46 kDa	9	7	
94	40S ribosomal protein S28-1	gi 332003279 (+2)	7 kDa	6	6	
95	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein [Arabidopsis thaliana]	gi 332641584 (+1)	60 kDa	15	8	
96	Oxygen-evolving enhancer protein 1-1, chloroplastic	gi 19883896 (+1)	35 kDa	9	8	
97	40S ribosomal protein S17-4	gi 15238332 (+16)	16 kDa	5	8	
98	Bifunctional enolase 2/transcriptional activator	gi 119350 (+1)	48 kDa	8	12	
99	patellin-3	gi 332197162 (+1)	56 kDa	7	5	
100	Chlorophyll a-b binding protein CP26	gi 28558077 (+1)	30 kDa	14	9	
101	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	gi 332005518 (+1)	57 kDa	10	13	
102	RAB GTPase homolog G3E	gi 332194293 (+3)	23 kDa	12	8	
103	Dynamin-related protein 1A	gi 27735181 (+4)	68 kDa	7	8	
104	Malate dehydrogenase 1, mitochondrial	gi 11133715 (+1)	36 kDa	11	5	
105	40S ribosomal protein S27-1	gi 330255496 (+3)	9 kDa	7	14	
106	40S ribosomal protein S15a-1	gi 1173218 (+4)	15 kDa	10	5	
107	pyrophosphatefructose 6-phosphate 1-phosphotransferase subunit alpha 1	gi 332191924 (+1)	67 kDa	9	12	
108	cell division control protein 48C	gi 18414193 (+2)	90 kDa	9	10	
109	40S ribosomal protein S7-2	gi 15232926 (+4)	22 kDa	3	11	
110	40S ribosomal protein S18	gi 332192166 (+3)	18 kDa	8	9	
111	coatomer subunit beta'-3	gi 30683862 (+10)	102 kDa	6	9	
112	ATP synthase subunit gamma	gi 330253683 (+1)	35 kDa	8	12	
113	V-type proton ATPase subunit H	gi 12585473 (+2)	50 kDa	14	4	
114	aspartic proteinase A1	gi 332190692 (+1)	55 kDa	15	6	
115	protein phosphatase 2A subunit A2	gi 332643548 (+1)	66 kDa	6	7	
116	60S ribosomal protein L22-2	gi 145331980 (+5)	14 kDa	6	6	
117	40S ribosomal protein S6-2	gi 21542430 (+5)	28 kDa	7	9	
118	Coatomer subunit gamma	gi 146286094 (+2)	98 kDa	8	9	
119	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	gi 332640302 (+1)	59 kDa	6	7	
120	26S proteasome regulatory subunit S2 1A	gi 330251938 (+1)	98 kDa	8	8	

щ	Identified Proteins (200)	Associate Number	5.6347	Exclusive spectrum counts	
Ħ	Identified Proteins (399)	Accession Number	IVIVV	TuMV-1	Mock-1
121	60S ribosomal protein L6-3	gi 332197421 (+3)	26 kDa	7	7
122	phosphoglycerate kinase	gi 30699430 (+2)	42 kDa	10	6
123	fructose-bisphosphate aldolase	gi 332645491	39 kDa	10	8
124	60S ribosomal protein L8-3	gi 15234298 (+4)	28 kDa	8	9
125	pectinacetylesterase family protein	gi 18415308 (+4)	42 kDa	5	15
126	60S ribosomal protein L21-2	gi 332195328 (+2)	19 kDa	4	9
127	Tubulin beta-4 chain	gi 27735260 (+1)	50 kDa	11	8
128	PLAT-plant-stress domain-containing protein	gi 330252180	20 kDa	8	7
129	60S ribosomal protein L10-3	gi 18408550 (+4)	25 kDa	5	6
130	40S ribosomal protein S16-3	gi 145334511 (+4)	17 kDa	6	3
131	V-type proton ATPase subunit D	gi 12643375 (+1)	29 kDa	13	3
132	phosphoinositide phospholipase C 2	gi 332641119 (+3)	66 kDa	5	4
133	bifunctional {beta}-D-xylosidase/{alpha}-L-arabinofuranosidase	gi 332008419 (+1)	84 kDa	8	10
134	metacaspase 4	gi 332198111 (+1)	45 kDa	7	10
135	60S ribosomal protein L24-1	gi 109893257 (+3)	19 kDa	7	7
136	60S ribosomal protein L23a-2	gi 145332855 (+9)	17 kDa	8	6
137	GTP-binding protein [Arabidopsis thaliana]	gi 15221444 (+2)	44 kDa	8	6
138	Coatomer subunit beta-1	gi 146286090 (+4)	106 kDa	10	3
139	acid beta-fructofuranosidase 3	gi 18407630 (+2)	72 kDa	5	2
140	40S ribosomal protein S20-1	gi 145334871 (+11)	14 kDa	7	5
141	fasciclin-like arabinogalactan protein 2	gi 332657771 (+1)	43 kDa	6	9
142	60S ribosomal protein L14-2	gi 332659899 (+1)	16 kDa	7	4
143	photosystem II light harvesting complex protein 2.2	gi 330250799 (+2)	29 kDa	8	4
144	Calcium-transporting ATPase 4, plasma membrane-type	gi 12229630 (+1)	113 kDa	9	4
145	60S ribosomal protein L13-3	gi 332005847 (+1)	23 kDa	5	5
146	protein ILITHYIA	gi 240254318 (+3)	285 kDa	15	2
147	tripeptidyl peptidase II	gi 30685230 (+2)	152 kDa	9	4
148	ATP synthase subunit beta, chloroplastic	gi 6686269	54 kDa	7	4
149	reversibly glycosylated polypeptide 1	gi 332640260 (+2)	41 kDa	9	0
150	Elongation factor Tu	gi 119194 (+1)	52 kDa	8	4

ш		A Number	D ALAZ	Exclusive sp	ectrum counts
#	Identified Proteins (399)	Accession Number	IVIVV	TuMV-1	Mock-1
151	Na+/Ca 2+ exchanger-like protein	gi 30695448 (+1)	63 kDa	10	3
152	60S ribosomal protein L26-1	gi 27735242 (+1)	17 kDa	8	6
153	probable mitochondrial-processing peptidase subunit beta	gi 332640240 (+1)	59 kDa	5	4
154	importin alpha isoform 2	gi 238480717 (+4)	59 kDa	8	7
155	ABC transporter B family member 19	gi 332643977 (+1)	137 kDa	9	7
156	uncharacterized protein	gi 240254592 (+2)	189 kDa	8	4
157	UDP-glucuronic acid decarboxylase 3	gi 145334845 (+3)	40 kDa	3	7
158	Phospholipase D alpha 2	gi 13124454 (+1)	92 kDa	8	7
159	uncharacterized protein AT3G08030	gi 332641111	39 kDa	0	12
160	PTI1-like tyrosine-protein kinase 2	gi 330253340 (+1)	41 kDa	10	4
161	regulatory particle triple-A ATPase 6A	gi 18420092 (+4)	47 kDa	6	8
162	Syntaxin-71	gi 28380165 (+1)	30 kDa	4	9
163	T-complex protein 1 subunit epsilon	gi 3024697 (+3)	59 kDa	3	10
164	V-type proton ATPase subunit F	gi 12585530 (+1)	14 kDa	6	3
165	1-phosphatidylinositol phosphodiesterase-related protein	gi 332661565	36 kDa	5	5
166	pyruvate kinase	gi 145332819 (+5)	52 kDa	8	7
167	eukaryotic translation initiation factor 5A-2	gi 145324016 (+3)	15 kDa	7	3
168	40S ribosomal protein S23-1	gi 27734450 (+3)	16 kDa	3	2
169	Chaperonin CPN60, mitochondrial	gi 12644189 (+1)	61 kDa	5	5
170	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase GAPA2	gi 186478427 (+5)	38 kDa	5	2
171	S-adenosylmethionine synthase 4	gi 332642427 (+1)	43 kDa	4	5
172	Hypersensitive-induced response protein 2	gi 145327201 (+13)	31 kDa	5	6
173	Protein kinase protein with tetratricopeptide repeat domain	gi 240254311 (+1)	55 kDa	6	4
174	glutathione S-transferase PHI 9	gi 330253354 (+1)	24 kDa	7	4
175	pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	gi 332189112 (+1)	47 kDa	7	8
176	Flavone 3'-O-methyltransferase 1	gi 24212073 (+1)	40 kDa	4	6
177	putative calcium-binding protein CML13	gi 332190744 (+1)	17 kDa	5	8
178	Full=Photosystem II CP43 reaction center protein	gi 374095488	52 kDa	8	6
179	Alcohol dehydrogenase class-3	gi 20141281 (+1)	41 kDa	3	5
180	Subtilase-like protein	gi 330250891	80 kDa	3	11

ц	Identified Proteins (399)	A	5.6347	Exclusive spectrum counts		
Ħ	Identified Proteins (399)	Accession Number	IVIVV	TuMV-1	Mock-1	
181	60S ribosomal protein L36-1	gi 145330683 (+12)	13 kDa	5	5	
182	Clathrin heavy chain 2	gi 122223626 (+2)	193 kDa	5	8	
183	60S ribosomal protein L32-1	gi 27735239 (+1)	16 kDa	5	5	
184	60S ribosomal protein L19-1	gi 20143885 (+1)	25 kDa	4	6	
185	BR-signaling kinase 1	gi 18418600 (+2)	57 kDa	8	4	
186	HAD superfamily, subfamily IIIB acid phosphatase	gi 332007666	31 kDa	6	5	
187	26S protease regulatory subunit 7 homolog A	gi 28558169 (+1)	48 kDa	0	7	
188	26S proteasome subunit RPT2B	gi 330251876 (+3)	49 kDa	5	1	
189	60S ribosomal protein L18a-3	gi 21362875 (+1)	21 kDa	4	6	
190	ATP synthase subunit alpha, chloroplastic	gi 6685244	55 kDa	8	5	
191	Malate dehydrogenase, cytoplasmic 1	gi 11133509 (+1)	36 kDa	4	5	
192	ADP-ribosylation factor-like A1D	gi 18425204 (+1)	20 kDa	8	4	
193	V-type proton ATPase subunit G1	gi 12585427 (+3)	12 kDa	9	3	
194	Jacalin-related lectin 35	gi 12230212 (+6)	48 kDa	10	4	
195	14-3-3-like protein GF14 nu	gi 3023217 (+1)	30 kDa	4	6	
196	TCP-1/cpn60 chaperonin family protein	gi 15229595 (+2)	58 kDa	6	4	
197	Formatetetrahydrofolate ligase	gi 332194434 (+1)	68 kDa	7	6	
198	isocitrate dehydrogenase	gi 332196321 (+1)	46 kDa	6	6	
199	synaptotagmin A	gi 330252015 (+3)	62 kDa	1	4	
200	regulatory particle triple-A ATPase 5A	gi 332640733 (+1)	47 kDa	7	3	
201	40S ribosomal protein S24-1	gi 11134742 (+1)	15 kDa	6	5	
202	putative cathepsin B-like cysteine protease	gi 332189292	40 kDa	3	5	
203	Tubulin beta-1 chain	gi 135442 (+1)	50 kDa	4	6	
204	Dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase component 2 of pyruvate	ail 119572000 (11)	EQLDO	5	c	
204	dehydrogenase complex, mitochondrial	gil1102/2020 (+1)	JOKDa	5	0	
205	uridine kinase-like 2	gi 332643756 (+1)	54 kDa	3	1	
206	Protein disulfide isomerase-like 1-2	gi 11134159 (+1)	56 kDa	5	2	
207	glutamyl/glutaminyl-tRNA synthetase, classIc	gi 30690281 (+1)	81 kDa	5	1	
208	alpha-soluble NSF attachment protein 2	gi 15228848 (+4)	33 kDa	6	5	
209	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	gi 23396624 (+1)	114 kDa	5	6	

	Identified Destains (200)		0.0347	Exclusive sp	ectrum counts
#	Identified Proteins (399)	Accession Number	IVIVV	TuMV-1	Mock-1
210	Photosystem I P700 chlorophyll a apoprotein A2	gi 6685789	82 kDa	4	7
211	50S ribosomal protein L12-3, chloroplastic	gi 21431811 (+3)	20 kDa	3	4
212	class II aaRS and biotin synthetases superfamily protein	gi 30695549 (+2)	61 kDa	4	4
213	Triosephosphate isomerase, cytosolic	gi 13432260 (+2)	27 kDa	4	2
214	FASCICLIN-like arabinogalactan protein 8	gi 18406799 (+2)	43 kDa	6	2
215	protein TRS120	gi 332004245 (+1)	130 kDa	4	8
216	light harvesting complex photosystem II subunit 6	gi 332191248	28 kDa	6	4
217	ATPase 6, plasma membrane-type	gi 12230478 (+1)	105 kDa	5	7
218	Probable elongation factor 1-gamma 1	gi 13626364 (+5)	47 kDa	6	5
219	S-adenosylmethionine synthase 2	gi 127045 (+4)	43 kDa	2	5
220	potassium channel beta subunit 1	gi 332189613 (+1)	37 kDa	2	6
221	Peroxidase 16	gi 25453203 (+1)	36 kDa	1	10
222	myrosinase 1	gi 30690085 (+4)	61 kDa	6	2
223	ABC transporter G family member 36	gi 332195511 (+1)	165 kDa	6	1
224	transketolase	gi 18411711 (+4)	80 kDa	6	4
225	26S proteasome regulatory subunit Rpn7	gi 18416433 (+4)	44 kDa	4	5
226	SH3 domain-containing protein	gi 332193235	49 kDa	4	4
227	Protein disulfide-isomerase like 2-1	gi 11132051 (+5)	39 kDa	5	4
228	Photosystem II D2 protein	gi 6685787	40 kDa	5	2
229	zinc-binding ribosomal protein family protein	gi 18411538 (+2)	10 kDa	4	6
230	14-3-3-like protein GF14 epsilon	gi 1345592 (+5)	29 kDa	6	2
231	serine hydroxymethyltransferase 4	gi 332657944 (+1)	52 kDa	2	6
232	Glutathione S-transferase F3	gi 12230166 (+1)	24 kDa	4	2
233	ras-related protein RABD2b	gi 18422766 (+4)	22 kDa	6	0
234	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 37	gi 108861890 (+1)	68 kDa	0	7
235	Serine/threonine-protein kinase SRK2A	gi 1168529 (+3)	41 kDa	5	4
236	syntaxin of plants 132	gi 18415701 (+4)	34 kDa	6	4
237	Translationally-controlled tumor protein homolog	gi 19883937 (+1)	19 kDa	3	3
238	Eukaryotic peptide chain release factor subunit 1-2	gi 18206253 (+4)	49 kDa	4	4
239	Ras-related protein RABE1c	gi 114088 (+5)	24 kDa	6	4

щ	Identified Proteins (200)	Accession Number	D ALAZ	Exclusive sp	ectrum counts
#	laentinea Proteins (399)	Accession Number	IVIVV	TuMV-1	Mock-1
240	nucleosome assembly protein 1;2	gi 145329176 (+5)	43 kDa	3	3
241	Xylose isomerase	gi 148877250 (+2)	54 kDa	4	2
242	lipoxygenase 2	gi 18407921 (+2)	102 kDa	3	3
243	60S ribosomal protein L7-3	gi 30689617 (+4)	28 kDa	5	5
244	cellulose synthase-interactive protein 1	gi 330252175 (+1)	231 kDa	5	4
245	transducin/WD40 domain-containing protein	gi 332645163 (+1)	176 kDa	5	4
246	developmentally regulated G-protein	gi 332661681 (+1)	41 kDa	5	5
247	60S ribosomal protein L30-2	gi 18411753 (+2)	12 kDa	4	4
248	26S proteasome AAA-ATPase subunit RPT4a	gi 332007517 (+1)	45 kDa	6	3
249	fasciclin-like arabinogalactan protein 7	gi 30678131 (+3)	27 kDa	6	4
250	Cysteine synthase 1	gi 12643284 (+7)	34 kDa	5	1
251	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FKBP15-2	gi 23396587 (+1)	18 kDa	4	2
252	Ras-related protein RABG3f	gi 332642631 (+1)	23 kDa	4	4
253	beta-galactosidase 10	gi 332010417 (+1)	83 kDa	0	6
254	serine/threonine-protein phosphatase 2A regulatory subunit A alpha isoform	gi 332192511 (+1)	65 kDa	4	2
255	Peroxidase 32	gi 166898075 (+4)	39 kDa	3	4
256	Myosin XI K	gi 238481323 (+4)	167 kDa	4	3
257	UTPglucose-1-phosphate uridylyltransferase 1	gi 12585448 (+1)	52 kDa	3	3
258	sec23/sec24-like transport protein	gi 145361384 (+5)	85 kDa	2	6
259	Exocyst complex component SEC10	gi 152013638 (+8)	90 kDa	2	3
260	Adenosine kinase 2	gi 17366963 (+5)	38 kDa	4	3
261	aldehyde dehydrogenase 2B4	gi 332644834 (+1)	59 kDa	3	6
262	calcium-dependent protein kinase 6	gi 332659389 (+1)	59 kDa	5	4
263	ubiquitin-conjugating enzyme E2 36	gi 18394416 (+2)	17 kDa	3	2
264	Elongation factor 1-beta 2	gi 30687350 (+2)	24 kDa	3	2
265	uncharacterized protein	gi 238480782 (+3)	49 kDa	2	6
266	Quinone reductase family protein	gi 332661297 (+1)	29 kDa	3	6
267	cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1	gi 22325430 (+4)	135 kDa	4	2
268	60S ribosomal protein L34-2	gi 332196835 (+1)	14 kDa	2	4
269	AlaninetRNA ligase	gi 21542451 (+4)	110 kDa	1	4

щ	Identified Ductoing (200)	Accession Number	5.4147	Exclusive sp	ectrum counts
Ħ	Identified Proteins (399)	Accession Number	IVIVV	TuMV-1	Mock-1
270	Cytochrome f	gi 6685374	35 kDa	2	5
271	histone H4	gi 145323776 (+17)	9 kDa	6	2
272	uncharacterized protein	gi 145332799 (+4)	29 kDa	6	3
273	Cytochrome b6	gi 6685349	24 kDa	4	4
274	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain 1B, chloroplastic	gi 132090 (+1)	20 kDa	0	3
275	VAC 14-like protein	gi 330250391 (+1)	84 kDa	4	3
276	Peroxidase 45	gi 26397742 (+1)	36 kDa	3	5
277	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein	gi 30678667 (+2)	30 kDa	2	4
278	NADH-ubiquinone oxidoreductase subunit	gi 18421656 (+4)	82 kDa	4	3
279	40S ribosomal protein S11-2	gi 11134432 (+5)	18 kDa	4	3
280	putative mitochondrial-processing peptidase subunit alpha-1	gi 145324909 (+5)	49 kDa	6	2
281	cytochrome c oxidase subunit 5b-1	gi 145332591 (+3)	19 kDa	4	4
282	60S ribosomal protein L18a-2	gi 21431842 (+1)	21 kDa	4	3
283	uncharacterized protein AT5G39570	gi 332007065 (+2)	44 kDa	3	2
284	flavodoxin-like quinone reductase 1	gi 332009119 (+1)	22 kDa	4	3
285	calcium-dependent protein kinase 21	gi 332657016 (+1)	60 kDa	2	4
286	Ras-related protein RABA1b	gi 15219955 (+2)	24 kDa	2	2
287	uncharacterized protein	gi 18425071 (+3)	70 kDa	1	3
288	phosphoglycerate kinase 1	gi 332641725 (+1)	50 kDa	2	3
289	putative pectinesterase/pectinesterase inhibitor 17	gi 330255433 (+1)	56 kDa	2	4
290	acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit alpha	gi 30687368 (+3)	85 kDa	2	5
291	Succinyl-CoA ligase [GDP-forming] subunit alpha-1	gi 332003896 (+3)	36 kDa	4	2
292	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1	gi 332003932 (+1)	53 kDa	0	3
293	GTP-binding nuclear protein Ran-1	gi 1172833 (+5)	25 kDa	5	1
294	Granulin repeat cysteine protease family protein	gi 18422289 (+1)	51 kDa	4	0
295	vacuolar proton ATPase A2	gi 330252081 (+1)	93 kDa	5	2
296	SecY protein transport family protein	gi 186479015 (+4)	52 kDa	3	2
297	eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	gi 15228840 (+4)	103 kDa	6	2
298	Cvtochrome b5 isoform E	gi 18206375 (+1)	15 kDa	6	2

щ		A	N (1) (1)	Exclusive sp	ectrum counts
#	Identified Proteins (399)	Accession Number	IVIV	TuMV-1	Mock-1
299	Calcium-binding tetratricopeptide family protein	gi 332189674 (+1)	90 kDa	4	4
300	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1	gi 332196086 (+1)	53 kDa	0	7
301	protein EMBRYO DEFECTIVE 2753	gi 22330770 (+3)	102 kDa	3	1
302	Monodehydroascorbate reductase	gi 18407925 (+6)	53 kDa	2	4
303	phospholipase D delta	gi 18419668 (+4)	99 kDa	4	2
304	Chlorophyll a-b binding protein 4, chloroplastic	gi 115385 (+2)	28 kDa	3	2
305	Proteasome subunit alpha type-5-A	gi 12229903 (+5)	26 kDa	3	3
306	Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c	gi 12644165 (+1)	71 kDa	3	2
307	60S ribosomal protein L38	gi 3122724 (+2)	8 kDa	3	3
308	auxin efflux transmembrane transporter MDR4	gi 330255691 (+4)	139 kDa	3	4
309	protein exordium like 4	gi 332004010 (+1)	29 kDa	2	4
310	40S ribosomal protein S3a-1	gi 332640622 (+1)	30 kDa	3	4
311	20S proteasome subunit PBA1	gi 332660487 (+5)	25 kDa	3	4
312	50S ribosomal protein L2, chloroplastic	gi 6685857	30 kDa	3	4
313	Photosystem I reaction center subunit XI, chloroplastic	gi 18203449 (+1)	23 kDa	2	1
314	xylem serine proteinase 1	gi 18411254 (+2)	80 kDa	1	2
315	leucine-rich repeat-containing protein	gi 332642907	40 kDa	1	4
316	dirigent-like protein DIR5	gi 332196082 (+1)	21 kDa	2	5
317	Glycerophosphodiester phosphodiesterase GDPDL1	gi 115502214 (+4)	84 kDa	4	2
318	20S proteasome alpha subunit PAD1	gi 15230435 (+4)	27 kDa	5	2
319	Ras-related small GTP-binding protein	gi 332189329	14 kDa	3	2
320	photosystem I subunit F	gi 332193221 (+1)	24 kDa	4	2
321	histone H3	gi 18390992 (+10)	15 kDa	5	2
322	tetraspanin3	gi 332644528 (+1)	32 kDa	4	2
323	calcium-dependent lipid-binding transcriptional regulator	gi 332646623 (+2)	55 kDa	5	2
324	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 12	gi 166201361 (+11)	131 kDa	0	2
325	Probable phosphoglucomutase, cytoplasmic 2	gi 12585324 (+5)	63 kDa	1	4
326	protein TPLATE	gi 30678420 (+2)	131 kDa	4	1
327	Succinyl-CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	gi 21264030 (+1)	45 kDa	4	1
328	Glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase 2, chloroplastic	gi 14195661 (+1)	50 kDa	1	4

184

щ	Identified Protoine (200)	Accession Number	D ALA/	Exclusive sp	ectrum counts
#	identified Proteins (399)	Accession Number	IVIVV	TuMV-1	Mock-1
329	glycine-rich RNA-binding protein 7	gi 30681492 (+3)	16 kDa	1	5
330	coatomer subunit beta'-2	gi 332194671 (+3)	104 kDa	2	3
331	UDP-L-rhamnose synthase	gi 15218420 (+2)	75 kDa	2	4
332	26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4 homolog	gi 1709794 (+1)	41 kDa	1	4
333	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpC	gi 18423214 (+2)	103 kDa	2	4
334	50S ribosomal protein L15, chloroplastic	gi 21431836 (+1)	30 kDa	0	3
335	heat shock factor binding protein	gi 240255880 (+1)	9 kDa	2	4
336	RAB GTPase homolog G3D	gi 332194656 (+1)	23 kDa	2	3
337	Pyridoxamine 5'-phosphate oxidase family protein	gi 332642945	43 kDa	1	3
338	developmentally regulated G-protein 1	gi 145323932 (+3)	45 kDa	4	2
339	Proteasome subunit alpha type-3	gi 12644056 (+1)	27 kDa	4	1
340	armadillo/beta-catenin-like repeat-containing protein	gi 15238758 (+2)	96 kDa	5	1
341	exocyst subunit exo70 family protein A1	gi 22326587 (+4)	72 kDa	4	2
342	ureidoglycolate amidohydrolase	gi 22327548 (+8)	51 kDa	4	2
343	transport protein SEC31	gi 30695804 (+6)	120 kDa	4	2
344	protein disulfide isomerase-like 1-4	gi 30697404 (+6)	66 kDa	4	1
345	leucine-rich repeat protein kinase family protein	gi 332640352 (+1)	68 kDa	4	2
346	dihydrolipoyl dehydrogenase	gi 240255914 (+2)	67 kDa	0	5
347	uncharacterized protein	gi 15239049 (+1)	40 kDa	0	3
348	beta-glucosidase 44	gi 15229584 (+2)	59 kDa	0	5
349	Germin-like protein subfamily 2 member 4	gi 18203246 (+3)	24 kDa	0	3
350	xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase protein 4	gi 330250927 (+1)	34 kDa	0	3
351	Cinnamyl alcohol dehydrogenase 5	gi 13626131 (+3)	39 kDa	0	6
352	multi-copper oxidase-like protein SKU5	gi 332657728 (+3)	66 kDa	3	2
353	Photosystem I reaction center subunit N, chloroplastic	gi 1709825 (+1)	18 kDa	2	0
354	ABC transporter B family member 1	gi 330254226 (+1)	141 kDa	1	2
355	Munc13-like protein PATROL1	gi 22326641 (+1)	125 kDa	2	2
356	Adenylate kinase 3	gi 29428000 (+1)	27 kDa	2	3
357	pyrophosphatefructose-6-phosphate 1-phosphotransferase	gi 332190704 (+1)	61 kDa	2	3
358	Vacuolar protein sorting-associated protein 41 homolog	gi 114152909 (+2)	110 kDa	3	2

#	Identified Proteins (399)	Accession Number	MW	Exclusive spectrum counts	
				TuMV-1	Mock-1
359	Phospholipase D gamma 2	gi 148887408 (+6)	96 kDa	3	2
360	endomembrane family protein 70	gi 18420880 (+7)	74 kDa	3	2
361	cytochrome B5 isoform D	gi 332008344 (+1)	15 kDa	2	0
362	probable beta-D-xylosidase 2	gi 332189332 (+1)	83 kDa	3	2
363	ATP binding/leucine-tRNA ligases/aminoacyl-tRNA ligases	gi 332190348 (+1)	123 kDa	3	1
364	dynamin-like protein 6	gi 332190441 (+1)	99 kDa	3	2
365	GMP-synthase-C and glutamine amidotransferase domain-containing protein	gi 332196006	59 kDa	3	2
366	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 3	gi 41019517	23 kDa	3	2
367	lipoxygenase 1	gi 332195054 (+1)	98 kDa	3	0
368	protein SEC6	gi 18409922 (+4)	86 kDa	3	0
369	auxin transport protein BIG	gi 30678519 (+2)	568 kDa	4	0
370	dynamin-related protein 1E	gi 18411520 (+2)	70 kDa	3	0
371	tRNA synthetase class I (I, L, M and V) family protein	gi 30681405 (+1)	135 kDa	0	5
372	prohibitin 3	gi 332007209 (+5)	30 kDa	1	3
373	Proteasome subunit alpha type-4-A	gi 12643237 (+1)	27 kDa	2	2
374	Ras-related protein Rab-18	gi 145324172 (+5)	24 kDa	3	1
375	Calcium-transporting ATPase 9	gi 150421517 (+2)	119 kDa	3	2
376	RNAse l inhibitor protein 2	gi 22328793 (+2)	68 kDa	0	2
377	sugar transporter ERD6-like 4	gi 332191732 (+1)	53 kDa	4	0
378	brefeldin A-inhibited guanine nucleotide-exchange protein 5	gi 332644265 (+2)	191 kDa	3	0
379	GTP-binding protein Rab7	gi 332192158 (+1)	23 kDa	3	0
380	phosphoserine aminotransferase	gi 15237069 (+2)	47 kDa	0	4
381	Proteinase inhibitor, propeptide	gi 18409953 (+1)	15 kDa	0	3
382	COP1-interactive protein 1	gi 186528371 (+1)	182 kDa	4	0
383	Vesicle-fusing ATPase; N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein	gi 28201831 (+2)	81 kDa	4	0
384	Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein	gi 30692796 (+5)	17 kDa	3	0
385	methylenetetrahydrofolate reductase 1	gi 332646473 (+1)	66 kDa	0	4
386	6-phosphofructokinase 1	gi 332660204 (+1)	52 kDa	0	4
387	two pore calcium channel protein 1	gi 18412295 (+2)	85 kDa	2	0
388	curculin-like (mannose-binding) lectin family protein	gi 15219200 (+3)	49 kDa	1	2

#	Identified Proteins (399)	Accession Number	MW	Exclusive spectrum counts	
				TuMV-1	Mock-1
389	carbohydrate-binding-like fold protein, partial	gi 700256635	113 kDa	3	0
390	WD40 domain-containing protein	gi 145358405 (+1)	148 kDa	3	0
391	Beta-D-glucopyranosyl abscisate beta-glucosidase	gi 166897681 (+5)	60 kDa	3	0
392	UDP-D-apiose/UDP-D-xylose synthase 2	gi 18390863 (+2)	44 kDa	3	0
393	dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit	gi 18425101 (+2)	49 kDa	3	0
394	uridine kinase-like 4	gi 240256077 (+4)	53 kDa	0	3
395	Probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase	gi 264664588 (+1)	115 kDa	2	0
396	dihydrolipoyl dehydrogenase 2	gi 30684419 (+8)	54 kDa	0	3
397	50S ribosomal protein L1	gi 332646971 (+1)	38 kDa	0	3
398	FAD-binding and BBE domain-containing protein	gi 332658967	60 kDa	0	3
399	Syntaxin-121	gi 28380149 (+3)	38 kDa	1	0

Références

- ABELS, E. R. et BREAKEFIELD, X. O. (2016). Introduction to extracellular vesicles : biogenesis, RNA cargo selection, content, release, and uptake.
- AGBECI, M., GRANGEON, R., NELSON, R. S., ZHENG, H. et LALIBERTÉ, J.-F. (2013). "Contribution of host intracellular transport machineries to intercellular movement of turnip mosaic virus". In : *PLoS pathogens* 9.10, e1003683.
- AHSAN, N. A., SAMPEY, G. C., LEPENE, B., AKPAMAGBO, Y., BARCLAY, R. A., IOR-DANSKIY, S., HAKAMI, R. M. et KASHANCHI, F. (2016). "Presence of viral RNA and proteins in exosomes from cellular clones resistant to RIFT valley fever virus infection". In : Frontiers in microbiology 7.
- AKERS, J. C., GONDA, D., KIM, R., CARTER, B. S. et CHEN, C. C. (2013). "Biogenesis of extracellular vesicles (EV) : exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies". In : *Journal of neuro-oncology* 113.1, p. 1–11.
- AN, Q., BEL, A. J. van et HÜCKELHOVEN, R. (2007). "Do plant cells secrete exosomes derived from multivesicular bodies?" In : *Plant signaling & amp ; behavior* 2.1, p. 4–7.
- AN, Q., EHLERS, K., KOGEL, K.-H., VAN BEL, A. J. et HÜCKELHOVEN, R. (2006). "Multivesicular compartments proliferate in susceptible and resistant MLA12-barley leaves in response to infection by the biotrophic powdery mildew fungus". In : New Phytologist 172.3, p. 563–576.
- AN, Q., HÜCKELHOVEN, R., KOGEL, K.-H. et VAN BEL, A. J. (2006). "Multivesicular bodies participate in a cell wall-associated defence response in barley leaves attacked by the pathogenic powdery mildew fungus". In : *Cellular microbiology* 8.6, p. 1009–1019.
- ARENACCIO, C., CHIOZZINI, C., COLUMBA-CABEZAS, S., MANFREDI, F., AFFABRIS,
 E., BAUR, A. et FEDERICO, M. (2014). "Exosomes from human immunodeficiency virus
 type 1 (HIV-1)-infected cells license quiescent CD4+ T lymphocytes to replicate HIV-

1 through a Nef-and ADAM17-dependent mechanism". In : *Journal of virology* 88.19, p. 11529–11539.

- BERN, M. M. (2017). "Extracellular vesicles : how they interact with endothelium, potentially contributing to metastatic cancer cell implants". In : *Clinical and translational medicine* 6.1, p. 33.
- BUKONG, T. N., MOMEN-HERAVI, F., KODYS, K., BALA, S. et SZABO, G. (2014). "Exosomes from hepatitis C infected patients transmit HCV infection and contain replication competent viral RNA in complex with Ago2-miR122-HSP90". In : *PLoS pathogens* 10.10, e1004424.
- BUREAU, M., LEH, V., HAAS, M., GELDREICH, A., RYABOVA, L., YOT, P. et KELLER, M. (2004). "P6 protein of Cauliflower mosaic virus, a translation reinitiator, interacts with ribosomal protein L13 from Arabidopsis thaliana". In : *Journal of general virology* 85.12, p. 3765–3775.
- CANITANO, A., VENTURI, G., BORGHI, M., AMMENDOLIA, M. G. et FAIS, S. (2013). "Exosomes released in vitro from Epstein–Barr virus (EBV)-infected cells contain EBVencoded latent phase mRNAs". In : *Cancer letters* 337.2, p. 193–199.
- CAÑIZARES, M. C., LOZANO-DURÁN, R., CANTO, T., BEJARANO, E. R., BISARO, D. M., NAVAS-CASTILLO, J. et MORIONES, E. (2013). "Effects of the crinivirus coat protein– interacting plant protein SAHH on post-transcriptional RNA silencing and its suppression".
 In : *Molecular Plant-Microbe Interactions* 26.9, p. 1004–1015.
- CHEN, H., ADAM ARSOVSKI, A., YU, K. et WANG, A. (2017). "Deep sequencing leads to the identification of eukaryotic translation initiation factor 5a as a key element in Rsv1-mediated lethal systemic hypersensitive response to Soybean mosaic virus infection in Soybean". In : *Molecular plant pathology* 18.3, p. 391–404.
- CHEN, J. et AHLQUIST, P. (2000). "Brome mosaic virus polymerase-like protein 2a is directed to the endoplasmic reticulum by helicase-like viral protein 1a". In : *Journal of Virology* 74.9, p. 4310–4318.
- CHEN, M.-H. et CITOVSKY, V. (2003). "Systemic movement of a tobamovirus requires host cell pectin methylesterase". In : *The Plant Journal* 35.3, p. 386–392.
- CIREGIA, F., URBANI, A. et PALMISANO, G. (2017). "Extracellular Vesicles in Brain Tumors and Neurodegenerative Diseases". In : *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10, p. 276.
- CLOUTIER, P., LAVALLÉE-ADAM, M., FAUBERT, D., BLANCHETTE, M. et COULOMBE,
 B. (2014). "Methylation of the DNA/RNA-binding protein Kin17 by METTL22 affects its association with chromatin". In : *Journal of proteomics* 100, p. 115–124.
- COTTON, S., GRANGEON, R., THIVIERGE, K., MATHIEU, I., IDE, C., WEI, T., WANG,
 A. et LALIBERTÉ, J.-F. (2009). "Turnip mosaic virus RNA replication complex vesicles are mobile, align with microfilaments, and are each derived from a single viral genome".
 In : Journal of virology 83.20, p. 10460–10471.
- DREYER, F. et BAUR, A. (2016). "Biogenesis and functions of exosomes and extracellular vesicles". In : *Lentiviral Vectors and Exosomes as Gene and Protein Delivery Tools*, p. 201–216.
- DUFRESNE, P. J., THIVIERGE, K., COTTON, S., BEAUCHEMIN, C., IDE, C., UBALIJORO, E., LALIBERTÉ, J.-F. et FORTIN, M. G. (2008). "Heat shock 70 protein interaction with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase within virus-induced membrane vesicles". In : *Virology* 374.1, p. 217–227.
- FENG, Z., HENSLEY, L., MCKNIGHT, K. L., HU, F., MADDEN, V., PING, L., JEONG, S.H., WALKER, C., LANFORD, R. E. et LEMON, S. M. (2013). "A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes". In : *Nature* 496.7445, p. 367–371.

- FLESHNER, M. et CRANE, C. R. (2017). "Exosomes, DAMPs and miRNA : Features of Stress Physiology and Immune Homeostasis". In : *Trends in immunology* 38.10, p. 768– 776.
- GRANGEON, R., AGBECI, M., CHEN, J., GRONDIN, G., ZHENG, H. et LALIBERTÉ, J.-F. (2012). "Impact on the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus of turnip mosaic virus infection". In : *Journal of virology* 86.17, p. 9255–9265.
- GRANGEON, R., JIANG, J., WAN, J., AGBECI, M., ZHENG, H. et LALIBERTÉ, J.-F.
 (2013). "6K2-induced vesicles can move cell to cell during turnip mosaic virus infection".
 In : Frontiers in microbiology 4.
- GU, Y. et INNES, R. W. (2012). "The KEEP ON GOING protein of Arabidopsis regulates intracellular protein trafficking and is degraded during fungal infection". In : *The Plant Cell* 24.11, p. 4717–4730.
- GUIX, F. X., SANNERUD, R., BERDITCHEVSKI, F., ARRANZ, A. M., HORRÉ, K., SNELLINX, A., THATHIAH, A., SAIDO, T., SAITO, T., RAJESH, S. et al. (2017). "Tetraspanin 6 : a pivotal protein of the multiple vesicular body determining exosome release and lysosomal degradation of amyloid precursor protein fragments". In : *Molecular neurodegeneration* 12.1, p. 25.
- GYÖRGY, B., SZABÓ, T. G., PÁSZTÓI, M., PÁL, Z., MISJÁK, P., ARADI, B., LÁSZLÓ,
 V., PÁLLINGER, É., PAP, E., KITTEL, Á. et al. (2011). "Membrane vesicles, current state-of-the-art : emerging role of extracellular vesicles". In : *Cellular and molecular life sciences* 68.16, p. 2667–2688.
- JIANG, J., PATARROYO, C., CABANILLAS, D. G., ZHENG, H. et LALIBERTÉ, J.-F. (2015).
 "The vesicle-forming 6K2 protein of turnip mosaic virus interacts with the COPII coatomer Sec24a for viral systemic infection". In : *Journal of virology* 89.13, p. 6695–6710.

- KALDE, M., NÜHSE, T. S., FINDLAY, K. et PECK, S. C. (2007). "The syntaxin SYP132 contributes to plant resistance against bacteria and secretion of pathogenesis-related protein 1". In : Proceedings of the National Academy of Sciences 104.28, p. 11850–11855.
- KOUWAKI, T., FUKUSHIMA, Y., DAITO, T., SANADA, T., YAMAMOTO, N., MIFSUD,
 E. J., LEONG, C. R., TSUKIYAMA-KOHARA, K., KOHARA, M., MATSUMOTO, M. et al. (2016). "Extracellular vesicles including exosomes regulate innate immune responses to hepatitis b virus infection". In : *Frontiers in immunology* 7.
- LALIBERTÉ, J.-F. et ZHENG, H. (2014). "Viral manipulation of plant host membranes". In : Annual review of virology 1, p. 237–259.
- LAWSON, C., KOVACS, D., FINDING, E., ULFELDER, E. et LUIS-FUENTES, V. (2017).
 "Focus : Comparative Medicine : Extracellular Vesicles : Evolutionarily Conserved Mediators of Intercellular Communication". In : *The Yale journal of biology and medicine* 90.3, p. 481.
- LIGAT, L., LAUBER, E., ALBENNE, C., CLEMENTE, H. S., VALOT, B., ZIVY, M., PONT-LEZICA, R., ARLAT, M. et JAMET, E. (2011). "Analysis of the xylem sap proteome of Brassica oleracea reveals a high content in secreted proteins". In : *Proteomics* 11.9, p. 1798–1813.
- LIONETTI, V., RAIOLA, A., CERVONE, F. et BELLINCAMPI, D. (2014a). "How do pectin methylesterases and their inhibitors affect the spreading of tobamovirus?" In : *Plant signaling & amp ; behavior* 9.12, e972863.
- (2014b). "Transgenic expression of pectin methylesterase inhibitors limits tobamovirus spread in tobacco and Arabidopsis". In : *Molecular plant pathology* 15.3, p. 265–274.
- LONGATTI, A., BOYD, B. et CHISARI, F. V. (2015). "Virion-independent transfer of replication-competent hepatitis C virus RNA between permissive cells". In : *Journal of virology* 89.5, p. 2956–2961.

- MASCIOPINTO, F., GIOVANI, C., CAMPAGNOLI, S., GALLI-STAMPINO, L., COLOM-BATTO, P., BRUNETTO, M., YEN, T., HOUGHTON, M., PILERI, P. et ABRIGNANI, S. (2004). "Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes". In : *European journal of immunology* 34.10, p. 2834–2842.
- MCMULLEN, C., GARDNER, W. et MYERS, G. (1977). "Ultrastructure of cell-wall thickenings and paramural bodies induced by barley stripe mosaic virus". In : *Phytopathology* 67, p. 462–7.
- MEYER, D., PAJONK, S., MICALI, C., O'CONNELL, R. et SCHULZE-LEFERT, P. (2009).
 "Extracellular transport and integration of plant secretory proteins into pathogen-induced cell wall compartments". In : *The Plant Journal* 57.6, p. 986–999.
- NIELSEN, M. E., FEECHAN, A., BÖHLENIUS, H., UEDA, T. et THORDAL-CHRISTENSEN,
 H. (2012). "Arabidopsis ARF-GTP exchange factor, GNOM, mediates transport required for innate immunity and focal accumulation of syntaxin PEN1". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.28, p. 11443–11448.
- PEREZ-HERNANDEZ, D., GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ, C., JORGE, I., LÓPEZ-MARTÍN, S., URSA, A., SÁNCHEZ-MADRID, F., VÁZQUEZ, J. et YÁÑEZ-MÓ, M. (2013). "The intracellular interactome of tetraspanin-enriched microdomains reveals their function as sorting machineries toward exosomes". In : *Journal of Biological Chemistry* 288.17, p. 11649– 11661.
- REGENTE, M., CORTI-MONZÓN, G., MALDONADO, A. M., PINEDO, M., JORRÍN, J. et CANAL, L. de la (2009). "Vesicular fractions of sunflower apoplastic fluids are associated with potential exosome marker proteins". In : *FEBS letters* 583.20, p. 3363–3366.
- RESTREPO-HARTWIG, M. A. et CARRINGTON, J. C. (1994). "The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication." In : *Journal of virology* 68.4, p. 2388–2397.

- RUTTER, B. et INNES, R. W. (2017). "Extracellular vesicles isolated from the leaf apoplast carry stress-response proteins". In : *Plant physiology*, pp–01253.
- RYABOVA, L, PARK, H.-S. et HOHN, T (2004). Control of translation reinitiation on the cauliflower mosaic virus (CaMV) polycistronic RNA.
- THIVIERGE, K., COTTON, S., DUFRESNE, P. J., MATHIEU, I., BEAUCHEMIN, C., IDE, C., FORTIN, M. G. et LALIBERTÉ, J.-F. (2008). "Eukaryotic elongation factor 1A interacts with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase and VPg-Pro in virus-induced vesicles". In : Virology 377.1, p. 216–225.
- TURTURICI, G., TINNIRELLO, R., SCONZO, G. et GERACI, F. (2014). "Extracellular membrane vesicles as a mechanism of cell-to-cell communication : advantages and disadvantages". In : *American Journal of Physiology-Cell Physiology* 306.7, p. C621–C633.
- UCHIYAMA, A., SHIMADA-BELTRAN, H., LEVY, A., ZHENG, J. Y., JAVIA, P. A. et LAZA-ROWITZ, S. G. (2014). "The Arabidopsis synaptotagmin SYTA regulates the cell-to-cell movement of diverse plant viruses". In : *Frontiers in plant science* 5.
- WAN, J., CABANILLAS, D. G., ZHENG, H. et LALIBERTÉ, J.-F. (2015). "Turnip mosaic virus moves systemically through both phloem and xylem as membrane-associated complexes". In : *Plant physiology* 167.4, p. 1374–1388.
- WAN, J. et LALIBERTÉ, J.-F. (2015). "Membrane-associated virus replication complexes locate to plant conducting tubes". In : *Plant signaling & amp ; behavior* 10.8, e1042639.
- WANG, J., WANG, X.-r., ZHOU, Q., YANG, J.-m., GUO, H.-x., YANG, L.-j. et LIU, W.-q. (2016). "iTRAQ protein profile analysis provides integrated insight into mechanisms of tolerance to TMV in tobacco (Nicotiana tabacum)". In : *Journal of proteomics* 132, p. 21–30.
- WANG, J., DING, Y., WANG, J., HILLMER, S., MIAO, Y., LO, S. W., WANG, X., RO-BINSON, D. G. et JIANG, L. (2010). "EXPO, an exocyst-positive organelle distinct from

multivesicular endosomes and autophagosomes, mediates cytosol to cell wall exocytosis in Arabidopsis and tobacco cells". In : *The Plant Cell* 22.12, p. 4009–4030.

- WANG, R. Y.-L. et NAGY, P. D. (2008). "Tomato bushy stunt virus co-opts the RNAbinding function of a host metabolic enzyme for viral genomic RNA synthesis". In : *Cell host & amp ; microbe* 3.3, p. 178–187.
- WEI, T., HIBINO, H. et OMURA, T. (2009). "Release of Rice dwarf virus from insect vector cells involves secretory exosomes derived from multivesicular bodies". In : *Communicative* & amp ; integrative biology 2.4, p. 324–326.
- XU, J.-Y., CHEN, G.-H. et YANG, Y.-J. (2017). "Exosomes : A Rising Star in Failing Hearts". In : *Frontiers in physiology* 8, p. 494.
- YANG, Y., HAN, Q., HOU, Z., ZHANG, C., TIAN, Z. et ZHANG, J. (2017). "Exosomes mediate hepatitis B virus (HBV) transmission and NK-cell dysfunction". In : *Cellular* & molecular immunology 14.5, p. 465–475.

CHAPITRE 5

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les virus à ARN+ remodèlent le système endomembranaire des cellules hôtes afin d'y édifier leurs usines de réplication virale. Ces dernières années, d'importantes avancées dans la compréhension du rôle des usines virales de virus animaux et de plantes ont été possible du fait de l'avenement de la microscopie confocale et de la mise en place d'outils de clonage performants pour générer des clones infectieux ou des réplicons de taille conséquentes. De plus, l'exploitation des propriétés de la bactérie Agrobacterium tumefaciens en biologie végétale a grandement facilité l'étude de protéines *in situ*. Par extension, ces améliorations ont permis d'approfondir les connaissances sur les virus de plantes et particulièrement sur les potyvirus. La protéine virale 6K2 associée aux membranes est responsable de la formation des usines de réplication virale des potyvirus qui prennent naissance dans le RE. Bien que depuis la création d'un clone infectieux du potyvirus TuMV permettant de localiser les usines virales in situ ai conduit à de considérables avancées, notamment dans leur implication dans la réplication, le mouvement intra- et intercellulaire et systémique, aucune information au-delà de leur formation et export du RE COPII dépendant n'est disponible. De ce fait, les projets de recherches menés au cours de la présente thèse ont permis de répondre à ces interrogations en clarifiant le devenir des usines de réplication du TuMV et en identifiant des facteurs de l'hôte nécessaires à ces processus. L'identification de motifs et de résidus d'acide aminé essentiels dans la protéine 6K₂ par des approches bio-informatiques d'alignement de séquences, l'emploi de mutagenèses dirigées et d'observations de microscopie confocale ont permis de mettre en évidence le rôle important d'un motif transmembranaire GxxxG dans le transport des usines virales du TuMV. Le motif de type GxxxG est bien connu pour être impliqué dans les interactions protéine-protéine.



Figure 5.1 – Test d'interaction entre les protéines 6K₂ et/ou VAP27. (A) Western blot d'échantillons ayant subit des expériences de coimmunoprécipitation entre la protéine 6K₂-mCherry et la protéine VAP27-GFP normale ou mutée dans le domaine GxxxG (VAP27^{GV}-GFP). (B-C) Images de microscopie confocale des tests d'intéraction par BIFC (*Bimolecular fluorescence complémentation*). Les vecteurs vides sont pnYFP et pcYFP. (B) Tests contrôles pour d'autoactivation du système entre (1, panneaux de droite] pnYFP et pcYFP-VAP27 ou pcYFP-6K₂ et (2, panneaux de gauche) entre pcYFP et pnYFP-6K₂ ou pnYFP-6K₂^{GV}. (C) Test d'interaction entre (1) VAP27 et 6K₂, (2) 6K₂ et 6K₂, (3) VAP27 et 6K₂^{GV}, (4) 6K₂^{GV} et 6K₂. nYFP : moitiée N terminale de la protéine *Green fluorescent protein*, protéine de fluorescence jaune (YFP), cYFP : moitiée C terminale de la protéine YFP.

Cependant, ce motif ne semble pas être impliqué dans l'auto-interaction de $6K_2$ ou de 6K₂ avec VAP27 qui contient lui aussi un motif GxxxG dans son domaine transmembranaire, car les interactions sont encore maintenues lorsque les résidus glycines du motif GxxxG de ces dernières sont remplacés par des valines (Figure 5.1). L'auto-interaction de 6K2 a été mise en évidence par BIFC (bimolecular fluorescence complementation) et par co-immunoprécipitation. L'auto-interaction de protéines virales responsables de la biogenèse des usines virales a été montrée pour de nombreux virus à ARN+, notamment la protéine p33 du TBSV, du CTV, les protéines TGBp du PMTV, la protéine 1a du BMV ou encore la protéine NS4B du HCV (KANG, DAO et al. 2017; RAJENDRAN et NAGY 2004; RAJEN-DRAN et NAGY 2006; COWAN, LIOLIOPOULOU et al. 2002; DIAZ, GALLEI et AHLQUIST 2012; PAUL, ROMERO-BREY et al. 2011). L'interaction entre protéines $6K_2$ doit sans doute être requise durant l'infection (réplication) telle qu'observée pour d'autres virus, sans pour autant impliquer de motif GxxxG, mais cela reste à être déterminé. Cependant, nous avons identifié que le motif GxxxG était essentiel au transport intracellulaire des usines virales du TuMV. Ces usines sortent du RE par une association de la protéine virale 6K $_2$ avec le coatomère Sec24A.De ce fait, l'hypothèse qui s'en suivait était de considérer que les usines virales suivaient la voie conventionnelle de sécrétion tel que suggéré pour le TEV. En revanche, en dépit de l'association de virus à ARN+ avec des coatomères, il a été montré que certains d'entre eux pouvaient manipuler leur fonction initiale, sans nécessairement entrer dans la voie conventionnelle de sécrétion. Par exemple, le BMV utilise le coatomère COPII Erv14 de la voie antérograde (RE vers appareil de Golgi) pour rediriger sa protéine membranaire 1a vers l'espace périnucléaire au lieu de la voie de sécrétion (LI, FUCHS et al. 2016). Le DENV déjoue la fonction classique de la voie rétrograde COPI pour mener à l'accumulation de ses protéines de capside vers la périphérie des gouttelettes lipidiques et servir de lieu d'assemblage des particules virales (IGLESIAS, MONDOTTE et al. 2015). Dans notre étude, le remplacement des résidus glycine du motif GxxxG par des valines dans la protéine $6K_2$ du TuMV s'est traduit par une complète relocalisation de celle-ci dans l'appareil de Golgi et la membrane plasmique, dénotant ainsi d'une entrée complète dans la voie de sécrétion. De plus, nous avons identifié par RT-PCR quantitative que les mutations du motif GxxxG redirigeant la protéine 6K2 vers le Golgi, non seulement perturbaient la forme et la distribution des usines virales, mais aussi la réplication du TuMV. De nombreuses protéines empruntent la voie de sécrétion pour atteindre leur destination finale dans la cellule et en contrepartie leur transport est régulé par de nombreuses protéines cellulaires notamment les coatomères, les protéines SNARE et les synaptotagmines. L'emploi d'inhibiteurs chimiques, de plantes KO (knock out) et de protéines inhibitrices bloquant ou déstabilisant le transport entre le RE et l'appareil de Golgi ont mis en évidence que les usines virales suivaient des voies de transport alternatives. Elles sont soumises à une épreuve de force moléculaire entre la voie de sécrétion et une voie de transport non conventionnelle. Ces résultats suggèrent aussi que certaines des protéines du Golgi pourraient agir comme facteur de restriction (Sec22, BET11, SYTB, SYTF) du TuMV. En l'absence de Sec22, BET11, SYTB, SYTF ou durant l'inhibition de leur fonction le mouvement intercellulaire et systémique du TuMV se déroulait plus rapidement. Durant l'épreuve de force, la plupart des usines virales empruntaient une voie de contournement de la voie de sécrétion conventionnelle, alors que les autres finissaient dans une voie sans issue. Cette découverte a suscité de nouvelles interrogations nous

menant ainsi à vouloir identifier quelles routes alternatives étaient exploitées par les usines de réplication du TuMV.

Les échanges de protéines entre compartiments cellulaires mettent souvent en jeu un transport vésiculaire. Les vésicules sont produites par un organite donneur vers un receveur et de ce fait font intervenir des contacts membrane/membrane, processus de fusion et fission. Les protéines SNARE distribuées dans différents compartiments cellulaires jouent un rôle déterminant dans la fusion des vésicules avec les membranes de destination. L'ultrastructure des usines virales du TuMV a été récemment révélée, montrant ainsi qu'elles prenaient la forme de tubules et de vésicules. De ce fait, nous avons choisi d'explorer les potentielles destinations cellulaires des usines virales en utilisant des protéines SNAREs connues pour être situées dans différents compartiments. Nous avons identifié que les usines de réplication virales s'associaient avec la protéine SNARE prévacuolaire Vti11 par l'entremise de $6K_2$. Pour comprendre l'impact de l'association $6K_2$ avec la protéine Vti11, des plantes déficientes en Vti11 ont été soumises à l'infection. Ces dernières se sont révélées être complètement résistantes au TuMV, soulignant ainsi l'importance de Vti11 durant l'infection. Les protéines SNARE transitent entre deux voir plusieurs compartiments. En effet, la protéine SNARE Vti11 transite depuis le RTG vers la vacuole en passant par les compartiments prévacuolaires. Les compartiments prévacuolaires sont des compartiments multivésiculaires. Ils sont non seulement impliqués dans le transport de molécules vers la vacuole/lysosome, la voie endosomale et sans doute l'autophagie, mais leur importance a aussi été montrée dans la voie d'exocytose menant à la libération de vésicules extracellulaires, telles que les exosomes. Nous avons aussi exploré les différents tissus colonisés durant l'infection du TuMV en effectuant de l'immunohistofluorescence sur des coupes histologiques (WAN, CABANILLAS et al. 2015). Nous avons trouvé qu'il exploitait tous les types de tissus en incluant les vaisseaux du xylème, notamment pour l'infection systémique. En complément des analyses histologiques in situ, des analyses biochimiques d'extractions de sève xylémienne ont été réalisées. Des analyses microscopiques de tissus infectés ont permis de mettre en évidence que les vaisseaux du xylème contenaient des usines de réplication virale ainsi que des particules virales (WAN, CABANILLAS et al. 2015). Notons que les vaisseaux du xylème sont constitués de cellules mortes et sont en continuité avec le milieu extracellulaire pour notamment redistribuer l'eau et les solutés puisés par les racines vers l'ensemble des cellules de la plante. De ce fait, ces deux projets nous ont menés à vouloir connaître d'une part l'origine des usines de réplication virale, d'autre part le devenir de la sous-population cellulaire des usines virales potentiellement associées à des compartiments multivésiculaires.

Les vésicules extracellulaires sont souvent dérivées de corps multivésiculaires fusionnant avec la membrane plasmique et peuvent avoir des tailles variables. L'exocytose de matériel cellulaire vers la paroi cellulaire par l'entremise de vésicules intervient notamment durant des infections fongiques au niveau de la papille de l'haustorium. Par ailleurs, de nombreux virus animaux (e.g virus à ARN+) exploitent le milieu extracellulaire par l'entremise de vésicules ou de particules transitoirement enveloppées pour infecter des cellules éloignées. Cependant, en dépit du fait que les virus animaux et de plante partagent de nombreuses caractéristiques similaires durant l'infection, à notre connaissance, la présence de vésicules extracellulaire n'a seulement été rapportée que pour le BSMV et leur nature n'a pas été identifiée. Ainsi, pour étudier les vésicules extracellulaires produites durant l'infection par le TuMV, nous avons mené des analyses du liquide extracellulaire (i.e apoplaste) par microscopie électronique, microscopie confocale, en complément d'analyses biochimiques et protéomiques. La collecte et l'enrichissement de vésicules extracellulaires d'origine animale ou humaine s'effectuent souvent à l'aide de kits permettant notamment de les immunopurifier ou sinon par des étapes d'ultrafiltration couplées à différentes étapes d'ultracentrifugations. En s'inspirant de ces méthodes, le laboratoire de RW. Innes a mis en place un protocole adapté pour la plante modèle A. thaliana (RUTTER et INNES 2017). Leurs analyses protéomiques de vésicules produites en condition d'infection avec Pseudo-

monas syringae ont révélés la présence de nombreuses protéines impliquées dans l'immunité et le remodelage membranaire (e.g Vti11). Les observations par microscopie électronique ont permis de mettre en évidence que les cellules d'Arabidopsis thaliana infectées par le TuMV présentaient plus souvent des CMV fusionnant avec la membrane plasmique et libérant des vésicules de taille et de densité aux électrons différente. Afin de savoir si les vésicules extracellulaires produites en condition d'infection correspondaient potentiellement aux usines de réplication du TuMV, nous avons extrait du liquide apoplastique à partir de plantes saines et infectées. Les vésicules ont été purifiées et resuspendues. Nous avons été en mesure d'isoler des structures membranaires contenant la protéine virale 6K2 et de montrer que ces dernières ne provenaient pas de contaminations intracellulaires liées aux différentes manipulations. (RUTTER et INNES 2017) se sont uniquement intéressés au contenu protéique des vésicules extracellulaires produites durant l'infection bactérienne. Cependant, les vésicules extracellulaires produites dans différents contextes chez l'humain sont capables de transporter des ARN de type différent. Dans un premier temps, nous avons voulu savoir si les vésicules extracellulaires contenaient l'ARNv. Nous avons extrait les ARN totaux issus des vésicules concentrées et procédé à une étape de RT-PCR. L'amplifiat obtenu ainsi que les observations effectuées par microscopie suggèrent que les vésicules collectées pourraient être des usines de réplication du TuMV. En outre, les vésicules extracellulaires telles que les exosomes obtenus chez l'humain ou à partir de cellules cultivées in vitro font souvent l'objet d'analyses protéomiques pour notamment développer des outils de diagnostic. Notre démarche visant à mieux comprendre les phénomènes qui interviennent durant l'infection, nous avons mené des analyses protéomiques à partir d'extraits concentrés en condition saine et d'infection par le TuMV. Les analyses protéomiques s'effectuent souvent par l'approche classique dite de bottom up où des peptides sont produits, séparés par chromatographie et analysés par spectrométrie de masse. Les premières analyses protéomiques ont révélé qu'une grande partie de protéines identifiées (94%) étaient présentes dans les échantillons mock infectés et infectés par le TuMV. Dans la partie des protéines non présentes dans les échantillons mock infectés étaient les protéines virales et d'autres correspondaient à des protéines de l'hôte connues pour faire partie des usines de réplication du TuMV (i.e Hsc70-3, eEF1A), ce qui suggère que les vésicules extracellulaires collectées contiendraient des protéines de réplication. Des protéines connues pour intervenir dans le remodelage membranaire (e.g SYT, SNARE) et dans la réponse immunitaire de la plante ont aussi été identifiées (e.g catalases). De manière intéressante, des protéines similaires de la réponse immunitaire avaient aussi été identifiées par (RUTTER et INNES 2017) dans les fractions enrichies en vésicules extracellulaires, ce qui suggère que ces les vésicules extracellulaires pourraient être la cible de réponse de défense de la plante hôte.

5.1 Conclusion

Ainsi, l'ensemble des travaux effectués durant ces années de thèse a permis de mieux comprendre le transport des usines virales intracellulaires et extracellulaires. Les infections virales constituent de nos jours un défi majeur à surmonter du fait que bien peu d'éléments de lutte directe ou préventive sont disponibles pour un bon nombre de virus animaux, humain et de plantes, notamment ceux dont le génome est à ARN+. Les usines virales étant des structures formées de manière très précoce durant l'infection et intervenant dans de multiples étapes du cycle viral, de plus amples investigations devraient être menées. L'identification de la protéine Vti11 durant l'étude des usines virales souligne l'importance qui devrait leur être portée non seulement pour les virus à ARN+ de plante, mais aussi de manière plus globale à celles des virus animaux pour élaborer de nouvelles stratégies de lutte antivirale. En effet, Vti11 semblerait être un gène de résistance récessive qui pourrait être ciblé dans des plantes d'intérêt agricole par le système d'édition des génomes CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)/CAS9 pour y introduire le même type de mutation

et générer des plantes résistantes au TuMV et potentiellement à d'autres potyvirus.

PERSPECTIVES ET PROJETS POTENTIELS

6.1 Identification des interacteurs impliqués dans le contournement de l'appareil de Golgi

Nous avons montré l'implication du motif GxxxG de la protéine $6K_2$ dans l'infection et dans la mise en évidence de la voie non conventionnelle empruntée, toutefois, le mécanisme sous-jacent reste encore à être déterminé. Pour mieux comprendre cette voie de transport, il serait intéressant d'identifier les interacteurs permettant à une partie des usines virales d'échapper à la voie conventionnelle de sécrétion. Pour ce faire, des analyses protéomiques de complexes pourraient être effectuées à partir de co-immunoprécipitations de la protéine $6K_2$ normale et modifiée $6K_2$ GV. Afin de réduire la détection de faux positifs, des criblages de banque ADNc par le système double hybride adapté aux protéines membranaires (yeast two hybrid split ubiquitin system) pourraient être effectués. Le croisement des informations recueillies devrait permettre d'identifier des partenaires spécifiques à la protéine $6K_2$ normale et modifiée $6K_2$ GV. Du fait que le motif GxxxG est connu pour être impliqué dans des interactions hétéro- et homotypiques protéiques, les partenaires identifiés pourraient être d'une part des protéines membranaires comportant ou pas, le motif GxxxG et/ou d'autre part des protéines solubles potentiellement associées aux membranes telles que des petites GTPases (e.g Rab).

6.2 Identification de nouvelles voies de transport et partenaires des usines de réplication virale

Nous avons montré que la voie de contournement des usines de réplication virale implique au minimum une voie de transport utilisant la protéine prévacuolaire SNARE Vti11. Il est primordial de tenir en compte que plusieurs sous-populations d'usines virales coexistent dans une cellule et sont sans doute loin d'être homogènes dans leur contenu. De ce fait il est envisageable que les usines virales du TuMV exploitent plusieurs routes cellulaires après le contournement de l'appareil de Golgi. Il serait intéressant d'explorer si d'autres voies cellulaires connues sont utilisées, notamment via des expériences de colocalisation et/ou d'interaction protéine-protéine en utilisant d'autres protéines marqueur de compartiments ou de voie de transport cellulaires (e.g autophagie).

6.3 Préciser les voies menant à la production des vésicules extracellulaires du TuMV

Nous avons identifié que la protéine prévacuolaire Vti11 était essentielle au TuMV. Il serait intéressant de vérifier l'origine intracellulaire des vésicules extracellulaires du TuMV, notamment en investiguant les compartiments multivesiculaires par immunohistochimie couplée à la microscopie électronique (ou de la microscopie corrélative CLEM). L'investigation des facteurs de l'autophagie impliqués dans le contournement de la voie de sécrétion (e.g CUPS) serait aussi interessant à analyser.



Figure 6.1 – Association de Vti11 et des usines virales avec un marqueur d'autophagosomes Images de microscopie confocale de protéines coexprimées dans *N. benthamiana* montrant en A l'association de Vti11-GFP avec des usines virales issues de l'inoculation avec pCambaTuMV/6K₂ :mCherry (flêches blanches). B Coupe optique 2D de montrant la colocalisation d'un marqueur des autophagosomes RFP-ATG8e avec certaines usines virales suite à l'inoculation de pCambaTuMV/6K₂ :GFP. CI Reconstruction 3D d'une cellule coexprimant le marqueur RFP-ATG8e avec Vti11-GFP. CII coupe optique 2D de la zone encadrée en pointillés blancs trouvée en CI

Des expériences de colocalisation préliminaires observées par microscopie confocale entre des usines virales ou Vti11 avec un marqueur souvent utilisé pour identifier les autophagosomes (i.e ATG8e) semblent indiquer un potentiel lien entre la voie non conventionnelle empruntée par les usines virales du TuMV et des protéines de l'autophagie (Figure 6.1). Il est cependant important de noter que même si des éléments appartenant à la voie de l'autophagie s'associent à des protéines ou des structures virales, notamment des virus à ARN+, cela ne veut pas forcément dire que toute la voie de l'autophagie (voie de dégradation) intervient (e.g CUPS).

6.4 Caractériser les vésicules extracellulaires produites durant l'infection par le TuMV

Nous avons identifié une présence de vésicules extracellulaires plus abondante durant l'infection par le TuMV et mené des analyses sur leur extraction. L'idéal serait de confirmer la présence des usines virales in situ par immunohistochimie couplée à de la microscopie électronique ou par microscopie électronique corrélative. De manière alternative, des observations par microscopie confocale pourraient être menées sur des cellules infectées avec un clone infectieux étiqueté (e.g TuMV/6K₂-mcherry ou TuMV/6K₂-GFP) et des marqueurs de membrane plasmique ou autrement avec une coloration avec chromophores lipophiles. L'espace extracellulaire est difficilement observable en condition normale, car la membrane plasmique est complètement accolée à la paroi cellulaire du fait de la pression de turgescence due à la grande vacuole centrale qui occupe un volume cellulaire considérable (jusqu'à 90%). De ce fait, les observations devraient être effectuées en condition de plasmolyse, afin d'accroître l'espace extracellulaire observable.

De plus, il serait important de vérifier par microscopie électronique et par Western Blot que les vésicules extracellulaires collectées ne sont pas associées à des particules virales. Il serait aussi intéressant de faire du séquençage par deep-sequencing (RNAseq) à partir de vésicules extracellulaires produites en condition saine et infectée, afin de savoir si ces dernières pourraient transporter des transcrits et/ou d'autres petits ARN. Par ailleurs, afin de mieux discerner quelles protéines sont réellement présentes dans les usines virales, il faudrait effectuer les analyses au minimum une deuxième fois et mener une approche de protéomique quantitative. L'étape d'après serait de choisir des candidats et de confirmer leurs localisations dans l'espace extracellulaire en relation avec les vésicules extracellulaires, notamment par immuno-histochimie associée soit à de la microscopie électronique ou confocale. Les protéines identifiées ayant une origine cellulaire seraient tout aussi intéressantes pour voir si elles s'associent avec les usines virales intracellulaires en relation ou pas avec Vti11.

D'autres part, il faudrait voir si les interacteurs identifiés ont un impact sur l'infection virale via l'utilisation de plantes KO, KD, de VIGS (virus induce gene silencing), la production de protéines inhibitrices (i.g dominants négatifs) ou d'inhibiteurs chimiques si les protéines appartiennent à des voies de signalisation. De surcroît, il faudrait aussi tester si les vésicules extracellulaires du TuMV extraites de l'apoplaste peuvent être infectieuses. Pour savoir si l'apoplaste intervient dans lors de l'infection, des plantes transgéniques dont le réseau intracellulaire interconnectant les cellules de la plante (réseau symplasmique) serait bloqué pourraient être soumises à l'infection du TuMV.

Enfin, bien qu'étant assez complexe à mettre en évidence, il serait intéressant de comprendre in situ et au cours du temps comment les vésicules extracellulaires de l'apoplaste et du xylème se retrouvent ou se propagent pour infecter d'autres cellules distantes et encore saines.

6.5 Étude de la réponse antivirale en relation avec les usines virales du TuMV

Les usines virales contiennent le complexe de réplication virale dont l'un des constituants essentiels est le génome ARN. L'un des moyens de lutte antivirale caractérisés durant ces dernières décennies dans les cellules est la voie du silencing qui se traduit par une dégradation des ARN viraux. En contrepartie, les virus disposent souvent de protéines jouant le rôle suppresseur de silencing qui leur permettent de contourner plus ou moins efficacement ce mécanisme de défense. En ce qui concerne les potyvirus, la protéine HC-Pro joue le rôle de suppresseur de silencing. Dans nos analyses protéomiques sur les vésicules extracellulaires, nous avons identifié que la protéine HC-Pro était présente dans les échantillons infectés. Une autre piste d'exploration viserait à comprendre où se déroulent ces mécanismes de lutte antivirale et si toutes les usines virales constituent vraiment un environnement protégé pour accomplir la réplication.

RÉFÉRENCES

RÉFÉRENCES

- ADAMS, M. J., ANTONIW, J. F. et BEAUDOIN, F. (2005). "Overview and analysis of the polyprotein cleavage sites in the family Potyviridae". In : *Molecular plant pathology* 6.4, p. 471–487.
- AGBECI, M., GRANGEON, R., NELSON, R. S., ZHENG, H. et LALIBERTÉ, J.-F. (2013). "Contribution of host intracellular transport machineries to intercellular movement of turnip mosaic virus". In : *PLoS pathogens* 9.10, e1003683.
- AKOPIAN, D., SHEN, K., ZHANG, X. et SHAN, S.-o. (2013). "Signal recognition particle : an essential protein-targeting machine". In : *Annual review of biochemistry* 82, p. 693– 721.
- ALENQUER, M. et AMORIM, M. J. (2015). "Exosome biogenesis, regulation, and function in viral infection". In : *Viruses* 7.9, p. 5066–5083.
- AMARI, K., DI DONATO, M., DOLJA, V. V. et HEINLEIN, M. (2014). "Myosins VIII and XI play distinct roles in reproduction and transport of tobacco mosaic virus". In : *PLoS pathogens* 10.10, e1004448.
- AMARI, K., LERICH, A., SCHMITT-KEICHINGER, C., DOLJA, V. V. et RITZENTHALER,
 C. (2011). "Tubule-guided cell-to-cell movement of a plant virus requires class XI myosin motors". In : *PLoS pathogens* 7.10, e1002327.

- ANDERSON, M. R., KASHANCHI, F. et JACOBSON, S. (2016). "Exosomes in viral disease". In : *Neurotherapeutics* 13.3, p. 535–546.
- ANDIKA, I. B., ZHENG, S., TAN, Z., SUN, L., KONDO, H., ZHOU, X. et CHEN, J. (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". In : *Virology* 435.2, p. 493–503.
- ANDREJEVA, J, PUURAND, U, MERITS, A, RABENSTEIN, F, VALKONEN, J. et al. (1999).
 "Potyvirus helper component-proteinase and coat protein (CP) have coordinated functions in virus-host interactions and the same CP motif affects virus transmission and accumulation." In : *Journal of General Virology* 80.5, p. 1133–1139.
- BAK, A., CHEUNG, A. L., YANG, C., WHITHAM, S. A. et CASTEEL, C. L. (2017). "A viral protease relocalizes in the presence of the vector to promote vector performance".
 In : Nature Communications 8, p. 14493.
- BAKER, A., HOGG, T. L. et WARRINER, S. L. (2016). "Peroxisome protein import : a complex journey". In : *Biochemical Society Transactions* 44.3, p. 783–789.
- BARAJAS, D., CASTRO MARTÍN, I. F. de, POGANY, J., RISCO, C. et NAGY, P. D. (2014).
 "Noncanonical role for the host Vps4 AAA+ ATPase ESCRT protein in the formation of Tomato bushy stunt virus replicase". In : *PLoS pathogens* 10.4, e1004087.
- BARAJAS, D., JIANG, Y. et NAGY, P. D. (2009). "A unique role for the host ESCRT proteins in replication of Tomato bushy stunt virus". In : *PLoS pathogens* 5.12, e1000705.
- BATOKO, H., ZHENG, H.-Q., HAWES, C. et MOORE, I. (2000). "A Rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus and for normal Golgi movement in plants". In : *The Plant Cell* 12.11, p. 2201–2217.
- BAYER, K., BANNING, C., BRUSS, V., WILTZER-BACH, L. et SCHINDLER, M. (2016). "Hepatitis C virus is released via a noncanonical secretory route". In : *Journal of virology* 90.23, p. 10558–10573.

- BEAUCHEMIN, C., BOUTET, N. et LALIBERTÉ, J.-F. (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". In : *Journal of virology* 81.2, p. 775–782.
- BEAUCHEMIN, C. et LALIBERTÉ, J.-F. (2007). "The poly (A) binding protein is internalized in virus-induced vesicles or redistributed to the nucleolus during turnip mosaic virus infection". In : *Journal of virology* 81.20, p. 10905–10913.
- BELOV, G. A., FENG, Q., NIKOVICS, K., JACKSON, C. L. et EHRENFELD, E. (2008).
 "A critical role of a cellular membrane traffic protein in poliovirus RNA replication". In : *PLoS pathogens* 4.11, e1000216.
- BELOV, G. A., NAIR, V., HANSEN, B. T., HOYT, F. H., FISCHER, E. R. et EHRENFELD, E. (2012). "Complex dynamic development of poliovirus membranous replication complexes".
 In : Journal of virology 86.1, p. 302–312.
- BERNONVILLE, T. D. de, ALBENNE, C., ARLAT, M., HOFFMANN, L., LAUBER, E. et JA-MET, E. (2014). "Xylem sap proteomics". In : *Plant Proteomics : Methods and Protocols*, p. 391–405.
- BESKE, O., REICHELT, M., TAYLOR, M. P., KIRKEGAARD, K. et ANDINO, R. (2007).
 "Poliovirus infection blocks ERGIC-to-Golgi trafficking and induces microtubule-dependent disruption of the Golgi complex". In : *Journal of cell science* 120.18, p. 3207–3218.
- BEYENE, A., BASU, A., MEYER, K. et RAY, R. (2004). "Influence of N-linked glycans on intracellular transport of hepatitis C virus E1 chimeric glycoprotein and its role in pseudotype virus infectivity". In : *Virology* 324.2, p. 273–285.
- BISWAS, A., TREADAWAY, J. et TELLINGHUISEN, T. L. (2016). "Interaction between Nonstructural Proteins NS4B and NS5A Is Essential for Proper NS5A Localization and Hepatitis C Virus RNA Replication". In : *Journal of virology* 90.16, p. 7205–7218.

- BOEVINK, P., OPARKA, K., CRUZ, S. S., MARTIN, B., BETTERIDGE, A. et HAWES, C. (1998). "Stacks on tracks : the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network". In : *The Plant Journal* 15.3, p. 441–447.
- BRANDIZZI, F. (2017). "Transport from the endoplasmic reticulum to the Golgi in plants : Where are we now?" In : Seminars in Cell & amp; Developmental Biology. Elsevier.
- BRANDIZZI, F. et BARLOWE, C. (2013). "Organization of the ER–Golgi interface for membrane traffic control". In : *Nature reviews. Molecular cell biology* 14.6, p. 382.
- BRIGGS, E. L. A., GOMES, R. G., ELHUSSEIN, M., COLLIER, W., FINDLOW, I. S., KHA-LID, S., MCCORMICK, C. J. et WILLIAMSON, P. T. (2015). "Interaction between the NS4B amphipathic helix, AH2, and charged lipid headgroups alters membrane morphology and AH2 oligomeric state—Implications for the Hepatitis C virus life cycle". In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1848.8, p. 1671–1677.
- BRUNS, C., MCCAFFERY, J. M., CURWIN, A. J., DURAN, J. M. et MALHOTRA, V. (2011). "Biogenesis of a novel compartment for autophagosome-mediated unconventional protein secretion". In : *J Cell Biol*, jcb–201106098.
- BUCHER, G. L., TARINA, C., HEINLEIN, M., DI SERIO, F., MEINS, F. et IGLESIAS,
 V. A. (2001). "Local expression of enzymatically active class I β-1, 3-glucanase enhances symptoms of TMV infection in tobacco". In : *The Plant Journal* 28.3, p. 361–369.
- CANETTA, E., KIM, S. H., KALININA, N. O., SHAW, J., ADYA, A. K., GILLESPIE, T., BROWN, J. W. et TALIANSKY, M. (2008). "A plant virus movement protein forms ringlike complexes with the major nucleolar protein, fibrillarin, in vitro". In : *Journal of molecular biology* 376.4, p. 932–937.
- CARELLA, P., WILSON, D. C., KEMPTHORNE, C. J. et CAMERON, R. K. (2016). "Vascular Sap Proteomics : Providing Insight into Long-Distance Signaling during Stress". In : *Frontiers in plant science* 7.

- CARETTE, J. E., LENT, J. van, MACFARLANE, S. A., WELLINK, J. et KAMMEN, A. van (2002). "Cowpea mosaic virus 32-and 60-kilodalton replication proteins target and change the morphology of endoplasmic reticulum membranes". In : *Journal of virology* 76.12, p. 6293–6301.
- CARRINGTON, J. C., FREED, D. D. et SANDERS, T. C. (1989). "Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in Escherichia coli and in vitro." In : *Journal of Virology* 63.10, p. 4459–4463.
- CASTEEL, C. L., YANG, C., NANDURI, A. C., JONG, H. N., WHITHAM, S. A. et JANDER,
 G. (2014). "The NIa-Pro protein of Turnip mosaic virus improves growth and reproduction of the aphid vector, Myzus persicae (green peach aphid)". In : *The Plant Journal* 77.4, p. 653–663.
- CASTORENA, K. M., STAPLEFORD, K. A. et MILLER, D. J. (2010). "Complementary transcriptomic, lipidomic, and targeted functional genetic analyses in cultured Drosophila cells highlight the role of glycerophospholipid metabolism in Flock House virus RNA replication". In : *BMC genomics* 11.1, p. 183.
- CASTRO, I. F. de, FERNÁNDEZ, J. J., BARAJAS, D., NAGY, P. D. et RISCO, C. (2017). "Three-dimensional imaging of the intracellular assembly of a functional viral RNA replicase complex". In : *J Cell Sci* 130.1, p. 260–268.
- CECCHINI, E., GONG, Z., GERI, C., COVEY, S. N. et MILNER, J. J. (1997). "Transgenic Arabidopsis lines expressing gene VI from cauliflower mosaic virus variants exhibit a range of symptom-like phenotypes and accumulate inclusion bodies". In : *Molecular plant-microbe interactions* 10.9, p. 1094–1101.
- CHATEL-CHAIX, L. et BARTENSCHLAGER, R. (2014). "Dengue virus-and hepatitis C virusinduced replication and assembly compartments : the enemy inside—caught in the web". In : *Journal of virology* 88.11, p. 5907–5911.

- CHEN, J. et AHLQUIST, P. (2000). "Brome mosaic virus polymerase-like protein 2a is directed to the endoplasmic reticulum by helicase-like viral protein 1a". In : *Journal of Virology* 74.9, p. 4310–4318.
- CHEN, Z., ZHOU, T., WU, X., HONG, Y., FAN, Z. et LI, H. (2008). "Influence of cytoplasmic heat shock protein 70 on viral infection of Nicotiana benthamiana". In : *Molecular plant pathology* 9.6, p. 809–817.
- CHO, M. W., TETERINA, N., EGGER, D., BIENZ, K. et EHRENFELD, E. (1994). "Membrane rearrangement and vesicle induction by recombinant poliovirus 2C and 2BC in human cells". In : *Virology* 202.1, p. 129–145.
- CHO, N.-J., LEE, C., PANG, P. S., PHAM, E. A., FRAM, B., NGUYEN, K., XIONG, A., SKLAN, E. H., ELAZAR, M., KOYTAK, E. S. et al. (2015). "Phosphatidylinositol 4, 5bisphosphate is an HCV NS5A ligand and mediates replication of the viral genome". In : *Gastroenterology* 148.3, p. 616–625.
- CHUNG, B. Y.-W., MILLER, W. A., ATKINS, J. F. et FIRTH, A. E. (2008). "An overlapping essential gene in the Potyviridae". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.15, p. 5897–5902.
- CITOVSKY, V., KNORR, D. et ZAMBRYSKI, P. (1991). "Gene I, a potential cell-to-cell movement locus of cauliflower mosaic virus, encodes an RNA-binding protein." In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 88.6, p. 2476–2480.
- CORDERO, T., CERDÁN, L., CARBONELL, A., KATSAROU, K., KALANTIDIS, K. et DARÒS, J.-A. (2017). "Dicer-Like 4 is involved in restricting the systemic movement of Zucchini yellow mosaic virus in Nicotiana benthamiana". In : *Molecular Plant-Microbe Interactions* 30.1, p. 63–71.
- Cortese, M., Goellner, S., Acosta, E. G., Neufeldt, C. J., Oleksiuk, O., Lampe, M., Haselmann, U., Funaya, C., Schieber, N., Ronchi, P. et al. (2017). "Ul-

trastructural characterization of Zika virus replication factories". In : *Cell reports* 18.9, p. 2113–2123.

- COSSON, P., SOFER, L., LE, Q. H., LÉGER, V., SCHURDI-LEVRAUD, V., WHITHAM,
 S. A., YAMAMOTO, M. L., GOPALAN, S., LE GALL, O., CANDRESSE, T. et al. (2010).
 "RTM3, which controls long-distance movement of potyviruses, is a member of a new plant gene family encoding a meprin and TRAF homology domain-containing protein".
 In : *Plant physiology* 154.1, p. 222–232.
- COTTON, S., GRANGEON, R., THIVIERGE, K., MATHIEU, I., IDE, C., WEI, T., WANG,
 A. et LALIBERTÉ, J.-F. (2009). "Turnip mosaic virus RNA replication complex vesicles are mobile, align with microfilaments, and are each derived from a single viral genome".
 In : Journal of virology 83.20, p. 10460–10471.
- COWAN, G., LIOLIOPOULOU, F, ZIEGLER, A et TORRANCE, L (2002). "Subcellular localisation, protein interactions, and RNA binding of potato mop-top virus triple gene block proteins". In : *Virology* 298.1, p. 106–115.
- COWAN, G. H., ROBERTS, A. G., CHAPMAN, S. N., ZIEGLER, A., SAVENKOV, E. I. et TORRANCE, L. (2012). "The potato mop-top virus TGB2 protein and viral RNA associate with chloroplasts and viral infection induces inclusions in the plastids". In : *Frontiers in plant science* 3.
- CRONIN, S., VERCHOT, J., HALDEMAN-CAHILL, R., SCHAAD, M. C. et CARRINGTON, J. C. (1995). "Long-distance movement factor : a transport function of the potyvirus helper component proteinase." In : *The Plant Cell* 7.5, p. 549–559.
- CUI, H. et WANG, A. (2016). "Plum pox virus 6K1 protein is required for viral replication and targets the viral replication complex at the early stage of infection". In : *Journal of virology* 90.10, p. 5119–5131.
- CUI, W. et LEE, J.-Y. (2016). "Arabidopsis callose synthases CalS1/8 regulate plasmodesmal permeability during stress". In : *Nature plants* 2, p. 16034.

- CUI, X., WEI, T., CHOWDA-REDDY, R. V., SUN, G. et WANG, A. (2010). "The Tobacco etch virus P3 protein forms mobile inclusions via the early secretory pathway and traffics along actin microfilaments". In : *Virology* 397.1, p. 56–63.
- DÁDER, B., THEN, C., BERTHELOT, E., DUCOUSSO, M., NG, J. C. et DRUCKER, M. (2017). "Insect transmission of plant viruses : multilayered interactions optimize viral propagation". In : *Insect Science*.
- DAVID, N., YAFFE, Y., HAGOEL, L., ELAZAR, M., GLENN, J. S., HIRSCHBERG, K. et SKLAN, E. H. (2015). "The interaction between the hepatitis C proteins NS4B and NS5A is involved in viral replication". In : *Virology* 475, p. 139–149.
- DAVIS, D. J., KANG, B.-H., HERINGER, A. S., WILKOP, T. E. et DRAKAKAKI, G. (2016).
 "Unconventional Protein Secretion in Plants". In : Unconventional Protein Secretion : Methods and Protocols, p. 47–63.
- DE MARCHIS, F., BELLUCCI, M. et POMPA, A. (2013). "Unconventional pathways of secretory plant proteins from the endoplasmic reticulum to the vacuole bypassing the Golgi complex". In : *Plant signaling & amp ; behavior* 8.8, e25129.
- DIAZ, A., GALLEI, A. et AHLQUIST, P. (2012). "Bromovirus RNA replication compartment formation requires concerted action of 1a's self-interacting RNA capping and helicase domains". In : *Journal of virology* 86.2, p. 821–834.
- DIAZ, A., WANG, X. et AHLQUIST, P. (2010). "Membrane-shaping host reticulon proteins play crucial roles in viral RNA replication compartment formation and function". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107.37, p. 16291–16296.
- DING, Y., ROBINSON, D. G. et JIANG, L. (2014). "Unconventional protein secretion (UPS) pathways in plants". In : *Current opinion in cell biology* 29, p. 107–115.
- DING, Y., WANG, J., WANG, J., STIERHOF, Y.-D., ROBINSON, D. G. et JIANG, L. (2012). "Unconventional protein secretion". In : *Trends in plant science* 17.10, p. 606–615.

- DOLJA, V., HALDEMAN, R., ROBERTSON, N., DOUGHERTY, W. et CARRINGTON, J. (1994). "Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants." In : *The EMBO journal* 13.6, p. 1482.
- DOLJA, V. V., HALDEMAN-CAHILL, R., MONTGOMERY, A. E., VANDENBOSCH, K. A. et CARRINGTON, J. C. (1995). "Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus". In : *Virology* 206.2, p. 1007–1016.
- DONOHOE, B. S., KANG, B.-H., GERL, M. J., GERGELY, Z. R., MCMICHAEL, C. M., BEDNAREK, S. Y. et STAEHELIN, L. A. (2013). "Cis-Golgi Cisternal Assembly and Biosynthetic Activation Occur Sequentially in Plants and Algae". In : *Traffic* 14.5, p. 551– 567.
- DRAKAKAKI, G. et DANDEKAR, A. (2013). "Protein secretion : how many secretory routes does a plant cell have ?" In : *Plant Science* 203, p. 74–78.
- DUFRESNE, P. J., THIVIERGE, K., COTTON, S., BEAUCHEMIN, C., IDE, C., UBALIJORO, E., LALIBERTÉ, J.-F. et FORTIN, M. G. (2008). "Heat shock 70 protein interaction with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase within virus-induced membrane vesicles". In : *Virology* 374.1, p. 217–227.
- DUNOYER, P, THOMAS, C, HARRISON, S, REVERS, F et MAULE, A (2004). "A cysteinerich plant protein potentiates Potyvirus movement through an interaction with the virus genome-linked protein VPg". In : *Journal of Virology* 78.5, p. 2301–2309.
- DUNOYER, P., RITZENTHALER, C., HEMMER, O., MICHLER, P. et FRITSCH, C. (2002). "Intracellular localization of the peanut clump virus replication complex in tobacco BY-2 protoplasts containing green fluorescent protein-labeled endoplasmic reticulum or Golgi apparatus". In : *Journal of virology* 76.2, p. 865–874.
- EGGER, D., WÖLK, B., GOSERT, R., BIANCHI, L., BLUM, H. E., MORADPOUR, D. et BIENZ, K. (2002). "Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane

alterations including a candidate viral replication complex". In : *Journal of virology* 76.12, p. 5974–5984.

- EIAMTANASATE, S., JURICEK, M. et YAP, Y.-K. (2007). "C-terminal hydrophobic region leads PRSV P3 protein to endoplasmic reticulum". In : *Virus Genes* 35.3, p. 611–617.
- EICHLER, J. et IRIHIMOVITCH, V. (2003). "Move it on over : getting proteins across biological membranes". In : *Bioessays* 25.12, p. 1154–1157.
- FANATA, W. I. D., LEE, S. Y. et LEE, K. O. (2013). "The unfolded protein response in plants : a fundamental adaptive cellular response to internal and external stresses". In : *Journal of proteomics* 93, p. 356–368.
- FEDORKIN, O., SOLOVYEV, A., YELINA, N., ZAMYATNIN JR, A., ZINOVKIN, R., MÄKI-NEN, K, SCHIEMANN, J et MOROZOV, S. Y. (2001). "Cell-to-cell movement of potato virus X involves distinct functions of the coat protein". In : *Journal of General Virology* 82.2, p. 449–458.
- FENG, Z., XUE, F., XU, M., CHEN, X., ZHAO, W., GARCIA-MURRIA, M. J., MINGARRO,
 I., LIU, Y., HUANG, Y., JIANG, L. et al. (2016). "The ER-membrane transport system is critical for intercellular trafficking of the NSm movement protein and tomato spotted wilt tospovirus". In : *PLoS pathogens* 12.2, e1005443.
- FERNANDEZ-CALVINO, L., GOYTIA, E., LOPEZ-ABELLA, D., GINER, A., URIZARNA, M., VILAPLANA, L. et LÓPEZ-MOYA, J. J. (2010). "The helper-component protease transmission factor of tobacco etch potyvirus binds specifically to an aphid ribosomal protein homologous to the laminin receptor precursor". In : *Journal of General Virology* 91.11, p. 2862–2873.
- FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M. R., CAMAFEITA, E., BONAY, P., MÉNDEZ, E., ALBAR, J. P. et GARCÍA, J. A. (2002). "The capsid protein of a plant single-stranded RNA virus is modified by O-linked N-acetylglucosamine". In : *Journal of Biological Chemistry* 277.1, p. 135–140.

- FERNANDEZ-VEGA, V., SOSNOVTSEV, S. V., BELLIOT, G., KING, A. D., MITRA, T., GORBALENYA, A. et GREEN, K. Y. (2004). "Norwalk virus N-terminal nonstructural protein is associated with disassembly of the Golgi complex in transfected cells". In : *Journal of virology* 78.9, p. 4827–4837.
- FONTANA, J., LÓPEZ-IGLESIAS, C., TZENG, W.-P., FREY, T. K., FERNÁNDEZ, J. J. et RISCO, C. (2010). "Three-dimensional structure of Rubella virus factories". In : Virology 405.2, p. 579–591.
- FONTANA, J., TZENG, W.-P., CALDERITA, G., FRAILE-RAMOS, A., FREY, T. K. et RISCO, C. (2007). "Novel replication complex architecture in rubella replicon-transfected cells". In : *Cellular microbiology* 9.4, p. 875–890.
- FORESTI, O. et DENECKE, J. (2008). "Intermediate organelles of the plant secretory pathway : identity and function". In : *Traffic* 9.10, p. 1599–1612.
- FRANCIN-ALLAMI, M., SAUMONNEAU, A., LAVENANT, L., BOUDER, A., SPARKES, I., HAWES, C. et POPINEAU, Y. (2011). "Dynamic trafficking of wheat γ-gliadin and of its structural domains in tobacco cells, studied with fluorescent protein fusions". In : *Journal* of experimental botany 62.13, p. 4507–4520.
- GAGUANCELA, O. A., ZÚÑIGA, L. P., ARIAS, A. V., HALTERMAN, D., FLORES, F. J., JOHANSEN, I. E., WANG, A., YAMAJI, Y. et VERCHOT, J. (2016). "The IRE1/bZIP60 Pathway and Bax Inhibitor 1 Suppress Systemic Accumulation of Potyviruses and Potexviruses in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana Plants". In : *Molecular Plant-Microbe Interactions* 29.10, p. 750–766.
- GALLIE, D. R. (2001). "Cap-independent translation conferred by the 5*t* leader of tobacco etch virus is eukaryotic initiation factor 4G dependent". In : *Journal of virology* 75.24, p. 12141–12152.

- GAO, C., CAI, Y., WANG, Y., KANG, B.-H., ANIENTO, F., ROBINSON, D. G. et JIANG,
 L. (2014). "Retention mechanisms for ER and Golgi membrane proteins". In : *Trends in plant science* 19.8, p. 508–515.
- GAO, C., ZHUANG, X., SHEN, J. et JIANG, L. (2017). "Plant ESCRT Complexes : Moving Beyond Endosomal Sorting". In : *Trends in Plant Science*.
- GENOVÉS, A., NAVARRO, J. A. et PALLÁS, V. (2010). "The intra-and intercellular movement of Melon necrotic spot virus (MNSV) depends on an active secretory pathway". In : *Molecular plant-microbe interactions* 23.3, p. 263–272.
- GILLESPIE, L. K., HOENEN, A., MORGAN, G. et MACKENZIE, J. M. (2010). "The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex". In : *Journal of virology* 84.20, p. 10438–10447.
- GÓMEZ-AIX, C., GARCÍA-GARCÍA, M., ARANDA, M. A. et SÁNCHEZ-PINA, M. A.
 (2015). "Melon necrotic spot virus replication occurs in association with altered mitochondria". In : *Molecular Plant-Microbe Interactions* 28.4, p. 387–397.
- GOODIN, M., YELTON, S., GHOSH, D., MATHEWS, S. et LESNAW, J. (2005). "Live-cell imaging of rhabdovirus-induced morphological changes in plant nuclear membranes". In : *Molecular plant-microbe interactions* 18.7, p. 703–709.
- GRANGEON, R., AGBECI, M., CHEN, J., GRONDIN, G., ZHENG, H. et LALIBERTÉ, J.-F. (2012). "Impact on the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus of turnip mosaic virus infection". In : *Journal of virology* 86.17, p. 9255–9265.
- GRANGEON, R., JIANG, J., WAN, J., AGBECI, M., ZHENG, H. et LALIBERTÉ, J.-F.
 (2013). "6K2-induced vesicles can move cell to cell during turnip mosaic virus infection".
 In : Frontiers in microbiology 4.
- GRENINGER, A. (2015). Picornavirus-host interactions to construct viral secretory membranes. Prog Mol Biol Transl Sci 129 : 189–212.

- GROEN, S. C., JIANG, S., MURPHY, A. M., CUNNIFFE, N. J., WESTWOOD, J. H., DAVEY, M. P., BRUCE, T. J., CAULFIELD, J. C., FURZER, O. J., REED, A. et al. (2016). "Virus infection of plants alters pollinator preference : A payback for susceptible hosts?" In : *PLoS pathogens* 12.8, e1005790.
- GRZELA, R., SZOLAJSKA, E., EBEL, C., MADERN, D., FAVIER, A., WOJTAL, I., ZA-GORSKI, W. et CHROBOCZEK, J. (2008). "Virulence factor of potato virus Y, genomeattached terminal protein VPg, is a highly disordered protein". In : *Journal of Biological Chemistry* 283.1, p. 213–221.
- HAN, S. et SANFAÇON, H. (2003). "Tomato ringspot virus proteins containing the nucleoside triphosphate binding domain are transmembrane proteins that associate with the endoplasmic reticulum and cofractionate with replication complexes". In : *Journal of virology* 77.1, p. 523–534.
- HARRIES, P. A., PARK, J.-W., SASAKI, N., BALLARD, K. D., MAULE, A. J. et NELSON,
 R. S. (2009). "Differing requirements for actin and myosin by plant viruses for sustained intercellular movement". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106.41, p. 17594–17599.
- HEINLEIN, M. (2015a). "Plant virus replication and movement". In : *Virology* 479, p. 657–671.
- (2015b). "Plasmodesmata : channels for viruses on the move". In : *Plasmodesmata :* Methods and Protocols, p. 25–52.
- HONG, Y. et HUNT, A. G. (1996). "RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirusencoded RNA-dependent RNA polymerase". In : *Virology* 226.1, p. 146–151.
- HU, C., HAM, B.-K., EL-SHABRAWI, H. M., ALEXANDER, D., ZHANG, D., RYALS, J. et LUCAS, W. J. (2016). "Proteomics and metabolomics analyses reveal the cucurbit sieve tube system as a complex metabolic space". In : *The Plant Journal* 87.5, p. 442–454.

- HUANG, T.-S., WEI, T., LALIBERTÉ, J.-F. et WANG, A. (2010). "A host RNA helicaselike protein, AtRH8, interacts with the potyviral genome-linked protein, VPg, associates with the virus accumulation complex, and is essential for infection". In : *Plant physiology* 152.1, p. 255–266.
- HULL, R. (2014). Plant virology. Fifth Edition. Academic press.
- HWANG, Y. T., MCCARTNEY, A. W., GIDDA, S. K. et MULLEN, R. T. (2008). "Localization of the Carnation Italian ringspot virus replication protein p36 to the mitochondrial outer membrane is mediated by an internal targeting signal and the TOM complex". In : *BMC cell biology* 9.1, p. 54.
- HYODO, K., MINE, A., TANIGUCHI, T., KAIDO, M., MISE, K., TANIGUCHI, H. et OKUNO, T. (2013). "ADP ribosylation factor 1 plays an essential role in the replication of a plant RNA virus". In : *Journal of virology* 87.1, p. 163–176.
- IGLESIAS, N. G., MONDOTTE, J. A., BYK, L. A., DE MAIO, F. A., SAMSA, M. M., ALVAREZ, C. et GAMARNIK, A. V. (2015). "Dengue virus uses a non-canonical function of the host GBF1-Arf-COPI system for capsid protein accumulation on lipid droplets". In : *Traffic* 16.9, p. 962–977.
- IGLESIAS, V. A. et MEINS, F. (2000). "Movement of plant viruses is delayed in a β -1, 3-glucanase-deficient mutant showing a reduced plasmodesmatal size exclusion limit and enhanced callose deposition". In : *The Plant Journal* 21.2, p. 157–166.
- IVANOV, K., ESKELIN, K, LÕHMUS, A et MÄKINEN, K (2014). "Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection". In : *Journal of General Virology* 95.7, p. 1415– 1429.
- JENNER, C. E., WANG, X., TOMIMURA, K., OHSHIMA, K., PONZ, F. et WALSH, J. A. (2003). "The dual role of the potyvirus P3 protein of Turnip mosaic virus as a symptom and avirulence determinant in brassicas". In : *Molecular plant-microbe interactions* 16.9, p. 777–784.
- JIANG, J. et LALIBERTÉ, J.-F. (2011). "The genome-linked protein VPg of plant viruses—a protein with many partners". In : *Current opinion in virology* 1.5, p. 347–354.
- JIANG, J., PATARROYO, C., CABANILLAS, D. G., ZHENG, H. et LALIBERTÉ, J.-F. (2015).
 "The vesicle-forming 6K2 protein of turnip mosaic virus interacts with the COPII coatomer Sec24a for viral systemic infection". In : *Journal of virology* 89.13, p. 6695–6710.
- JONCZYK, M., PATHAK, K. B., SHARMA, M. et NAGY, P. D. (2007). "Exploiting alternative subcellular location for replication : tombusvirus replication switches to the endoplasmic reticulum in the absence of peroxisomes". In : *Virology* 362.2, p. 320–330.
- JORDAN, T. X. et RANDALL, G. (2017). "Dengue Virus Activates the AMP Kinase-mTOR Axis To Stimulate a Proviral Lipophagy". In : *Journal of Virology* 91.11, e02020–16.
- KANG, S.-H., DAO, T. N. M., KIM, O.-K. et FOLIMONOVA, S. Y. (2017). "Self-interaction of Citrus tristeza virus p33 protein via N-terminal helix". In : Virus Research 233, p. 29–34.
- KEHR, J. et BUHTZ, A. (2007). "Long distance transport and movement of RNA through the phloem". In : *Journal of experimental botany* 59.1, p. 85–92.
- KENDALL, A., MCDONALD, M., BIAN, W., BOWLES, T., BAUMGARTEN, S. C., SHI, J., STEWART, P. L., BULLITT, E., GORE, D., IRVING, T. C. et al. (2008). "Structure of flexible filamentous plant viruses". In : *Journal of virology* 82.19, p. 9546–9554.
- KESSLER, F. et SCHNELL, D. (2009). "Chloroplast biogenesis : diversity and regulation of the protein import apparatus". In : *Current opinion in cell biology* 21.4, p. 494–500.
- KIM, S. H., RYABOV, E. V., KALININA, N. O., RAKITINA, D. V., GILLESPIE, T., MAC-FARLANE, S., HAUPT, S., BROWN, J. W. et TALIANSKY, M. (2007). "Cajal bodies and the nucleolus are required for a plant virus systemic infection". In : *The EMBO journal* 26.8, p. 2169–2179.
- KIM, Y.-C., UDESHI, N. D., BALSBAUGH, J. L., SHABANOWITZ, J., HUNT, D. F. et OLS-ZEWSKI, N. E. (2011). "O-GlcNAcylation of the Plum pox virus capsid protein catalyzed

by SECRET AGENT : characterization of O-GlcNAc sites by electron transfer dissociation mass spectrometry". In : *Amino acids* 40.3, p. 869–876.

- KIRKEGAARD, K. (2017). "Unconventional secretion of hepatitis A virus". In : *Proceedings* of the National Academy of Sciences, p. 201707142.
- KNOOPS, K., BÁRCENA, M., LIMPENS, R. W., KOSTER, A. J., MOMMAAS, A. M. et SNIJDER, E. J. (2012). "Ultrastructural characterization of arterivirus replication structures : reshaping the endoplasmic reticulum to accommodate viral RNA synthesis". In : *Journal of virology* 86.5, p. 2474–2487.
- KNOOPS, K., KIKKERT, M., WORM, S. H. van den, ZEVENHOVEN-DOBBE, J. C., MEER, Y. van der, KOSTER, A. J., MOMMAAS, A. M. et SNIJDER, E. J. (2008). "SARScoronavirus replication is supported by a reticulovesicular network of modified endoplasmic reticulum". In : *PLoS biology* 6.9, e226.
- KOMODA, K., NAITO, S. et ISHIKAWA, M. (2004). "Replication of plant RNA virus genomes in a cell-free extract of evacuolated plant protoplasts". In : Proceedings of the National Academy of Sciences 101.7, p. 1863–1867.
- KOPEK, B. G., PERKINS, G., MILLER, D. J., ELLISMAN, M. H. et AHLQUIST, P. (2007).
 "Three-dimensional analysis of a viral RNA replication complex reveals a virus-induced mini-organelle". In : *PLoS biology* 5.9, e220.
- KOPEK, B. G., SETTLES, E. W., FRIESEN, P. D. et AHLQUIST, P. (2010). "Nodavirusinduced membrane rearrangement in replication complex assembly requires replicase protein a, RNA templates, and polymerase activity". In : *Journal of virology* 84.24, p. 12492– 12503.
- KOVALEV, N., CASTRO MARTÍN, I. F. de, POGANY, J., BARAJAS, D., PATHAK, K., RISCO, C. et NAGY, P. D. (2016). "Role of viral RNA and co-opted cellular ESCRT-I and ESCRT-III factors in formation of tombusvirus spherules harboring the tombusvirus replicase". In : *Journal of virology* 90.7, p. 3611–3626.

- KOVALEV, N., INABA, J.-i., LI, Z. et NAGY, P. D. (2017). "The role of co-opted ESCRT proteins and lipid factors in protection of tombusviral double-stranded RNA replication intermediate against reconstituted RNAi in yeast". In : *PLoS pathogens* 13.7, e1006520.
- KUJALA, P., AHOLA, T., EHSANI, N., AUVINEN, P., VIHINEN, H. et KÄÄRIÄINEN, L. (1999). "Intracellular distribution of rubella virus nonstructural protein P150". In : *Journal* of virology 73.9, p. 7805–7811.
- KUMAR, D., KUMAR, R., HYUN, T. K. et KIM, J.-Y. (2015). "Cell-to-cell movement of viruses via plasmodesmata". In : *Journal of plant research* 128.1, p. 37–47.
- KUSUMANEGARA, K., MINE, A., HYODO, K., KAIDO, M., MISE, K. et OKUNO, T. (2012). "Identification of domains in p27 auxiliary replicase protein essential for its association with the endoplasmic reticulum membranes in Red clover necrotic mosaic virus".
 In : *Virology* 433.1, p. 131–141.
- LAMONTAGNE, E. D. et HEESE, A. (2017). "Trans-Golgi network/early endosome : a central sorting station for cargo proteins in plant immunity". In : *Current Opinion in Plant Biology* 40, p. 114–121.
- LALIBERTÉ, J.-F. et SANFAÇON, H. (2010). "Cellular remodeling during plant virus infection". In : Annual review of phytopathology 48, p. 69–91.
- LALIBERTÉ, J.-F. et ZHENG, H. (2014). "Viral manipulation of plant host membranes". In : Annual review of virology 1, p. 237–259.
- LE BARS, R., MARION, J., LE BORGNE, R., SATIAT-JEUNEMAITRE, B. et BIANCHI,M. W. (2014). "ATG5 defines a phagophore domain connected to the endoplasmic reticulum during autophagosome formation in plants". In : *Nature communications* 5.
- LEE, J.-Y. (2015). "Plasmodesmata : a signaling hub at the cellular boundary". In : *Current opinion in plant biology* 27, p. 133–140.

- LEE, W.-M. et AHLQUIST, P. (2003). "Membrane synthesis, specific lipid requirements, and localized lipid composition changes associated with a positive-strand RNA virus RNA replication protein". In : *Journal of virology* 77.23, p. 12819–12828.
- LÉONARD, S., PLANTE, D., WITTMANN, S., DAIGNEAULT, N., FORTIN, M. G. et LALI-BERTÉ, J.-F. (2000). "Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity". In : *Journal of Virology* 74.17, p. 7730–7737.
- LEONARD, S., VIEL, C., BEAUCHEMIN, C., DAIGNEAULT, N., FORTIN, M. G. et LALI-BERTE, J.-F. (2004). "Interaction of VPg-Pro of Turnip mosaic virus with the translation initiation factor 4E and the poly (A)-binding protein in planta". In : *Journal of General Virology* 85.4, p. 1055–1063.
- LEVY, A., ERLANGER, M., ROSENTHAL, M. et EPEL, B. L. (2007). "A plasmodesmataassociated β -1, 3-glucanase in Arabidopsis". In : *The Plant Journal* 49.4, p. 669–682.
- LEVY, A., GUENOUNE-GELBART, D. et EPEL, B. L. (2007). "β-1, 3-Glucanases : plasmodesmal gate keepers for intercellular communication". In : *Plant signaling & amp ; behavior* 2.5, p. 404–407.
- LI, F. et VIERSTRA, R. D. (2012). "Autophagy : a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling". In : *Trends in plant science* 17.9, p. 526–537.
- LI, J., FUCHS, S., ZHANG, J., WELLFORD, S., SCHULDINER, M. et WANG, X. (2016).
 "An unrecognized function for COPII components in recruiting the viral replication protein BMV 1a to the perinuclear ER". In : *J Cell Sci* 129.19, p. 3597–3608.
- LI, Y, WU, M., SONG, H., HU, X et QIU, B. (2005). "Identification of a tobacco protein interacting with tomato mosaic virus coat protein and facilitating long-distance movement of virus". In : *Archives of virology* 150.10, p. 1993–2008.
- LIGAT, L., LAUBER, E., ALBENNE, C., CLEMENTE, H. S., VALOT, B., ZIVY, M., PONT-LEZICA, R., ARLAT, M. et JAMET, E. (2011). "Analysis of the xylem sap proteome

of Brassica oleracea reveals a high content in secreted proteins". In : *Proteomics* 11.9, p. 1798–1813.

- LIMPENS, R. W., SCHAAR, H. M. van der, KUMAR, D., KOSTER, A. J., SNIJDER, E. J., KUPPEVELD, F. J. van et BÁRCENA, M. (2011). "The transformation of enterovirus replication structures : a three-dimensional study of single-and double-membrane compartments". In : *MBio* 2.5, e00166–11.
- LONGATTI, A., BOYD, B. et CHISARI, F. V. (2015). "Virion-independent transfer of replication-competent hepatitis C virus RNA between permissive cells". In : *Journal of virology* 89.5, p. 2956–2961.
- LOPEZ-MOYA, J. J. (2002). "Genes involved in insect-mediated transmission of plant viruses". In : *Plant viruses as molecular pathogens*, p. 31–55.
- MAEHAMA, T., FUKASAWA, M., DATE, T., WAKITA, T. et HANADA, K. (2013). "A class II phosphoinositide 3-kinase plays an indispensable role in hepatitis C virus replication". In : *Biochemical and biophysical research communications* 440.1, p. 150–156.
- MAHAJAN, S. K., CHISHOLM, S. T., WHITHAM, S. A. et CARRINGTON, J. C. (1998). "Identification and characterization of a locus (RTM1) that restricts long-distance movement of tobacco etch virus in Arabidopsis thaliana". In : *The Plant Journal* 14.2, p. 177– 186.
- MCCARTNEY, A. W., GREENWOOD, J. S., FABIAN, M. R., WHITE, K. A. et MULLEN,
 R. T. (2005). "Localization of the tomato bushy stunt virus replication protein p33 reveals a peroxisome-to-endoplasmic reticulum sorting pathway". In : *The Plant Cell* 17.12, p. 3513–3531.
- MCNEW, J. A., SØGAARD, M., LAMPEN, N. M., MACHIDA, S., YE, R. R., LACOMIS, L., TEMPST, P., ROTHMAN, J. E. et SÖLLNER, T. H. (1997). "Ykt6p, a prenylated SNARE essential for endoplasmic reticulum-Golgi transport". In : *Journal of Biological Chemistry* 272.28, p. 17776–17783.

- MEIER, I. et SOMERS, D. E. (2011). "Regulation of nucleocytoplasmic trafficking in plants".In : *Current opinion in plant biology* 14.5, p. 538–546.
- MERKLE, T. (2001). "Nuclear import and export of proteins in plants : a tool for the regulation of signalling". In : *Planta* 213.4, p. 499–517.
- MILLER, D. J., SCHWARTZ, M. D. et AHLQUIST, P. (2001). "Flock house virus RNA replicates on outer mitochondrial membranes in Drosophila cells". In : *Journal of virology* 75.23, p. 11664–11676.
- MILLER, S., KASTNER, S., KRIJNSE-LOCKER, J., BÜHLER, S. et BARTENSCHLAGER, R. (2007). "The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner". In : *Journal of Biological Chemistry* 282.12, p. 8873–8882.
- MINGOT, A., VALLI, A., RODAMILANS, B., SAN LEÓN, D., BAULCOMBE, D. C., GARCÍA, J. A. et LÓPEZ-MOYA, J. J. (2016). "The P1N-PISPO trans-frame gene of Sweet Potato Feathery Mottle Potyvirus is produced during virus infection and functions as an RNA silencing suppressor". In : *Journal of virology* 90.7, p. 3543–3557.
- MIORIN, L., ROMERO-BREY, I., MAIURI, P., HOPPE, S., KRIJNSE-LOCKER, J., BAR-TENSCHLAGER, R. et MARCELLO, A. (2013). "Three-dimensional architecture of tickborne encephalitis virus replication sites and trafficking of the replicated RNA". In : *Journal of virology* 87.11, p. 6469–6481.
- MOVAHED, N., PATARROYO, C., SUN, J., VALI, H., LALIBERTE, J.-F. et ZHENG, H. (2017). "Cytoplasmic Inclusion of Turnip Mosaic Virus serves as a docking point for the intercellular movement of viral replication vesicles". In : *Plant Physiology*, pp–01484.
- MURCHA, M. W., KMIEC, B., KUBISZEWSKI-JAKUBIAK, S., TEIXEIRA, P. F., GLASER,
 E. et WHELAN, J. (2014). "Protein import into plant mitochondria : signals, machinery,
 processing, and regulation". In : *Journal of experimental botany* 65.22, p. 6301–6335.

- NAGY, P. D. (2016). "Tombusvirus-host interactions : co-opted evolutionarily conserved host factors take center court". In : *Annual review of virology* 3, p. 491–515.
- NAVARRO, B., RUBINO, L. et RUSSO, M. (2004). "Expression of the Cymbidium ringspot virus 33-kilodalton protein in Saccharomyces cerevisiae and molecular dissection of the peroxisomal targeting signal". In : *Journal of virology* 78.9, p. 4744–4752.
- NEBENFÜHR, A., RITZENTHALER, C. et ROBINSON, D. G. (2002). "Brefeldin A : deciphering an enigmatic inhibitor of secretion". In : *Plant physiology* 130.3, p. 1102–1108.
- NG, J. C. et FALK, B. W. (2006). "Virus-vector interactions mediating nonpersistent and semipersistent transmission of plant viruses". In : *Annu. Rev. Phytopathol.* 44, p. 183–212.
- NICOLAS, W. J., GRISON, M. S., TRÉPOUT, S., GASTON, A., FOUCHÉ, M., CORDE-LIÈRES, F. P., OPARKA, K., TILSNER, J., BROCARD, L. et BAYER, E. M. (2017).
 "Architecture and permeability of post-cytokinesis plasmodesmata lacking cytoplasmic sleeves." In : *Nature plants* 3, p. 17082–17082.
- NIELSEN, E., CHEUNG, A. Y. et UEDA, T. (2008). "The regulatory RAB and ARF GTPases for vesicular trafficking". In : *Plant Physiology* 147.4, p. 1516–1526.
- NISHIKIORI, M., DOHI, K., MORI, M., MESHI, T., NAITO, S. et ISHIKAWA, M. (2006). "Membrane-bound tomato mosaic virus replication proteins participate in RNA synthesis and are associated with host proteins in a pattern distinct from those that are not membrane bound". In : *Journal of virology* 80.17, p. 8459–8468.
- NISHIKIORI, M., MORI, M., DOHI, K., OKAMURA, H., KATOH, E., NAITO, S., MESHI, T. et ISHIKAWA, M. (2011). "A host small GTP-binding protein ARL8 plays crucial roles in tobamovirus RNA replication". In : *PLoS pathogens* 7.12, e1002409.
- OHNO, T, TAKAMATSU, N, MESHI, T, OKADA, Y, NISHIGUCHI, M et KIHO, Y (1983). "Single amino acid substitution in 30K protein of TMV defective in virus transport function". In : *Virology* 131.1, p. 255–258.

- OKINAKA, Y., MISE, K., OKUNO, T. et FURUSAWA, I. (2003). "Characterization of a novel barley protein, HCP1, that interacts with the Brome mosaic virus coat protein". In : *Molecular plant-microbe interactions* 16.4, p. 352–359.
- OLSPERT, A., CHUNG, B. Y.-W., ATKINS, J. F., CARR, J. P. et FIRTH, A. E. (2015). "Transcriptional slippage in the positive-sense RNA virus family Potyviridae". In : *EMBO reports*, e201540509.
- OPARKA, K. J. et CRUZ, S. S. (2000). "The great escape : phloem transport and unloading of macromolecules". In : *Annual review of plant biology* 51.1, p. 323–347.
- OVEČKA, M, LANG, I, BALUŠKA, F, ISMAIL, A, ILLEŠ, P et LICHTSCHEIDL, I. (2005). "Endocytosis and vesicle trafficking during tip growth of root hairs". In : *Protoplasma* 226.1, p. 39–54.
- PASCAL, E., SANDERFOOT, A. A., WARD, B. M., MEDVILLE, R., TURGEON, R. et LA-ZAROWITZ, S. G. (1994). "The geminivirus BR1 movement protein binds single-stranded DNA and localizes to the cell nucleus." In : *The Plant Cell* 6.7, p. 995–1006.
- PASTOR-CANTIZANO, N., BERNAT-SILVESTRE, C., MARCOTE, M. J. et ANIENTO, F. (2017). "Loss of Arabidopsis p24 function affects ERD2 traffic and Golgi structure and activates the unfolded protein response". In : *J Cell Sci*, jcs–203802.
- PATARROYO, C., LALIBERTÉ, J.-F. et ZHENG, H. (2013). "Hijack it, change it : how do plant viruses utilize the host secretory pathway for efficient viral replication and spread?" In : *Frontiers in plant science* 3, p. 308.
- PAUL, D., ROMERO-BREY, I., GOUTTENOIRE, J., STOITSOVA, S., KRIJNSE-LOCKER, J., MORADPOUR, D. et BARTENSCHLAGER, R. (2011). "NS4B self-interaction through conserved C-terminal elements is required for the establishment of functional hepatitis C virus replication complexes". In : *Journal of virology* 85.14, p. 6963–6976.

- PÉREZ-LARA, Á. et JAHN, R. (2015). "Extended synaptotagmins (E-Syts) : architecture and dynamics of membrane contact sites revealed". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112.16, p. 4837–4838.
- POMPA, A., DE MARCHIS, F., PALLOTTA, M. T., BENITEZ-ALFONSO, Y., JONES, A., SCHIPPER, K., MOREAU, K., ŽÁRSKÝ, V., DI SANSEBASTIANO, G. P. et BELLUCCI, M. (2017). "Unconventional Transport Routes of Soluble and Membrane Proteins and Their Role in Developmental Biology". In : *International journal of molecular sciences* 18.4, p. 703.
- PROD'HOMME, D., JAKUBIEC, A., TOURNIER, V., DRUGEON, G. et JUPIN, I. (2003).
 "Targeting of the turnip yellow mosaic virus 66K replication protein to the chloroplast envelope is mediated by the 140K protein". In : *Journal of virology* 77.17, p. 9124–9135.
- RAJAMÄKI, M.-L. et VALKONEN, J. P. (1999). "The 6K2 protein and the VPg of potato virus A are determinants of systemic infection in Nicandra physaloides". In : *Molecular plant-microbe interactions* 12.12, p. 1074–1081.
- RAJENDRAN, K. et NAGY, P. D. (2004). "Interaction between the replicase proteins of Tomato bushy stunt virus in vitro and in vivo". In : *Virology* 326.2, p. 250–261.
- (2006). "Kinetics and functional studies on interaction between the replicase proteins of Tomato bushy stunt virus : requirement of p33 : p92 interaction for replicase assembly".
 In : Virology 345.1, p. 270–279.
- RAMAKRISHNAIAH, V., THUMANN, C., FOFANA, I., HABERSETZER, F., PAN, Q., RUITER, P. E. de, WILLEMSEN, R., DEMMERS, J. A., RAJ, V. S., JENSTER, G. et al. (2013). "Exosome-mediated transmission of hepatitis C virus between human hepatoma Huh7. 5 cells". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.32, p. 13109–13113.

- RANTALAINEN, K. I., ESKELIN, K., TOMPA, P. et MÄKINEN, K. (2011). "Structural flexibility allows the functional diversity of potyvirus genome-linked protein VPg". In : *Journal of virology* 85.5, p. 2449–2457.
- RAO, A. et GRANTHAM, G. L. (1995). "A spontaneous mutation in the movement protein gene of brome mosaic virus modulates symptom phenotype in Nicotiana benthamiana."
 In : Journal of virology 69.4, p. 2689–2691.
- REGHELLIN, V, DONNICI, L, FENU, S, BERNO, V, CALABRESE, V, PAGANI, M, ABRI-GNANI, S, PERI, F, DE FRANCESCO, R et NEDDERMANN, P (2014). "NS5A Inhibitors Impair NS5A–Phosphatidylinositol 4-Kinase IIIα Complex Formation and Cause a Decrease of Phosphatidylinositol 4-Phosphate and Cholesterol Levels in Hepatitis C Virus-Associated Membranes". In : Antimicrobial agents and chemotherapy 58.12, p. 7128– 7140.
- REIS FIGUEIRA, A. dos, GOLEM, S., GOREGAOKER, S. P. et CULVER, J. N. (2002). "A nuclear localization signal and a membrane association domain contribute to the cellular localization of the Tobacco mosaic virus 126-kDa replicase protein". In : *Virology* 301.1, p. 81–89.
- RESTREPO-HARTWIG, M. A. et CARRINGTON, J. C. (1994). "The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication." In : *Journal of virology* 68.4, p. 2388–2397.
- RESTREPO-HARTWIG, M. A. et AHLQUIST, P. (1996). "Brome mosaic virus helicase-and polymerase-like proteins colocalize on the endoplasmic reticulum at sites of viral RNA synthesis." In : *Journal of Virology* 70.12, p. 8908–8916.
- REVERS, F. et GARCÍA, J. A. (2015). "Chapter three-molecular biology of potyviruses". In : *Advances in virus research* 92, p. 101–199.
- RITZENTHALER, C. (2011). "Parallels and distinctions in the direct cell-to-cell spread of the plant and animal viruses". In : *Current opinion in virology* 1.5, p. 403–409.

- RITZENTHALER, C., NEBENFÜHR, A., MOVAFEGHI, A., STUSSI-GARAUD, C., BEHNIA, L., PIMPL, P., STAEHELIN, L. A. et ROBINSON, D. G. (2002). "Reevaluation of the effects of brefeldin A on plant cells using tobacco Bright Yellow 2 cells expressing Golgitargeted green fluorescent protein and COPI antisera". In : *The Plant Cell* 14.1, p. 237– 261.
- RITZENTHALER, C., PINCK, M. et PINCK, L. (1995). "Grapevine fanleaf nepovirus P38 putative movement protein is not transiently expressed and is a stable final maturation product in vivo". In : *Journal of general virology* 76.4, p. 907–915.
- ROBINSON, D. G., DING, Y. et JIANG, L. (2016). "Unconventional protein secretion in plants : a critical assessment". In : *Protoplasma* 253.1, p. 31–43.
- ROBY, J. A., SETOH, Y. X., HALL, R. A. et KHROMYKH, A. A. (2015). "Post-translational regulation and modifications of flavivirus structural proteins". In : *Journal of General Virology* 96.7, p. 1551–1569.
- ROCHON, D., SINGH, B., READE, R., THEILMANN, J., GHOSHAL, K., ALAM, S. B. et MAGHODIA, A. (2014). "The p33 auxiliary replicase protein of Cucumber necrosis virus targets peroxisomes and infection induces de novo peroxisome formation from the endoplasmic reticulum". In : *Virology* 452, p. 133–142.
- ROMERO-BREY, I., BERGER, C., KALLIS, S., KOLOVOU, A., PAUL, D., LOHMANN, V. et BARTENSCHLAGER, R. (2015). "NS5A domain 1 and polyprotein cleavage kinetics are critical for induction of double-membrane vesicles associated with hepatitis C virus replication". In : *MBio* 6.4, e00759–15.
- ROMERO-BREY, I., MERZ, A., CHIRAMEL, A., LEE, J.-Y., CHLANDA, P., HASELMAN,
 U., SANTARELLA-MELLWIG, R., HABERMANN, A., HOPPE, S., KALLIS, S. et al.
 (2012). "Three-dimensional architecture and biogenesis of membrane structures associated with hepatitis C virus replication". In : *PLoS pathogens* 8.12, e1003056.

- RUSCH, S. L. et KENDALL, D. A. (1995). "Protein transport via amino-terminal targeting sequences : common themes in diverse systems". In : *Molecular membrane biology* 12.4, p. 295–307.
- RUTTER, B. et INNES, R. W. (2017). "Extracellular vesicles isolated from the leaf apoplast carry stress-response proteins". In : *Plant physiology*, pp–01253.
- RYABOV, E. V., ROBINSON, D. J. et TALIANSKY, M. E. (1999). "A plant virus-encoded protein facilitates long-distance movement of heterologous viral RNA". In : *Proceedings* of the National Academy of Sciences 96.4, p. 1212–1217.
- SAHEKI, Y. et DE CAMILLI, P. (2017). "The Extended-Synaptotagmins". In : *Biochimica* et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research.
- SAITO, C. et UEDA, T. (2009). "Functions of RAB and SNARE proteins in plant life". In : International review of cell and molecular biology 274, p. 183–233.
- SANFAÇON, H., WIECZOREK, A. et HANS, F. (1995). "Expression of the tomato ringspot nepovirus movement and coat proteins in protoplasts". In : *Journal of general virology* 76.9, p. 2299–2303.
- SCHAAD, M. C. et CARRINGTON, J. C. (1996). "Suppression of long-distance movement of tobacco etch virus in a nonsusceptible host." In : *Journal of virology* 70.4, p. 2556–2561.
- SCHAAD, M. C., LELLIS, A. D. et CARRINGTON, J. C. (1997). "VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement." In : *Journal of virology* 71.11, p. 8624–8631.
- SHAO, S. et HEGDE, R. S. (2011). "Membrane protein insertion at the endoplasmic reticulum". In : Annual review of cell and developmental biology 27, p. 25–56.
- SHARMA, M., SASVARI, Z. et NAGY, P. D. (2011). "Inhibition of phospholipid biosynthesis decreases the activity of the tombusvirus replicase and alters the subcellular localization of replication proteins". In : *Virology* 415.2, p. 141–152.

- SOELLICK, T.-R., UHRIG, J., BUCHER, G., KELLMANN, J.-W. et SCHREIER, P. (2000). "The movement protein NSm of tomato spotted wilt tospovirus (TSWV) : RNA binding, interaction with the TSWV N protein, and identification of interacting plant proteins". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97.5, p. 2373–2378.
- SOMNUKE, P., HAUHART, R. E., ATKINSON, J. P., DIAMOND, M. S. et AVIRUTNAN, P. (2011). "N-linked glycosylation of dengue virus NS1 protein modulates secretion, cellsurface expression, hexamer stability, and interactions with human complement". In : *Virology* 413.2, p. 253–264.
- SONG, P., ZHI, H., WU, B., CUI, X. et CHEN, X. (2016). "Soybean Golgi SNARE 12 protein interacts with Soybean mosaic virus encoded P3N-PIPO protein". In : *Biochemical and biophysical research communications* 478.4, p. 1503–1508.
- SOREL, M, GARCIA, J. et GERMAN-RETANA, S (2014). "The Potyviridae cylindrical inclusion helicase : a key multipartner and multifunctional protein". In : *Molecular Plant-Microbe Interactions* 27.3, p. 215–226.
- SOTO-ACOSTA, R., BAUTISTA-CARBAJAL, P., CERVANTES-SALAZAR, M., ANGEL-AMBROCIO, A. H. et ANGEL, R. M. del (2017). "DENV up-regulates the HMG-CoA reductase activity through the impairment of AMPK phosphorylation : A potential antiviral target". In : *PLoS pathogens* 13.4, e1006257.
- SOUMOUNOU, Y. et LALIBERTÉ, J.-F. (1994). "Nucleic acid-binding properties of the P1 protein of turnip mosaic potyvirus produced in Escherichia coli". In : *Journal of general virology* 75.10, p. 2567–2573.
- SPETZ, C. et VALKONEN, J. P. (2004). "Potyviral 6K2 protein long-distance movement and symptom-induction functions are independent and host-specific". In : *Molecular plantmicrobe interactions* 17.5, p. 502–510.
- STEWART, L. R., MEDINA, V., TIAN, T., TURINA, M., FALK, B. W. et NG, J. C. (2010). "A mutation in the Lettuce infectious yellows virus minor coat protein disrupts white-

fly transmission but not in planta systemic movement". In : *Journal of virology* 84.23, p. 12165–12173.

- STRATING, J. R. et KUPPEVELD, F. J. van (2017). "Viral rewiring of cellular lipid metabolism to create membranous replication compartments". In : *Current Opinion in Cell Biology* 47, p. 24–33.
- SUHY, D. A., GIDDINGS, T. H. et KIRKEGAARD, K. (2000). "Remodeling the endoplasmic reticulum by poliovirus infection and by individual viral proteins : an autophagy-like origin for virus-induced vesicles". In : *Journal of virology* 74.19, p. 8953–8965.
- SUZUKI, T. (2017). "Hepatitis C Virus Replication". In : *Organelle Contact Sites*. Springer, p. 199–209.
- SYNEK, L., SEKERES, J. et ZARSKY, V. (2014). "The exocyst at the interface between cytoskeleton and membranes in eukaryotic cells". In : *Frontiers in plant science* 4, p. 543.
- TANG, W.-F., YANG, S.-Y., WU, B.-W., JHENG, J.-R., CHEN, Y.-L., SHIH, C.-H., LIN, K.-H., LAI, H.-C., TANG, P. et HORNG, J.-T. (2007). "Reticulon 3 binds the 2C protein of enterovirus 71 and is required for viral replication". In : *Journal of Biological Chemistry* 282.8, p. 5888–5898.
- TEH, O.-K. et HOFIUS, D. (2014). "Membrane trafficking and autophagy in pathogentriggered cell death and immunity". In : *Journal of experimental botany* 65.5, p. 1297– 1312.
- THIVIERGE, K., COTTON, S., DUFRESNE, P. J., MATHIEU, I., BEAUCHEMIN, C., IDE, C., FORTIN, M. G. et LALIBERTÉ, J.-F. (2008). "Eukaryotic elongation factor 1A interacts with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase and VPg-Pro in virus-induced vesicles". In : Virology 377.1, p. 216–225.
- THYSSEN, G., SVAB, Z. et MALIGA, P. (2012). "Cell-to-cell movement of plastids in plants". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109.7, p. 2439–2443.

- TILSNER, J., LINNIK, O., WRIGHT, K. M., BELL, K., ROBERTS, A. G., LACOMME, C., SANTA CRUZ, S. et OPARKA, K. J. (2012). "The TGB1 movement protein of Potato virus X reorganizes actin and endomembranes into the X-body, a viral replication factory". In : *Plant physiology* 158.3, p. 1359–1370.
- TILSNER, J., LINNIK, O., LOUVEAUX, M., ROBERTS, I. M., CHAPMAN, S. N. et OPARKA,
 K. J. (2013). "Replication and trafficking of a plant virus are coupled at the entrances of plasmodesmata". In : *J Cell Biol* 201.7, p. 981–995.
- TORRANCE, L., LUKHOVITSKAYA, N. I., SCHEPETILNIKOV, M. V., COWAN, G. H., ZIE-GLER, A. et SAVENKOV, E. I. (2009). "Unusual long-distance movement strategies of Potato mop-top virus RNAs in Nicotiana benthamiana". In : *Molecular plant-microbe interactions* 22.4, p. 381–390.
- TURINA, M., OMAROV, R., MURPHY, J. F., BAZALDUA-HERNANDEZ, C., DESVOYES,
 B. et SCHOLTHOF, H. B. (2003). "A newly identified role for Tomato bushy stunt virus
 P19 in short distance spread". In : *Molecular plant pathology* 4.1, p. 67–72.
- UEKI, S. et CITOVSKY, V. (2002). "The systemic movement of a tobamovirus is inhibited by a cadmium-ion-induced glycine-rich protein". In : *Nature cell biology* 4.7, p. 478–486.
- (2011). "To gate, or not to gate : regulatory mechanisms for intercellular protein transport and virus movement in plants". In : *Molecular plant* 4.5, p. 782–793.
- UEMURA, T., SATO, M. H. et TAKEYASU, K. (2005). "The longin domain regulates subcellular targeting of VAMP7 in Arabidopsis thaliana". In : *FEBS letters* 579.13, p. 2842– 2846.
- UEMURA, T. et UEDA, T. (2014). "Plant vacuolar trafficking driven by RAB and SNARE proteins". In : *Current opinion in plant biology* 22, p. 116–121.
- UNGAR, D. et HUGHSON, F. M. (2003). "SNARE protein structure and function". In : Annual review of cell and developmental biology 19.1, p. 493–517.

- UNTIVEROS, M., OLSPERT, A., ARTOLA, K., FIRTH, A. E., KREUZE, J. F. et VALKONEN,
 J. (2016). "A novel sweet potato potyvirus open reading frame (ORF) is expressed via polymerase slippage and suppresses RNA silencing". In : *Molecular plant pathology* 17.7, p. 1111–1123.
- VAN DER HEIJDEN, M. W., CARETTE, J. E., REINHOUD, P. J., HAEGI, A. et BOL, J. F. (2001). "Alfalfa mosaic virus replicase proteins P1 and P2 interact and colocalize at the vacuolar membrane". In : *Journal of virology* 75.4, p. 1879–1887.
- VERCHOT, J., KOONIN, E. V. et CARRINGTON, J. C. (1991). "The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase".
 In : Virology 185.2, p. 527–535.
- VIJAYAPALANI, P., MAESHIMA, M., NAGASAKI-TAKEKUCHI, N. et MILLER, W. A. (2012). "Interaction of the trans-frame potyvirus protein P3N-PIPO with host protein PCaP1 facilitates potyvirus movement". In : *PLoS pathogens* 8.4, e1002639.
- VOGEL, K. et ROCHE, P. A. (1999). "SNAP-23 and SNAP-25 Are Palmitoylatedin Vivo". In : *Biochemical and biophysical research communications* 258.2, p. 407–410.
- VUKAŠINOVIĆ, N. et ŻÁRSKY, V. (2016). "Tethering complexes in the Arabidopsis endomembrane system". In : *Frontiers in cell and developmental biology* 4.
- WAN, J., BASU, K., MUI, J., VALI, H., ZHENG, H. et LALIBERTÉ, J.-F. (2015). "Ultrastructural characterization of turnip mosaic virus-induced cellular rearrangements reveals membrane-bound viral particles accumulating in vacuoles". In : *Journal of virology* 89.24, p. 12441–12456.
- WAN, J., CABANILLAS, D. G., ZHENG, H. et LALIBERTÉ, J.-F. (2015). "Turnip mosaic virus moves systemically through both phloem and xylem as membrane-associated complexes". In : *Plant physiology* 167.4, p. 1374–1388.
- WAN, S. et JIANG, L. (2016). "Endoplasmic reticulum (ER) stress and the unfolded protein response (UPR) in plants". In : *Protoplasma* 253.3, p. 753–764.

- WEI, T. et WANG, A. (2008). "Biogenesis of cytoplasmic membranous vesicles for plant potyvirus replication occurs at endoplasmic reticulum exit sites in a COPI-and COPIIdependent manner". In : *Journal of virology* 82.24, p. 12252–12264.
- WEI, T., ZHANG, C., HONG, J., XIONG, R., KASSCHAU, K. D., ZHOU, X., CARRINGTON,
 J. C. et WANG, A. (2010). "Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO". In : *PLoS pathogens* 6.6, e1000962.
- WEI, T., ZHANG, C., HOU, X., SANFAÇON, H. et WANG, A. (2013). "The SNARE protein Syp71 is essential for turnip mosaic virus infection by mediating fusion of virus-induced vesicles with chloroplasts". In : *PLoS pathogens* 9.5, e1003378.
- WELLINK, J, VAN LENT, J., VERVER, J, SIJEN, T, GOLDBACH, R. et VAN KAMMEN, A (1993). "The cowpea mosaic virus M RNA-encoded 48-kilodalton protein is responsible for induction of tubular structures in protoplasts." In : *Journal of virology* 67.6, p. 3660– 3664.
- WELSCH, S., MILLER, S., ROMERO-BREY, I., MERZ, A., BLECK, C. K., WALTHER,
 P., FULLER, S. D., ANTONY, C., KRIJNSE-LOCKER, J. et BARTENSCHLAGER, R.
 (2009). "Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites". In : *Cell host & amp; microbe* 5.4, p. 365–375.
- WESSELS, E., DUIJSINGS, D., NIU, T.-K., NEUMANN, S., OORSCHOT, V. M., LANGE,
 F. de, LANKE, K. H., KLUMPERMAN, J., HENKE, A., JACKSON, C. L. et al. (2006).
 "A viral protein that blocks Arf1-mediated COP-I assembly by inhibiting the guanine nucleotide exchange factor GBF1". In : *Developmental cell* 11.2, p. 191–201.
- WESTWOOD, J. H., LEWSEY, M. G., MURPHY, A. M., TUNGADI, T., BATES, A., GIL-LIGAN, C. A. et CARR, J. P. (2014). "Interference with jasmonic acid-regulated gene expression is a general property of viral suppressors of RNA silencing but only partly ex-

plains virus-induced changes in plant-aphid interactions". In : *Journal of General Virology* 95.3, p. 733-739.

- WHITHAM, S. A., ANDERBERG, R. J., CHISHOLM, S. T. et CARRINGTON, J. C. (2000). "Arabidopsis RTM2 gene is necessary for specific restriction of tobacco etch virus and encodes an unusual small heat shock–like protein". In : *The Plant Cell* 12.4, p. 569–582.
- WILLEBRAND, M., JASCUR, T., BONNEFOY-BÉRARD, N., YANO, H., ALTMAN, A., MATSUDA, Y. et MUSTELIN, T. (1996). "Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase blocks T cell antigen receptor/CD3-induced activation of the mitogen-activated kinase Erk2". In : *The FEBS Journal* 235.3, p. 828–835.
- WITTMANN, S., CHATEL, H., FORTIN, M. G. et LALIBERTÉ, J.-F. (1997). "Interaction of the Viral Protein Genome Linked of Turnip Mosaic Potyvirus with the Translational Eukaryotic Initiation Factor (iso) 4E ofArabidopsis thalianaUsing the Yeast Two-Hybrid System". In : *Virology* 234.1, p. 84–92.
- WRIGHT, K. M., COWAN, G. H., LUKHOVITSKAYA, N. I., TILSNER, J., ROBERTS, A. G., SAVENKOV, E. I. et TORRANCE, L. (2010). "The N-terminal domain of PMTV TGB1 movement protein is required for nucleolar localization, microtubule association, and longdistance movement". In : *Molecular plant-microbe interactions* 23.11, p. 1486–1497.
- XIONG, Z, KIM, K., GIESMAN-COOKMEYER, D et LOMMEL, S. (1993). "The roles of the red clover necrotic mosaic virus capsid and cell-to-cell movement proteins in systemic infection". In : *Virology* 192.1, p. 27–32.
- YANG, X., BALIJI, S., BUCHMANN, R. C., WANG, H., LINDBO, J. A., SUNTER, G. et BISARO, D. M. (2007). "Functional modulation of the geminivirus AL2 transcription factor and silencing suppressor by self-interaction". In : *Journal of virology* 81.21, p. 11972– 11981.

- YANG, Y., DING, B., BAULCOMBE, D. C. et VERCHOT, J. (2000). "Cell-to-cell movement of the 25K protein of Potato virus X is regulated by three other viral proteins". In : *Molecular plant-microbe interactions* 13.6, p. 599–605.
- YORIMITSU, T., SATO, K. et TAKEUCHI, M. (2014). "Molecular mechanisms of Sar/Arf GTPases in vesicular trafficking in yeast and plants". In : *Frontiers in plant science* 5.
- YU, I.-M., HOLDAWAY, H. A., CHIPMAN, P. R., KUHN, R. J., ROSSMANN, M. G. et CHEN, J. (2009). "Association of the pr peptides with dengue virus at acidic pH blocks membrane fusion". In : *Journal of virology* 83.23, p. 12101–12107.
- YU, I.-M., ZHANG, W., HOLDAWAY, H. A., LI, L., KOSTYUCHENKO, V. A., CHIPMAN,
 P. R., KUHN, R. J., ROSSMANN, M. G. et CHEN, J. (2008). "Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation". In : *Science* 319.5871, p. 1834–1837.
- YUAN, Z., CHEN, H., CHEN, Q., OMURA, T., XIE, L., WU, Z. et WEI, T. (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". In : *Virus research* 159.1, p. 62–68.
- ZHANG, J., ZHANG, Z., CHUKKAPALLI, V., NCHOUTMBOUBE, J. A., LI, J., RANDALL,
 G., BELOV, G. A. et WANG, X. (2016). "Positive-strand RNA viruses stimulate host phosphatidylcholine synthesis at viral replication sites". In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113.8, E1064–E1073.
- ZHAO, M. et BRUNGER, A. T. (2016). "Recent advances in deciphering the structure and molecular mechanism of the AAA+ ATPase N-ethylmaleimide-sensitive factor (NSF)".
 In : Journal of molecular biology 428.9, p. 1912–1926.
- ZHUANG, X. et JIANG, L. (2014). "Autophagosome biogenesis in plants : roles of SH3P2". In : *Autophagy* 10.4, p. 704–705.

PUBLICATION 3 : Turnip mosaic virus moves systemically through both phloem and xylem as membrane-associated complexes

Turnip mosaic virus moves systemically through both phloem and xylem as membrane-associated complexes

Plant Physiology

April 2015, Vol. 167, No. 4, p.1374-1388.

Juan Wan¹, Daniel Garcia Cabanillas¹, Huanquan Zheng², and Jean-François Laliberté^{1*}

- 1. INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada
- 2. Department of Biology, McGill University, Montréal, Québec, Canada

* Author for correspondence: Prof. Jean-François Laliberté

Address : INRS-Institut Armand Frappier

531, boulevard des Prairies, Laval, Québec, Canada, H7V 1B7

Tel: 1.450.687.5010

Email: jean-francois.laliberte@iaf.inrs.ca

Contributions : Le manuscrit a été publié dans *Plant Physiology*. J'ai effectué les expériences relatives aux analyses de la sève xylémiene (Figure 5D, Figure 7) et rédigé la partie du Matériels et méthodes correspondant aux extractions. La plupart des expériences de l'article ont été élaborées, réalisées et analysées par ma collègue Juan Wan. Le manuscrit a été rédigé par Juan Wan et le Pr. Jean-François Laliberté et Pr. Huanquan Zheng ont aidé à l'améliorer.

A.1 Résumé

Les virus de plante se déplacent systémiquement au travers des vaisseaux du phloème. Bien qu'ils se déplacent sous forme de virions ou sous forme de complexes ribonucléoprotéiques (RNP), leur nature n'a pas encore était clarifiée. Le génome ARN d'environ 10kb du virus de la mosaïque du navet (Turnip mosaic virus, TuMV) code pour une protéine virale membranaire appelée $6K_2$. La protéine $6K_2$ induit une réorganisation du système endomembranaire pour former des usines de réplication virale. Les usines de réplication virale prennent la forme de vésicules qui contiennent l'ARN viral (ARNv) ainsi que des protéines impliquées dans la réplication. Ici, nous dévoilons la présence de vésicules contenant la protéine $6K_2$, l'ARNv, ainsi que l'ARN polymérase ARN dépendante dans les vaisseaux du phloème et du xylème. Des observations effectuées par microscopie électronique à transmission ont montré que les vésicules contenant l'ARN viral étaient associées avec des particules virales. L'induction de la mort cellulaire autour des vaisseaux du xylème sur une courte portion de tige a confirmé que le TuMV pouvait accomplir une infection systémique en passant par les vaisseaux du xylème. Des analyses de vaisseaux du xylème et du phloème issus de plantes infectées par le Potato virus X ont révélé que de l'ARNv non encapsidé associé à des lipides était présent. Ces résultats indiquent que la présence de complexes RNP associé à des

membranes dans les vaisseaux du xylème et du phloème n'est pas uniquement restreinte au TuMV. Prises ensemble ces analyses indiquent que des usines de réplication virale peuvent se retrouver non seulement dans les vaisseaux du phloème, mais aussi dans les vaisseaux du xylème.

A.2 Article

Abstract

Plant viruses move systemically in plants through the phloem. They move as virions or as ribonucleic protein complexes, although it is not clear what these complexes are made of. The approximately 10-kb RNA genome of Turnip mosaic virus (TuMV) encodes a membrane protein, known as 6K₂, that induces endomembrane rearrangements for the formation of viral replication factories. These factories take the form of vesicles that contain viral RNA (vRNA) and viral replication proteins. In this study, we report the presence of 6K₂-tagged vesicles containing vRNA and the vRNAdependent RNA polymerase in phloem sieve elements and in xylem vessels. Transmission electron microscopy observations showed the presence in the xylem vessels of vRNA-containing vesicles that were associated with viral particles. Stemgirdling experiments, which leave xylem vessels intact but destroy the surrounding tissues, confirmed that TuMV could establish a systemic infection of the plant by going through xylem vessels. Phloem sieve elements and xylem vessels from Potato virus Xinfected plants also contained lipid-associated nonencapsidated vRNA, indicating that the presence of membrane-associated ribonucleic protein complexes in the phloem and xylem may not be limited to TuMV. Collectively, these studies indicate that viral replication factories could end up in the phloem and the xylem.

Introduction

Plant viruses use the host preexisting transport routes to propagate infection to the whole plant. After replication in the initially infected cells, viruses move cell to cell through plasmodesmata (PDs) and start a new round of replication in the newly infected cells. This cycle is repeated until viruses reach vascular tissues, where they enter into the conducting tubes for systemic movement. Several studies have indicated that plant viruses are passively transported along the source-to-sink flow of photoassimilates and thus are believed to move systemically through the phloem (for review, see Hipper et al., 2013).

The conducting tube of the phloem is the sieve element. The mature sieve element is enucleated and relies on the associated companion cells for the maintenance of its physiological function (Fisher et al., 1992). The specialized PD connecting one sieve element with one companion cell is called the pore plasmodesmal unit (PPU). Different from the other PDs, PPUs are always branched on the companion cell side but have only one channel on the sieve element side (Oparka and Turgeon, 1999). It is believed that the loading and uploading of viral material during phloem transport are through PPUs. Even though the size exclusion limit of PPUs (Kempers and Bel, 1997) is larger than that of the other PDs (Wolf et al., 1989; Derrick et al., 1990), PPUs should not allow, in their native state, virions or viral ribonucleoprotein (vRNP) complexes to pass through. It is thus believed that specific interactions between virus and host factors are required to allow the viral entity to go through. For instance, the movement protein of *Cucumber mosaic virus* (CMV) is targeted to PPUs (Blackman et al., 1998), suggesting that this viral protein modifies the size exclusion limit of PPUs and helps viral entry into sieve elements.

Most plant viruses are assumed to move systemically through the phloem as virions. This assumption is based on the observation that Coat Protein (CP) deletions debilitating virus assembly prevent systemic infection (Brault et al., 2003; Zhang et al., 2013; Hipper et al., 2014). Some investigations showed the actual presence of virions in sieve elements. This is the case for the icosahedral *Tobacco ringspot virus* (Halk and McGuire, 1973), *Carrot red leaf virus* (Murant and Roberts, 1979), *Potato leaf roll virus*

(Shepardson et al., 1980), and *Beet western yellows virus* (Hoefert, 1984). In addition, virions also were observed in phloem sap, such as the icosahedral CMV (Requena et al., 2006) and the rigid rod-shaped Cucumber green mottle mosaic virus (Simón-Buela and García-Arenal, 1999). Some viruses also are believed to move as ribonucleic protein (RNP) complexes, since systemic movement was observed in CP mutants where virion assembly was hindered. For instance, *Tobacco rattle virus, Potato mop-top virus, Brome mosaic virus*, and *Tomato bushy stunt virus* can still move systemically when the CP gene has been deleted from the viral genome (Swanson et al., 2002; Savenkov et al., 2003; Gopinath and Kao, 2007; Manabayeva et al., 2013). For potyviruses, it is still not clear if long-distance transport involves exclusively viral particles or if vRNP complexes also are implicated (Dolja et al., 1994, 1995; Cronin et al., 1995; Schaad et al., 1997; Kasschau and Carrington, 2001; Rajamaki and Valkonen, 2002). But whether virions or vRNP complexes are involved in viral movement, the full nature of the viral entity being implicated has not been defined.

Xylem also is used for systemic infection of viruses, but its importance in viral transport generally has been overlooked. Vessel elements are the building blocks of xylem vessels, which constitute the major part of the water-upward-transporting system in a plant. The side walls of mature vessel elements contain pits, which are areas lacking a secondary cell wall; the end walls of the mature vessel elements are removed, and the openings are called perforation plates (Roberts and McCann, 2000). CP or virions of some plant viruses of all different shapes have been detected in the xylem vessels and/or guttation fluid, suggesting that these viruses may move systemically through xylem vessels. For example, the CP of the icosahedral Tomato bushy stunt virus (Manabayeva et al., 2013) and Rice yellow mottle virus (Opalka et al., 1998), the CP of the rigid rod-shaped Soilborne wheat mosaic virus (Verchot et al., 2001) and Cucumber green mottle mosaic virus (Moreno et al., 2004), and the flexuous rodshaped Potato virus X (PVX; Betti et al., 2012) were detected in xylem vessels. Colocalization of anti-Rice yellow mottle virus antibodies and a cell wall marker for cellulosic β -(1-4)-D-glucans over vessel pit membranes suggests that the pit membranes might be a pathway for virus migration between vessels (Opalka et al., 1998). Moreover, flexuous rod-shaped virions of Zucchini yellow mosaic virus were

found in both xylem vessels of root tissue and the guttation fluid (French and Elder, 1999). Finally, icosahedral *Brome mosaic virus* (Ding et al., 2001) and rigid rod-shaped *Tomato mosaic virus* and *Pepper mild mottle virus* (French et al., 1993) virions were found in guttation fluid. Guttation fluid originates from xylem exudate, indicating that these plant viruses can move through xylem within the infected plant. The above studies, however, mainly relied on electron microscopy and infection assays and may have missed the presence of other viral components that might be involved in transport.

Turnip mosaic virus (TuMV) is a positive-strand RNA virus belonging to the family Potyviridae, genus Potyvirus, which contains around 30% of the currently known plant viruses and causes serious diseases in numerous crops (Shukla et al., 1994). Potyviruses are nonenveloped, flexuous rod-shaped particles of 680 to 900 nm in length and 11 to 13 nm in diameter. The genomic approximately 10-kb RNA encodes a polyprotein, which is processed into at least 11 mature proteins. TuMV remodels cellular membranes into viral factories, which are intracellular compartments involved in viral replication and movement. These compartments take the form of vesicles of approximately 100 nm in diameter originating from the endoplasmic reticulum (Grangeon et al., 2012). These vesicles contain viral RNA (vRNA) and viral and host proteins involved in vRNA replication (Beauchemin et al., 2007; Beauchemin and Laliberté, 2007; Dufresne et al., 2008; Huang et al., 2010; Grangeon et al., 2012). The viral membrane 6K₂ protein is involved in the membrane alterations and vesicle production (Beauchemin et al., 2007). The membrane-bound replication complexes can move intracellularly and cell to cell (Grangeon et al., 2013) at a rate of one cell being infected every 3 h (Agbeci et al., 2013). Intercellular trafficking of the replication complex is likely mediated by the PD-localized potyviral proteins Cytoplasmic Inclusion (CI) and P3N-PIPO (for N-terminal Half of P3 fused to the Pretty Interesting Potyviridae ORF; Carrington et al., 1998; Wei et al., 2010; Vijayapalani et al., 2012) as well as CP (Dolja et al., 1994, 1995), Viral Protein genome-linked (VPg; Nicolas et al., 1997; Rajamaki and Valkonen, 1999, 2002), and Helper Component-Proteinase (HC-Pro; Cronin et al., 1995; Kasschau et al., 1997; Rojas et al., 1997; Kasschau and Carrington, 2001), which are involved in both cell-to-cell and vascular movement.

It is expected that, ultimately, TuMV reaches the vascular tissues of the plant, but how and under what form it is released into the conducting tubes are not known. To further understand viral spread and systemic movement, we investigated the distribution of 6K₂-tagged TuMV factories in all of the leaf and stem tissues other than the epidermal cells. We found TuMV factories in all tissues. Interestingly, we observed 6K₂tagged vesicles, containing vRNA and viral replication proteins, in both phloem sieve elements and xylem vessels. We confirmed that TuMV could move systemically through xylem by a so-called stem-girdling assay, which induces cell death of the phloem without affecting xylem integrity. Hence, our study indicates that membrane-associated TuMV replication complexes are involved in the systemic movement of the virus.

Materials and Methods

Plasmid DNA and Plant Inoculation

Turnip mosaic virus infectious clone was engineered to coproduce $6K_2$ as a fluorescence protein fusion at its C-terminal end to form the plasmids pCambiaTuMV/6K₂:GFP and pCambiaTuMV/6K₂:mCherry (Cotton et al., 2009). The $6K_2$:GFP or $6K_2$:mCherry coding region was inserted between P1 and HC-Pro cistrons of the TuMV genome. The junctions flanking P1 and HC-Pro contained residues recognized by the P1 and Pro proteinases, respectively. $6K_2$:GFP or $6K_2$:mCherry is thus released from the polyprotein when the latter is processed during infection. TuMV infectious clones and the mock empty vector pCambia 0390 were electroporated into Agrobacterium tumefaciens strain AGL1 and selected on Luria-Bertani ampicillinkanamycin plates. The pellet of an overnight culture was resuspended in water supplemented with 10 mM MgCl₂ and 150 μ M acetosyringone and kept at room temperature for 2 to 4 h. The solution was then diluted to an optical density at 600 nm of 0.2. Agroinfiltration was performed in 4-week-old *N. benthamiana* plants, which were grown under a 16-h-light/8-h-dark photoperiod with 22°C day/20°C night temperatures.

Antibodies

The mouse monoclonal anti-dsRNA J2 antibody (stock solution is 1 mg mL⁻¹; English and Scientific Consulting) was used at the following dilutions: for immunohistolocalization, 1:500; and for immunogold labeling, 1:40. The rabbit polyclonal antibodies were used at the following dilutions for immunolocalization: for anti-vRdRp (Dufresne et al., 2008), 1:50; and for anti-CP (Cotton et al., 2009), 1:50. The dilutions for western-blot analysis were as follows: anti-GFP, 1:20,000; anti-vRdRp, 1:6,000; anti-elF(iso)4E (Léonard et al., 2004), 1:1,000; anti-CP, 1:2,500; and anti-PTB3 (Rühl et al., 2012), 1:5,000.

For immunohistolocalization, goat anti-mouse and goat anti-rabbit conjugated to Alexa Fluor 568 secondary antibodies (Molecular Probes) were used at a dilution of 1:500. For immunogold labeling, secondary goat anti-mouse antibodies conjugated to 10-nm gold particles (Sigma-Aldrich) were used at a dilution of 1:20. For western-blot analysis, the secondary goat anti-rabbit antibodies conjugated to horseradish peroxidase (Kirkegaard & Perry Laboratories) were used at a dilution of 1:20,000.

Cryohistological Preparation and Immunohistolocalization

Histological preparation and immunohistolocalization were done as described previously (Grangeon et al., 2013). Briefly, one N. benthamiana leaf was agroinfiltrated with mock empty vector or TuMV infectious clones or PVX-GFP (Peart et al., 2002). Systemically infected leaves and stems were fixed at 6 d postinoculation followed by a sucrose gradient and cryosectioning as described (Knapp et al., 2012). In addition, before sucrose gradient treatment, the samples were treated with 100 mM Gly in phosphate-buffered saline (PBS) for 1 h to reduce the background fluorescence. The sections were collected on Superfrost Plus Microscope Slides (Fisher Scientific) pretreated with 0.01% (w/v) poly-L-Lys (Sigma-Aldrich). After drying for 2 h, the sections were incubated in PBS for 20 min. They were then incubated for 1 h in a blocking solution of 5% (w/v) bovine serum albumin (BSA) and 0.3% (v/v) Triton X-100 in PBS. Thereafter, the sections were incubated for 1 h with the primary antibody in an incubation solution containing 5% (w/v) BSA and 0.05% (v/v) Tween 20 in PBS, washed three times with a washing solution of 0.05% (v/v) Tween 20 in PBS for 10 min, incubated for 1 h with secondary antibody, followed by washing three times with washing solution for 10 min. Both the primary and secondary antibodies were pretreated with mock sections for 1 h to reduce the nonspecific binding. SlowFade Gold (Molecular Probes) was mounted on the sections after they dried, and cover glasses (VWR) were sealed with nail polish.

Fluorescent Brightener 28, Aniline Blue, and DiOC₆(3) Staining

Fluorescent Brightener 28 (Calcofluor White M2R; Sigma-Aldrich) staining was done as described previously (Knapp et al., 2012). For staining sieve plate callose with Aniline Blue (Methyl Blue; Sigma-Aldrich), sections were incubated for 15 min in 0.05% (w/v) Aniline Blue in 50 mM sodium phosphate, pH 7.2, and then washed three times with PBS for 10 min. The stock solution and the buffer were mixed just before use. For DiOC₆(3) staining (Molecular Probes), DiOC₆(3) was used at a final concentration of 1

 μ M in PBS. Sections were incubated for 30 min in DiOC₆(3) solution and washed three times with PBS for 10 min. When Aniline Blue and DiOC₆(3) staining were coupled with immunohistolocalization, DiOC₆(3) staining was processed after immunohistolocalization, and Aniline Blue staining was the last step. All of the staining steps were performed in the dark.

Confocal Microscopy

The sections were observed using a 20× (numerical aperture = 0.8) objective and a 63× (numerical aperture = 1.4) oil-immersion objective on an LSM-780 confocal microscope (Zeiss). Zen 2011 (Zeiss) was used for image acquisition. Solid-state and argon ion lasers were used for LSM-780 microscope experiments. Excitation/emission wavelengths were 405/410 to 440 nm for Fluorescent Brightener 28 and Aniline Blue, 488/490 to 560 nm for GFP and CFDA, 561/600 to 630 nm for mCherry, 561/570 to 640 nm for Alexa Fluor 568 goat anti-mouse and anti-rabbit IgG, and 561/650 to 700 nm for chloroplasts. Data from blue, green, and red channels were collected separately.

ТЕМ

For TEM, the stems at 6 d postinoculation were fixed in 2.5% (w/v) glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4, postfixed in 1% (w/v) osmium tetroxide with 1.5% (w/v) potassium ferrocyanide in sodium cacodylate buffer, stained with 2% (w/v) tannic acid, dehydrated in a graded series of acetone, and embedded in Epon resin. After polymerization, 90- to 100-nm ultrathin sections were obtained and stained with 4% (w/v) uranyl acetate for 8 min and Reynolds lead citrate for 5 min. Then, the sections were examined in a Tecnai T12 transmission electron microscope (FEI) operating at 120 kV. Images were recorded using an AMT XR80C CCD camera system (FEI).

Immunogold Labeling

The stems obtained at 6 d postinoculation were fixed in 4% (w/v) formaldehyde and 0.25% (w/v) glutaraldehyde in 0.1 M Sorensen's phosphate buffer, pH 7.4,

dehydrated in a graded series of alcohol, and embedded in LR White resin. Ninety- to 100-nm sections were treated with 0.02 M Gly in Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.5 mM KH₂PO₄, 6.5 mM Na₂HPO₄, 1 mM CaCl₂, and 0.5 mM MgCl₂, pH 7.4) to inactivate residual aldehyde groups for 10 min, blocked with DPBS plus 2% (w/v) BSA, 2% (w/v) casein, and 0.5% (w/v) ovalbumin (DPBS-BCO) for 5 min, and then incubated for 1 h with the primary antibody that was diluted in DPBS-BCO. Grids were washed six times for 5 min in DPBS, incubated for 1 h with the secondary antibody that was diluted in DPBS-BCO, and washed six times for 5 min in DPBS and then six times for 5 min in water. The sections were stained with 4% (w/v) uranyl acetate for 5 min and Reynolds lead citrate for 3 min. Background labeling was determined using mock-infected stem sections. Quantification of the distribution of gold particles per μ m² and relative labeling distribution were performed over mock-infected and TuMV-infected sections according to Lucocq et al. (2004).

Xylem Sap Collection and Western-Blot Analysis

The collection of xylem sap was based on a protocol that was described previously (Metzner et al., 2010). Briefly, stems from *N. benthamiana* were harvested 7 d postinoculation by agroinfiltration with pCambiaTuMV/6K₂:GFP. The stems were then cut, washed under water to avoid sampling contamination from injured cells, and dried on tissue papers. They were next placed in different 3-mL syringes that were connected with centrifugation tubes following by centrifugation at 3,000 rpm for 10 min at 4°C. Western-blot analysis was done as described previously (Cotton et al., 2009).

Surface Application of CFDA

The dye CFDA (Sigma-Aldrich) was made up as a 6 mg mL⁻¹ stock in acetone and diluted with water to 60 μ g mL⁻¹ for use. Approximately 1 cm² of adaxial mature source leaf surfaces was gently abraded with fine sandpaper, and 20 μ L of CFDA was applied to both steam-treated and control non-steam-treated *N. benthamiana* leaf surfaces. The treated leaves were then covered with a thin polyethylene film to ensure an even coverage of the dye across the leaf surface and to prevent evaporation. After 6 and 24 h, young sink leaves were observed with a confocal microscope.

Results

TuMV Factories Are Present in All Types of *N. benthamiana* Leaf and Stem Cells

TuMV factories in *N. benthamiana* epidermal cells are characterized by the presence of numerous 100-nm 6K₂-tagged vesicles containing replication complexes, many of them aggregating to form a large irregularly shaped globe-like structure near the nucleus (Grangeon et al., 2012). Different types of cells have different structures and functions. Hence, it is of interest to investigate how TuMV factories appear in the other types of plant cells in addition to epidermal cells. To do this, we improved a cryohistological protocol (Knapp et al., 2012) to view TuMV factories in different types of cells. Instead of vacuum infiltration, the fixative was infiltrated in the leaf with a 3-mL syringe. Additionally, glutaraldehyde autofluorescence was quenched with Gly, allowing the glutaraldehyde concentration to be increased from 0.1% to 1%. This increase helped to maintain the integrity of the sections, especially for the fragile and large longitudinal stem sections.

N. benthamiana plants were agroinfiltrated with the TuMV infectious clone pCambiaTuMV/6K₂:GFP or with the mock empty vector pCambia 0390, and 6 d later the systemically infected and mock-infected leaf tissues were cryosectioned into 30-µm-thick cross-section samples and processed for confocal microscopy observation. To distinguish the different types of cells, the cell wall was labeled with Fluorescent Brightener 28 dye, which binds $(1\rightarrow 4)$ - β -linked D-glucopyranosyl units (Wood, 1980). As shown in Figure 1A (left), the lower and upper epidermal cells, mesophyll cells, angular collenchyma cells, and vascular tissue were easily distinguishable. Notably, the chloroplasts (shown in red) are predominantly located in the mesophyll cells. At higher magnification (right), we could also distinguish the xylem and phloem easily. $6K_2$:GFP was present in all types of leaf cells of infected plants (Fig. 1B). We also detected $6K_2$:GFP-tagged signals in xylem vessels (Fig. 1B, right, dashed circle), suggesting that TuMV systemic movement involves these conducting tube elements. A closeup view of two vascular parenchyma cells (Fig. 1B, right, bottom dashed rectangle) showed that $6K_2$:GFP-tagged structures are approximately 0.5-µm vesicles. This is consistent with

what is observed in live epidermal cells (Grangeon et al., 2012), which indicates that tissue fixation did not produce any apparent artifactual structures.

To further investigate if $6K_2$:GFP-tagged TuMV factories are found in vascular conducting tubes, we processed stem internodes just above the inoculated leaf at 6 d postinoculation to obtain 30-µm longitudinal section samples for confocal microscopy observation. In TuMV-infected stem, the $6K_2$:GFP-tagged TuMV factories were distributed in trichomes, epidermal cells, cortex, vascular tissue, and pith cells (Fig. 1C, arrows). As for leaf cross sections, we detected $6K_2$:GFP-tagged signals in xylem vessels (Fig. 1C, dashed circle; see below).



Figure 1. Distribution of TuMV 6K2:GFP in N. benthamiana leaf and stem tissues.

A and B, Cross sections of mock-infected (A) and TuMV/6K₂:GFP systemically infected (B) *N. benthamiana* leaf midrib were observed by confocal microscopy. Samples were analyzed with a Zeiss LSM-780 confocal microscope using a 20× objective (left). White squares indicate the vascular tissue region observed with a 63× objective shown at right. The dashed rectangle at right in B shows a closeup view of two vascular parenchyma cells. C, Longitudinal section of a TuMV/6K₂:GFP-infected *N. benthamiana* stem internode above the inoculated leaf imaged by confocal tile scanning. The tile scan was carried out by assembly two × four images with a 20× objective. The dashed circles indicate the presence of $6K_2$:GFP in xylem vessels. The Fluorescent Brightener 28-stained cell wall is shown in false-color magenta, $6K_2$:GFP is shown in green, and chloroplasts are shown in red. All of the images are single optical slices. Ac, Angular collenchyma cells; C, cortex; Ep, epidermal cells; Le, lower epidermis; Me, mesophyll cells; Ph, phloem; Pi, pith cells; T, trichome; Ue, upper epidermis; Vt, vascular tissue; Xy, xylem.
6K₂-Associated Membrane Complexes Are Present in Sieve Elements

To examine more specifically the presence of 6K₂:GFP in the phloem, sieve elements were highlighted by staining callose in the sieve plates with Aniline Blue (Evert, 1977; Koh et al., 2012). As shown in Figure 2A, the mock-infected stem longitudinal section was stained with Aniline Blue and the lipophilic dye 3,3'dihexyloxacarbocyanine iodide [DiOC₆(3)], which at high concentration stains all intracellular membranes in fixed cells (Terasaki and Reese, 1992). The Aniline Blue staining (shown in false-colored magenta) clearly highlighted the sieve plate (Fig. 2A, arrow) and labeled PPUs (Fig. 2A, dashed arrow) of one sieve element. $DiOC_{6}(3)$ stained ring-like structures of about 1 µm in diameter were located at the parietal layer of sieve elements (Fig. 2A, arrowheads), which are sieve element plastids (Froelich et al., 2011). In TuMV-infected stems, 6K₂:mCherry (shown in false-colored green) was observed as large aggregates (dashed ovals) throughout the sieve tube elements, and the aggregates contained lipids, as they were labeled with the lipophilic dye $DiOC_6(3)$ (Fig. 2B, shown in false-colored red). 6K2-labeled ring-like structures also were observed (Fig. 2B, arrowheads), and these may represent sieve element plastids whose membrane had incorporated the viral protein.

To test whether the 6K₂ aggregates might be replication complexes, we performed immunohistolocalization with the double-stranded RNA (dsRNA)-specific monoclonal antibody J2, which specifically recognizes dsRNA of more than 40 bp in length in a sequence-nonspecific manner (Schönborn et al., 1991). No dsRNA signal was observed in noninfected samples (Fig. 2C). In infected samples, dsRNA was detected in the 6K₂ aggregates (Fig. 2D, dashed oval) but not within the sieve element plastids (Fig. 2D, arrowheads). We also performed immunohistolocalization with a rabbit serum against the TuMV viral RNA-dependent RNA polymerase (vRdRp; Dufresne et al., 2008). No vRdRp signal was observed in mock samples (Fig. 2E). In the sieve elements of infected samples, vRdRp was associated with 6K₂ aggregates (Fig. 2F, dashed ovals) but not with the 6K₂-tagged sieve element plastids (Fig. 2F, arrowheads). Thus, 6K₂-associated membrane complexes were present in phloem sieve elements

and contained vRNA and vRdRp, suggesting that viral replication complexes were present in these conducting vessels.



Figure 2. Phloem membrane aggregates contain viral replication complexes.

Longitudinal sections of mock-infected (A, C, and E), TuMV/6K₂:mCherry-infected (B), and TuMV/6K₂:GFP-infected (D and F) *N. benthamiana* stem internodes above the inoculated leaf were observed with a Zeiss LSM-780 confocal microscope using a $63 \times$ objective. Aniline Blue-stained sieve plates are shown in false-color magenta, DiOC₆(3)-stained lipids are shown in green in A and in red in the middle and right parts of B, and 6K₂:mCherry has been false colored in green. Immunohistolocalization of dsRNA (C and D) and vRdRp (E and F) was performed on mock-infected (C and E) and TuMV/6K₂:GFP-infected (D and F) longitudinal sections. $6K_2$:GFP is shown in green, and dsRNA and vRdRp are shown in red. Dashed ovals highlight the presence of $6K_2$ vesicle aggregates, and arrowheads point to the ring-like structures in sieve elements. Images are single optical slices. Sp, Sieve plate.

Moreover, we performed immunohistolocalization with a rabbit serum against TuMV CP (Cotton et al., 2009). No CP signal was observed in noninfected samples (Fig. 3A). TuMV CP has been shown not to localize with dsRNA punctate structures in infected *N. benthamiana* protoplasts (Cotton et al., 2009). Likewise, CP was localized mainly at the periphery of 6K₂ aggregates, as punctate and sometimes elongated structures, and was not associated with cortical 6K₂ vesicles, as shown here for cells of the pith cell area (Fig. 3B, bottom left rectangle). These CP signals are likely TuMV virions, which have been observed adjacent to vesicle aggregates by transmission electron microscopy (TEM; J. Wan, unpublished data). We also detected CP in sieve elements (Fig. 3D), but it was not associated with 6K₂ aggregates (dashed oval) or with sieve element plastids (arrowhead). Thus, the CP signal in sieve elements likely represents TuMV virions.



Figure 3. CP distribution in TuMV-infected cells.

Immunohistolocalization of CP was performed on mock-infected (A and C) and TuMV/6K₂:GFP-infected (B and D) longitudinal sections of *N. benthamiana* stem internodes. Sections were observed with a Zeiss LSM-780 confocal microscope using a 63× objective. CP signal was detected in TuMV-infected pith cell area (B) as well as in sieve elements (D). The rectangles in B show 6K₂ and CP at the cell periphery. Aniline Blue-stained sieve plates are shown in false-color magenta, $6K_2$:GFP is shown in green, and CP is shown in red. The images are single optical slices. The dashed oval highlights the presence of $6K_2$ vesicle aggregates, and the arrowhead points to the ring-like structures in sieve elements.

6K₂-Associated Membrane Complexes Are Present in Xylem Vessels

As described above, leaf cross sections pointed to the possible presence of $6K_2$:GFP in xylem vessels (Fig. 1B). Longitudinal sections of stem internodes just above the inoculated leaf confirmed the presence of $6K_2$:GFP in xylem vessels (Fig. 4A). Xylem vessels were easily discernible due to their characteristic perforated cell wall. The presence of $6K_2$:GFP within xylem vessels was not an experimental spillover contamination resulting from tissue damage during the sectioning process, as optical sectioning showed that $6K_2$:GFP-tagged aggregates were truly located inside the xylem vessels (see the three-dimensional reconstruction of an infected xylem vessel in Supplemental Movie S1). Moreover, $6K_2$:mCherry-tagged aggregates contained lipids, as they were labeled with the lipophilic dye DiOC6(3) (Fig. 4B).

Xylem vessels are dead cells normally used for water transportation. This raises the question of whether the 6K₂:GFP aggregates are active for viral infection. To answer this question, we looked for the presence of dsRNA/vRNA, vRdRp, and CP via immunohistolocalization in the 6K₂:GFP aggregates. dsRNA, vRdRp, and CP (Fig. 4, C–E) were detected in the 6K₂:GFP aggregates. As for sieve elements (Figs. 2, C and E, and 3, A and C), no signal for the presence of dsRNA, vRdRp, and CP was observed in mock samples (data not shown). Taken together, these observations indicate that 6K₂-associated membrane complexes in xylem vessels contain vRNA and viral replication and movement proteins (i.e. CP).



Figure 4. TuMV replication complexes in xylem vessel.

Longitudinal sections of *N. benthamiana* stem internodes infected with TuMV expressing $6K_2$ fused to either GFP (A and C–E) or mCherry (B) were observed with a Zeiss LSM-780 confocal microscope with a $63 \times$ objective. Lipids were stained with the membrane dye DiOC₆(3) (B). Immunohistolocalization of dsRNA (C), vRdRp (D), and CP (E) was performed as described in Figure 3. The Fluorescent Brightener 28-stained cell wall is shown in false-color magenta, $6K_2$:GFP is shown in green, $6K_2$:mCherry has been false colored in green, and DiOC₆(3) has been false colored in red. dsRNA, vRdRp, and CP are shown in red. A is a three-dimensional image; the other confocal images are single optical slices.

We then examined the ultrastructure of TuMV aggregates in xylem vessels by TEM. At 6 d postinoculation, TuMV-infected and mock-infected stem internodes just above the inoculated leaf were fixed, dehydrated, and embedded in Epon for structure observation or in LR White for immunogold labeling. In mock-infected stem, the xylem vessels contained only a few electron-opaque materials (Fig. 5A). In contrast, in TuMV-infected stem, the xylem vessels were full of vesicular structures, especially in the perforation plates between two xylem vessel elements (Fig. 5B), indicating that the vesicles might be moving through these pore structures. Interestingly, under higher magnification, we detected TuMV virion-like structures that were associated with the membrane vesicles (Fig. 5C, arrow). The presence of TuMV particles was confirmed by negative staining with 2% (w/v) phosphotungstate of the collected xylem sap (Fig. 5D, arrows).



Figure 5. Ultrastructure of TuMV-induced membrane alterations in xylem vessels.

A and B, Longitudinal sections of mock-infected (A) and TuMV-infected (B) *N. benthamiana* stem internodes above the inoculated leaf were collected and observed by TEM. White squares indicate the areas that are shown at higher magnification at right. The higher magnification of the white square in B shows TuMV viral factories located in the perforation plate between two xylem vessel elements. C, TuMV virions (arrow) associated with vesicles. D, Xylem sap from TuMV-infected *N. benthamiana* was collected and observed by TEM following negative staining. TuMV virions are highlighted by arrows.

To further confirm the content of the membrane structures in xylem vessels, we performed immunogold labeling using the anti-dsRNA monoclonal antibody. Very few gold particles were found in xylem parenchyma cells (Fig. 6A) and xylem vessels (Fig. 6B) on a mock-infected section treated with primary antibody J2 and secondary antibodies. The detection of inclusion bodies and membrane vesicles in partially differentiated xylem vessels indicated that this cell was infected by TuMV (Fig. 6C). Under higher magnification, we detected gold particles (arrows) in the membrane vesicles in partially differentiated (Fig. 6C) and also in fully differentiated xylem vessels (Fig. 6D). Quantification of the gold particles per μm^2 and relative labeling distribution were performed over mock-infected and TuMV-infected sections. The results revealed that, compared with TuMV-infected sections (0.42 \pm 0.04 particles μm^{-2}), the mockinfected sections did not show any significant labeling (0.07 \pm 0.03 particles μm^{-2} ; Fig. 6E). In TuMV-infected sections, the gold particles were mainly found decorating TuMVinduced vesicles (76.25%). Only a few gold particles were found over the rest of the cytoplasm, corresponding to the nonspecific background signal from the antibody (Fig. 6F). Thus, TuMV virions in xylem vessels are associated with vesicular complexes that contain TuMV RNA.



Figure 6. Immunoelectron microscopy localization of dsRNA in TuMV-infected xylem vessels.

A to D, Labeling was performed by using the anti-dsRNA monoclonal antibody J2 on longitudinal sections of mock-infected (A and B) and TuMV-infected (C and D) *N. benthamiana* stem internodes. White squares indicate the areas that are shown at higher magnification at right. Arrows point to gold particles in vesicles. E and F, Number of gold particles per µm² in mock-infected versus TuMV-infected cells (E) and relative labeling distribution in infected cells (F). Two different labeling experiments were considered, and 200 gold particles were counted per experiment. chl, Chloroplast; cw, cell wall; cyt, cytosol; ER, endoplasmic reticulum; In, inclusion bodies; mit, mitochondrion; N and nuc, nucleus; pm, plasma membrane; PW, primary cell wall; SW, secondary cell wall; vac, vacuole; Ve and ves, vesicles; XV, xylem vessel; XVP, xylem parenchymal cell.

Xylem Sap from TuMV-Infected Plants Contains Eukaryotic Initiation Factor (iso)4E and Is Infectious

Analysis of xylem sap by confocal microscopy confirmed our previous finding in the fixed stem tissues. Using phase contrast, the xylem sap from mock-infected plants was essentially devoid of cellular material (Fig. 7A). In contrast, the xylem sap from TuMV-infected plants contained a large number of what appears to be vesicles, many of which were positively labeled with $6K_2$:GFP (Fig. 7B). We then looked for the presence of viral proteins and for the host translation eukaryotic initiation factor (iso)4E [eIF(iso)4E] in xylem sap by western-blot analysis. eIF(iso)4E was chosen because it has been shown to be part of the TuMV replication complex (Beauchemin et al., 2007). As expected, the viral proteins 6K₂:GFP, CP, and vRdRp, as well as eIF(iso)4E, were detected in the xylem sap from TuMV-infected plants but not from mock-infected plants (Fig. 7C). Since eIF(iso)4E is an intracellular protein, its absence in mock-infected xylem sap indicates that the presence of the above proteins in infected xylem sap was not the consequence of contaminating cellular breakage during sap collection. As an indicator of phloem contamination in the collected xylem sap, we looked for the presence of Polypyrimidine Tract-Binding Protein3 (PTB3), a homolog to the pumpkin (Cucurbita maxima) phloem-mobile ribonucleoprotein complex RBP50 (Ham et al., 2009). This protein was detected in a total protein extract but not in an infected xylem sap from TuMV-infected plants (Fig. 7D), suggesting that there was no apparent contamination from companion cells and phloem exudates. The xylem sap from TuMVinfected plants also was tested for the infection of healthy N. benthamiana plants by mechanical inoculation. After 5 d, we detected TuMV systemic infection under UV light (data not shown), which indicated that the xylem sap was infectious. In conclusion, the xylem sap from TuMV-infected plants contains 6K₂ vesicles and viral as well as host protein that are essential for TuMV replication and assembly.



Figure 7. Western-blot protein analysis of xylem sap.

A and B, Xylem sap was collected from mock-infected (A) and TuMV/6K₂:GFP-infected (B) *N. benthamiana* plants and was observed by confocal microscopy. 6K₂:GFP is shown in green. C, Westernblot analysis of xylem sap from mock- and TuMV-infected plants using rabbit sera against GFP, CP, vRdRp, or eIF(iso)4E. D, Western-blot analysis of xylem sap and total protein leaf extract from TuMVinfected plants using a rabbit serum against the phloem-specific PTB3 protein.

Stem Girdling Confirms That TuMV Can Spread Systemically through the Xylem

To further substantiate that xylem vessels are involved in TuMV systemic movement, we performed a stem-girdling experiment. N. benthamiana plants were agroinfiltrated with pCambiaTuMV/6K₂:GFP. At 1 h following agroinfiltration with pCambiaTuMV/6K2:GFP, the stem internode just above the agroinfiltrated leaf was treated with a jet of steam for 15 s, until water soaking became apparent (Moreno et al., 2004). As a consequence, a segment of about 5 to 10 mm long was reduced to a very thin strand within 1 h and showed dry necrosis 1 d later (Fig. 8A). Since xylem vessels are dead tissues surrounded by a thick cell wall, their structural integrity should not be affected by the steam treatment. To confirm that this was the case, cross and longitudinal sections of girdled stems were examined by confocal microscopy, which showed that all cells had collapsed except for the xylem vessels (Fig. 8B). To further confirm that the phloem was totally destroyed after steam treatment, we used the phloem-loading dye 5-(and 6)-carboxyfluorescein diacetate (CFDA). It was reported previously that the phloem transport of CFDA was interrupted when phloem was destroyed following stem girdling (Grignon et al., 1989). Thus, CFDA was applied to an abraded source leaf below the girdled stem section, and its movement into upper sink leaves was assessed 6 and 24 h later by confocal microscopy. As expected for phloem movement, CFDA clearly marked the class I, II, and III vein network of a young sink leaf of nongirdled plants 6 h after CFDA application (Fig. 8C, left). On the other hand, no CFDA labeling was observed in young sink leaves of girdled plants (n = 10) 6 and 24 h after CFDA application (Fig. 8C, right). Normally, in TuMV-agroinfiltrated leaves, cell-tocell movement starts at 3 d postinoculation and systemic infection is detected at 5 d postinoculation. Here, TuMV/6K2:GFP infection was observed above the steam-treated section by UV light between 7 and 10 d (Fig. 8D; Table I), suggesting that xylem vessels also are used by TuMV for its systemic infection, although at a slower rate. At the first indication of systemic infection taking place in girdled plants, we collected stem cross sections just above the girdled part for histological analysis. Figure 8E shows that 6K₂:GFP was found only in vascular tissues at this early stage. Under higher magnification, we observed the $6K_2$:GFP-tagged vesicles in xylem vessels and xylem parenchymal cells (arrowhead) as well as other xylem-associated cells, indicating that once TuMV passed the girdled stem through xylem vessels, it can be unloaded in the xylem parenchymal cells just above the girdled stem.



Figure 8. TuMV infection following the stem-girdling experiment.

A, Closeup view of an *N. benthamiana* stem internode that was treated with steam for 15 s the day before. The internode is above the leaf that was infiltrated with A. tumefaciens containing pCambiaTuMV/6K₂:GFP 1 h before the steam treatment. B, Cross sections and longitudinal sections of TuMV-infected stem internode above the inoculated leaf were collected by cryosectioning and observed by confocal microscopy. Cross-sections of TuMV-infected stem internode are shown before (I) and after (II) steam treatment. Longitudinal sections of TuMV-infected stem internode are shown before (II) and after (IV) steam treatment. Top right squares show at a high magnification the xylem vessels and surrounding cells before steam treatment (I and III) and intact xylem vessels and dead surrounding cells after steam treatment (II and IV). C, Upper young leaves of stem nongirdled (left) and girdled (right) plants in which the source leaves were treated with CFDA. D, The steam-treated plant from A shows TuMV systemic infection under UV light at 10 d after agroinoculation. E, A stem cross-section just above the girdled stem section at a very early stage of systemic infection. The white square indicates the area of higher magnification shown at bottom. C, Cortex; Ep, epidermal cell; Pi, pith cells; T, trichome; Vt, vascular tissue; XV, xylem vessel; XVP, xylem parenchymal cell.

Treatment	Inoculated Leaves (5 d p.i.)		Upper Leaves (10 d p.i.)	
	Ν	Infected	Ν	Infected
		%		%
TuMV nonsteamed	15	15 (100)	15	15 (100)
TuMV steamed 1	8	8 (100)	8	3 (38)
TuMV steamed 2	15	15 (100)	15	1 (6)
TuMV steamed 3	15	15 (100)	15	4 (26.7)
TuMV steamed 4	15	15 (100)	15	3 (20)

Table 1. Analysis of TuMV infection in steam-treated *N. benthamiana* plants.

N, Number of inoculated plants; p.i., days postinoculation; TuMV steamed 1/2/3/4, four separate experiments.

Membrane-Associated vRNA of PVX Is Present in Both Phloem and Xylem

The observations that TuMV factories are present in both phloem and xylem led us to ask whether this is a unique feature of potyviruses. PVX virions can enter, move through, and exit the phloem, as demonstrated by grafting experiments (Cruz et al., 1998). In addition, the CP of PVX was detected in xylem vessels (Betti et al., 2012). We thus analyzed the vascular tissues of PVX-infected plants. *N. benthamiana* plants were agroinfiltrated with the PVX infectious clone PVX-GFP (Peart et al., 2002), and 8 d later the stem internodes just above the inoculated leaf were processed to collect 30-µm longitudinal section samples for confocal microscopy observation. Sieve elements were stained with Aniline Blue and xylem vessels were stained with Fluorescent Brightener 28, and both are shown in magenta. We detected dsRNA in the sieve elements via immunohistolocalization, which was associated with lipids (Fig. 9A), suggesting that those structures could be PVX-infected plants (Fig. 9B). Thus, PVX RNA was present in both phloem and xylem and was associated with lipids.



Figure 9. Membrane-associated vRNA in PVX-infected sieve elements and xylem vessels.

Longitudinal sections of PVX-infected *N. benthamiana* stem internode above the inoculated leaf were collected by cryosectioning and observed by confocal microscopy. Immunohistolocalization of dsRNA and lipid staining with $DiOC_6(3)$ in one sieve element (A) and one xylem vessel (B) of a PVX-infected plant are shown. Aniline Blue-stained callose and Fluorescent Brightener 28-stained cell wall are shown in false-color magenta, $DiOC_6(3)$ is shown in green, and dsRNA is shown in red. All images are single optical slices.

Discussion

Viruses use the vascular tissues, in particular the phloem, for the systemic infection of plants. Viral particles are apparently the transmission agent responsible for transmitting the disease in the whole plant, but vRNP complexes also have been implicated. The nature of this trafficking vRNA complex, however, has not been defined.

In this study, we showed the presence of membrane-associated complexes centered on the 6K₂ protein of TuMV, which also contained vRNA and vRdRp, in sieve elements and xylem vessels. Since $6K_2$ is detected as a $6K_2$ -VPg-Proteinase (Pro) fusion in infected cells (Léonard et al., 2004), it is likely that VPg and Pro also are present. The vRNA associated with the 6K₂:GFP aggregates is probably the replicative form of the vRNA, since the dsRNA punctate structures observed in xylem vessels are identical to those observed in the cytoplasm of infected epidermal cells. Moreover, the dsRNA recognized by the monoclonal antibody is not likely to be encapsidated vRNA, since the immunohistolocalization protocol does not involve protease treatment, and gold particles are associated with vesicles and not viral particles in immunogold electron microscopy images following incubation with the dsRNA monoclonal antibody. The vesicles in sieve elements and xylem vessels are reminiscent to those found in the cytoplasm of TuMV (Grangeon et al., 2012) and are very similar to other plant and mammalian virus-infected cells (for review, see Miller and Krijnse-Locker, 2008; Laliberté and Sanfaçon, 2010). These intracellular vesicles are the building blocks of viral factories, which contain viral replication complexes. In the case of TuMV, these same vesicles also are the vehicles for the intracellular and intercellular movement of vRNA (Grangeon et al., 2012, 2013). It thus appears that the TuMV RNP complexes found in vascular conducting tubes are, in fact, membrane-associated viral replication complexes. The observation that the host translation initiation factor eIF(iso)4E, which is part of the potyvirus replication complex (Beauchemin et al., 2007), was found in infected xylem sap supports the idea that viral factories end up in vascular conducting tubes. It will be interesting to see if CI and P3N-PIPO are involved in phloem loading from the companion cells and if they are associated with the 6K₂ structures found in sieve elements and xylem vessels. Consequently, the long-distance transducing agent for TuMV is likely to contain membrane-bound replication complexes closely associated with particles. The presence of viral factories in the phloem and xylem may not be limited to TuMV, since membrane-associated, nonencapsidated vRNA also was observed in PVX-infected plants.

To our knowledge, the possibility that viral replication complexes could end up in, and could travel through, the phloem and the xylem has never been considered. Limited evidence for their presence, on the other hand, can be found in some previous investigations. For instance, the membrane association of *Turnip yellow mosaic virus* and CMV particles in xylem has been reported (Hitchborn and Hills, 1965). Likewise, *Potato virus* Y particles along with cytoplasmic inclusions as well as vesicles were documented in xylem vessels (Otulak and Garbaczewska, 2009, 2012). Finally, large aggregates of Triple Gene Block Protein 3 (TGBp3) of CMV were found in sieve elements and were associated with CMV particles (Blackman et al., 1998). Recently, TGBp2 and TGBp3 of PVX were shown to induce the formation of endoplasmic reticulum-derived vesicles at PD orifices. These vesicles contained the vRdRp and nonencapsidated vRNA (Tilsner et al., 2013). So, it may well be that the TGBp3 aggregates are, in fact, CMV replication complexes associated with viral particles.

Traditionally, the phloem has been considered as a canal for distributing water, nutrients, and hormones essential for the growth and development of various organs of the plant. Recent studies have shown, however, that the phloem has more elaborate functions (for review, see Lucas et al., 2013). For instance, it has been demonstrated that PDs and the phloem sieve tube system function cooperatively for the long-distance delivery of proteins (Xoconostle-Cázares et al., 2000; Aoki et al., 2002; Gómez et al., 2005), mRNA (Sasaki et al., 1998; Ruiz-Medrano et al., 1999; Xoconostle-Cázares et al., 1999; Haywood et al., 2005; Roney et al., 2007), and small RNA (Yoo et al., 2004; Buhtz et al., 2008; Lin et al., 2008; Pant et al., 2008). Furthermore, the identification of ribosomal and associated components involved in mRNA translation in the sieve tube system of the cucurbits (Lin et al., 2009; Ma et al., 2010) is challenging the general belief that mature sieve elements lack the capacity for protein synthesis (Ham and Lucas, 2014). Sieve elements thus have the capacity of enclosing intricate structures such as membrane-bound vRNP complexes that might be active in RNA synthesis, as

evidenced by the presence of dsRNA, a marker for vRNA replication, in the $6K_2$ aggregates. This hypothesis could be tested by collecting phloem exudate and subjecting it to in vitro metabolic labeling to see if vRNA synthesis and translation are indeed taking place.

Based on our observation, we suggest a schematic model for the movement of TuMV into small vein sieve elements (Fig. 10A). In this scheme, 6K₂-tagged vesicles, which contain vRNA and vRdRp, move from epidermal cells to mesophyll cells, bundle sheath, vascular parenchyma, and companion cells through PDs. Once in companion cells, the 6K₂-tagged vesicles are loaded into sieve elements through PPUs. Either individual 6K₂ vesicles move through sieve elements or they amalgamate to form a membrane support for virion assembly, which would be released for phloem transport, as proposed by Blackman et al. (1998) for CMV.



Figure 10. Model for TuMV long-distance movement.

A, Schematic model for TuMV moving into small vein sieve elements. First, 6K₂-tagged vesicles, which contain vRNA and vRdRp, move from epidermal cells to mesophyll cells, bundle sheath, vascular parenchyma (1), and companion cells through PDs (2). Then, the 6K₂-tagged vesicles are loaded into sieve elements through PPUs (3). Once in the sieve element, there are two possibilities. One possibility is that individual 6K₂ vesicles move through sieve elements (4). Another possibility is that the 6K₂ vesicles amalgamate together to form membrane aggregates, which stay in sieve elements for virion assembly, and the assembled virions are then released for phloem transport (5). B, Schematic model for TuMV movement into xylem vessels. 6K₂-tagged vesicles enter into the immature xylem elements through pit membranes and replicate in the cytoplasm before programmed cell death occurs and then move upward in the plant after xylem becomes a hollow vessel.

CP or particles for some viruses have been found in the xylem (French et al., 1993; Andrianifahanana et al., 1997; Opalka et al., 1998; French and Elder, 1999; Ding et al., 2001; Verchot et al., 2001; Moreno et al., 2004; Betti et al., 2012; Manabayeva et al., 2013). This conducting vessel would not be a dead end for infection, since the stemgirdling experiment (Fig. 8) demonstrated that TuMV spreading through xylem vessels caused systemic infection. This investigation has shown that, in addition to viral particles, membrane-bound replication complexes also end up in xylem vessels. TuMV vesicles containing dsRNA were found in immature xylem vessels. This suggests that TuMV replication vesicles may enter into immature xylem vessels and replicate in the cytoplasm before programmed cell death occurs and then move upward in the plant after the xylem becomes a hollow vessel (Fig. 10B), as proposed by Opalka et al. (1998) for Rice yellow mosaic virus. The question that follows is how the replication complex is unloaded from xylem vessels. The fluid and content that are exchanged between xylem vessels and xylem parenchymal cells move through pit membranes. Small and large solutes, such as the membrane-impermeant fluorophores CFDA and Texas Red-labeled dextran (10 kD), are unloaded from xylem via the xylem vesselxylem parenchyma pit membranes, likely by endocytosis. They are then symplasmically transported through PDs to other parenchyma elements and ultimately to sieve elements (Botha et al., 2008). This may also be the case for TuMV, since 6K₂ is observed in xylem parenchymal cells just above the girdled stem section in which only xylem vessels are intact. This has been suggested for Soilborne wheat mosaic virus, which enters and moves systemically through xylem vessels and also laterally between adjacent xylem vessels through pit membranes (Verchot et al., 2001). Displacement of the Ca²⁺ from pit membranes by some viral factors may contribute to the disruption of the pit membranes and may facilitate systemic virus transport (Opalka et al., 1998).

Acknowledgments

We thank Dr. Andreas Wachter (University of Tübingen) for the serum against PTB3, Dr. Peter Moffett (Université de Sherbrooke) for the plasmid PVX-GFP and critical reading of the article, Dr. Hojatollah Vali and Jeannie Mui (Facility of Electron Microscopy Research, McGill University) for TEM technical support, and Jessy Tremblay (Institut National de la Recherche Scientifique-Institut Armand-Frappier) for support with the Zeiss LSM-780 confocal microscope.

References

Agbeci M, Grangeon R, Nelson RS, Zheng H, Laliberté J-F (2013) Contribution of host intracellular transport machineries to intercellular movement of turnip mosaic virus. PLoS Pathog **9:** e1003683

Andrianifahanana M, Lovins K, Dute R, Sikora E, Murphy JF (1997) Pathway for phloem-dependent movement of pepper mottle potyvirus in the stem of capsicum annuum. Phytopathology **87:** 892-898

Aoki K, Kragler F, Xoconostle-Cázares B, Lucas WJ (2002) A subclass of plant heat shock cognate 70 chaperones carries a motif that facilitates trafficking through plasmodesmata. Proceedings of the National Academy of Sciences **99:** 16342-16347

Beauchemin C, Boutet N, Laliberté J-F (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

Beauchemin C, Laliberté J-F (2007) The poly(a) binding protein is internalized in virusinduced vesicles or redistributed to the nucleolus during turnip mosaic virus infection. Journal of Virology **81:** 10905-10913

Betti C, Lico C, Maffi D, D'Angeli S, Altamura MM, Benvenuto E, Faoro F, Baschieri S (2012) Potato virus X movement in Nicotiana benthamiana: new details revealed by chimeric coat protein variants. Molecular Plant Pathology **13**: 198-203

Blackman LM, Boevink P, Cruz SS, Palukaitis P, Oparka KJ (1998) The movement protein of cucumber mosaic virus traffics into sieve elements in minor veins of nicotiana clevelandii. The Plant Cell Online **10:** 525-537

Botha CE, Aoki N, Scofield GN, Liu L, Furbank RT, White RG (2008) A xylem sap retrieval pathway in rice leaf blades: evidence of a role for endocytosis? J Exp Bot **59**: 2945-2954

Brault V, Bergdoll M, Mutterer J, Prasad V, Pfeffer S, Erdinger M, Richards KE, Ziegler-Graff V (2003) Effects of point mutations in the major capsid protein of beet

western yellows virus on capsid formation, virus accumulation, and aphid transmission. Journal of Virology **77:** 3247-3256

Buhtz A, Springer F, Chappell L, Baulcombe DC, Kehr J (2008) Identification and characterization of small RNAs from the phloem of Brassica napus. The Plant Journal **53**: 739-749

Carrington JC, Jensen PE, Schaad MC (1998) Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. Plant J **14:** 393-400

Cotton S, Grangeon R, Thivierge K, Mathieu I, Ide C, Wei T, Wang A, Laliberté J-F (2009) Turnip mosaic virus rna replication complex vesicles are mobile, align with microfilaments, and are each derived from a single viral genome. Journal of Virology **83**: 10460-10471

Cronin S, Verchot J, Haldeman-Cahill R, Schaad MC, Carrington JC (1995) Longdistance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. Plant Cell **7:** 549-559

Cronin S, Verchot J, Haldemancahill R, Schaad MC, Carrington JC (1995) Longdistance movement factor - a transport function of the potyvirus helper component proteinase. Plant Cell **7:** 549-559

Cruz SS, Roberts AG, Prior DAM, Chapman S, Oparka KJ (1998) Cell-to-cell and phloem-mediated transport of potato virus x: The role of virions. The Plant Cell Online **10:** 495-510

Derrick PM, Barker H, Oparka KJ (1990) Effect of virus infection on symplastic transport of fluorescent tracers in Nicotiana clevelandii leaf epidermis. Planta **181:** 555-559

Ding XS, Boydston CM, Nelson RS (2001) Presence of brome mosaic virus in barley guttation fluid and its association with localized cell death response. Phytopathology **91:** 440-448

Dolja VV, Haldeman R, Robertson NL, Dougherty WG, Carrington JC (1994) Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. The EMBO journal **13:** 1482-1491 **Dolja VV, Haldeman-Cahill R, Montgomery AE, Vandenbosch KA, Carrington JC** (1995) Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. Virology **206:** 1007-1016

Dufresne PJ, Thivierge K, Cotton S, Beauchemin C, Ide C, Ubalijoro E, Laliberté J-F, Fortin MG (2008) Heat shock 70 protein interaction with Turnip mosaic virus RNAdependent RNA polymerase within virus-induced membrane vesicles. Virology **374**: 217-227

Evert RF (1977) Phloem structure and histochemistry. Annual Review of Plant Physiology **28**: 199-222

Fisher DB, Wu Y, Ku MSB (1992) Turnover of soluble proteins in the wheat sieve tube. Plant Physiology **100:** 1433-1441

French CJ, Elder M (1999) Virus particles in guttate and xylem of infected cucumber (Cucumis sativus L.). Annals of Applied Biology **134:** 81-87

French CJ, Elder M, Skelton F (1993) Recovering and identifying infectious plant viruses in guttation fluid. HortScience **28:** 746-747

Froelich DR, Mullendore DL, Jensen KH, Ross-Elliott TJ, Anstead JA, Thompson GA, Pélissier HC, Knoblauch M (2011) Phloem ultrastructure and pressure flow: Sieve-element-occlusion-related agglomerations do not affect translocation. The Plant Cell Online **23**: 4428-4445

Gómez G, Torres H, Pallás V (2005) Identification of translocatable RNA-binding phloem proteins from melon, potential components of the long-distance RNA transport system. The Plant Journal **41:** 107-116

Gopinath K, Kao CC (2007) Replication-independent long-distance trafficking by viral rnas in nicotiana benthamiana. The Plant Cell **19:** 1179-1191

Grangeon R, Agbeci M, Chen J, Grondin G, Zheng H, Laliberté J-F (2012) Impact on the endoplasmic reticulum and golgi apparatus of turnip mosaic virus infection. Journal of Virology **86:** 9255-9265 **Grangeon R, Jiang J, Wan J, Agbeci M, Zheng H, Laliberte JF** (2013) 6K2-induced vesicles can move cell to cell during turnip mosaic virus infection. Front Microbiol **4:** 351

Grignon N, Touraine B, Durand M (1989) 6(5) Carboxyfluorescein as a tracer of phloem sap translocation. American Journal of Botany **76:** 871-877

Ham BK, Brandom JL, Xoconostle-Cazares B, Ringgold V, Lough TJ, Lucas WJ (2009) A polypyrimidine tract binding protein, pumpkin RBP50, forms the basis of a phloem-mobile ribonucleoprotein complex. Plant Cell **21**: 197-215

Ham BK, Lucas WJ (2014) The angiosperm phloem sieve tube system: a role in mediating traits important to modern agriculture. J Exp Bot **65:** 1799-1816

Haywood V, Yu T-S, Huang N-C, Lucas WJ (2005) Phloem long-distance trafficking of GIBBERELLIC ACID-INSENSITIVE RNA regulates leaf development. The Plant Journal **42:** 49-68

Hipper C, Brault V, Ziegler-Graff V, Revers F (2013) Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. Frontiers in Plant Science **4**

Hipper C, Monsion B, Bortolamiol-Bécet D, Ziegler-Graff V, Brault V (2014) Formation of virions is strictly required for turnip yellows virus long-distance movement in plants. Journal of General Virology **95:** 496-505

Hitchborn JH, Hills GJ (1965) The use of negative staining in the electron microscopic examination of plant viruses in crude extracts. Virology **27**: 528-540

Hoefert LL (1984) Beet western yellows virus in phloem of pennycress. Journal of Ultrastructure Research **88:** 44-54

Huang T-S, Wei T, Laliberté J-F, Wang A (2010) A Host RNA Helicase-Like Protein, AtRH8, Interacts with the Potyviral Genome-Linked Protein, VPg, Associates with the Virus Accumulation Complex, and Is Essential for Infection. Plant Physiology **152**: 255-266

Kasschau KD, Carrington JC (2001) Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. Virology **285:** 71-81

Kasschau KD, Cronin S, Carrington JC (1997) Genome amplification and longdistance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. Virology **228**: 251-262

Kempers R, Bel AE (1997) Symplasmic connections between sieve element and companion cell in the stem phloem ofVicia faba L. have a molecular exclusion limit of at least 10 kDa. Planta **201:** 195-201

Knapp E, Flores R, Scheiblin D, Scheiblin D, Modla S, Czymmek K, Czymmek K,
Yusibov V (2012) A cryohistological protocol for preparation of large plant tissue sections for screening intracellular fluorescent protein expression. Biotechniques 52: 31-37

Koh E-J, Zhou L, Williams D, Park J, Ding N, Duan Y-P, Kang B-H (2012) Callose deposition in the phloem plasmodesmata and inhibition of phloem transport in citrus leaves infected with "Candidatus Liberibacter asiaticus". Protoplasma **249:** 687-697

Laliberté J-F, Sanfaçon H (2010) Cellular remodeling during plant virus infection. Annual Review of Phytopathology **48**: 69-91

Leonard S, Viel C, Beauchemin C, Daigneault N, Fortin MG, Laliberte JF (2004) Interaction of VPg-Pro of Turnip mosaic virus with the translation initiation factor 4E and the poly(A)-binding protein in planta. Journal of General Virology **85**: 1055-1063

Lin M-K, Lee Y-J, Lough TJ, Phinney BS, Lucas WJ (2009) Analysis of the Pumpkin Phloem Proteome Provides Insights into Angiosperm Sieve Tube Function. Molecular & Cellular Proteomics 8: 343-356

Lin S-I, Chiang S-F, Lin W-Y, Chen J-W, Tseng C-Y, Wu P-C, Chiou T-J (2008) Regulatory network of microrna399 and pho2 by systemic signaling. Plant Physiology **147:** 732-746

Lucas WJ, Groover A, Lichtenberger R, Furuta K, Yadav SR, Helariutta Y, He XQ, Fukuda H, Kang J, Brady SM, Patrick JW, Sperry J, Yoshida A, Lopez-Millan AF, Grusak MA, Kachroo P (2013) The plant vascular system: evolution, development and functions. J Integr Plant Biol **55**: 294-388 Lucocq JM, Habermann A, Watt S, Backer JM, Mayhew TM, Griffiths G (2004) A Rapid Method for Assessing the Distribution of Gold Labeling on Thin Sections. Journal of Histochemistry & Cytochemistry **52:** 991-1000

Ma Y, Miura E, Ham BK, Cheng HW, Lee YJ, Lucas WJ (2010) Pumpkin eIF5A isoforms interact with components of the translational machinery in the cucurbit sieve tube system. Plant J **64:** 536-550

Manabayeva SA, Shamekova M, Park J-W, Ding XS, Nelson RS, Hsieh Y-C, Omarov RT, Scholthof HB (2013) Differential requirements for Tombusvirus coat protein and P19 in plants following leaf versus root inoculation. Virology **439**: 89-96

McGuire ELHJM (1973) Translocation of tobacco ringspot virus in soybean. Phytopathology **63:** 1291-1300

Metzner R, Schneider HU, Breuer U, Thorpe MR, Schurr U, Schroeder WH (2010) Tracing cationic nutrients from xylem into stem tissue of French bean by stable isotope tracers and cryo-secondary ion mass spectrometry. Plant Physiol **152**: 1030-1043

Miller S, Krijnse-Locker J (2008) Modification of intracellular membrane structures for virus replication. Nat Rev Micro **6:** 363-374

Moreno IM, Thompson JR, García-Arenal F (2004) Analysis of the systemic colonization of cucumber plants by Cucumber green mottle mosaic virus. Journal of General Virology **85:** 749-759

Murant AF, Roberts IM (1979) Virus-like particles in phloem tissue of chervil (Anthriscus cerefolium) infected with carrot red leaf virus. Annals of Applied Biology **92:** 343-346

Nicolas O, Dunnington SW, Gotow LF, Pirone TP, Hellmann GM (1997) Variations in the VPg protein allow a potyvirus to overcome va gene resistance in tobacco. Virology 237: 452-459

Opalka N, Brugidou C, Bonneau C, Nicole M, Beachy RN, Yeager M, Fauquet C (1998) Movement of rice yellow mottle virus between xylem cells through pit membranes. Proceedings of the National Academy of Sciences **95:** 3323-3328

Oparka KJ, Turgeon R (1999) Sieve elements and companion cells—traffic control centers of the phloem. The Plant Cell **11**: 739-750

Otulak K, Garbaczewska G (2009) Ultrastructural events during hypersensitive response of potato cv. Rywal infected with necrotic strains of potato virus Y. Acta Physiologiae Plantarum **32:** 635-644

Otulak K, Garbaczewska G (2012) Cytopathological potato virus Y structures during Solanaceous plants infection. Micron **43:** 839-850

Pant BD, Buhtz A, Kehr J, Scheible W-R (2008) MicroRNA399 is a long-distance signal for the regulation of plant phosphate homeostasis. The Plant Journal **53**: 731-738

Peart JR, Cook G, Feys BJ, Parker JE, Baulcombe DC (2002) An EDS1 orthologue is required for N-mediated resistance against tobacco mosaic virus. The Plant Journal **29:** 569-579

Rajamaki ML, Valkonen JP (1999) The 6K2 protein and the VPg of potato virus A are determinants of systemic infection in Nicandra physaloides. Mol Plant Microbe Interact **12:** 1074-1081

Rajamaki ML, Valkonen JP (2002) Viral genome-linked protein (VPg) controls accumulation and phloem-loading of a potyvirus in inoculated potato leaves. Mol Plant Microbe Interact **15:** 138-149

Rajamaki ML, Valkonen JPT (2002) Viral genome-linked protein (VPg) controls accumulation and phloem-loading of a potyvirus in inoculated potato leaves. Molecular Plant-Microbe Interactions **15:** 138-149

Requena A, Simón-Buela L, Salcedo G, García-Arenal F (2006) Potential involvement of a cucumber homolog of phloem protein 1 in the long-distance movement of cucumber mosaic virus particles. Molecular Plant-Microbe Interactions **19**: 734-746

Roberts K, McCann MC (2000) Xylogenesis: the birth of a corpse. Current Opinion in Plant Biology **3:** 517-522

Rojas MR, Zerbini FM, Allison RF, Gilbertson RL, Lucas WJ (1997) Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. Virology **237:** 283-295

Roney JK, Khatibi PA, Westwood JH (2007) Cross-species translocation of mrna from host plants into the parasitic plant dodder. Plant Physiology **143**: 1037-1043

Rühl C, Stauffer E, Kahles A, Wagner G, Drechsel G, Rätsch G, Wachter A (2012) Polypyrimidine tract binding protein homologs from arabidopsis are key regulators of alternative splicing with implications in fundamental developmental processes. The Plant Cell Online **24**: 4360-4375

Ruiz-Medrano R, Xoconostle-Cazares B, Lucas WJ (1999) Phloem long-distance transport of CmNACP mRNA: implications for supracellular regulation in plants. Development **126**: 4405-4419

Sasaki T, Chino M, Hayashi H, Fujiwara T (1998) Detection of several mrna species in rice phloem sap. Plant and Cell Physiology **39**: 895-897

Savenkov El, Germundsson A, Zamyatnin AA, Sandgren M, Valkonen JPT (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

Schaad MC, Lellis AD, Carrington JC (1997) VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. Journal of Virology **71**: 8624-8631

Schonborn J, Oberstraβ J, Breyel E, Tittgen J, Schumacher J, Lukacs N (1991) Monoclonal antibodies to double-stranded RNA as probes of RNA structure in crude nucleic acid extracts. Nucleic Acids Research **19:** 2993-3000

Shepardson S, Esau K, McCrum R (1980) Ultrastructure of potato leaf phloem infected with potato leafroll virus. Virology **105:** 379-392

Shukla DD, Ward CW, Brunt AA (1994) The Potyviridae. CAB international, Wallingford, United kingdom
Simón-Buela L, García-Arenal F (1999) Virus particles of cucumber green mottle mosaic tobamovirus move systemically in the phloem of infected cucumber plants. Molecular Plant-Microbe Interactions **12:** 112-118

Swanson M, Barker H, Macfarlane SA (2002) Rapid vascular movement of tobraviruses does not require coat protein: evidence from mutated and wild-type viruses. Annals of Applied Biology **141**: 259-266

Terasaki M, Reese TS (1992) Characterization of endoplasmic reticulum by colocalization of BiP and dicarbocyanine dyes. Journal of Cell Science **101**: 315-322

Tilsner J, Linnik O, Louveaux M, Roberts IM, Chapman SN, Oparka KJ (2013) Replication and trafficking of a plant virus are coupled at the entrances of plasmodesmata. The Journal of Cell Biology **201:** 981-995

Verchot J, Driskel BA, Zhu Y, Hunger RM, Littlefield LJ (2001) Evidence that soilborne wheat mosaic virus moves long distance through the xylem in wheat. Protoplasma **218**: 57-66

Vijayapalani P, Maeshima M, Nagasaki-Takekuchi N, Miller WA (2012) Interaction of the trans-frame potyvirus protein P3N-PIPO with host protein PCaP1 facilitates potyvirus movement. PLoS Pathog **8:** e1002639

Wei T, Zhang C, Hong J, Xiong R, Kasschau KD, Zhou X, Carrington JC, Wang A (2010) Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. PLoS Pathog **6**: e1000962

Wolf S, Lucas WJ, Deom CM, Beachy RN (1989) Movement protein of tobacco mosaic virus modifies plasmodesmatal size exclusion limit. Science **246**: 377-379

Wood PJ (1980) Specificity in the interaction of direct dyes with polysaccharides. Carbohydrate Research **85**: 271-287

Xoconostle-Cázares B, Ruiz-Medrano R, Lucas WJ (2000) Proteolytic processing of CmPP36, a protein from the cytochrome b5 reductase family, is required for entry into the phloem translocation pathway. The Plant Journal **24:** 735-747

Xoconostle-Cázares B, Xiang Y, Ruiz-Medrano R, Wang H-L, Monzer J, Yoo B-C, McFarland KC, Franceschi VR, Lucas WJ (1999) Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mrna into the phloem. Science **283**: 94-98

Yoo B-C, Kragler F, Varkonyi-Gasic E, Haywood V, Archer-Evans S, Lee YM, Lough TJ, Lucas WJ (2004) A systemic small rna signaling system in plants. The Plant Cell **16**: 1979-2000

Zhang X, Zhao X, Zhang Y, Niu S, Qu F, Zhang Y, Han C, Yu J, Li D (2013) Nterminal basic amino acid residues of Beet black scorch virus capsid protein play a critical role in virion assembly and systemic movement. Virol J **10**: 200

ANNEXE **B**

PUBLICATION 4 : The Vesicle-Forming 6K₂ Protein of Turnip Mosaic Virus Interacts with the COPII Coatomer Sec24a for Viral Systemic Infection.

The Vesicle-Forming 6K₂ Protein of Turnip Mosaic Virus Interacts with the COPII Coatomer Sec24a for Viral Systemic Infection.

Journal of Virology. 2015 Jul;89(13) :6695-710.

Jun Jiang¹, Camilo Patarroyo², Daniel Garcia Cabanillas¹, Huanquan Zheng² and Jean-François Laliberté¹

- 1. INRS-Institut Armand-Frappier, 531 Boulevard des Prairies, Laval, QC, H7V 1B7, Canada
- Department of Biology, McGill University, 1205 Dr. Penfield Avenue, Montréal, QC, H3A 1B1, Canada

Corresponding author : Jean-François Laliberté

Tel: 1.450.687.5010, Fax: 1.450.686.5501, Email: jean-francois.laliberte@iaf.inrs.ca

Contributions : Le manuscrit a été publié dans *Journal of Virology*. J'ai participé dans les manipulations du système double hybride split ubiquitin (Figure.8) en effectuant la construction de la protéine appât LV-Cub-6K₂, des vérifications expérimentales et en rédigeant la partie du Matériels et méthodes correspondante. La plupart des expériences de l'article ont été élaborées et réalisées par Jun Jiang. Camilo Patarroyo a contribué aux expériences (Figure 8A, Figure 9A, 9E-F). Le manuscrit a été rédigé par mon collègue Jun Jiang et le Pr. Jean-François Laliberté et Pr. Huanquan Zheng ont aidé à l'améliorer.



LISTE DES PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS ORALES OU PAR AFFICHES

C.1 Liste des publications

- Garcia Cabanillas, D., Wan, J., Movahed, N., Zheng, H. et Laliberté, J-F. Turnip mosaic virus components-associated to membranes are present in the extracellular space during infection. En préparation.
- Garcia Cabanillas, D., Jiang, J., C., Germain, H., Yamaji, Y., Zheng, H. et Laliberté, J-F. Unconventional replication vesicle trafficking route involving the pre-vacuolar compartment SNARE Vti11 for Turnip mosaic virus infection. En révision, The Plant Cell.
- Sofer, L., Cabanillas, D.G., Gayral, M., Téplier, R., Pouzoulet, J., Ducousso, M., Dufin, L., Bréhélin, C., Ziegler-Graff, V., Brault, V., Revers, F.(2017). Identification of host factors potentially involved in RTM-mediated resistance during potyvirus long distance movement. In : Arch Virol.162(7) :1855-1865.
- Wan, J., Cabanillas, D. G., Zheng, H. et Laliberté, J-F. (2015). Turnip mosaic virus moves systemically through both phloem and xylem as membrane-associated complexes. In : Plant physiology 167.4, p. 1374–1388.
- Jiang, J., Patarroyo, C., Garcia Cabanillas, D., Zheng, H. et Laliberté, J-F. (2015). The vesicle-forming 6K₂ protein of turnip mosaic virus interacts with the CO- PII coatomer Sec24a for viral systemic infection. In : Journal of virology 89.13, p. 6695–6710.

C.2 Communications orales

- Garcia Cabanillas, D., Jiang, J., Laliberté, J-F. RNA virus replication vesicles bypass the Golgi apparatus and require the pre-vacuolar compartment SNARE Vti11 for infection. Congrès Intercellular communication in development and disease, EMBO worshop, 2017.
- Garcia Cabanillas, D., Jiang, J., Laliberté, J-F. Molecular tug-of-war between conventional and unconventional trafficking pathways for viral replication complex formation. Congrès UPMT (Unconventional Proteins and Membranes Traffic), 2016.

- 3. Garcia Cabanillas, D. et Laliberté, J-F. Synaptotagmins play opposite roles during Turnip mosaic virus restriction infection. Congrès ASV (American Society of Virology), 2016.
- 4. Garcia Cabanillas, D., Jiang, J., Zheng, H. et Laliberté, J-F. SNARE proteins function as Turnip mosaic virus restriction factors. Congrès ASV (American Society of Virology), 2015.
- Garcia Cabanillas, D., Wan, J., Laliberté, J-F. Insight into Turnip mosaic virus replication complex content : New co-opted host factors and old partners. Congrès Montreal Plant Meeting, 2014.
- Garcia Cabanillas, D. et Laliberté, J-F. Identification de facteurs de l'hôte dans le complexe de réplication du virus de la mosaïque du navet (TuMV). 82ème congrès Acfas et concours "Ma thèse en 180 secondes", 2014.

C.3 Communications par affiches

- Garcia Cabanillas, D., Jiang, J., Zheng, H. et Laliberté, J-F. Epreuve de force moléculaire pour la formation et transit des usines de réplication virale du Turnip mosaic virus. Congrès Armand-Frappier, 2017.
- 2. Garcia Cabanillas, D. et Laliberté, J-F. Les synaptotagmines jouent des rôles essentiels et antagonistes dans l'infection induite par le TuMV. Congrès Armand-Frappier, 2015.
- Garcia Cabanillas, D., Wan, J., Zheng, H. et Laliberté, J-F. (2015). Xylem vessel analysis in Turnip mosaic virus infected plants. Congrès IUMS (International Union of Microbiological Societies), 2014.
- Garcia Cabanillas, D., Jiang, J., Patarroyo, C., Wan, J., Zheng, H., Laliberté, J-F. Insight into host proteins involved in TuMV viral factories biogenesis and trafficking : SNARE proteins . Congrès Armand-Frappier, 2013.