

Année 2013

Thèse n° 2116

THÈSE

pour le

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ BORDEAUX 2

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Mention : Sciences, technologie, Santé
Sépcialité : Biologie végétale

Présentée et soutenue publiquement le :

19 Décembre 2013

Par Maud Sorel

Née le 19 août 1987 à Poitiers

**La protéine d'inclusion cylindrique (CI) : un facteur viral clé dans
l'adaptation du LMV à la résistance conférée par eIF4E chez la laitue**

Membres du Jury

Mr Michel Hernould,	Professeur Université de Bordeaux	Président
Mme Cécile Desbiez,	Chargée de Recherche INRA	Rapporteur
Mr Emmanuel Jacquot,	Directeur de Recherche INRA	Rapporteur
Mme Véronique Brault,	Directrice de Recherche INRA	Examinatrice
Mr Jean Luc Gallois,	Chargé de Recherche INRA	Examinateur
Mme Sylvie German-Retana,	Chargée de Recherche INRA	Directrice de Thèse

« Moins on a de connaissances, plus on a de convictions »

Boris Cyrulnik

Remerciements

Les travaux de cette thèse ont été réalisés au sein de l'équipe de Virologie de l'UMR Biologie du Fruit et Pathologie (INRA, Villenave d'Ornon), je tiens donc tout d'abord à remercier M. Thierry Candresse de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire. Merci également d'avoir égrené conseils et réflexions sur mon travail tout au long de cette thèse.

Je remercie également les membres du Jury, Mesdames Véronique Brault et Cécile Desbiez et Messieurs Emmanuel Jacquot et Jean-Luc Gallois, de me faire l'honneur d'évaluer mon travail de thèse. Mes remerciements vont également à Monsieur Michel Hernould, président de ce jury, qui a participé à ma formation et à mon éveil scientifique durant mes années de Master.

Je remercie ensuite du fond du cœur Sylvie German-Retana, pour m'avoir accueillie au sein de sa fine équipe lors de mon stage de Master 1 et d'avoir accepté de re-signer pour 3 ans, quelques temps plus tard. Si tout n'a pas marché comme sur des roulettes, cette thèse a tout de même été une superbe expérience grâce à la disponibilité dont tu as fait preuve au long de ces trois années, à ta pédagogie et ton ouverture d'esprit même envers mes théories les plus capillotractées. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir permis d'aller parler de ma CI à droite et à gauche, cela fût très formateur pour moi.

Mais nous n'étions pas que deux dans ce bateau, je remercie donc aussi l'équipe des « girls » : Laurence Svanella, Geneviève Roudet-Tavert, Marie-Christine Houvenaghel et Amandine Bordat. Vous avez toutes participé à l'aboutissement de cette thèse, par votre aide technique et scientifique. Merci d'avoir toujours été disponibles pour répondre à mes questions ou partager mes interrogations. Nos réunions interminables vont me manquer ! Je remercie à ce titre également très sincèrement Benoit Moury et Eugénie Hébrard pour leur participation précieuse lors de mes deux comités de thèses. Vous êtes passionnés et passionnants.

Je remercie aussi très chaleureusement mes deux comparses, Aurélie Poque et Amandine Barra, d'avoir été aussi présentes pour moi. Merci Aurélie pour nos longues discussions existentielles autour d'une balance en serre S2, d'être venue tant de fois me demander si je n'avais pas faim, soif, chaud, froid... Et d'avoir joué la maman aussi avec mes plantes ! Merci Amandine de m'avoir offert tous ces petits moments de décrochage, d'avoir toujours su trouver LE moment opportun pour venir me changer les idées en me parlant voyages... Merci à vous deux pour ces bons moments passés ensemble, qui ne seront pas les derniers, assurément !

Je remercie également tous les thésards et étudiants qui sont passés par notre bureau : merci à Anas qui m'a passé le flambeau, à Fater pour sa bonne humeur et sa bienveillance, tes conseils sont restés gravés dans ma tête (et puis de toute façon, « on est les meilleurs, on va y arriver ! »), à Anne-Sophie et Flavio croisés durant mon stage de M1 et qui ont si bien réussi à me faire aimer la virologie, merci à Jessica, Elise, Sandra, Anaïs, Léa d'avoir mis votre grain de sel dans ma thèse en goutant aux joies des extractions Bertheau, merci à Monika pour son implication dans nos manips de confocale et pour sa gentillesse. Je remercie aussi bien évidemment Sylvain Poque, en quelques sortes mon « grand

frère » du labo, pour nos discussions et pour ton aide lors de la correction de ce manuscrit. A présent, Justine et Carole, ce sont vous les meilleures et vous allez y arriver ! Cette année de cohabitation bureautique (oui oui, je veux le dire comme ça) fut très agréable pour moi Justine, tu débordes d'énergie et de gentillesse. Merci d'apporter tant de vie dans ce bureau (et de plantes, et de schtroumpfs, et de Dragibus, et...).

J'adresse un grand merci général à toute l'équipe de virologie de m'avoir accueillie avec le sourire. Merci à tous ceux que je suis allée embêter pour des conseils, en particulier Luc que j'ai sollicité de nombreuses fois pour des vecteurs ou des anticorps et qui s'est battu comme nous contre les western blots, Patrick pour ses conseils en ELISA lors de mes débuts et sa gentillesse, Valie qui s'intéresse à tout et qui s'est donc intéressée aussi à mes soucis, Jos et Timi pour nos discussions biochimiques : même si ce pan de la thèse a été mis de côté, j'ai adoré ces réunions pleines d'enthousiasme, merci à Chantal qui a toujours un mot gentil en poche, merci à Sebastien pour son aide calme et sereine au moment de boucler ce fichu manuscrit, à Rémi qui n'a pas compris que son bureau c'était à l'étage d'en-dessous... merci à tout le monde, la liste n'est pas exhaustive mais j'ai aimé croiser vos sourires à tous dans les couloirs.

Et puisque la vie ne se résume pas au laboratoire, j'ai aussi une pensée pour mes amis. Tout d'abord j'adresse mes plus vifs encouragements à ceux qui ont choisi la même voie que moi et dont certains vivent leurs derniers jours en tant que doctorant : Sabine, Jean-baptiste, Eric, Violaine, Lamia, Vanessa : hauts les cœurs ! Je pense aussi à Claireline, ma collègue de chez Lessire, qui a partagé avec moi les hauts et les bas du cursus universitaire. Ce fut une belle traversée en ta compagnie, merci pour tous ces moments passés ensemble, en particulier durant ces trois dernières années. Merci d'être restée tant de fois dehors dans le froid parce que nous avons toujours plus de choses à nous dire avant de nous quitter.

Je remercie de tout mon cœur mes coupines pour nos retrouvailles poitevines, parisiennes, nantaise, à effet « bouffée d'oxygène », vos encouragements et tout simplement votre amitié si précieuse.

Enfin, merci à celui qui partage mon quotidien, qui essuie les sautes d'humeurs d'une thésarde en fin de course en gardant le sourire. Merci Jean-Baptiste d'être toujours là quand j'en ai besoin et d'être aussi fier de moi. Et merci de bien vouloir te lancer dans la périlleuse aventure qu'est d'accompagner un jeune docteur dans ses pérégrinations post-doctorales.

Et je ne vous oublie pas non plus, vous mes parents ! Merci à mon petit papa de m'avoir insufflé si tôt l'envie d'apprendre toujours plus. Tu as gardé cet esprit insatiable qui te pousse à me demander à chacun de nos repas : « alors, tu as des nouveaux résultats ? ». Merci de tout ce que tu m'as appris et que tu m'apprends encore. Merci à ma douce maman pour ton soutien sans faille et tous les efforts que tu fais pour moi. Cette thèse vous est dédiée à tous les deux.

- **Publications**

Maud Sorel, Laurence Svanella-Dumas, Guillaume Acelin, Anaïs Pitarch, Marie-Christine Houvenaghel, Thierry Candresse & Sylvie German-Retana – Key mutations in the Cylindrical Inclusion of Lettuce mosaic virus (LMV) are involved in adaptation to eIF4E-mediated resistance in lettuce. – *Soumission prévue à Journal of Virology*

Maud Sorel, Juan-Antonio García & Sylvie German-Retana – The Potyviridae Cylindrical Inclusion: a key multipartner and multifunctional protein – *Revue publiée en février 2014 dans le journal Molecular Plant-Microbe Interactions (MPMI)*

- **Communications orales**

Maud Sorel, Laurence Svanella-Dumas, Guillaume Acelin, Amandine Bordat, Marie-Christine Houvenaghel, Thierry Candresse & Sylvie German-Retana – Virus de la mosaïque de la laitue vs résistance « eIF4E » de la laitue : un combat à deux contre un – Journées des Doctorants du Département SPE, 20-22 juin **2013**, Montpellier, France

Maud Sorel, Anas Abdul-Razzak, Laurence Svanella-Dumas, Guillaume Acelin, Marie-Christine Houvenaghel, Thierry Candresse & Sylvie German-Retana – Virus de la mosaïque de la laitue vs résistance « eIF4E » de la laitue : un combat à deux contre un. – 13^{ème} Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale SVS, 10 avril **2013**, Arcachon, France

Maud Sorel, Laurence Svanella, Geneviève Roudet-Tavert, Thierry Candresse & Sylvie German-Retana – Evolution of Lettuce mosaic virus towards resistance-breaking in lettuce : involvement of the viral cylindrical inclusion – # 8 REID , 4-6 Février **2013**, Bordeaux, France.

Maud Sorel, Anas Abdul-Razzak, Laurence Svanella-Dumas, Guillaume Acelin, Marie-Christine Houvenaghel, Thierry Candresse & Sylvie German-Retana – Key Mutations in the Cylindrical Inclusion of Lettuce mosaic virus (LMV) are involved in the breakdown of eIF4E-mediated resistance – 14^{èmes} Rencontres de Virologie Végétale, 13-17 janvier **2013**, Aussois, France.

Maud Sorel, Laurence Svanella-Dumas, Geneviève Roudet-Tavert, Thierry Candresse & Sylvie German-Retana – Evolution of *Lettuce mosaic virus* towards resistance-breaking in lettuce: involvement of the viral Cylindrical Inclusion – Workshop Réseau Evolution Virale, 4-5 octobre **2012**, Montpellier, France

Maud Sorel, Anas Abdul-Razzak, Laurence Svanella-Dumas, Guillaume Acelin, Marie-Christine Houvenaghel, Thierry Candresse & Sylvie German-Retana – Key mutations in the cylindrical inclusion of LMV are involved in the breakdown of eIF4E mediated resistance – Journées des Doctorants du Département SPE, 20-22 juin **2012** - Toulouse, France.

Maud Sorel, Anas Abdul-Razzak, Laurence Svanella-Dumas, Guillaume Acelin, Marie-Christine Houvenaghel, Thierry Candresse & Sylvie German-Retana – Key mutations in the cylindrical inclusion of LMV are involved in the breakdown of eIF4E mediated resistance. 8^{ème} colloque de la Société Française de Phytopathologie. 5-8 juin **2012**, Paris, France.

- **Communications évoquant mes travaux de thèse**

Le nom de l'orateur qui a donné la communication est souligné.

Maud Sorel, Laurence Svanella-Dumas, Geneviève Roudet-Tavert, Guillaume Acelin, Marie-Christine Houvenaghel, Amandine Bordat, Thierry Candresse & Sylvie German-Retana – Functional analysis of plant-potyvirus interactions – 42th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology, May 18th to 21nd **2013**, Foz do Iguacu, Paraná, Brazil. Conférence invitée.

Maud Sorel, Laurence Svanella-Dumas, Guillaume Acelin, Marie-Christine Houvenaghel, Olivier Le Gall, Thierry Candresse & Sylvie German-Retana – Mutations in the Cylindrical Inclusion of *Lettuce mosaic virus* are associated with evolution towards resistance-breaking of eIF4E-mediated resistance in lettuce – Plant Resistance Sustainability 2012 International Conference, 16-19 october **2012**, La Colle sur Loup, France.

Laurence Svanella-Dumas, **Maud Sorel**, Anas Abdul-Razzak, Marie-Christine Houvenaghel, Olivier Le Gall, Thierry Candresse & Sylvie German-Retana – Towards a global perspective on Lettuce mosaic virus (LMV) biological and molecular diversity – « XXII Meeting on Virology - V MERCOSUL Meeting on Virology », octobre **2011**, Atibaia, Sao Paulo, Brésil,. Conférence invitée

Anas Abdul-Razzak, Laurence Svanella, Geneviève Roudet-Tavert, **Maud Sorel**, Marie-Christine Houvenaghel, Jocelyne Walter, Thierry Michon, Olivier Le Gall, Thierry Candresse & Sylvie German-Retana – A new potyvirus virulence determinant: the CI C-terminus modulates pathogenicity of *Lettuce mosaic virus* in lettuce – 13^{èmes} Rencontres de Virologie Végétale, 16-20 janvier 2011, Aussois, France.

- **Communications par poster**

Maud Sorel, Laurence Svanella-Dumas, Geneviève Tavert-Roudet, Amandine Bordat, Guillaume Acelin, Marie-Christine Houvenaghel, Thierry Candresse & Sylvie German-Retana – Resistance mechanism against LMV in lettuce involving eIF4E, VPg and CI: beyond the tip of the iceberg – EMBO Workshop : « Green viruses : from gene to landscape », 7-11 septembre **2013**, Hyères-les-palmiers, France.

Maud Sorel, Anas Abdul-Razzak, Laurence Svanella-Dumas, Guillaume Acelin, Marie-Christine Houvenaghel, Thierry Candresse and Sylvie German-Retana – Key mutations in the cylindrical inclusion of LMV are involved in the breakdown of eIF4E mediated resistance – 12^{ème} Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale SVS, 11 avril **2012**, Arcachon, France.

Anas Abdul-Razzak, **Maud Sorel**, Laurence Svanella, Geneviève Roudet-Tavert, M.C. Houvenaghel, J. Walter, T. Michon, Olivier Le Gall, Thierry Candresse & Sylvie German-Retana – Mutations in the CI-Cter cistron of Lettuce mosaic virus are associated with evolution towards resistance-breaking of eIF4E-mediated resistance in lettuce – Plant Virus Ecology Network (PVEN), 30mai-1^{er} juin **2011**, Montpellier, France.

Formations suivies

Formation à la **recherche bibliographique**, à la mise en place d'une veille bibliographique et à l'établissement d'une **stratégie de publication** – Modules MISTeR 1, 2 et 3 par Patricia Volland-Nail (INRA), durée : **20h**

Initiation aux **statistiques** niveaux 1 et 2, formatrice : Frédérique Pellerin (INRA), durée : **6 + 4 jours**

Formation Professionnelle des Doctorants (Université de Bordeaux), composante **enseignement**, durée : **39h**. *Je n'ai cependant pas pu assister aux 39h de cours, la formation n'est donc pas formellement validée.*

Formation à la **Microscopie** à épifluorescence et confocale (Pôle d'Imagerie du Végétal), formatrices : Brigitte Batailler, durée : **8h**

Formation à l'outil d'analyse d'image **Image J** (Pôle d'Imagerie Végétale), formatrice : Catherine Chenillet, durée : **4h**

Formation à l'**enseignement** par l'enseignement, formateurs André Quinton et Véronique Lapostole (Université de Bordeaux), durée : **3 jours** d'enseignement théorique + **20h** d'encadrement de TP de Biochimie de Licence et TP de Physiologie Végétale de Master, en compagnie d'un enseignant-tuteur (Jérôme Joubès).

Encadrement d'étudiants stagiaires de tous niveaux, de la Licence 2 au Master 2.

Liste des abréviations

Produits et Réactifs

BrdU	BromodéoxyUridine
PBS	Tampon Phosphate Salin
PVP	PolyVinylPyrrolidone
PEG	PolyEthylèneGlycol
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
DIECA	Diethyl Dithiocaremate de Sodium
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
PNPP	Para-Nitrophényl-Phosphate
LB	Lysogeny-Broth
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
YPD	Yeast extract Peptone Dextrose
MES	Acide 2-(N-morpholino) Ethanesulfonic
GUS	β -glucuronidase
GFP	Green Fluorescent Protein
RFP	Red Fluorescent Protein
Luc	Luciférase
LOB	LOading Buffer
UV	Lumière Ultra-Violette
He/Ne	Laser Hélium/Néon

Résistances aux virus

ExR	Extreme Resistance
HR	Hypersensitive Response
SHR	Systemic Hypersensitive Response
LSHR	Lethal Systemic Hypersensitive Response
Avr	Avirulence
R	Résistance
Rsv	Resistance to SMV
Pvr	PVY resistance
TuRBO	TuMV Resistance in Brassica
Rnt1	Resistance and Necrosis to TuMV

Facteurs cellulaires

eIF	Facteur d'Initiation de la Traduction
PABP	PolyA Binding Protein
PVIP	Potyvirus VPg-Interaction Protein
HSP	Protéines de Choc Thermique
RTM	Restricted TEV Movement
PCaP1	Plasma-Membrane Associated Cation Binding Protein
AtRH8	<i>Arabidopsis thaliana</i> Dead-box RNA helicase like
P58 ^{IPK}	58 kDa Inhibitor of Protein Kinase
PSI-K	Protéine K du Photosystème I
RbcS1	Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase small Subunit 1

Acides Nucléique, Nucléotides

A	Adénine
T	Thymine
G	Guanine
C	Cytosine
U	Uracile
dNTP	Désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP et dTTP)
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	ARN messenger
ADN-T	ADN de transfert
ADNc	ADN complémentaire
ATP	Adénosine-TriPhosphate
nt	Nucleotides
kb	Kilo Paire de Base
ORF	Cadre Ouvert de Lecture (Open Reading Frame)
Tm	Température de Fusion
aa	Acide Aminé
RNP	RiboNucléoProtéine

Unités

DO	Densité Optique
rpm	Rotations Par Minute
k	Kilo-(10^3)
c	Centi-(10^{-2})
m	Milli-(10^{-3})
μ	Micro-(10^{-6})
n	Nano-(10^{-9})
Log	Logarithme
% p/v	Pourcent (Poids par volume)
% v/v	Pourcent (Volume par volume)
°C	Degré Celsius
Da	Dalton
nt	Nucleotides
kb	Kilo Paire de Base
h	Heure
min	Minute
sec	Seconde
nm	Nanomètre (Longueur d'Onde)
psi	Pound Per Square Inch
L	Litre
g	Gramme
M	Molaire (moles par litre)
mol	Mole
pH	Potentiel Hydrogène
hpi	Heures Post-Inoculation
jpi ou dpi	Jours Post-Inoculation ou Day Post Inoculation
jpa ou dpa	Jours Post-Agroinfiltration ou Days Post-Agroinfiltration

Protéines virales

CI	Protéine d'Inclusion Cylindrique
CP	Protéine de Capside
MP	Protéine de Mouvement
VPg	Protéine Virale Liée au Génome
HcPro	Facteur Assistant / Protéase
NIa	Protéine d'Inclusion Nucléaire a
NIb	Protéine d'Inclusion Nucléaire b
Pro	Protéinase
PIPO	Pretty Interesting Potyviridae ORF
RdRp	ARN Polymérase ARN Dépendante
C-ter	Région Carboxy-terminale
N-ter	Région Amino-terminale
TGB	Triple Gene Block
NOS	NOpaline Synthase

Méthodes

DAS-ELISA	Double Antibody Sandwich Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
VIGS	Virus Induced Gene Silencing
ITC	Isothermal Titration Calorimetry
BiFC	Bimolecular Fluorescence Complementation
PCR	Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
SDS-PAGE	Sodium-Dodecyl-Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis
TAP	Tandem Affinity Purification
Y2H	Yeast Two Hybrid
IFEL	Internal Fixed Effects Likelihood
FUBAR	Fast Unbiased Bayesian AppRoximation
MEME	Mixed Effects Model of Evolution
SLAC	Single Likelihood Ancestor Counting

Abreviations autres

SEL	Seuil d'Exclusion Limite
PD	Plasmodesme
RE	Reticulum Endoplasmique
COP	Coat Protein complex
MP	Movement Protein
VRC	Vesicle-associated Replication Complex
Cv	Cultivar
Vs	Versus

Liste des virus cités

Acronyme	Espèce	Genre	Famille
BCMV	<i>Bean common mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
BCMNV	<i>Bean common mosaic necrosis virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
BYMV	<i>Bean yellow mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
CVMoV	<i>Carnation vein mottle virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
CIYVV	<i>Clover yellow vein virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
LMV	<i>Lettuce mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
MDMV	<i>Maize dwarf mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
PepMoV	<i>Pepper mottle virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
PPV	<i>Plum pox virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
PSbMV	<i>Pea seed-borne mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
PVA	<i>Potato virus A</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
PVY	<i>Potato virus Y</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
SMV	<i>Soybean mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
SCMV	<i>Sugarcane mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
SPFMV	<i>Sweet potato feathery mottle virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
TamMV	<i>Tamarillo mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
TBV	<i>Tulip breaking virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
TVMV	<i>Tobacco vein mottling virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
WMV	<i>Watermelon mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
WSMV	<i>Wheat streak mosaic virus</i>	<i>Tritimovirus</i>	<i>Potyviridae</i>
WSSMV	<i>Wheat spindle streak mosaic virus</i>	<i>Bymovirus</i>	<i>Potyviridae</i>
ZYMV	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>	<i>Cucumovirus</i>	<i>Bromoviridae</i>
PVX	<i>Potato virus X</i>	<i>Potexvirus</i>	<i>Alphaflexiviridae</i>
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>	<i>Caulimovirus</i>	<i>Caulimoviridae</i>
TBSV	<i>Tomato bushy stunt virus</i>	<i>Tombusvirus</i>	<i>Tombusviridae</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>	<i>Tobamovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>
TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus</i>	<i>Tospovirus</i>	<i>Bunyaviridae</i>
RYMV	<i>Rice yellow mottle virus</i>	<i>Sobemovirus</i>	<i>Unallocated ssRNA+ viruses</i>

Résumé

<u>Introduction</u>	1
<i>I- Avant-propos</i>	3
<i>II- Caractéristiques du genre Potyvirus</i>	5
<i>III- Revue bibliographique : La CI des Potyvirus, une protéine clé multifonctionnelle</i>	11
<i>IV- Pathosystème LMV/Laitue</i>	33
<i>V- Contexte scientifique de la thèse</i>	35

Chapitre 1 : Caractérisation biologique de mutations candidates de la région C-terminale de la CI identifiées après analyse de la diversité naturelle du LMV

<i>I- Identification de quatre positions candidate dans la CI-Cter</i>	41
<i>II- Article de recherche : Des mutations clé dans la CI du LMV sont impliquées dans l'adaptation du virus aux résistances conférées par eIF4E</i>	43
<i>III- Résultats supplémentaires</i>	85
<i>IV- Conclusion</i>	87

Chapitre 2 : L'implication de la CI dans le mouvement de cellule à cellule et dans le contournement des résistances *mo1* sont-elles liées ?

<i>I- Contexte de l'étude</i>	93
<i>II- Les mutations de contournement de la CI-Cter du LMV sont-elles impliquées dans le mouvement de cellule à cellule ?</i>	95
<i>III- La région C-terminale de la CI du LMV est-elle impliquée dans son recrutement au niveau des plasmodesmes ?</i>	109

Chapitre 3 : La VPg du LMV agit-elle de concert avec la CI pour contourner les résistances *mo1* de la laitue ?

<i>I- Contexte de l'étude</i>	127
<i>II- Le contournement de l'allèle de résistance <i>mo1</i>² est-il dépendant de la VPg ?</i>	129
<i>III- La localisation subcellulaire de la VPg est-elle modifiée en présence de la CI ou en condition d'infection ?</i>	133

Discussion et perspectives 137

- I- Deux combinaisons de mutations dans la région C-terminale de la CI permettent au LMV d'acquérir la virulence vis-à-vis du gène majeur de résistance mo1 chez la laitue* 139
- II- Le contournement de la résistance mo1 serait associé à la restauration du mouvement en systémie* 143
- III- Modulation du rôle des mutations de contournement de la résistance mo1 par le fond génétique du virus* 149
- IV- Comment expliquer la durabilité de la résistance conférée par mo1 chez la laitue ?* 151

Matériel et méthodes 157

- I- Matériel biologique et conditions de culture* 159
- II- Manipulation d'acides nucléiques* 163
- III- Techniques de clonage et de transformation* 167
- IV- Détection et quantification des virus* 175
- V- Tests de compétition* 181
- VI- Expression transitoire de protéines in planta* 183
- VII- Outils bioinformatiques* 187

Références Bibliographiques 191

Annexes

- Annexe 1 : Recherche de sites de phosphorylation au sein de la CI-Cter*
- Annexe 2 : Arbre phylogénétique CI/VPg représentant la diversité naturelle du LMV*
- Annexe 3 : Stratégie de clonage de P3N-PIPO du LMV - Alignement nucléotidique*

Résumé

Les facteurs d'initiation de la traduction sont des protéines de plante cruciales pour l'établissement du cycle viral des *Potyvirus*. Des mutations dans ces facteurs sont la source de résistances récessives chez de nombreuses plantes d'intérêt agronomique. Ces résistances peuvent être déjouées par les *Potyvirus*, principalement par l'acquisition de mutations dans la VPg (Viral Protein Genome-linked) permettant de rétablir une interaction compatible avec les formes mutées des facteurs eIF4E. Ce modèle simple de co-évolution n'est pas applicable au pathosystème Laitue/LMV (*Lettuce mosaic virus*). En effet, chez la laitue, deux allèles $mo1^1$ et $mo1^2$ du gène *mo1* codant pour eIF4E confèrent la résistance au LMV. Dans ce pathosystème, la VPg n'a été associée qu'au contournement de l'allèle de résistance $mo1^1$. Un deuxième facteur de virulence entre en jeu : la protéine CI (Cylindrical Inclusion, helicase caractéristique des potyvirus), responsable du contournement des résistances $mo1^1$ et $mo1^2$.

L'étude approfondie de la diversité naturelle du LMV a permis d'identifier 4 positions en acides aminés dans la CI, potentiellement impliquées dans le mécanisme de contournement. Celles-ci ont été étudiées par une approche de génétique inverse. Les résultats mettent pour la première fois en évidence l'existence d'un contournement de résistance partiel (toutes les plantes ne sont pas infectées) et graduel (la proportion de plantes infectées augmente avec le nombre de mutations). Par ailleurs, ce contournement est associé au rétablissement du mouvement en systémie du virus en contexte de résistance et est dépendant du fond génétique du virus.

Mots-clés : *Lettuce mosaic virus*, Potyvirus, résistance récessive, Inclusion Cylindrique, CI, eIF4E, Evolution, contournement

Abstract

Eukaryotic translation initiation factors are essential host factors required for *Potyvirus* infection and represent a major component of recessive resistance against potyviruses in several crops. Potyvirus adaptation to eIF4E-mediated resistance usually occurs through mutations in the VPg (Viral Protein Genome-linked), restoring its interaction with the mutated eIF4E factor. Such co-evolution model doesn't match the Lettuce/LMV (*Lettuce mosaic virus*) pathosystem. Indeed, two resistance alleles $mo1^1$ and $mo1^2$ of the *mo1* gene encoding eIF4E, confer resistance against LMV in lettuce. The VPg triggers virulence only towards the $mo1^1$ allele. Another virulence determinant was identified: the CI (Cylindrical inclusion, potyviral helicase), which was associated with both $mo1^1$ and $mo1^2$ overcoming.

By investigating the LMV natural diversity, we identified 4 amino acid positions in the CI-Cterminus potentially involved in *mo1* overcoming. Reverse genetics experiments were carried out, demonstrating that mutations at these positions are associated with a partial (not all the plants are infected) and gradual (increase with the accumulation of mutations) resistance breaking mechanism. Resistance-breaking mutations were shown to restore the systemic movement of the virus and to be influenced by the viral genetic background.

Keywords: *Lettuce mosaic virus*, Potyvirus, recessive resistance, Cylindrical Inclusion, CI, eIF4E, Evolution, virulence

Introduction

Avant-propos

Caractéristiques du genre Potyvirus

**Revue Bibliographique : la CI des Potyviridae, une protéine clé
multifonctionnelle**

Pathosystème LMV/Laitue : notre modèle d'étude

Contexte scientifique de la thèse

Avant propos

Les plantes qui sont des organismes sessiles, doivent faire face à de nombreuses agressions auxquelles elles ne peuvent échapper, qu'il s'agisse de stress abiotiques tels que le manque d'eau, ou biotiques associés à des agents pathogènes. Parmi les organismes responsables de maladies de plantes, les virus sont parmi les plus dommageables sur les cultures d'intérêt agronomique. Les quelques moyens de lutte disponibles contre les phytovirus reposent principalement sur des mesures prophylactiques, certaines visant à limiter la présence d'insectes vecteurs à proximité des cultures, afin de limiter la propagation de la maladie. Une autre alternative est l'emploi de la lutte génétique, qui repose sur l'utilisation au champ de cultivars résistants, lorsque de tels cultivars ont été identifiés (Palukaitis and Carr, 2008). Les résistances aux virus sont de deux types : les résistances à caractère dominant et les résistances à caractère récessif. Les résistances dominantes suivent le modèle gène pour gène énoncé par Flor (1971) : la plante possède un gène dont le produit est capable de reconnaître directement ou indirectement un facteur viral et de déclencher en conséquence une cascade de signalisation qui donnera lieu à l'activation de réactions de défense par la plante. Les résistances récessives reposent quant à elles sur l'absence ou la modification d'un facteur de l'hôte nécessaire à l'établissement du cycle viral. Cependant le déploiement à grande échelle de ces résistances au sein de monocultures favorise l'émergence de virus variants qui compromettent la durabilité de ces résistances. Dans un souci de mieux comprendre l'apparition de tels variants, un intérêt croissant est porté aux populations virales présentes dans les plantes adventices présentes aux abords des champs de culture, qui sont susceptibles de constituer des réservoirs pour de nouvelles infections.

L'amélioration de la lutte génétique passe donc par une meilleure connaissance des résistances de l'hôte et des mécanismes qui président à l'évolution des virus vers la virulence. Le but à terme est d'être capable de prédire la durabilité des résistances employées et de l'allonger, le cas échéant par des pratiques culturales adaptées ou par pyramidage des résistances.

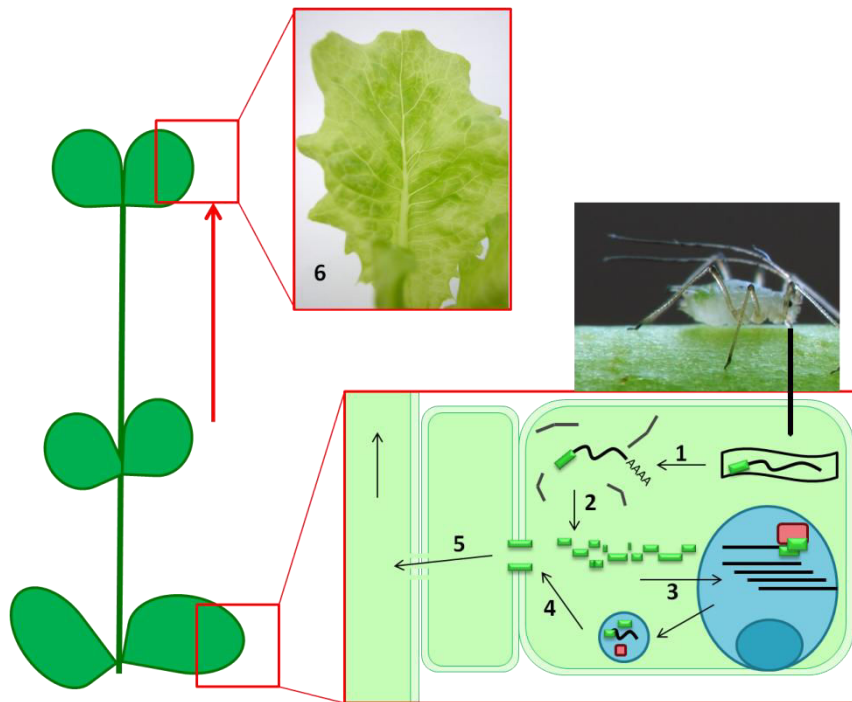


Figure 1 : Cycle d'infection d'une plante par un potyvirus, suite à son inoculation par puceron

1) Le virus est décapsidé et l'ARN viral est libéré dans les feuilles inoculées ; 2) l'ARN est ensuite traduit par la machinerie de traduction de l'hôte en une polyprotéine qui est clivée en 11 protéines multifonctionnelles ; 3) l'induction de la formation d'une structure périmucléaire dérivée du réticulum endoplasmique permet une réplication élevée du virus ; 4) le virus se déplace (mouvement intra-cellulaire) jusqu'à atteindre les plasmodesmes, lieux de passage de cellule à cellule (mouvement inter-cellulaire) ; 5) le virus envahit la cellule compagne et se charge dans le phloème pour y suivre le flux de sève élaborée ; 6) Après déchargement depuis le phloème dans les feuilles infectées en systémie, le virus envahit les cellules du mésophylle où il continue sa multiplication et son mouvement inter-cellulaire, en induisant parfois des symptômes.

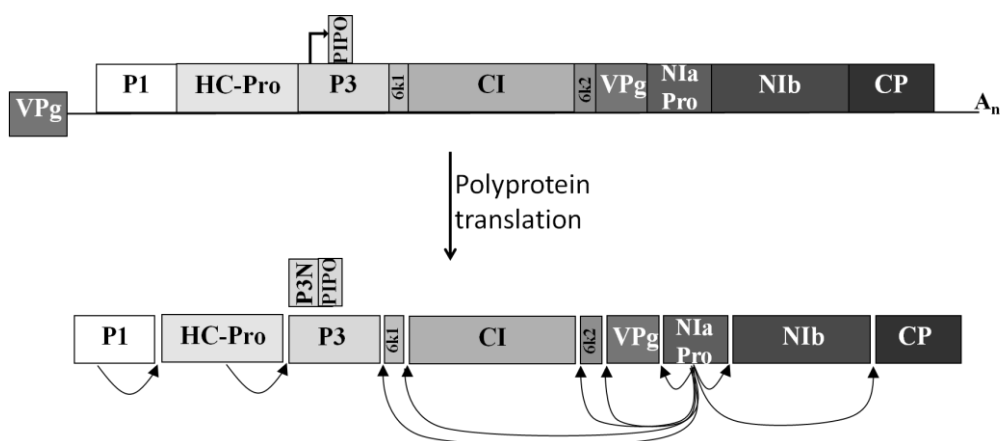


Figure 2 : Traduction du génome des potyvirus et maturation de la polyprotéine

Les sites de clivage reconnus par les différentes protéases virales sont indiqués par une flèche.

Caractéristiques du genre *Potyvirus*

Parmi les virus de plante, le genre des *Potyvirus* regroupe le plus grand nombre d'espèces virales parmi les plus étudiées (Adams et al., 2011). Les potyvirus appartiennent à la famille des *Potyviridae* et causent des dégâts sur de nombreuses plantes d'intérêt agricole.

Les potyvirus sont transmis d'une plante à une autre par pucerons selon un mode non-persistant. Lorsqu'un insecte atteint une plante infectée, il réalise des piqûres d'essai au cours desquelles le virus est chargé dans le stylet : l'insecte est alors capable d'inoculer d'autres plantes par de nouvelles piqûres d'essai. Le virus reste localisé au niveau du stylet et la capacité du puceron à transmettre le virus est donc limitée à quelques minutes (Brault et al., 2010). Lorsque le virus pénètre dans la cellule végétale, il est décapsidé pour permettre la traduction des protéines virales à partir de l'ARN viral de polarité positive. L'infection de la cellule résulte en la formation d'une structure péri-nucléaire dérivée du réticulum endoplasmique et dans laquelle ont lieu la traduction et la réplication à haut débit du virus. Simultanément, le virus est assemblé en sa forme de mouvement (différentes études parlent de virion encapsidé, de complexe ribonucléoprotéique ou de vésicules dérivées du réticulum endoplasmique) et dirigé vers les plasmodesmes qu'il va traverser pour atteindre la cellule adjacente. Ce mouvement se fait de proche en proche par les plasmodesmes jusqu'à ce que le virus atteigne les vaisseaux conducteurs : il se charge alors dans le phloème via les cellules compagnes et suit le flux de sève élaborée jusqu'aux feuilles puits, causant l'infection systémique, parfois corrélée à l'apparition de symptômes. Toutes ces étapes du cycle viral sont assurées par des coopérations étroites entre les protéines virales et les protéines de l'hôte (Figure 1).

L'étude de ces facteurs de l'hôte nécessaires au virus pour assurer son cycle infectieux donne lieu à la découverte de facteurs de sensibilité potentiellement associés à des résistances naturelles aux potyvirus, permettant la mise en place de la lutte génétique. Près de la moitié des résistances aux *Potyvirus* identifiées à ce jour sont des résistances récessives, reposant sur la mutation ou l'absence de tels facteurs de sensibilité (Kang et al., 2005), et en particulier sur des mutations du complexe d'initiation de la traduction pour le cycle des potyvirus (Le Gall, 2011). En effet, le clonage au début des années 2000 de plusieurs gènes de résistance codant pour le facteur eIF4E chez le piment, la laitue et le pois (Ruffel et al., 2002; Nicaise et al., 2003; Gao et al., 2004) a permis l'attribution ultérieure de nombreuses résistances récessives à des mutations dans ce facteur (pour revue, voir Wang and Krishnaswamy, 2012)(Hart and Griffiths, 2013; Wang et al., 2013). L'utilisation de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* et des immenses ressources génétiques disponibles pour cette plante ont permis de démontrer qu'en plus du facteur eIF4E, le facteur eIF4G et les isoformes eIF(iso)4E et eIF(iso)4G sont également importants pour l'infection de la plante par les potyvirus (Lellis et al., 2002; Nicaise et al., 2007; Yoshii et al., 2004; Duprat et al., 2002; Gallois et al., 2010; Contreras-Paredes et al., 2012). S'il est probable que ces facteurs soient impliqués dans la traduction de l'ARN viral (Beauchemin et Laliberté, 2007; Khan et al., 2008; Michon et al., 2006; Hafrén et al., 2013), plusieurs études démontrent qu'ils peuvent également intervenir dans d'autres étapes du cycle viral. En effet, il a été démontré chez

Protéine	Taille (kDa)	Fonctions connues	Références
P1	32-64	Clivage de la polyprotéine Réplication Suppression du silencing	Verchot et al., 1991 Verchot and Carrington, 1995 Valli et al., 2006, Tena Fernández et al., 2013
		Définition du spectre d'hôte et symptomatologie	Nagyová et al., 2012
HC-Pro	56	Clivage de la polyprotéine Réplication	Oh and Carrington, 1989 Kasschau and Carrington, 2001 Kasschau and Carrington, 1995
		Mouvement de cellule à cellule Mouvement systémique Suppression du silencing	Rojas et al., 1997 Cronin et al., 1995 Lakatos et al., 2006
		Transmission par puceron Symptomatologie	Huet et al., 1994 Redondo et al., 2001; Tribodet et al., 2005; Moury et al., 2011; Haikonen et al., 2013
P3	37	Réplication Symptomatologie	Merits et al., 1999 Jenner, 2002
P3N-PIPO	14	Mouvement de cellule à cellule	Wei et al., 2010; Wen and Hajimorad, 2010; Vijayapalani et al., 2012
6k1	6	Symptomatologie	Sáenz et al., 2000
CI	79	Hélicase, ATPase Réplication Mouvement de cellule à cellule	Láin et al., 1990 Kekarainen et al., 2002 Carrington et al., 1998; Wei et al., 2010b
		Symptomatologie	Zhang et al., 2009; Fujiwara et al., 2011
6k2	6	Formation des vésicules de réplication	Cotton et al., 2009; Agbeci et al., 2013; Grangeon et al., 2012
		Mouvement à longue distance	Spetz and Valkonen, 2004
		Symptomatologie	Spetz and Valkonen, 2004
VPg-Nla-Pro	49	Réplication	Rajamäki and Valkonen, 2002; You and Shirako, 2012
		Mouvement systémique	Schaad et al., 1997; Rajamäki and Valkonen, 2002; You and Shirako, 2012
		Traduction	Eskelin et al., 2011
		Définition du spectre d'hôte Clivage de la polyprotéine Transmission par puceron	Keller et al., 1998 Carrington et al., 1998 Torrance et al., 2006
Nlb	58	ARN polymérase ARN-dépendante	Hong et hunt 1996
CP	28-40	Encapsidation du virus Réplication	Allison et al., 1985 Mahajan et al., 1996
		Mouvement de cellule à cellule Mouvement à longue distance	Rojas et al., 1997 Dolja et al., 1995
		Transmission par puceron Définition du spectre d'hôte	Flassinski et Cassidy 1998 Carbonell et al., 2013

Figure 2 : Fonctions des protéines codées par les potyvirus

Les fonctions de la protéine CI sont détaillées dans la revue « *The Potyviridae Cylindrical Inclusion Helicase: a key multipartner and multifunctional protein* » Sorel et al. (2014).

Arabidopsis thaliana comme chez la laitue, que l'absence ou la mutation du facteur eIF(iso)4E ou eIF4E pouvaient résulter en un blocage du mouvement à longue distance du *Tobacco etch virus* (TEV) et du *Lettuce mosaic virus* (LMV) respectivement, alors que les étapes de réplication/traduction et de mouvement de cellule à cellule ont toujours lieu (German-Retana et al., 2003; Contreras-Paredes et al., 2012).

Si les virus dépendent autant de facteurs de l'hôte c'est parce que leur génome code pour un nombre très limité de protéines. Le génome des potyvirus consiste en un ARN simple brin positif d'environ 10kb, polyadénylé en 3', lié covalamment en 5' à la protéine virale VPg (Viral Protein Genome-linked) et encapsidé dans une particule filamenteuse (Figure 2). Lorsque le virus pénètre la cellule, celui-ci est décapsidé et l'ARN viral est pris en charge par des protéines de l'hôte qui vont assurer sa traduction en une polyprotéine. Celle-ci est ensuite maturée par clivage en 10 protéines : P1, HC-Pro, P3, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa, NIb et CP. Ce clivage est assuré par trois protéines virales P1, HC-Pro et NIa (Figure 2, Riechmann et al., 1992). A ces 10 protéines s'ajoutent une 11^{ème}, qui est le produit d'un décalage du cadre de lecture lors de la traduction de la P3 et qui résulte en l'expression d'une protéine de fusion appelée P3N-PIPO (Chung et al., 2008).

La majorité de ces protéines sont multifonctionnelles et interviennent presque toutes dans la réplication du virus et d'autres étapes du cycle viral (Figure 3). Parmi elles, la protéine de capsid CP a été démontrée comme intervenant dans le mouvement du virus de cellule à cellule et en systémie, la transmission par puceron, mais également dans la réplication. La protéine HC-Pro, au-delà de son activité protéolytique, intervient en tant que suppresseur de silencing et dans le mouvement à longue distance du virus ainsi que dans l'interaction du virus avec l'insecte vecteur (pour revue, voir Syller, 2005). Peu de données sont disponibles concernant la protéine P1, qui elle aussi fut démontrée comme permettant d'inhiber le silencing induit par le virus (Valli et al., 2006; Tena Fernández et al., 2013). La VPg, protéine à désordre intrinsèque (Hébrard et al., 2009) qui est liée à l'extrémité 5' de l'ARN viral a été démontrée comme importante pour la réplication du virus et est considérée comme une protéine d'échafaudage de par les nombreuses interactions qui lui ont été attribuées (pour revue, voir Jiang and Laliberté, 2011).

La VPg est le déterminant majeur de virulence vis-à-vis des résistances liées aux facteurs d'initiation de la traduction dans de nombreux pathosystèmes. En effet, une simple mutation au sein de la VPg permet de conférer au virus la capacité d'infecter des plantes résistantes (Truniger and Aranda, 2009). En particulier, la capacité du virus PVY à infecter le piment a même été démontrée comme directement corrélée à la capacité de la VPg du virus à interagir avec le facteur eIF4E de la plante (Charron et al., 2008). Cependant tous les pathosystèmes ne semblent pas obéir à cette règle simple et d'autres facteurs viraux ont été récemment démontrés comme impliqués dans le contournement des résistances conférées par eIF4E : il s'agit des protéines P1 du CIYVV (*Clover yellow vein virus*) (Nakahara et al., 2010) et de la CI du LMV (Abdul-Razzak et al., 2009; Tavert-Roudet et al., 2012). D'autre part, la protéine HC-Pro a également été démontrée comme interagissant avec les facteurs eIF4E et eIF(iso)4E (Ala-Poikela et al., 2011). Ces résultats mettent donc en

évidence la nature complexe des interactions plante-virus, et plus particulièrement des résistances conférées par des mutations de facteurs d'initiation de la traduction. S'il est établi que ces facteurs sont essentiels au cycle viral des potyvirus, leur(s) rôle(s) exact(s) n'a pas encore été déterminé et l'étude des facteurs de virulence autre que VPg pourraient nous en apprendre plus à ce sujet. Parmi ces facteurs se trouve donc la protéine CI, protéine caractéristique et spécifique de la famille *Potyviridae*.

La protéine CI (Cylindrical Inclusion) est responsable de la formation d'inclusions en roue à aube au sein des cellules végétales infectées par des potyvirus. Elle possède une activité hélicase nécessaire à la réplication du virus mais semble également impliquée dans le mouvement local et systémique du virus, et dans les interactions impliquant des gènes de résistance dominante et récessive. Ce sont toutes ces informations que nous avons regroupées dans la revue bibliographique ci-dessous, qui sera publiée dans le journal MPMI.

The *Potyviridae* Cylindrical Inclusion Helicase: A Key Multipartner and Multifunctional Protein

M. Sorel,¹ J. A. Garcia,² and S. German-Retana¹

¹INRA, UMR BFP 1332, Equipe de Virologie, CS 20032, 33882 Villenave d'Ornon, France; ²Departamento de Genética Molecular de Plantas, Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Campus Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain

Submitted 13 November 2013. Accepted 14 December 2013.

A unique feature shared by all plant viruses of the *Potyviridae* family is the induction of characteristic pinwheel-shaped inclusion bodies in the cytoplasm of infected cells. These cylindrical inclusions are composed of the viral-encoded cylindrical inclusion helicase (CI protein). Its helicase activity was characterized and its involvement in replication demonstrated through different reverse genetics approaches. In addition to replication, the CI protein is also involved in cell-to-cell and long-distance movements, possibly through interactions with the recently discovered viral P3N-PIPO protein. Studies over the past two decades demonstrate that the CI protein is present in several cellular compartments interacting with viral and plant protein partners likely involved in its various roles in different steps of viral infection. Furthermore, the CI protein acts as an avirulence factor in gene-for-gene interactions with dominant-resistance host genes and as a recessive-resistance overcoming factor. Although a significant amount of data concerning the potential functions and subcellular localization of this protein has been published, no synthetic review is available on this important multifunctional protein. In this review, we compile and integrate all information relevant to the current understanding of this viral protein structure and function and present a mode of action for CI, combining replication and movement.

The *Potyviridae* family includes the genus *Potyvirus*, one of the largest groups of plant viruses, and seven additional genera (*Brambyvirus*, *Bymovirus*, *Ipomovirus*, *Macluravirus*, *Poacevirus*, *Potyvirus*, *Rymovirus*, and *Tritimovirus*) that are defined on the basis of genomic relatedness, genome organization, and mode of transmission. According to the Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses (Adams et al. 2011), the *Potyviridae* family is composed of 176 virus species, of which 146 belong to the *Potyvirus* genus. These worldwide pathogens infect a large range of hosts, including important agricultural crops. Due to their economic and scientific importance, two *Potyvirus* spp., *Plum pox virus* (PPV) and *Potato virus Y* (PVY), were recently listed in the top 10 most important plant viruses in molecular pathology (Scholthof et al. 2011).

Corresponding author: S. German-Retana; E-mail: german@bordeaux.inra.fr

© 2014 The American Phytopathological Society

Members of the *Potyviridae* family have non-enveloped flexuous filamentous particles of 680 to 900 nm in length and 11 to 13 nm in diameter. The encapsidated genome is formed by a positive, single-stranded RNA of approximately 10,000 nucleotides, except for the bymoviruses, whose genome consists of two RNAs. The uncapped genomic RNA has a viral protein linked to the 5' end, contains 5' and 3' terminal untranslated regions (about 100 to 150 and 200 nucleotides, respectively), and a large open reading frame (ORF) encoding a polyprotein processed co- and post-translationally into 10 multifunctional proteins: P1, helper component proteinase (HC-Pro), P3, 6K1, cylindrical inclusion (CI) protein, 6K2, viral genome-linked protein (VPg), nuclear inclusion a (NIa), nuclear inclusion b (NIb), and capsid protein (CP) (Urcuqui-Inchima et al. 2001) (Fig. 1). A small ORF called "pretty interesting *Potyviridae* ORF" (PIPO) embedded in the P3 cistron is expressed as a functional protein fused to the N-terminal region of P3 (P3N-PIPO), presumably via a ribosomal frameshift during translation or transcriptional slippage during RNA synthesis (Chung et al. 2008; Vijayapalani et al. 2012; Wen and Hajimorad 2010). Based on similarities of genome structure and some protein sequences, the *Potyviridae* spp. are considered as distantly related to the plant viruses of the family *Secoviridae* and to animal viruses of the family *Picornaviridae* as well as other families of the order *Picornavirales* (International Committee on Taxonomy of Viruses website), in the proposed supergroup of Picorna-like viruses (Goldbach et al. 1994).

A unique feature shared by all species of *Potyviridae* is the induction of characteristic pinwheel-shaped inclusion bodies in the cytoplasm of infected cells (Edwardson 1974). These cylindrical inclusions are composed of the virus-encoded CI protein and are one of the key features for diagnosis of *Potyviridae* spp. infection. Other types of inclusions can be seen in *Potyviridae*-infected plant cells, such as nuclear inclusions and amorphous inclusions, but they are neither produced by all the *Potyviridae* members nor exclusive to them. Although inclusion bodies associated with virus infection are often considered to be inactive storage forms of particular proteins, it seems unlikely that highly ordered structures such as pinwheels could only be random protein aggregates with no function in the viral infection. The CI protein forming these inclusions is a multifunctional protein whose involvement in virus replication and cell-to-cell movement has been demonstrated. CI protein may also participate in the systemic movement of the virus and contribute to symptom determination, elicit dominant resistance responses, and facilitate the breaking of recessive resistance.

Additionally, a significant number of viral and plant factors located in different subcellular compartments of the plant cell have been demonstrated to interact with this protein. In this review, we present an integrated view of the CI protein's localization, interacting partners, and activities in order to develop a model of its action that combines the replication and movement functions of this protein during the viral infection process.

In this review, the abbreviated term "CI" will be used to design the viral protein that forms the cylindrical inclusions, whereas we will refer to these structures without abbreviation.

Cylindrical inclusions: The main ultrastructural diagnostic criterion for *Potyviridae* infection.

In the 1950s, improvement of histological techniques for electron microscopy based on negative staining and transmission electron microscopy enabled plant virologists to observe viral particles in plant tissues and ultrastructural changes induced by viruses. In 1958, the potyvirus PVY was first observed in infected leaves of *Datura metel* (David-Ferreira and Borges 1958). Filamentous virus particles of constant width were observed, together with cylindrical inclusions in the cytoplasm of infected cells. Similar structures were further described in various plant hosts infected by different members of the *Potyviridae* family, such as *Tulip breaking virus*, *Turnip mosaic virus* (TuMV), *Tobacco etch virus* (TEV), *Wheat streak mosaic virus* (WSMV), *Bean yellow mosaic virus*, *Watermelon mosaic virus*, *Lettuce mosaic virus* (LMV), *Bean common mosaic virus*, and *Sugarcane mosaic virus* (Edwardson 1966). Some of those inclusions were described as pinwheels and others as bundles, which led to a misinterpretation that they represented two distinct types of inclusion bodies. In 1966, Edwardson performed series of cross and longitudinal sections of tobacco leaves infected with TEV and demonstrated that pinwheels and bundles were two sides of the same structure. Cylindrical inclusions were described as "curved or flat striated protein plates with their inner edges converging around the central axis of the cylinder and their outer edges diverging to form boundary of the cylinder" (Edwardson 1966). Scrolls, tubes, and laminated aggregates were also associated with the pinwheel bundle and, thus, the potyviral cylindrical inclusions were also usually known as pinwheels. After purification of the cylindrical inclusions (Hiebert et al. 1971), antisera raised against them did not react with the CP protein or with host proteins (Purcifull et al. 1973). Hence, nonstructural proteins encoded by the viral genome were hypothesized to comprise these cylindrical inclusions. This was supported by the identification of the CI protein among the in vitro translation products of *Pepper mosaic virus* genomic RNA (Dougherty and Hiebert 1980).

Cylindrical inclusions are characteristic of *Potyviridae* spp. infection and their detection by electron microscopy is used as a diagnostic tool (Edwardson 1974). Based on variations in shape and size, four subgroups of inclusions were established in order to help identify viral species (Edwardson and Christie 1978; Edwardson et al. 1984). However, further ultrastructural analysis revealed that the forms of the cytoplasmic inclusions were not valid cytological criterion for distinguishing species because, as reported by Edwardson (1992), different isolates of the same virus could induce different inclusions. Today, the identification of new viral species is based on the degree of similarity of their genome sequences along with biological characteristics, such as host range, vector, and pathogenicity (Adams et al. 2005).

Despite the abundance of literature describing the structural aspects of the pinwheel inclusions, the exact mechanism for their formation is still unknown and it is not clear whether inclusions form spontaneously or if their assembly requires the activity of other viral or host proteins (Graybosch et al. 1989; Wittner et al. 1998). Self-interaction was demonstrated in planta for the full-length CI protein of PPV by a bimolecular fluorescence complementation system (BiFC) (Zilian and Maiss 2011) and for the CI protein of the tritivirus WSMV through an in vitro binding assay using a glutathione-S-transferase fusion protein expressed in bacteria and in vitro translation products (Choi et al. 2000). In yeast two-hybrid (Y2H) assays, positive self-interactions were detected for N-terminal fragments of the PPV CI protein (Gómez de Cedrón et al. 2006; López et al. 2001). However, in contrast, the C-terminal region of the WSMV CI protein was shown to be involved in the self-interaction (Choi et al. 2000). Therefore, it seems that the *Potyviridae* CI proteins are able to interact in the absence of other viral proteins through their C-terminal and N-terminal ends.

Previous work tends to demonstrate that CI self-assembly is virus specific, because mixed infections with members of different genera of *Potyviridae* failed to form hybrid cylindrical inclusions (Langenberg 1991, 1993). To assess the possible auto-formation of pinwheels, heterologous expression of CI protein from diverse potyviruses in transgenic *Nicotiana tabacum* (under the control of *Cauliflower mosaic virus* [CaMV] 35S or *rbcS1* promoter) and in *N. benthamiana* (under the control of CaMV 35S promoter) was performed; no cylindrical inclusion could be detected in those transgenic plants, despite a great disturbance of cellular inter- and intra-arrangements (Graybosch et al. 1989; Maiti et al. 1993; Shand et al. 2009; Wittner et al. 1998). This suggests that either the expression level of transgenic CI was insufficient or other viral partners were needed to form pinwheels, in spite of the capacity of the CI protein to self-interact.

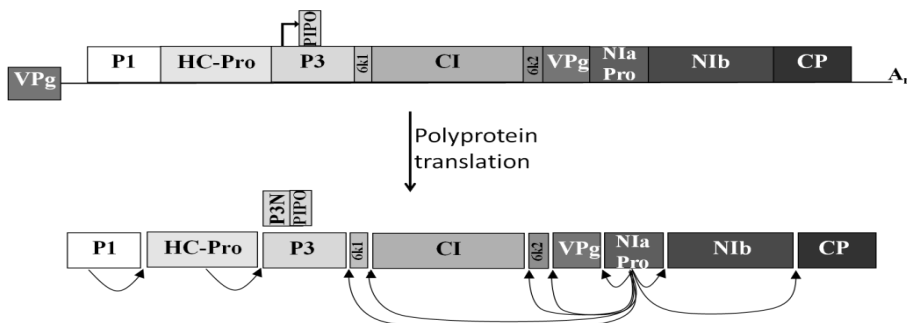


Fig. 1. Genomic organization of potyviruses.

Observation of *Sweet potato feathery mottle virus*-infected *Iris setosa* leaves at various time points after infection via aphids, allowed Lawson and co-workers (1971) to provide a comprehensive description of the formation of cylindrical inclusions. Inclusions first appeared in the parenchyma cells of the vascular bundle and in phloem cells, then in mesophyll cells, where they were close to the plasmalemma and perpendicular to the cell wall. In another article from the same group, Lawson and Hearon (1971) demonstrated that the inclusions associated with plasmodesmata (PDs). The association of cylindrical inclusions with PDs was also observed in wheat root cells newly infected with WSMV and *Wheat spindle streak mosaic virus* (Langenberg 1986, 1993), in newly emerged leaves of tobacco infected with *Tobacco vein mottling virus* (TVMV) (Rodríguez-Cerezo et al. 1997), and at the front of infection of *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV) in pea cotyledons (Roberts et al. 1998) (Fig. 2). In all cases, a close association of CI with CP was observed. In all those studies, at early stages of the infection (1 to 5 days), pinwheels were intact and close to the plasma membrane; no structures were observed in the cytoplasm. In SFMV-inoculated leaves, the PD-associated inclusions were detached partially from the plasmalemma and associated with the endoplasmic reticulum (ER) at 7 days after inoculation (dai) (Lawson et al. 1971). Pinwheels that were completely cytoplasmic began to disintegrate, forming loops and circles in the cytoplasm (Fig. 2). At 10 dai, some membrane-like aggregates appeared to result from the association of pinwheel septa becoming parallel with ER-derived vesicles. These structures were also observed by Weintraub and Ragetli (1970) in leaf cells of *Dianthus barbatus* infected with *Carnation vein mottle virus* and were associated with virus-like particles. The physical association between inclusions and virus particles was later further supported by co-purification of virus particles with CI protein (Gabrenaite-Verkhovskaya et al. 2008; Hiebert and McDonald 1973).

Recently, cylindrical inclusions have been described in phloem parenchyma and companion cells of tobacco and pepper plants infected with PVY, as well as in the xylem tracheary elements (Otulak and Garbaczewska 2012). Similarly to those previously observed in mesophyll cells, these inclusions were in close proximity to the plasmalemma, opposed to PD.

Thus far, although one would think that the aggregation of waste proteins would not require such highly arranged structures, no clear function has been assigned to the cylindrical inclusions other than a potential role in movement (discussed below). Furthermore, it was shown by electron microscopy and immunogold labeling that the CP and the P3 proteins of TVMV and the P1 protein of PVY are associated with cylindrical inclusions in infected tobacco leaves and protoplasts (Ammar et al. 1994; Arbatova et al. 1998; Rodríguez-Cerezo et al. 1993), suggesting a possible role of the cylindrical inclusions as a scaffold structure related to the virus replication.

CI protein: A major viral replication factor.

CI and replication factories. Proliferation of ER membranes in infected cells leading to the formation of viral factories was observed for several viruses, including potyviruses (den Boon and Ahlquist 2010; Schaad et al. 1997; Zechmann et al. 2003). For TuMV and TEV, it was shown that replication and translation of the viral genome could be coordinated into specialized cytoplasmic vesicles originating from the ER and induced by the viral membrane anchoring protein 6K2 or 6K2-VPg-Pro precursor (Beauchemin and Laliberté 2007; Cotton et al. 2009; Schaad et al. 1997). The biogenesis of the replication vesicles occurs at ER exit sites in a COPI- and COPII-dependent manner (Wei and Wang 2008), potentially stabilizing the vesicles. In *N. benthamiana* cells infected with TuMV:6K2-green fluorescent protein, 6K2 vesicles were observed to co-localize with chloroplasts and induce their invagination (Wei et al. 2010a). Viral RNA, double-stranded (ds)RNA, and viral replicase components were detected in these

chloroplast-bound 6K2 vesicles, suggesting a sequential recruitment of ER and chloroplasts for potyvirus replication. More recently, an integrative model was proposed by Grangeon and associates (2012), who described the formation during TuMV infection of a large perinuclear globular structure: an amalgamation of ER, Golgi bodies, COPII coatamers, chloroplasts, and viral replication complex components. ER and Golgi bodies in this globular structure remained connected to the host secretory pathway and 6K2 vesicles appeared to emerge from and be functionally linked to this structure, probably for intra- and intercellular movement purposes (Agbeci et al. 2013).

In 1990, Calder and Ingerfeld observed that pinwheel inclusions induced by PSbMV infection were in close proximity to the rough ER in pea-infected leaf cells. Moreover, they observed vesicles originating from pinwheel-associated ER: some were light and others were electron dense. Similar vesicles were observed in TuMV-infected cells (Grangeon et al. 2012). This led to the hypothesis that the CI protein of the inclusions might be associated with these vesicles, although this hypothesis has not received further experimental support. Analysis of the proteolytic processing of the *Potato virus A* (PVA) polyprotein performed by virus-encoded proteinases in insect cells showed that cleavage between CI and 6K2 was slow (Merits et al. 2002). Indeed, the unprocessed CI-6K2 intermediate was detected in infected leaves associated with the membrane fraction, while the fully processed CI protein was associated with the soluble fraction. Hence, the 6K2 fusion would provide membrane anchoring for CI loading in the vesicles. In fact, immunolocalization assays performed on *N.*

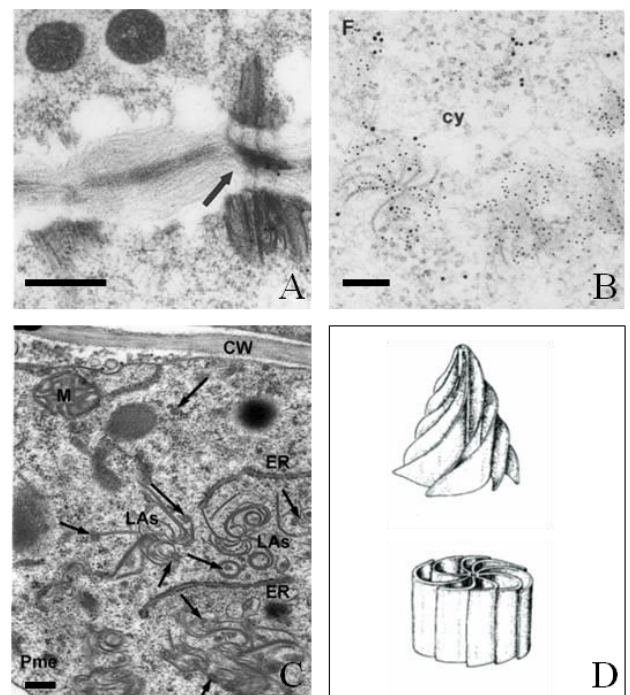


Fig. 2. Various morphologies of cylindrical inclusions (CI). **A**, Detection of PSbMV CI at both sides of the plasmodesmata connecting two pea cotyledon cells at the front of infection (from Roberts et al. 1998). Bar = 500 nm. The arrow indicates the presence of capsid protein in the plasmodesmata cavity. **B**, Immunodetection of CI proteins in pinwheels detached from the cell wall (from Rodríguez-Cerezo et al. 1997). Bar = 100 nm; cy = cytoplasm. **C**, Observation of pinwheels disintegrating, some of them being connected to endoplasmic reticulum (ER). Vesicles are detected in the vicinity of condensing inclusions (arrows) (from Otulak and Garbaczewska 2012). Bar = 1 μ m, CW = cell wall, LA = pinwheel inclusions, M = mitochondrion, Pme = Palisade Parenchyma. **D**, Three-dimensional schematic representation of conical and pinwheel inclusions (Astier et al. 2001).

benthamiana leaves infected with TuMV demonstrated that ER-derived vesicles were associated with CI and that all dsRNA punctates detected in these vesicles co-localized with the CI but not all CI co-localized with the dsRNA (Cotton et al. 2009). The vesicles contained other viral proteins associated with RNA synthesis (VPg, RNA-dependent RNA polymerase [RdRP] N1b) and RNA replication was demonstrated by BrdU staining (Cotton et al. 2009). Alternatively, CI protein expressed transiently in TuMV-infected cells was shown to accumulate as spike-like structures in proximity to these vesicles, in addition to structures penetrating the cell wall (Wei et al. 2010a). These observations suggested that, inside the vesicles, the CI could be involved in viral replication but exhibit another role in their vicinity. For example, interactions between the CI of the vesicles (replication complexes) and the CI of the cylindrical inclusions (transport engine) could facilitate the transport of the RNA-CP complex (or virions) through the PDs.

Furthermore, host factors involved in mRNA translation were detected in these vesicles, among them eIF(iso)4E, whose lettuce homolog eIF4E was demonstrated to interact with the C-terminal part of the LMV CI protein (Tavert-Roudet et al. 2012). In the case of TuMV infection, the presence of eIF(iso)4E in these vesicles suggests a role of this protein in RNA replication, and also a close physical relationship between translation and replication of the viral RNA (Beauchemin and Laliberté 2007). The authors hypothesize that 6K2-VPg-Pro, another polyprotein intermediate cleavage product, not only induces the formation of membrane vesicles that house replication complexes but also may be responsible for the coupling of viral RNA translation and replication through interaction with both eIF(iso)4E and viral RdRP within a single vesicle. An alternative hypothesis states that the interaction of CI with eIF4E which, in turn, interacts with eIF4G would facilitate intracellular movement of those vesicles via eIF4G association with microtubules (Wang and Krishnaswamy 2012). Indeed, it has been demonstrated that the TuMV-induced 6K2 vesicles are very motile and that an intact microfilament network and a functional secretory pathway are important for intracellular movement and the establishment of a productive infection (Agbeci et al. 2013; Cotton et al. 2009; Wei et al. 2010a). However, the involvement of microtubules in the vesicle movement is questioned by the results of Cotton and associates (2009), because they showed that drugs that disassemble microtubules did not significantly affect TuMV infection.

The presence of CI in the virus-induced vesicles was also supported by the fact that Y2H interactions have been demonstrated between the CI protein and host proteins originating from the ER and chloroplast (Bilgin et al. 2003; Jiménez et al. 2006). One study has shown that CI from TEV, as well as the P50 helicase of the tobamovirus *Tobacco mosaic virus* (TMV), interacts with the ER stress-related P58^{IPK} protein of *Arabidopsis thaliana* and *N. benthamiana*. In a second study, Jimenez and associates (2006) identified the chloroplastic photosystem I PSI-K subunit from *A. thaliana* and *N. benthamiana* as a protein that interacts with the CI protein from PPV and TVMV. Although the enhancement of chloroplast associated ATPase activity in maize plants infected by *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) (Chen et al. 1994) was probably the result of global physiological changes caused by the infection, the possibility that helicase activity of the CI protein in the chloroplast compartment contributed to the observed effect cannot be ruled out. In this regard, in the same study, ATPase activity was also observed at the end of the pinwheels arms, in the ER-derived vesicles, and throughout the PD.

Helicase activity. *Potyviridae* CI proteins possess highly conserved amino acids in their amino-terminal and central domains

(Fig. 3, amino acids 35 to 360) that are organized in 12 characteristic sequence motifs (Fairman-Williams et al. 2010; Gorbalenya and Koonin 1993) with great similarity to helicase proteins of the super family 2 (SF2) (Fairman-Williams et al. 2010; Kadaré and Haenni 1997; Laín et al. 1989). Interestingly, whereas *Potyviridae* spp. belong to the picorna-like cluster of RNA viruses, whose putative helicases belong to the SF3 group, their CI proteins are more similar to the viral helicases of the SF2 group in the family *Flaviviridae* (Laín et al. 1989).

An RNA helicase activity was first demonstrated for PPV CI purified from *N. clelandii*-infected leaves (Laín et al. 1990, 1991). The authors showed that the purified CI protein displayed a poly-A-stimulated ATPase activity involved in unwinding RNA in a 3' to 5' direction. Furthermore, a PPV CI/maltose-binding fusion protein synthesized in *Escherichia coli* retained NTPase and RNA helicase activities in vitro (Fernández et al. 1995). NTPase and RNA helicase activities of the CI protein of *Tamarillo mosaic virus* were also characterized (Eagles et al. 1994). One hypothesis stemming from these results is that CI protein, through its RNA helicase activity, plays a role in viral replication by unwinding RNA secondary structure or possibly recruiting viral RNA for replication and transfer to the translation machinery. Fernández and coworkers (1997) demonstrated that motif V of the PPV CI, which is involved in NTP hydrolysis and necessary for helicase activity, was essential for systemic viral infection and virus replication in protoplasts. Likewise, any mutation or insertion within the conserved helicase motifs of TVMV, PVA, or TEV abolished or drastically lowered virus replication, further underscoring the strong correlation between helicase activity and virus replication (Carrington et al. 1998; Kekarainen et al. 2002; Klein et al. 1994) (Fig. 3).

Reverse genetics experiments also uncovered permissive mutations or insertions all along the CI coding region that apparently do not disturb the structural arrangement of the protein. Some insertions in the C-terminal part of the CI protein of TVMV or TEV were deleterious for virus replication in tobacco plants, even though the removal of the C-terminal 103 amino acids (aa) of the protein from PPV CI did not affect its RNA helicase activity in vitro (Fernández et al. 1995). Thus far, no function has been assigned to the C-terminal region of the CI protein, although it is a prominent feature, extending beyond the conserved domains. Hence, the C-terminal part of the CI protein might be a regulatory module, necessary in the context of a plant infection; for example, by brokering interaction with other proteins involved in virus replication.

CI is required for virus movement within the plant.

CI inclusions flirting with plasmodesmata. As mentioned above, ultrastructural analyses revealed that cylindrical inclusions were localized in the vicinity of the plasmalemma at early times of infection. CI was associated with cone-shaped structures close to PD, together with CP and viral RNA (Calder and Ingerfeld 1990; Langenberg 1993; Lawson et al. 1971; Roberts et al. 1998; Rodríguez-Cerezo et al. 1997). In this regard, one could hypothesize that CI acts as a movement protein (MP) by increasing the size exclusion limit (SEL) of PD. Nevertheless, this was not supported by microinjection experiments performed by Rojas and associates (1997) with *Bean common mosaic necrosis virus* CI. One major advance in understanding the relevance of PD localization in the function of CI was made with the recent discovery of P3N-PIPO (Chung et al. 2008; Vijayapalani et al. 2012). This protein was shown to be localized at the PD and was able to promote its own movement between cells (Vijayapalani et al. 2012; Wei et al. 2010b). Anchoring of P3N-PIPO to PD was demonstrated to be dependent on its interaction with myristoylated plasma-membrane-associated cation-binding

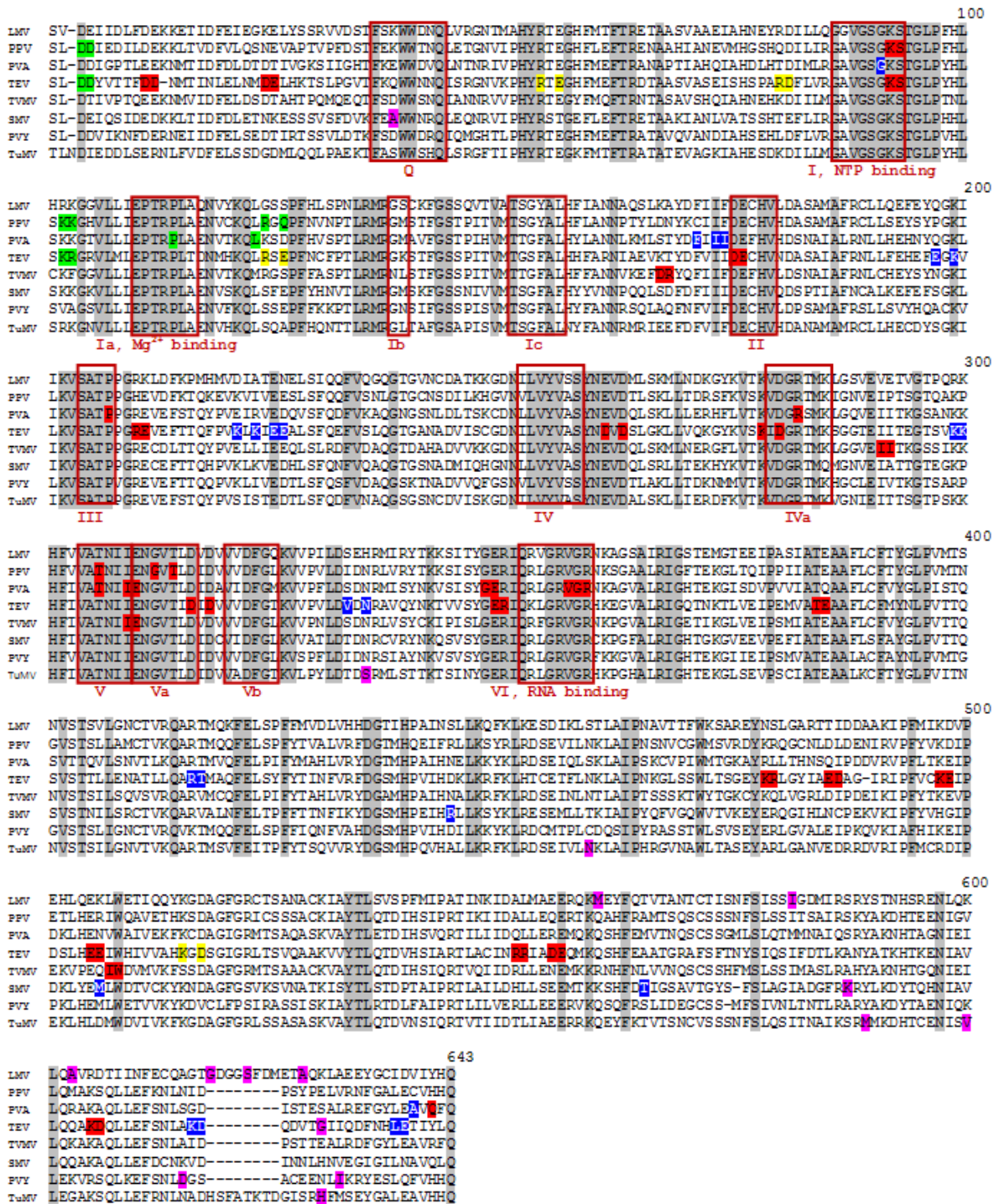


Fig. 3. Cylindrical inclusion (CI) protein sequence alignment of model potyviruses (numbering according to TuMV CI sequence). Conserved amino acids are colored in gray and helicase domains determined according to Fairman-Williams and associates (2010) are indicated in the red boxes. Amino acid positions whose mutation affects virus replication are highlighted in red, virus movement in green, both replication and movement in yellow, virulence against plant resistance in purple, and permissive amino acid positions whose mutation does not affect the viral cycle in blue. Data on LMV refer to Krause-Sakate and associates (2005), Abdul-Razzak, and associates (2009), and personal data (M. Sorel and L. Svanella, *unpublished*). Data on PPV refer to Fernández and associates (1997) and Gómez de Cedrón and associates (2006). Data on PVA refer to Kekkarainen and associates (2002). Data on TEV refer to Chu and associates (1997) and Carrington and associates (1994). Data on TVMV refer to Klein and associates (2009) and Seo and associates (2009). Data on PVY refers to Faurez and associates (2012). Data on TuMV refer to Jenner and associates (2000, 2002) and Fujiwara and associates (2011). Sequences were retrieved from GenBank: accession numbers 21492611 (PVA), 9629179 (TVMV), 9790340 (TEV), 9627728 (PVY), 9626508 (PPV), 20153339 (LMV), 56407093 (TuMV), and 12018225 (SMV).

protein 1 (PCaP1) (Vijayapalani et al. 2012). Furthermore, the PD localization of CI in *N. benthamiana* leaf cells was shown to be modulated by its interaction with P3N-PIPO (Wei et al. 2010b). Altogether, ultrastructural studies and subcellular localization data suggest that the potyvirus CI is involved in cell-to-cell movement, likely through the formation of conical structures anchored to and extending through PD. Furthermore, CI protein was also detected in the phloem of infected plants and in the companion cells in different studies (Lawson et al. 1971; Otulak and Garbaczewska 2012; YanHong et al. 2009), suggesting a potential role in long-distance movement of the virus.

Genetic evidence of the role of the CI protein in movement.

Alanine-scanning mutagenesis experiments performed on TEV CI (Carrington et al. 1998) together with point mutation analyses of PPV CI (Gómez de Cedrón et al. 2006) in the N-terminal 177-aa CI self-interaction domain (López et al. 2001), identified mutations that did not disturb viral replication but delayed or blocked cell-to-cell movement. The alanine replacement of Asp3 and Asp4 (DD3,4AA mutation) drastically impaired cell-to-cell spread of both TEV and PPV (Fig. 3). Mutations to alanines of Lys100, Arg 101 (KR100,101AA) and Lys 101, Lys 102 (KK101,102AA), respectively, for TEV and PPV affected cell-to-cell movement in a host-specific manner in the case of PPV. Both double mutations (DD3,4AA and KK101,102AA) significantly reduced the self-interaction strength of PPV CI in the Y2H system. Furthermore, the defect in cell-to-cell movement of TEV with CI mutations DD3,4AA or KK101,102AA was linked to the absence of PD-associated structures in the presence of P3N-PIPO, even though P3N-PIPO-CI interaction still occurred (Wei et al. 2010b). These results argue that CI structures are necessary for cell-to-cell movement of the virus. Nevertheless, the PPV CI self-interaction evident in planta by BiFC (Zilian and Maiss 2011) occurred in small aggregates located close to the plasma membrane, possibly in PD, even in the absence of a P3N-PIPO partner.

In addition to the cell-to-cell movement-defective mutants with amino acid changes in the N-terminus of CI, Carrington and associates (1998) designed TEV mutants with substitutions in the C-terminal part of the protein (EE502,503AA, KD512,513AA, and KD602,603AA) (Fig. 3). These mutants proved to be able to establish multicellular infection foci by functional cell-to-cell movement despite a low replication level for two of them. However, long-distance movement seemed to be impaired, because no systemic infection was detected. This suggests an involvement of the CI protein in the long-distance movement of the virus. Thus, it is of interest to investigate the possible role of CI in phloem loading and unloading, and to assess whether the functionally unknown C-terminal part of the protein participates in this presumed function. It would also be of interest to map the interaction domain of CI with P3N-PIPO and to determine whether long-distance movement is dependent on this interaction as well.

All these data point toward an essential role of CI in the virus movement as a part of a multiprotein "movement complex".

Cell-to-cell movement complex for potyvirus infection. The cone-shaped structures formed by CI and anchored at PD early in the infection by P3N-PIPO-CI interaction were also shown to contain CP and viral RNA (Roberts et al. 1998; Rodríguez-Cerezo et al. 1997; Wei et al. 2010b). Furthermore, different studies revealed interactions between CI and CP proteins (Langenberg 1991; Zilian and Maiss 2011), and the CI protein was shown to be associated with entire virus particles for PVA, PVY, and TEV (Gabrenaitė-Verkhovskaya et al. 2008; Langenberg and Purcifull 1989). BiFC evidence even located the PPV CI-CP interaction in aggregates in close proximity to the plasma membrane. The CI of PVA was demonstrated to interact with HC-Pro as well. Unlike

the CI, CP, HC-Pro, and P3N-PIPO are able to increase the SEL of PD to promote their own cell-to-cell movement (Rojas et al. 1997; Vijayapalani et al. 2012). Therewith, genetic evidence shows that the P3N-PIPO and CP are essential for virus cell-to-cell movement (Wen and Hajimorad 2010; Dolja et al. 1994, 1995) while evidence exists for the involvement in this process of the HC-Pro protein, which could as well be able to move autonomously from cell to cell and long distance in order to fulfill its silencing suppression function (Kasschau and Carrington 2001).

In light of these experimental data, one can conceive a model in which CI self-interacts to form pinwheel inclusions anchored to the PD via CI-P3N-PIPO interaction. This self-interaction seems to be dependent on the N-terminal part of the CI whose mutations abolish the cell-to-cell movement. Those cone-shaped CI structures cross the PD, making a tunnel to facilitate the movement of the virus. Their interaction with CP and the viral RNA could help the recruiting and concentration of viral movement forms in the PD, analogously to a funnel. Recent data on TuMV infection demonstrated that intracellular movement of the 6K2 vesicles was necessary for cell-to-cell movement of the virus and that both early and late secretory pathways were required for TuMV intercellular movement (Agbeci et al. 2013). The authors hypothesize that the secretory pathway would be required for sorting membrane-associated viral RNA protein complexes to PDs. Hence, the targeting of the virus to PD might be operated via vesicle recruitment to PD by interaction between spike-like CI associated with vesicles and pinwheel CI associated with PDs.

This suggests either docking of these vesicles at PD for unloading of the virion or viral RNA-CP complex to the adjacent cell, or movement of the vesicles themselves from cell to cell.

The movement of 6K2 vesicles has been described to occur from cytoplasm toward viral factory and back to the cytoplasm (Grangeon et al. 2012), suggesting a recycling of the vesicles. This could explain the existence of two types of vesicles observed in infected cells: electron-dense and electron-translucent vesicles (Calder and Ingerfeld 1990; Grangeon et al. 2012), corresponding to vesicles targeted to PD or back to the perinuclear structure. If vesicles are recycled back to the viral factory, cell-to-cell movement of the virus would need their unloading at the PD vicinity. Most of the positive-sense RNA viruses induce replication vesicles, emerging from different host cell compartments. These vesicles are interconnected and, in most of the cases, are linked to the cytoplasm by neck-like opening allowing the export of the viral RNA (den Boon and Ahlquist 2010). No such opening has been observed to date in 6K2 vesicles, implying that the hypothetical export would be driven by protein transport. These proteins would be associated with the vesicle membrane by transmembrane domains or amphipathic helices, as detected in the N-terminal region of 2C protein of picornaviruses.

Therewith, the transfer through PD might be an active process, utilizing the energy of ATPase activity of CI. In fact, ATPase activity was demonstrated in PD of maize infected by MDMV (Chen et al. 1994), demonstrating that the CI helicase domain could be active even in PD. Consequently, one can hypothesize that the CI RNA helicase, beside replication, could be involved as a chaperone or maturase that facilitates a correct RNA folding or be involved in the rearrangement of RNA-protein interactions, as suggested by Schwer (2001) and Linder (2004), to form functional viral movement ribonucleic acid-protein complexes (RNPs). Our knowledge here is limited by the inability to uncouple replication and movement in order to study the virus cell-to-cell movement in the absence of helicase activity. On the other hand, in contrast to the enhancement in translatability of virus particles of the potexvi-

rus *Potato virus X* by interaction of the MP with RNA helicase activity TGBp1 (Atabekov et al. 2000), the attachment of CI to PVA virions appears to reinforce particle integrity and to reduce the translation efficiency (Gabrenaite-Verkhovskaya et al. 2008). Thus, it is suggested that detachment of CI from particles after transport through the PD may be required to initiate a new infection.

Although the replication and movement functions of the CI protein are discussed separately in the present review, these two processes could act in a coordinated way. Indeed, Tilsner and Oparka (2012) recently proposed a model for coupling of movement and replication of viruses. Their review gathers multiple examples of viral MPs associated with vesicle replication complexes (VRCs) and shows how this localization is correlated with viral cell-to-cell movement. In the case of potyviruses, the CI protein is the top candidate for this link between replication and movement: the inclusions could provide an ordered structure for anchoring the VRC and targeting it to PD.

CI and host resistance.

Plant viruses are difficult to combat and the use of cultivars that are genetically resistant to viruses has become a critical factor for sustainable agriculture (Elena et al. 2011). Resistance to viruses can be determined by defensive reactions of the plant in response to the recognition of molecular patterns common to different pathogens as dsRNA, which induces antiviral RNA silencing; defense mediated by dominant resistance (*R*) genes that are elicited by specific factors of the virus; and by the absence or lack of functionality of host factors required for the viral infection, which are governed by recessive resistance genes (Pallas and García 2011). Unfortunately, the use of resistance genes for crop protection suffers from the emergence of adapted resistance-breaking virus populations, as a consequence of the ability of the virus to evolve, favored by the selective pressure.

R-gene-mediated recognition of virus elicitors is accompanied by hypersensitive response (HR) or extreme resistance (ExR). In the first case, HR is characterized by the appearance of macroscopic necrotic lesions at the site of inoculation (local lesions) whereas, in ExR, plants remain symptomless and virus accumulation is undetectable even in the inoculated leaf. Sometimes, the virus can escape the HR in the inoculated leaf and move to the upper leaves, where the systemic hypersensitive response takes place, which can be lethal, leading to the death of the plant. The *R* genes involved in these reactions code for products that interact directly or indirectly with corresponding viral elements that are known as avirulence (Avr) factors (Dangl et al. 2013; Flor 1971). Any protein of the infecting virus can be the particular Avr specifically recognized by the *R* gene (Culver 1997). In many cases, it has been possible to map the precise amino acids in viral proteins that determine the recognition, and mutations in these residues allow the virus to recover virulence. Similarly, in the cases of recessive resistance derived from the inability of the resistant plant to provide a functional element required for the infection process, the virus can be adapted by mutations in a viral factor that facilitates a productive interaction with the defective host factor or even the escape from its requirement. The potyvirus CI protein was shown to be involved in the elicitation of defensive responses mediated by *R* genes and in presumed interactions with host factors determining recessive resistance. Mutations in the CI coding region were shown to allow potyviruses to break both kinds of resistance in several plant-potyvirus pathosystems. Moreover, CI has been shown to be an important determinant of the symptoms caused by potyviruses in productive infections.

CI: a resistance-eliciting and resistance-breaking determinant. The Avr determinant may be multifaceted for some resistance traits, as illustrated by the thoroughly studied pathosystem involving *Soybean mosaic virus* (SMV) and soybean, where three distinct *R* genes (*Rsv1*, *Rsv3*, and *Rsv4*) conferring dominant resistance to different strains of SMV were reported (Hayes et al. 2004; ShagaiMaroof et al. 2010; Suh et al. 2011). Several studies suggest that different disease responses on soybean cultivars result from interactions among these three *R* genes and viral pathogenic determinants. The molecular determinants in SMV for *Rsv*-resistance breaking have been characterized to various extents (Chowda-Reddy et al. 2011; Hajimorad et al. 2008; Khatabi et al. 2012; Seo et al. 2009, 2011; Wen et al. 2013; Zhang et al. 2009). In particular, determinants for virulence on *Rsv3* were mapped to the CI protein (Seo et al. 2009; Zhang et al. 2009). By using chimeras between avirulent and virulent SMV isolates, the authors demonstrated that both the N-terminal and C-terminal parts of CI are required for *Rsv3*-mediated resistance breaking (Seo et al. 2009; Zhang et al. 2009) and revealed the key role played by amino acids heterogeneities D/A37 and R/K589 of CI for gain or loss of elicitor function (Fig. 3). In addition, Chowda-Reddy and coworkers (2011) intended to demonstrate the possible interactions between viral Avr factors involved in the three *Rsv* resistances. The authors showed that appropriate CI sequences are required for gain of virulence on *Rsv1* and *Rsv3* genotype soybean, although P3 also played an essential role in virulence determination on these two resistance loci as well as on *Rsv4*-conferred resistance. This study, consequently, emphasizes the importance of the genetic background of the virus in the over-coming process and its complexity in the case of pyramided resistances.

CI was also shown to be an Avr factor for several other potyviruses. Another case of P3-CI co-involvement in virulence in resistant plants was evidenced for the TuMV-*Brassica napus* pathosystem (Jenner 2002), with a particular P3 sequence enabling the virus to overpass the *TuRB04*-mediated ExR, epistatic to the *TuRB05*-mediated HR, which could be overcome by TuMV carrying an M589T mutation in the CI C-terminal region (Fig. 3). Another *B. napus* resistance against TuMV, conferred by *TuRB01*, is overcome by mutations in the CI protein at positions 335 (S to N) and 630 (H to R) (Fig. 3) (Jenner et al. 2000), as well as the resistance conferred by the gene *Rnt1* in *B. rapa*, which is overcome by the V600E mutation in the CI C-terminal region (Fujiwara et al. 2011). Despite the fact that they share a common virulence determinant, the *TuRB05* *R* gene is considered to be different from *TuRB01* based on the resistance phenotype. In fact *TuRB01* triggers ExR while *TuRB05* triggers HR, and TuMV variants able to infect *TuRB05*-resistant plants do not infect *TuRB01* plants. On the other hand, *TuRB01* and *Rnt1* loci are mapped on the same chromosomal region and the authors do not conclude whether they are different alleles of the same gene or two different but closely located *R* genes.

Whereas dominant *R* genes are the most usual source of resistance against bacteria and fungi, recessive resistance is frequently found for plant viruses (Truniger and Aranda 2009). Since the molecular cloning of the first recessive resistance gene against a plant potyvirus 10 years ago (Nicaise et al. 2003; Ruffel et al. 2002), all studies aiming at the characterization of recessive resistance from a range of plant species have, thus far, only identified genes coding for translation initiation factors eIF4E, eIF4G, and their isoforms (Truniger and Aranda 2009; Wang and Krishnaswamy 2012).

Although the majority of eIF4E-resistance breakdowns have been associated with mutations in the central region of VPg (Charron et al. 2008; Moury et al. 2004; Yeam et al. 2007), amino

acid changes in two other potyviral proteins were recently described to be involved in the breakdown of eIF4E-mediated resistances: the CI and P1 proteins in the lettuce-LMV (Abdul-Razzak et al. 2009) and pea-*Clover yellow vein virus* (Nakahara et al. 2010) pathosystems, respectively. In particular, site-directed mutagenesis in LMV CI pinpointed a key role of a threonine at position 621 in the virulence (Abdul-Razzak et al. 2009). Interactions between VPg and HC-Pro of LMV and between LMV VPg and lettuce eIF4E were demonstrated in vitro (German-Retana et al. 2008; Roudet-Tavert et al. 2007). Recently, both the central domain of LMV VPg and the C-terminal domain of LMV CI (amino acids 372 to 643) were shown to be involved in binding to lettuce eIF4E in vitro and in planta (Tavert-Roudet et al. 2012). HC-Pro of another potyvirus, PVA, was also recently demonstrated to be an interaction partner of eIF4E (Ala-Poikela et al. 2011), suggesting that the step of viral infection in which eIF4E is involved could also be either facilitated or regulated by HC-Pro (and host proteins interacting with it).

Therefore, the C terminus of LMV CI could be involved in a complex network of viral and cellular protein interactions, involving (in addition to the CI protein) VPg, eIF4E, and, possibly, HC-Pro and the translation initiation factor eIF4G, shown to be required for LMV infection in *A. thaliana* (Nicaise et al. 2007). Such interactions should be crucial for eIF4E recruitment and could play important roles in different processes in the viral infection. The VPg of potyviruses is expected to contribute to both genome replication (Puustinen and Mäkinen 2004) and translation (Eskelin et al. 2011), which are mutually exclusive processes. In this context, mutually exclusive interactions of VPg with CI or cellular eIF4E might conceivably be associated with replication and translation, respectively. In such a scenario, eIF4E-mediated resistance would be hypothesized to interfere with replication or translation either by a defect on VPg-eIF4E interactions (overcome by mutations in VPg) or by interference of CI in this interaction (overcome either by VPg or CI mutations); because mutations in P1 can also suppress eIF4E-based resistance, P1 would be expected to be involved in any of these interactions. In an alternative scenario, P1, HC-Pro, CI, VPg, eIF4E, and eIF4G could be forming a large multicomponent complex, whose structure would not be necessarily static and that probably would be nucleated by VPg and involved in viral replication. As explained above, there is abundant evidence of a close relationship between replication complexes and viral movement (Tilsner and Oparka 2012); thus, it is not surprising that eIF4E-based resistance could act at the level of virus cell-to-cell movement as well, as has also been postulated for some pea and lettuce resistance genes (Gao et al. 2004; German-Retana et al. 2003). In particular, in lettuce, the *mo1²* allele at the *Ls-eIF4E* locus restricts the intercellular movement of the avirulent isolate LMV-0 and affects its loading and unloading from the phloem (German-Retana et al. 2003). Therefore, the eIF4E-LMV CI interaction could contribute somehow to the cell-to-cell and long-distance movement process. More effort, however, is still needed to understand this network and the underlying function or functions that are associated with the viral and host protein interactions involved.

In any case, as shown above, the C-terminal part of the CI protein carries virulence determinants toward numerous plant resistances for different potyviruses. Interestingly, this region, unlike to the central helicase domain, shows high sequence variability among *Potyvirus* spp. This variability could be interpreted as the CI C-terminal region being involved in specific interactions with host factors and adaptation to new hosts.

Moreover, it has been observed that exchanging the CI cistron of a PVY isolate by another one could confer to the resulting chimera an enhanced capacity to evolve toward breaking of eIF4E-mediated resistance (Montarry et al. 2011; E. Redondo, *personal communication*). The mechanistic basis of this enhancement is unknown but it does not involve an increase in the global mutation rate of the virus (Montarry et al. 2011).

CI: a viral pathogenesis determinant. CI protein was shown to be a symptom determinant in *B. rapa* carrying the *Rntl* locus, determining the ability of TuMV to cause leaf malformation, necrosis, or mild mosaic, depending on the *Rntl* allele and the TuMV isolate (Fujiwara et al. 2011). In parallel, an S/N heterogeneity at position 7 of SMV CI was shown to be involved in symptom determinism in susceptible soybean cultivars (Zhang et al. 2009). The TEV CI-6K2 region is involved in wilting symptoms induced on Tabasco pepper, pointing out the possible role of G619 of the C-terminal part of the CI, and the additional involvement of the P3 protein (Chu et al. 1997). Indeed, replacing both the P3-C-terminus (PIPO sequence not included) and CI C-terminus 6K2-VPg N-terminus fragments from a wilting TEV isolate with the corresponding fragments of a mosaic TEV isolate abolishes the wilting response. Similarly, a necrotic response of lettuce to the LMV-AF199 isolate was shown to depend on P1 N-terminus and CI C-terminus sequences (Krause-Sakate et al. 2005). It was hypothesized that RNA sequence rather than protein was involved, because transient expression of each protein alone or in combination did not trigger necrosis. Involvement of each region alone could not be tested because chimeras exchanging only the P1 N-terminus or CI C-terminus sequences between LMV-E and AF-199 were not infectious. Comparable results were obtained when studying PVY symptom determinants in tobacco plants (Faurez and Baldwin 2012). In fact, two regions of the PVY genome, independent from HC-Pro, were able to induce necrotic symptoms: CI C-terminus-VPg N-terminus (R1) and VPg C-terminus-Nlpro N-terminus (R3), while the in-between region (R2) VPg-central had no effect. Both R1 and R3 regions had to originate from a non-necrotic isolate to prevent necrosis from occurring. However, clones exchanging both R1 and R2 regions were not infectious. These findings emphasize the possible role of CI in symptom determinism and also the fact that chimeric viruses exchanging parts of viral proteins may not be infectious. In addition, chimeric viruses with foreign CI sequences can cause new types of symptoms, different from those caused by the parental viruses. This is the case of some LMV chimeras which provoke vein curving on susceptible lettuce (Redondo et al. 2001).

Bilgin and coworkers (2003) demonstrated that the helicase domains of TEV CI as well as the TMV P50 helicase were able to interact with the P58^{IPK} protein from *N. benthamiana* and *A. thaliana* in a Y2H system and in planta. This factor proved to facilitate virus infection, because loss of P58^{IPK} in silenced or knockout plants led to reduced viral accumulation. Furthermore, viral infection of P58^{IPK}-silenced *N. benthamiana* and knockout *Arabidopsis* led to host death. In animal cells, the P58^{IPK} ortholog is an ER factor involved in the attenuation of the unfolded protein response upon ER stress and as a cellular inhibitor of the host defense that interferes with virus-induced apoptosis and inflammation to improve host survival, allowing further virus accumulation (Goodman et al. 2009). In plants, P58^{IPK} could endorse a similar role, because P58^{IPK}-defective mutants were more sensitive to virus-induced cell death. No data are available about the way P58^{IPK} is activated upon viral infection but one can hypothesize that the interaction with the viral helicase, which carries ATPase activity, could induce structural changes that activate P58^{IPK}. The interaction of CI with P58^{IPK} would then int-

erfere with the ability of the plant to induce stress-associated necrosis, facili- tating viral infection.

In contrast, downregulation of the *psaK* gene, which codes for the PSI-K protein, leads to higher PPV accumulation, and the interaction of PPV CI with PSI-K induces the degradation of this chloroplastic protein (Jiménez et al. 2006). These results prompted the suggestion that PSI-K is involved in a host defensive response and CI contributes to counteract this defense. These possible connections of CI with host defensive pathways might be related to the involvement of CI in symptom determinism. In fact, the interaction of CI with P58^{IPK} might be involved in the attenuation of the plant symptoms by inhibiting the plant defenses, while the inhibition of the host defenses by degradation of PSI-K upon CI interaction would interfere with the photosynthetic system and induce symptoms such as mosaic.

CONCLUSION

Taken together, data from this review, including genetic, biochemical, cellular, and ultrastructural studies, highly suggest that the CI protein of the family *Potyviridae* is involved in a large network of interactions with viral and cellular proteins. Therefore, the CI protein can be envisioned as a multifunctional scaffolding protein involved in crucial steps of the viral infection (replication, translation, and movement of the virus) and in elicitation and overcoming of plant defenses. Furthermore, many of the CI

functions, or consequences of them, are probably transient, and the different subcellular localizations of the CI protein that have been observed (PD-connected and cytosolic pinwheels, ER- and chloroplast-associated mem- brane vesicles, and so on) could be the consequence of this pluri-functionality. Here, we propose a preliminary working model to integrate the fate of the CI protein during viral infection (Fig. 4).

In newly infected cells, the CI protein detaches from the vi- rion to allow decapsidation and viral RNA translation in the cytoplasm of infected cells. A pool of CI is incorporated into pinwheel-shaped inclusions and associated with the PDs through interactions with P3N-PIPO. These structures allow recruitment of RNP or virions to PD and movement to the adjacent cell via interaction with CP and viral RNA. Simultaneously, a pool of CI proteins is recruited to the 6K2-induced vesicles, thanks to intermediate cleavage form 6K2-CI. The expression of 6K2 protein induces a disorganization of the early secretory pathway, giving birth to a large globular perinuclear structure amalgamating ER, Golgi, COPI, and COPII coatomers and chloroplasts, probably by inhibition of the protein secretion. This structure, considered as a "viral factory", is the place of extensive genome translation and replication. In this viral factory, the CI could play a role in switching from translation to replication in a model where VPg-eIF4E and VPg-CI interactions

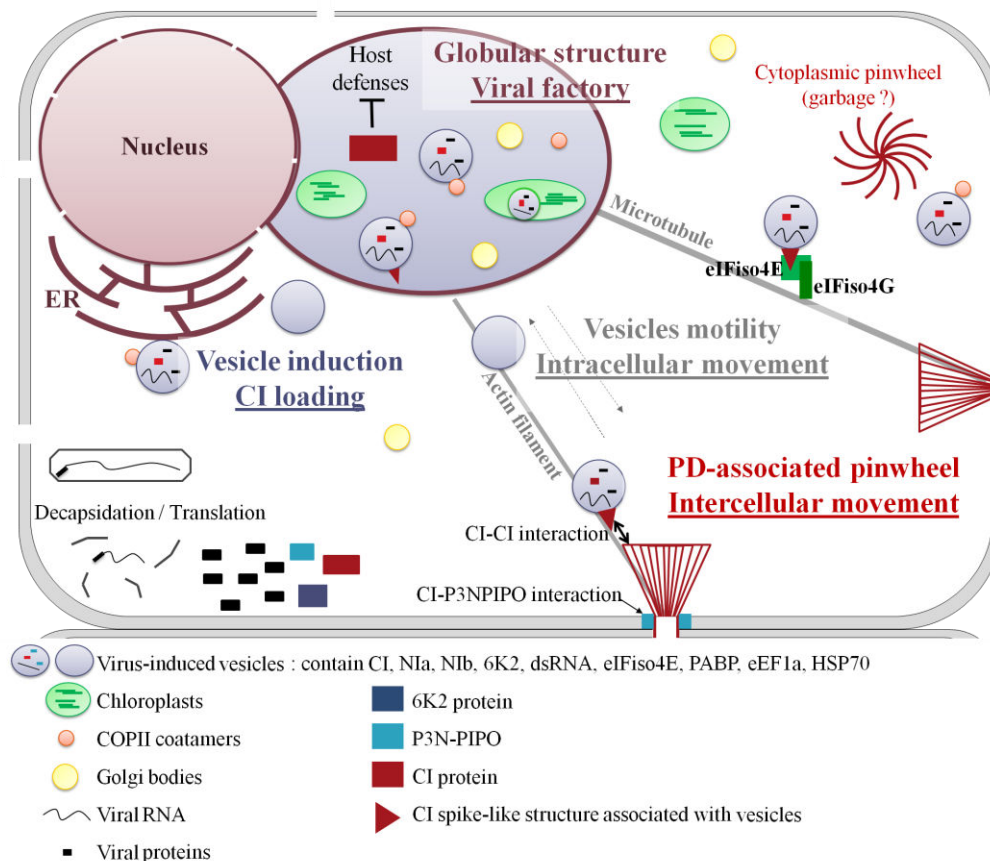


Fig. 4. Integrative model of the different functions of cylindrical inclusion (CI) in the potyviral cycle. The CI is loaded into the 6K2-induced vesicles via its fusion with 6K2. Those vesicles are part of a large perinuclear globular structure where the CI is involved in viral translation and replication, as well as inhibition of host defenses by interactions with host partners (P58^{IPK}, PSI-K). Another pool of CI proteins is recruited to the plasmodesmata (PD) by interaction with P3N-PIPO, where it assembles into pinwheel structures facilitating viral intercellular movement to adjacent cells. The 6K2 vesicles associated with CI spike-like structures are proposed to target the viral content to the PD for further movement. This targeting is operated either via actin filament through CI-CI interaction between spike-like structures and pinwheels or via the microtubules interacting with the CI-eIF(iso)4E-eIF(iso)4G complex. Later in infection, pinwheels retreat in the cytoplasm, probably as a garbage form.

are mutually exclusive. Alternatively, the CI helicase could act as a maturase and facilitate the switch between translation and replication by RNA-protein interaction rearrangement.

In addition to replication and translation, the CI would interfere with the host defense machinery by its interactions with the host ER P58^{IPK} protein, probably influencing symptom determinism in the plant. Similarly, the CI is likely to interact with PSI-K protein within the abnormal amoeboid-shaped chloroplasts observed by Wei and associates (2010a), whose extrusions encircle vesicles. This invagination is thought to be the preferential organelle for robust virus replication. Hence, in chloroplasts, the CI protein might participate to the RNA replication via its helicase activity but also contribute to the host defense neutralization by degradation of PSI-K. This CI-PSI-K interaction is also likely to induce symptoms such as mosaic by disorganization of the host photosystem.

The perinuclear viral factory is connected to the host secretory pathway, and 6K2 vesicles emerge from it and move intracellularly following transvacuolar actin strands. These vesicles containing viral RNA could provide a protective environment for virion assembly. When the vesicles reach the PD-associated pinwheels, interaction between the CI spike-like structures at the surface of the 6K2 vesicles and the pinwheel CI provides docking of the vesicles and movement to the adjacent cell. This would occur either by direct transfer of the vesicles or by unloading of the vesicle content through the PD, powered by the energy provided by ATPase activity of the CI protein. "Empty" vesicles are then recycled back to the viral factory by actin-dependent intracellular movement. At later times of infection, when further transport is not required, the pinwheels are detached from the membrane and become garbage in the cytoplasm. An alternative hypothesis states that the interaction of CI with eIF4E which, in turn, interacts with eIF4G would facilitate intracellular movement of those vesicles or a viral movement complex via eIF4G association with microtubules. As previously mentioned, this model is a working base, gathering information collected on different pathosystems. It is of importance to assess whether the perinuclear globular structure described in TuMV-infected cells is a common feature of *Potyviridae* infection or specific to this species and to the precise possible compartmentalization of replication and translation within this structure. In the future, correlative microscopy should be a useful tool to localize proteins or protein complexes in subcellular compartments, opening the way to new findings.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank A. G. Abbott for his help with the English in the manuscript.

LITERATURE CITED

- Abdul-Razzak, A., Guiraud, T., Peypelut, M., Walter, J., Houvenaghel, M.-C., Candresse, T., Le Gall, O., and German-Retana, S. 2009. Involvement of the cylindrical inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against Lettuce mosaic potyvirus. *Mol. Plant Pathol.* 10:109-113.
- Adams, M. J., Antoniw, J. F., and Fauquet, C. M. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. *Arch. Virol.* 150:459-479.
- Adams, M. J., King, A. M., Lefkowitz, E., and Carstens, E. B. 2011. Part II: The viruses—family *Potyviridae*. Pages 1069-1090 in: *Virus Taxonomy—Ninth Rep. Int. Committee on Taxonomy of Viruses*, Elsevier, San Diego, CA, U.S.A.
- Agbeci, M., Grangeon, R., Nelson, R. S., Zheng, H., and Laliberté, J.-F. 2013. Contribution of host intracellular transport machineries to intercellular movement of *Turnip mosaic virus*. *PLoS Pathog.* 9:e1003683. Published online.
- Ala-Poikela, M., Goytia, E., Haikonen, T., Rajamäki, M.-L., and Valkonen, J. P. T. 2011. Helper component proteinase of the genus *Potyvirus* is an interaction partner of translation initiation factors eIF(iso)4E and eIF4E and contains a 4E binding motif. *J. Virol.* 85:6784-6794.
- Ammar, E., Rodriguez-Cerezo, E., Shaw, J., and Pirone, T. 1994. Association of virions and coat protein of tobacco vein mottling potyvirus with cylindrical inclusions in tobacco cells. *Phytopathology* 84:520-524.
- Arbatova, J., Lehto, K., Pehu, E., and Pehu, T. 1998. Localization of the P1 protein of potato Y potyvirus in association with cytoplasmic inclusion bodies and in the cytoplasm of infected cells. *J. Gen. Virol.* 79:2319-2323.
- Astier S., Albouy J., Maury Y., Robaglia C., and Lecoq H. 2001. *Principes de virologie végétale*. Page 444 in: *Génome, Pouvoir Pathogène, Écologie des Virus*. INRA Éditions, Paris.
- Atabekov, J. G., Rodionova, N. P., Karpova, O. V., Kozlovsky, S. V., and Poljakov, V. Y. 2000. The movement protein-triggered in situ conversion of *Potato virus X* virion RNA from a nontranslatable into a translatable form. *Virology* 271:259-263.
- Beauchemin, C., and 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. *J. Virol.* 81:10905-10913.
- Bilgin, D. D., Liu, Y., Schiff, M., and Dinesh-Kumar, S. P. 2003. P58^{IPK}, a plant ortholog of double-stranded RNA-dependent protein kinase pkr inhibitor, functions in viral pathogenesis. *Dev. Cell* 4:651-661.
- Calder, V. L., and Ingerfeld, M. 1990. The roles of the cylindrical inclusion protein of a potyvirus in the induction of vesicles and in cell-to-cell spread. *J. Struct. Biol.* 105:62-66.
- Carrington, J. C., Jensen, P. E., and Schaad, M. C. 1998. Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *Plant J.* 14:393-400.
- Charron, C., Nicolai, M., Gallois, J.-L., Robaglia, C., Moury, B., Palloix, A., and Caranta, C. 2008. Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *Plant J.* 54:56-68.
- Chen, S., Das, P., and Hari, V. 1994. In situ localization of ATPase activity in cells of plants infected by maize dwarf mosaic potyvirus. *Arch. Virol.* 134:433-439.
- Choi, I.-R., Stenger, D. C., and French, R. 2000. Multiple interactions among proteins encoded by the mite-transmitted wheat streak mosaic tritrovirus. *Virology* 267:185-198.
- Chowda-Reddy, R. V., Sun, H., Hill, J. H., Poysa, V., and Wang, A. 2011. Simultaneous mutations in multi-viral proteins are required for *Soybean mosaic virus* to gain virulence on soybean genotypes carrying different R genes. *PLoS One* 6:e28342. Published online.
- Chu, M., Lopez-Moya, J. J., Llave-Correas, C., and Pirone, T. P. 1997. Two separate regions in the genome of the tobacco etch virus contain determinants of the wilting response of tabasco pepper. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10:472-480.
- Chung, B. Y.-W., Miller, W. A., Atkins, J. F., and Firth, A. E. 2008. An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105:5897-5902.
- Cotton, S., Grangeon, R., Thivierge, K., Mathieu, I., Ide, C., Wei, T., Wang, A., and Laliberté, J.-F. 2009. *Turnip mosaic virus* RNA replication complex vesicles are mobile, align with microfilaments, and are each derived from a single viral genome. *J. Virol.* 83:10460-10471.
- Culver, J. N. 1997. Viral avirulence genes. Pages 196-219 in: *Plant-Microbe Interactions 2 SE-6*. G. Stacey and N. Keen, eds. Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- Dangl, J., Horvath, D., and Staskawicz, B. 2013. Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* 341:746-751.
- David-Ferreira, J., and Borges, M. 1958. Virus na célula vegetal obseracoes ao microscopio electrónico I-Virus Y da batateira. *Bol. Soc. Broteriana* 32:329-332.
- den Boon, J. A., and Ahlquist, P. 2010. Organelle-like membrane compartmentalization of positive-strand RNA virus replication factories. *Annu. Rev. Microbiol.* 64:241-256.
- Dolja, V. V., Haldeman, R., Robertson, N. L., Dougherty, W. G., and Carrington, J. C. 1994. Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 13:1482-1491.
- Dolja, V. V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A. E., Vandenbosch, K. A., and Carrington, J. C. 1995. Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology* 206:1007-1016.
- Dougherty, W. G., and Hiebert, E. 1980. Translation of potyvirus RNA in a rabbit reticulocyte lysate: Identification of nuclear inclusion proteins as products of tobacco etch virus RNA translation and cylindrical inclusion protein as a product of the potyvirus genome. *Virology* 104:174-182.

- Eagles, R. M., Balmori-Melián, E., Beck, D. L., Gardner, R. C., and Forster, R. L. 1994. Characterization of NTPase, RNA-binding and RNA-helicase activities of the cytoplasmic inclusion protein of tamarillo mosaic potyvirus. *Eur. J. Biochem.* 224:677-684.
- Edwardson, J., Christie, R., and Ko, N. 1984. Potyvirus cylindrical inclusions—subdivision IV. *Phytopathology* 74:1111-1114.
- Edwardson, J. R. 1966. Cylindrical inclusions in the cytoplasm of leaf cells infected with tobacco etch virus. *Science* 153:883-884.
- Edwardson, J. R. 1974. Some Properties of the Potato Virus Y Group. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, Gainesville, FL, U.S.A.
- Edwardson, J. R. 1992. Inclusion bodies. Pages 25-30 in: *Potyvirus Taxonomy SE-3*. O. Barnett, Jr., ed. Springer, Vienna.
- Edwardson, J. R., and Christie, R. G. 1978. Use of virus-induced inclusions in classification and diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 16:31-55.
- Elena, S. F., Bedhomme, S., Carrasco, P., Cuevas, J. M., de la Iglesia, F., Lafforgue, G., Lalić, J., Prósper, A., Tromas, N., and Zwart, M. P. 2011. The evolutionary genetics of emerging plant RNA viruses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24:287-293.
- Eskelin, K., Hafrén, A., Rantalainen, K. I., and Mäkinen, K. 2011. Potyviral VPg enhances viral RNA translation and inhibits reporter mRNA translation in planta. *J. Virol.* 85:9210-9221. Fairman-Williams, M. E., Guenther, U., and Jankowsky, E. 2010. SF1 and SF2 helicases: Family matters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20:313-324.
- Faurez, F., and Baldwin, T. 2012. Identification of new *Potato virus Y* (PVY) molecular determinants for the induction of vein necrosis in tobacco. *Mol. Plant Pathol.* 13:948-959.
- Fernández, A., Laín, S., and García, J. A. 1995. RNA helicase activity of the plum pox potyvirus CI protein expressed in *Escherichia coli*. Mapping of an RNA binding domain. *Nucleic Acids Res.* 23:1327-1332.
- Fernández, A., Guo, H. S., Sáenz, P., Simón-Buela, L., Gómez de Cedrón, M., and García, J. A. 1997. The motif V of plum pox potyvirus CI RNA helicase is involved in NTP hydrolysis and is essential for virus RNA replication. *Nucleic Acids Res.* 25:4474-4480.
- Flor, H. H. 1971. Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9:275-296.
- Fujiwara, A., Inukai, T., Kim, B. M., and Masuta, C. 2011. Combinations of a host resistance gene and the CI gene of *Turnip mosaic virus* differentially regulate symptom expression in *Brassica rapa* cultivars. *Arch. Virol.* 156:1575-1581.
- Gabrenaitė-Verkhovskaya, R., Andreev, I. A., Kalinina, N. O., Torrance, L., Taliansky, M. E., and Mäkinen, K. 2008. Cylindrical inclusion protein of *Potato virus A* is associated with a subpopulation of particles isolated from infected plants. *J. Gen. Virol.* 89:829-838.
- Gao, Z., Eyers, S., Thomas, C., Ellis, N., and Maule, A. 2004. Identification of markers tightly linked to sbm recessive genes for resistance to *Pea seed-borne mosaic virus*. *Theor. Appl. Genet.* 109:488-494.
- German-Retana, S., Redondo, E., Tavert-Roudet, G., Le Gall, O., and Candresse, T. 2003. Introduction of a Nla proteinase cleavage site between the reporter gene and HC-Pro only partially restores the biological properties of GUS- or GFP-tagged LMV. *Virus Res.* 98:151-162.
- German-Retana, S., Walter, J., Doublet, B., Roudet-Tavert, G., Nicaise, V., Lecampion, C., Houvenaghel, M. C., Robaglia, C., Michon, T., and Le Gall, O. 2008. Mutational analysis of plant cap-binding protein eIF4E reveals key amino acids involved in biochemical functions and potyvirus infection. *J. Virol.* 82:7601-7612.
- Goldbach, R., Wellink, J., Verver, J., Kammen, A., Kasteel, D., and Lent, J. 1994. Adaptation of positive-strand RNA viruses to plants. *Arch. Virol.* (Suppl.) 9:87-97.
- Gómez de Cedrón, M., Osaba, L., López, L., and García, J. A. 2006. Genetic analysis of the function of the *Plum pox virus* CI RNA helicase in virus movement. *Virus Res.* 116:136-145.
- Goodman, A. G., Fornek, J. L., Medigeshi, G. R., Perrone, L. A., Peng, X., Dyer, M. D., Proll, S. C., Knoblauch, S. E., Carter, V. S., Korth, M. J., Nelson, J. A., Tumpey, T. M., and Katze, M. G. 2009. P58(IPK): A novel "CIHD" member of the host innate defense response against pathogenic virus infection. *PLoS Pathog.* 5:e1000438. Published online.
- Gorbalenya, E., and Koonin, E. V. 1993. Helicases: Amino acid sequence comparisons relationships and of Med. *Curr.* 3:419-429.
- Grangeon, R., Agbeci, M., Chen, J., Grondin, G., Zheng, H., and Laliberté, J.-F. 2012. Impact on the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus of *Turnip mosaic virus* infection. *J. Virol.* 86:9255-9265.
- Graybosch, R., Hellmann, G. M., Shaw, J. G., Rhoads, R. E., and Hunt, A. G. 1989. Expression of a potyvirus non-structural protein in transgenic tobacco. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160:425-432.
- Hajimorad, M. R., Eggenberger, A. L., and Hill, J. H. 2008. Adaptation of *Soybean mosaic virus* avirulent chimeras containing P3 sequences from virulent strains to Rsv1-genotype soybeans is mediated by mutations in HC-Pro. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21:937-946.
- Hayes, A., Jeong, S., Gore, M., and Yu, Y. 2004. Recombination within a nucleotide-binding-site/leucine-rich-repeat gene cluster produces new variants conditioning resistance to *Soybean mosaic virus* in soybeans. *Genetics* 166:493-503.
- Hiebert, E., and McDonald, J. G. 1973. Characterization of some proteins associated with viruses in the potato Y group. *Virology* 56:349-361.
- Hiebert, E., Purcifull, D. E., Christie, R. G., and Christie, S. R. 1971. Partial purification of inclusions induced by tobacco etch virus and potato virus Y. *Virology* 43:638-646.
- Jenner, C. 2002. Mutations in *Turnip mosaic virus* P3 and cylindrical inclusion proteins are separately required to overcome two *Brassica napus* resistance genes. *Virology* 300:50-59.
- Jenner, C. E., Sánchez, F., Nettleship, S. B., Foster, G. D., Ponz, F., and Walsh, J. A. 2000. The cylindrical inclusion gene of *Turnip mosaic virus* encodes a pathogenic determinant to the Brassica resistance gene TuRB01. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13:1102-1108.
- Jiménez, I., López, L., Alamillo, J. M., Valli, A., and García, J. A. 2006. Identification of a *Plum pox virus* CI-interacting protein from chloroplast that has a negative effect in virus infection. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19:350-358.
- Kadaré, G., and Haenni, A. 1997. Virus-encoded RNA helicases. *J. Virol.* 71:2583-2590.
- Kasschau, K. D., and Carrington, J. C. 2001. Long-distance movement and replication maintenance functions correlate with silencing suppression activity of potyviral HC-Pro. *Virology* 285:71-81.
- Kekarainen, T., Savilahti, H., and Valkonen, J. P. T. 2002. Functional genomics on *Potato virus A*: Virus genome-wide map of sites essential for virus propagation. *Genome Res.* 12:584-594.
- Khatabi, B., Fajolu, O., Wen, R.-H., and Hajimorad, M. R. 2012. of North American isolates of *Soybean mosaic virus* for gain of virulence on Rsv-genotype soybeans with special emphasis on resistance-breaking determinants on. *Mol. Plant Pathol.* 13:1077-1088.
- Klein, P., Klein, R., and Rodriguez-Cerezo, E. 1994. Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. *Virology* 204:759-769.
- Krause-Sakate, R., Redondo, E., Richard-Forget, F., Jado, A. S., Houvenaghel, M.-C., German-Retana, S., Pavan, M. A., Candresse, T., Zerbini, F. M., and Le Gall, O. 2005. Molecular mapping of the viral determinants of systemic wilting induced by a *Lettuce mosaic virus* (LMV) isolate in some lettuce cultivars. *Virus Res.* 109:175-180.
- Laín, S., Riechmann, J., Martín, M. T., and García, J. A. 1989. Homologous potyvirus and flavivirus proteins belonging to a superfamily of helicase-like proteins. *Gene.* 82:357-362.
- Laín, S., Riechmann, J. L., and García, J. A. 1990. RNA helicase: A novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic Acids Res.* 18:7003-7006.
- Laín, S., Martín, M. T., Riechmann, J. L., and García, J. A. 1991. Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection: Nucleic acid-stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicase-like protein. *J. Virol.* 65:1-6.
- Langenberg, W. G. 1986. Virus protein association with cylindrical inclusions of two viruses that infect wheat. *J. Gen. Virol.* 67:1161-1168.
- Langenberg, W. G. 1991. Cylindrical inclusion bodies of wheat streak mosaic virus and three other potyviruses only self-assemble in mixed infections. *J. Gen. Virol.* 72:493-497.
- Langenberg, W. G. 1993. Structural proteins of three viruses in the potyviridae adhere only to their homologous cylindrical inclusions in mixed infections. *J. Struct. Biol.* 110:188-195.
- Langenberg, W. G., and Purcifull, D. E. 1989. Interactions between pepper ringspot virus and cylindrical inclusions of two potyviruses. *J. Ultra-struct. Mol. Struct. Res.* 102:53-58.
- Lawson, R. H., and Hearon, S. S. 1971. The association of pinwheel inclusions with plasmodesmata. *Virology* 44:454-456.
- Lawson, R. H., Hearon, S. S., and Smith, F. F. 1971. Development of pinwheel inclusions associated with sweet potato russet crack virus. *Virology* 46:453-463.
- Linder, P. 2004. Molecular biology. The life of RNA with proteins. *Science* 304:694-695.
- López, L., Urzainqui, A., Domínguez, E., and García, J. A. 2001. Identification of an N-terminal domain of the plum pox potyvirus CI RNA helicase involved in self-interaction in a yeast two-hybrid system. *J. Gen. Virol.* 82:677-686.
- Maiti, I. B., Murphy, J. F., Shaw, J. G., and Hunt, A. G. 1993. Plants that express a potyvirus proteinase gene are resistant to virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6110-6114.
- Merits, A., Rajamäki, M.-L., Lindholm, P., Runeberg-Roos, P., Kekarainen, T., Puustinen, P., Mäkeläinen, K., Valkonen, J. P. T., and Saarma, M. 2002. Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells. *J. Gen. Virol.* 83:1211-1221.
- Montarry, J., Doumayrou, J., Simon, V., and Moury, B. 2011. Genetic background matters: A plant-virus gene-for-gene interaction is strongly influenced by genetic contexts. *Mol. Plant Pathol.* 12:911-920.

- Moury, B., Morel, C., Johansen, E., Guilbaud, L., Souche, S., Ayme, V., Caranta, C., Palloix, A., and Jacquemond, M. 2004. Mutations in *Potato virus Y* genome-linked protein determine virulence toward recessive resistances in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 17:322-329.
- Nakahara, K. S., Shimada, R., Choi, S.-H., Yamamoto, H., Shao, J., and Uyeda, I. 2010. Involvement of the P1 cistron in overcoming eIF4E-mediated recessive resistance against *Clover yellow vein virus* in pea. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23:1460-1469.
- Nicaise, V., German-Retana, S., Sanjua, R., Dubrana, M., Mazier, M., Maisonneuve, B., Candresse, T., Caranta, C., and Legall, O. 2003. The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the potyvirus *Lettuce mosaic virus*. *Plant Physiol.* 132:1272-1282.
- Nicaise, V., Gallois, J.-L., Chafiai, F., Allen, L. M., Schurdi-Levraud, V., Browning, K. S., Candresse, T., Caranta, C., Le Gall, O., and German-Retana, S. 2007. Coordinated and selective recruitment of eIF4E and eIF4G factors for potyvirus infection in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.) Lett.* 581:1041-1046.
- Otulak, K., and Garbaczewska, G. 2012. Cytopathological *Potato virus Y* structures during solanaceous plants infection. *Micron* 43:839-850.
- Pallas, V., and García, J. A. 2011. How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *J. Gen. Virol.* 92:2691-2705.
- Purcifull, D. E., Hiebert, E., and McDonald, J. G. 1973. Immunochemical specificity of cytoplasmic inclusions induced by viruses in the potato Y group. *Virology* 55:275-279.
- Puustinen, P., and Mäkinen, K. 2004. Uridylation of the potyvirus VPg by viral replicase N1b correlates with the nucleotide binding capacity of VPg. *J. Biol. Chem.* 279:38103-38110.
- Redondo, E., Krause-Sakate, R., Yang, S.-J., Lot, H., Le Gall, O., and Candresse, T. 2001. *Lettuce mosaic virus* pathogenicity determinants in susceptible and tolerant lettuce cultivars map to different regions of the viral genome. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:804-810.
- Roberts, I. M., Wang, D., Findlay, K., and Maule, A. J. 1998. Ultrastructural and temporal observations of the potyvirus cylindrical inclusions (CIs) show that the CI protein acts transiently in aiding virus movement. *Virology* 245:173-181.
- Rodríguez-Cerezo, E., Ammar, E. D., Pirone, T. P., and Shaw, J. G. 1993. Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *J. Gen. Virol.* 74:1945-1949.
- Rodríguez-Cerezo, E., Findlay, K., Shaw, J. G., Lomonosoff, G. P., Qiu, S. G., Linstead, P., Shanks, M., and Risco, C. 1997. The coat and cylindrical inclusion proteins of a potyvirus are associated with connections between plant cells. *Virology* 236:296-306.
- Rojas, M. R., Zerbini, F. M., Allison, R. F., Gilbertson, R. L., and Lucas, W. J. 1997. Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. *Virology* 237:283-295.
- Roudet-Tavert, G., Michon, T., Walter, J., Delaunay, T., Redondo, E., and Le Gall, O. 2007. Central domain of a potyvirus VPg is involved in the interaction with the host translation initiation factor eIF4E and the viral protein HC-Pro. *J. Gen. Virol.* 88:1029-1033.
- Ruffel, S., Dussault, M.-H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C., and Caranta, C. 2002. A natural recessive resistance gene against *Potato virus Y* in pepper corresponds to the eukaryotic translation factor 4E (eIF4E). *Plant J.* 32:1067-1075.
- Schaad, M. C., Jensen, P. E., and Carrington, J. C. 1997. Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: Role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO (Eur. Mol. Biol. Organ.) J.* 16:4049-4059.
- Scholthof, K. G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C., and Foster, G. D. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 12:938-954.
- Schwer, B. 2001. A new twist on RNA helicases: DEXH/D box proteins as RNAPases. *Nat. Struct. Biol.* 8:113-116.
- Seo, J.-K., Lee, S.-H., and Kim, K.-H. 2009. Strain-specific cylindrical inclusion protein of *Soybean mosaic virus* elicits extreme resistance and a lethal systemic hypersensitive response in two resistant soybean cultivars. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22:1151-1159.
- Seo, J.-K., Sohn, S.-H., and Kim, K.-H. 2011. A single amino acid change in HC-Pro of *Soybean mosaic virus* alters symptom expression in a soybean cultivar carrying Rsv1 and Rsv3. *Arch. Virol.* 156:135-141.
- ShagaiMaroof, M. A., Tucker, D. M., Skoneczka, J. A., Bowman, B. C., Tripathy, S., and Tolin, S. A. 2010. Fine mapping and candidate gene discovery of the *Soybean mosaic virus* resistance gene, Rsv4. *Plant Genome J.* 3:14.
- Shand, K., Theodoropoulos, C., Stenzel, D., Dale, J. L., and Harrison, M. D. 2009. Expression of *Potato virus Y* cytoplasmic inclusion protein in tobacco results in disorganization of parenchyma cells, distortion of epidermal cells, and induces mitochondrial and chloroplast abnormalities, formation of membrane whorls and atypical lipid a. *Micron* 40:730-736.
- Suh, S. J., Bowman, B. C., Jeong, N., Yang, K., Kastl, C., Tolin, S. A., Maroof, M. A. S., and Jeong, S.-C. 2011. The Rsv3 locus conferring resistance to *Soybean mosaic virus* is associated with a cluster of coiled-coil nucleotide-binding leucine-rich repeat genes. *Plant Genome J.* 4:55.
- Tavert-Roudet, G., Abdul-Razzak, A., Doublet, B., Walter, J., Delaunay, T., German-Retana, S., Michon, T., Le Gall, O., and Candresse, T. 2012. The C terminus of lettuce mosaic potyvirus cylindrical inclusion helix-case interacts with the viral VPg and with lettuce translation eukaryotic initiation factor 4E. *J. Gen. Virol.* 93:184-193.
- Tilsner, J., and Oparka, K. J. 2012. Missing links? The connection between replication and movement of plant RNA viruses. *Curr. Opin. Virol.* 2:705-711.
- Truniger, V., and Aranda, M. A. 2009. Recessive Resistance to Plant Viruses. Pages 119-159 in: *Advances in Virus Research*, Vol. 75. Elsevier, Amsterdam.
- Urcuqui-Inchima, S., Haenni, A.-L., and Bernardi, F. 2001. Potyvirus proteins: A wealth of functions. *Virus Res.* 74:157-175.
- Vijayapalani, P., Maeshima, M., Nagasaki-Takekuchi, N., and Miller, W. A. 2012. Interaction of the trans-frame potyvirus protein P3N-PIPO with host protein PCaP1 facilitates potyvirus movement. *PLoS Pathog.* 8:e1002639. Published online.
- Wang, A., and Krishnaswamy, S. 2012. Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. *Mol. Plant Pathol.* 13:1-9.
- Wei, T., and Wang, A. 2008. Biogenesis of cytoplasmic membranous vesicles for plant potyvirus replication occurs at endoplasmic reticulum exit sites in a COPI- and COPII-dependent manner. *J. Virol.* 82:12252-12264.
- Wei, T., Huang, T.-S., McNeil, J., Laliberté, J.-F., Hong, J., Nelson, R. S., and Wang, A. 2010a. Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant potyvirus replication. *J. Virol.* 84:799-809.
- Wei, T., Zhang, C., Hong, J., Xiong, R., Kasschau, K. D., Zhou, X., Carrington, J. C., and Wang, A. 2010b. Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathog.* 6:e1000962. Published online.
- Weintraub, M., and Ragetli, H. W. J. 1970. Distribution of viruslike particles in leaf cells of *Dianthus barbatus* infected with carnation vein mottle virus. *Virology* 40:868-881.
- Wen, R.-H., and Hajimorad, M. R. 2010. Mutational analysis of the putative pipo of *Soybean mosaic virus* suggests disruption of PIPO protein impedes movement. *Virology* 400:1-7.
- Wen, R.-H., Khatabi, B., Ashfield, T., Saghai Maroof, M. A., and Hajimorad, M. R. 2013. The HC-Pro and P3 cistrons of an avirulent *Soybean mosaic virus* are recognized by different resistance genes at the complex Rsv1 locus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26:203-215.
- Wittner, A., Palkovics, L., and Balázs, E. 1998. *Nicotiana benthamiana* plants transformed with the plum pox virus helicase gene are resistant to virus infection. *Virus Res.* 53:97-103.
- YanHong, Q., DongMei, L., Tao, Z., and ZaiFeng, F. 2009. Immunolocalization of the CI protein of *Sugarcane mosaic virus* in the phloem cells of maize. *Acta Phytophyloc. Sin.* 36:234-238.
- Yeam, I., Cavatorta, J. R., Ripoll, D. R., Kang, B.-C., and Jahn, M. M. 2007. Functional dissection of naturally occurring amino acid substitutions in eIF4E that confers recessive potyvirus resistance in plants. *Plant Cell* 19:2913-2928.
- Zechmann, B., Müller, M., and Zellnig, G. 2003. Cytological modifications in *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV)-infected Styrian pumpkin plants. *Arch. Virol.* 148:1119-1133.
- Zhang, C., Hajimorad, M. R., Eggenberger, A. L., Tsang, S., Whitham, S. A., and Hill, J. H. 2009. Cytoplasmic inclusion cistron of *Soybean mosaic virus* serves as a virulence determinant on Rsv3-genotype soybean and a symptom determinant. *Virology* 391:240-248.
- Zilian, E., and Maiss, E. 2011. Detection of plum pox potyviral protein-protein interactions in planta using an optimized mRFP-based bimolecular fluorescence complementation system. *J. Gen. Virol.* 92:2711-2723.

AUTHOR-RECOMMENDED INTERNET RESOURCE

International Committee on Taxonomy of Viruses website: ictvonline.org/virusTaxonomy.asp

Pathosystème LMV/Laitue : notre modèle d'étude

Le LMV appartient au genre des *Potyvirus*. Ce pathogène de la laitue est également capable d'infecter des laitues sauvages et des plantes ornementales tout comme les plantes modèles *A. thaliana* et *N. benthamiana* (Figure 4). Il peut causer sur laitue des symptômes allant de la simple mosaïque vers une nécrose de la plante. Il fut décrit pour la première fois sur laitue cultivée en 1921 en Floride et s'est propagé depuis sur tout le globe. Le contrôle de ce pathogène repose sur la mise en place de programmes de certification des graines mais aussi et surtout, sur l'utilisation de cultivars de laitue résistants (German-Retana et al., 2008b).

Les deux sources de résistance récessive au LMV connues correspondent aux allèles mutés $mo1^1$ et $mo1^2$ du gène *mo1* codant pour le facteur d'initiation de la traduction eIF4E, l'allèle de sensibilité étant noté $mo1^0$. Les mutations sont situées dans deux régions conservées à la surface de la protéine eIF4E, certainement impliquées dans l'interaction avec un (des) facteur(s) viral(aux) (Figure 5, Nicaise et al., 2003).

Comme énoncé plus tôt, des études réalisées dans différents pathosystèmes plante /potyvirus impliquant les espèces cultivées de pois, tomate, piment et laitue, ont révélé que la VPg (Viral Protein genome-linked, qui interagit avec l'extrémité 5' de l'ARN viral) est systématiquement impliquée dans le contournement de la résistance conférée par les facteurs d'initiation de la traduction (Truninger et Aranda, 2009). Dans le cas du piment, il a été démontré par Charon *et al.* (2008) que la capacité de la VPg du PVY à interagir en double-hybride avec le facteur eIF4E codé par le gène *pvr2*, est directement corrélée à la capacité de l'isolat correspondant à infecter la plante.

Cependant, ce modèle binaire ne s'applique pas à la résistance conférée par *eIF4E* chez la laitue vis-à-vis du LMV puisque des études d'interaction *in-vitro* menées au laboratoire ont montré que la VPg du LMV-0 interagit avec eIF4E de laitue, quel que soit sa forme allélique (Roudet-Tavert *et al.*, 2012). De plus, la VPg n'est pas le seul facteur viral du LMV impliqué dans le contournement de la résistance associée à eIF4E de laitue. Il a en effet été démontré que la région clé du contournement comprend à la fois le gène codant pour la VPg mais aussi la partie C-terminale du gène codant pour l'hélicase virale CI (Cylindrical Inclusion) (Redondo *et al.*, 2001, Abdul Razzak *et al.*, 2009). Ainsi, Abdul-Razzak *et al.* (2009) ont montré que la région codant pour la portion C-terminale de la CI et la protéine 6K2, suffit pour le contournement des deux allèles de résistance $mo1^1$ et $mo1^2$, tandis que la VPg ne permet le contournement que de $mo1^1$. Un mutant ponctuel dans la CI (LMV-0-S621T, sérine substituée par une thréonine) dérivé d'un isolat de LMV non virulent (LMV-0), devient capable de contourner la résistance conférée par $mo1^2$ et, partiellement, celle conférée par $mo1^1$, alors que le

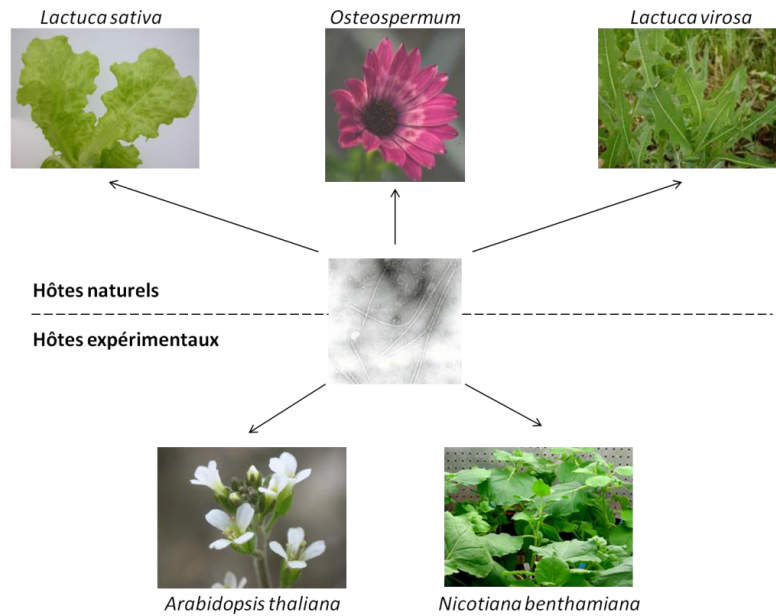


Figure 3 : Exemples de plantes hôtes du LMV

L'infection par le LMV de laitues et d'*Osteospermum* résulte en l'apparition de symptômes sur feuilles et fleurs. Des symptômes peuvent également être observés sur la plante modèle *Nicotiana benthamiana* (selon l'isolat de LMV considéré) et le LMV infecte plusieurs écotypes d'*Arabidopsis thaliana* sans cependant induire de symptômes.

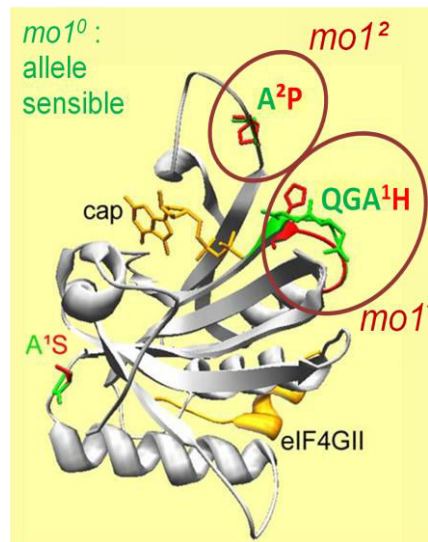


Figure 4 : Modélisation de la structure tridimensionnelle d'eIF4E de laitue et des formes mutantes impliquées dans la résistance au LMV

Figure extraite de Nicaise et al. (2003). Les mutations caractérisant les allèles de résistance sont représentées en rouge sur la figure. L'analogue de la coiffe est représenté en orange. Le domaine d'interaction d'eIF4G avec eIF4E est représenté en jaune. Les deux cercles indiquent les domaines d'eIF4E impliqués dans la résistance aux potyvirus et en particulier au LMV. La structure a été prédite en se basant sur la structure 3D d'eIF4E de souris et en utilisant le logiciel Swiss-PdbViewer.

mutant réciproque (LMV-E-T621S) dérivé d'un isolat de LMV virulent (LMV-E), perd sa capacité à contourner les deux allèles de résistance.

Cette découverte ouvre une nouvelle voie dans la compréhension des résistances associées aux facteurs d'initiation de la traduction, dont les mécanismes restent encore non élucidés depuis leur découverte il y a plus de 10 ans. C'est pourquoi lors de cette thèse je me suis intéressée au rôle de la CI dans le contournement des résistances *mo1* chez la laitue, dans le but d'en apprendre d'avantage sur les mécanismes sous-jacents aux résistances « 4E » mais également sur les stratégies de contre-attaque des potyvirus. En effet, décrypter les mécanismes de la résistance (côté plante) et de son contournement (côté virus) permettra de proposer de nouvelles approches pour réduire l'impact des populations virales dans le cadre d'une gestion durable de la résistance

Contexte scientifique de la thèse

Des études de la variabilité naturelle du LMV ont été menées au laboratoire par le groupe d'étiologie, portant sur une collection de virus d'origine géographiques variées, isolés de laitues sauvages, laitues cultivées et de plantes ornementales telles qu'*Osteospermum*. Ces études ont révélé la capacité d'isolats de LMV d'origine sauvage ou ornementale à évoluer vers le contournement des résistances *mo1*¹ et *mo1*² chez la laitue cultivée. L'analyse de la séquence nucléotidique de la région CI-VPg de ces virus a révélé l'apparition d'une ou plusieurs des 2 mutations au sein de la protéine CI : A602V (alanine substituée par une valine) et A627T (alanine substituée par une thréonine) au sein des isolats évolués. De plus, tous les isolats capables d'évoluer vers la virulence possédaient en position 617 une sérine, une thréonine ou une asparagine, au lieu d'une glycine pour les isolats issus de laitue cultivée.

Ces travaux viennent alimenter les travaux publiés par notre équipe (Abdul-razzak et al., 2009) qui démontrent, par l'étude de virus chimériques entre le LMV-0 avirulent et le LMV-E virulent, que la région CI-Cter du LMV est porteuse de déterminants de contournement vis-à-vis des deux résistances *mo1* alors que la VPg n'entraîne que le contournement de *mo1*¹. Ces travaux ont été poussés jusqu'à l'identification par alignement de séquences de deux positions en acides aminés potentiellement associées au contournement : les acides aminés 602 et 621 de la CI. Les études de mutagenèse inverse menées à cette occasion ont démontré que la mutation S621T est suffisante pour permettre au LMV-0 de contourner les résistances *mo1*, de même que la combinaison A602V-S621T, alors que la simple mutation A602V n'a aucun effet sur le phénotype de contournement du LMV-0.

Il est alors troublant de constater que l'acide aminé V602 est à nouveau identifié grâce aux études d'évolution forcée menées par L. Svanella, ce qui semblerait indiquer que cet acide aminé puisse faire partie d'une combinaison de mutations nécessaires au contournement, à l'inverse de S621T qui est suffisante au contournement. Ainsi l'effet de la mutation A602V serait dépendante du fond génétique du virus, au sein de la CI ou en dehors.

Le but de cette thèse est donc de comprendre le rôle de ces mutations, qu'elles soient directement associées au contournement des résistances *mo1* ou qu'elles facilitent l'évolution du virus vers le contournement ou sa stabilisation au sein de la plante. Cette étude vise par ce biais à caractériser le mécanisme de résistance faisant intervenir eIF4E.

Le chapitre 1 de ce mémoire s'inscrit dans la démarche d'élucidation du rôle de ces mutations dans la CI, par une approche de génétique inverse associée à l'étude de la diversité naturelle du LMV menée par L. Svanella. Ces travaux ont fait l'objet d'un article qui sera soumis à la revue *Journal of Virology* dans le courant du mois de mars 2014. Les chapitres 2 et 3 concernent un questionnement plus mécanistique visant à comprendre l'articulation de la CI, de la VPg et d'eIF4E dans le pathosystème LMV/Laitue et la place que peut y tenir la protéine P3N-PIPO nouvellement découverte. En particulier, dans le Chapitre 2 nous avons tenté de déterminer si l'implication de la CI dans le mouvement de cellule à cellule et dans le contournement des résistances *mo1* sont liées. Dans le Chapitre 3, nous nous sommes interrogés sur les possibles interférences existant entre le contournement conféré par la VPg et celui conféré par la CI-Cter.

Chapitre 1

Caractérisation biologique des mutations candidates de la région C-terminale de la CI identifiées après analyse de la diversité naturelle du LMV

Identification des mutations

Key Mutations in the Cylindrical Inclusion are involved in *Lettuce mosaic virus* adaptation to eIF4E-mediated resistance in lettuce

Résultats complémentaires

Identification de quatre positions en acides aminés potentiellement impliquées dans le contournement des résistances *mo1* chez la laitue

Comme énoncé plus tôt, quatre mutations en acide aminés dans la CI ont été identifiées comme participant au contournement des résistances *mo1* par le LMV. L'apparition de deux d'entre elles, 602V et 627T, au sein d'isolats LMV non-laitue est directement corrélée à l'acquisition de la virulence sur laitue résistante, alors que les deux autres, 617S et 621T, ont été identifiées par alignement de séquence du LMV-0 avec le LMV-E et les isolats non-laitue avant acquisition de la virulence.

Une étude préalable réalisée par Anas Abdul-razzak (2009) a permis de démontrer que la mutation S621T introduite dans un clone LMV-0 confère à elle seule la capacité au virus d'infecter des laitues résistantes *mo1*¹ et *mo1*². Cependant, nous n'avions alors aucune donnée concernant l'effet des trois autres mutations identifiées, ni de leurs possibles effets combinés. En effet, il semblerait que le virus privilégie une accumulation de ces mutations, à en croire par les séquences obtenues à partir des CI d'isolats Most, contournants et transmis par la graine, qui possèdent la combinaison 602V-617S/N-621T/I.

C'est pourquoi nous avons entrepris des expériences de génétique inverse, visant à étudier le comportement biologique de clones de LMV-0 dans lequel ces différentes mutations ont été introduites seules ou en combinaison. Ces résultats ont été mis en perspective avec le polymorphisme existant à ces positions dans la diversité naturelle du LMV afin de détecter de possibles pressions de sélection imposées et de retracer l'histoire évolutive du LMV.

Ces résultats sont présentés conjointement aux expériences d'évolution vers la virulence d'isolats non-laitue réalisées par L. Svanella, au sein de l'article suivant dont la soumission au Journal of Virology est prévue pour le mois de mars 2014.

Key Mutations in the Cylindrical Inclusion are involved in *Lettuce mosaic virus* adaptation to eIF4E-mediated resistance in lettuce

M. Sorel^{1,2*}, L. Svanella-Dumas^{1,2*}, T. Candresse^{1,2}, G. Acelin^{1,2}, A. Pitarch^{1,2}, M.C. Houvenaghel^{1,2} and S. German-Retana^{1,2#}

Authors' affiliation:

¹ : INRA, UMR BFP 1332, Equipe de Virologie, CS 20032, 33882 Villenave d'Ornon, France.

² : Université de Bordeaux, UMR BFP 1332, Equipe de Virologie, CS 20032, 33882 Villenave d'Ornon, France.

*: these authors contributed equally to this work

: corresponding author : german@bordeaux.inra.fr

New affiliation of GA: Université de Bordeaux, UMR 5248, F-33600 Pessac, France

Acknowledgment : We thank E. Hébrard, B. Moury and O. LeGall for their scientific advices about this work, A. Poque and T. Mauduit for plant growing and R. Krause-Sakate for help with sampling.

Abstract :

To date, the identified sources of resistance to potyviruses involve components of the eukaryotic translation initiation complex. In particular, allelic genes *mo1*¹ and *mo1*² used to protect lettuce crops against *Lettuce mosaic potyvirus* (LMV) have been shown to correspond to mutant alleles of the gene encoding eIF4E. LMV resistance-breaking determinants map not only to the main potyvirus virulence determinant, the VPg, but also to the C-terminal region of the CI (Cylindrical Inclusion) helicase, with a key role of amino acid position 621. Here, we show that the propagation of several non-lettuce isolates of LMV in *mo1*¹ plants is accompanied by a gain of virulence correlated with the presence in the CI C-terminus of a serine at position 617 and the accumulation of mutations at positions 602 and/or 627. Whole genome sequencing of native and evolved isolates showed that no other mutation could be associated with adaptation to *mo1* resistance. Site-directed mutagenesis in a LMV-0 (avirulent) background pinpointed the key role in the virulence of the combination of mutations at positions 602 and 617, besides the previously identified position 621. However, resistance-breakdown was partial, with different infection rates according to the mutation(s) introduced and the *mo1* allele. The impact of these mutations on the fitness of the virus was evaluated, suggesting that the durability of *mo1* resistance in the field relies on both the fitness cost associated with the resistance-breaking mutations, the nature of the mutations and their potential antagonistic effects.

Importance

A major breakthrough about plant resistance to viruses was the identification of *eIF4E* as a major component of plant resistance to potyviruses, and of the VPg as the main viral resistance-breaking determinant. Here, we explored the complexity of the lettuce-LMV pathosystem, where two viral *eIF4E* resistance-breaking determinants, the VPg, and the CI have been identified. We show that non-lettuce isolates (from weeds and ornamental plants) can adapt to *eIF4E*-mediated resistance in lettuce, by acquiring mutations in the CI-Cterminal region and we validate by reverse genetics the role of these mutations in *eIF4E* resistance-breaking. Furthermore, through the analysis of the fitness cost associated to those mutations, the nature of the mutations, and the molecular diversity of natural LMV isolates, we propose a hypothesis to explain why an *eIF4E*-resistance that can be overcome by mutations in either the VPg or the CI is nevertheless durable in the field.

Introduction

The genus *Potyvirus* is considered as one of the largest among plant viruses, causing considerable economic damages in various crops (Adams et al 2011). Potyviruses have non-enveloped flexuous filamentous particles, encapsidating a positive single-stranded RNA, covalently linked at its 5' end to a genome-linked viral protein (VPg) and polyadenylated at its 3' end. This RNA encodes a large polyprotein processed by three virus-encoded proteases into 10 multifunctional proteins. In addition, a frameshifted ORF encoding a small protein, P3N-PIPO, has been identified (Chung et al. 2008).

Control of plant viruses in the field relies mostly on the deployment of genetic resistances (Kang et al. 2005). Unlike for other plant pathogens, recessive resistances are the most common against plant viruses (Diaz-Pendon et al. 2004; Kang et al. 2005). Such resistance is likely to be passive, being the consequence of the loss (null allele) or mutation of a host factor required by the virus to complete a particular step of its infectious cycle (Fraser 1992). In recent years, components of the eukaryotic translation initiation complex such as *eIF4E* and, to a lesser extent,

eIF4G have been identified as essential determinants in the outcome of potyviral infection (Nicaise et al. 2007; Wang and Krishnaswamy 2012). In particular, recessive allelic lettuce genes *mo1*¹ and *mo1*², currently used worldwide to protect lettuce crops against *Lettuce mosaic virus* (LMV), have been shown to correspond to mutant alleles of the gene encoding the translation initiation factor *eIF4E* (German-Retana et al. 2008a; Nicaise et al. 2003). LMV, a member of the genus *Potyvirus*, is a major pathogen of worldwide distribution in commercial lettuce crops (Dinant and Lot 1992). As other potyviruses it is transmitted by aphids in a non-persistent manner, while some LMV isolates are seed-borne in lettuce (Dinant and Lot 1992). A range of species within the family Asteraceae are susceptible to LMV, including cultivated and ornamental species such as common (*Lactuca sativa*) or wild (*L. virosa*) lettuce, Cape daisy (*Dimorphoteca* or *Osteospermum* spp.) and *Gazania* (*Gazania rigens*). In addition, a few species within the families *Brassicaceae*, *Cucurbitaceae*, *Fabaceae*, *Solanaceae* and *Chenopodiaceae* are natural or experimental hosts of LMV (Dinant and Lot 1992; German-Retana et al. 2008b), including *N. benthamiana* and *A. thaliana*.

Depending on the LMV isolate to which they are confronted, the *mo1* genes in lettuce can confer true resistance (no detectable virus systemic accumulation) or tolerance (virus accumulation in the absence of symptoms). Even though the mechanism underlying *eIF4E*-mediated resistance is still unknown, it has been demonstrated that the *mo1*² allele partially inhibits the intercellular movement of the avirulent LMV-0 isolate and affects its phloem loading and unloading (German-Retana et al. 2003).

Attempts to link the biological properties of LMV isolates with their phylogeny have been carried out (Krause-Sakate et al. 2002; Revers et al. 1997). LMV isolates harvested in lettuce could be clustered in three main groups: a single isolate from Yemen, a group from the Balkans (Greece and Croatia, named Gr) and a third group with very diverse geographical origins (called 'Rest of the World' or RoW) (German-Retana et al. 2008b). Within the RoW group, two large sub-clusters of isolates

Name	Sampling year	Geographical origin	Host origin	Accession N°
CI117	2003	Chile	<i>Dimorphoteca sp.</i>	KJ161175
CI427	2007	Chile	<i>Lactuca virosa</i>	KJ161180
CI574	2007	Chile	<i>Lactuca virosa</i>	KJ161183
Tn515	2005	Tunisia	<i>Dimorphoteca sp.</i>	KJ161188
Tn516	2005	Tunisia	<i>Dimorphoteca sp.</i>	KJ161190
Tn517	2005	Tunisia	<i>Dimorphoteca sp.</i>	KJ161192

Table S1: Isolates which evolved towards *mo1¹* resistance breaking in *L. sativa*.

contained all known seed-borne LMV isolates: one with isolates unable to infect *mo1*¹ or *mo1*² plants, collectively named 'LMV-Common', and the other with the isolates cumulating *mo1*-breaking and seed transmission properties, collectively named 'LMV-Most' for *mo1*-breaking, seed transmitted.

Although the *mo1* resistance has largely remained effective since its intensive deployment, occasional outbreaks of resistance-breaking forms of LMV have been reported and may represent a threat to resistance durability (Krause-Sakate et al. 2002). Previous work has demonstrated that the VPg from a virulent isolate (LMV-E) enabled the multiplication of an avirulent isolate (LMV-0, group Common) only in *mo1*¹ and not in *mo1*² plants while the C-terminus region of the LMV-E CI (Cylindrical inclusion) helicase carried determinants for both *mo1*¹ and *mo1*² resistance-breaking, revealing a complex picture, with two LMV genomic regions independently conferring the ability to overcome eIF4E-mediated resistance in lettuce and providing the first example of a potyviral CI acting as an eIF4E resistance breaking determinant (Abdul-Razzak et al. 2009). In particular, the S621T mutation in the CI C-terminus (CI-Cter) was demonstrated to confer *mo1*¹ and *mo1*² resistance-breaking properties to LMV-0.

There are many examples of damaging viruses emerging into cultivated crops from native ecosystems, and it has been argued that "the viral genetic variability contained in reservoir populations is the most important genetic determinant of viral emergence" (Elena et al. 2011). It is generally assumed that weeds and wild hosts have a broader genetic diversity than crop species, and therefore harbor viral populations with a higher genetic diversity, potentially including resistance-breaking variants (Chiba et al. 2010).

Weeds and ornamental plants could act as LMV local reservoirs for lettuce crops (Zerbini et al. 1995). Whether this may contribute to the breakdown of the *mo1* resistance deployed in lettuce crops is still unknown. The first objective of the present study was to evaluate the biological behavior non-lettuce isolates (weeds and ornamental isolates) of LMV in resistant and susceptible cultivated lettuce genotypes. The results obtained show that

propagation of five non-lettuce isolates of LMV in *mo1*¹ lettuce was accompanied by a gain of virulence correlated with the accumulation of mutations in the CI C-terminus, when the same isolates propagated in susceptible lettuce did not accumulate mutations and did not show a gain in virulence. The *mo1*¹-evolved isolates had simultaneously gained the ability to overcome the *mo1*² resistance. Whole genome sequencing of native and evolved isolates determined that no other mutation could be associated with adaptation to the *mo1* resistance. Site-directed mutagenesis of an infectious clone of the avirulent LMV-0 isolate demonstrated the cumulative contribution of mutations in the CI-Cter to resistance breaking. Lastly, an analysis of the competitiveness of the various LMV-0 derived point mutants demonstrated that only one single mutant is counter-selected in susceptible crops, while no clear fitness cost can be associated with the other mutations.

Materials and Methods

Plant material and virus inoculation

The non-lettuce isolates of LMV listed in bold in Table S1 were collected in the field in Chile and in Tunisia, from weeds (*L. virosa*) and ornamental plants (*Dimorphotheca* sp.). All isolates were mechanically propagated in the susceptible lettuce (*L. sativa*) cultivar Trocadéro under insect-proof conditions in a greenhouse, following the procedures described by Revers et al. (Revers et al. 1997). Each LMV isolate was also propagated in indicator plants to check for the potential presence of other viruses frequently found in lettuce (*Cucumber mosaic virus*, *Turnip mosaic virus*, *Tomato spotted wild virus*).

The infectious recombinant cDNA clones derived from LMV-0 were inoculated by DNA-coated gold particles bombardment on susceptible lettuce cultivars Trocadéro and/or Salinas as previously described (Redondo et al. 2001). The ability of the viral isolates to overcome the *mo1* resistance alleles was evaluated after rub-inoculating at least three plants of cultivars carrying either the *mo1*¹ (Mantilia) or the *mo1*² alleles (Salinas 88 or 8713142M, an early flowering line provided by E. Ryder). Trocadero or Salinas cultivars were used as susceptible inoculation controls.

Primer pair	Primer sequence (5'→ 3')	5' Position	Tm	Isolates
0.1cp 0.2144M-rev2	AAAATAAAACAACCCAACACAACCTC AGCGAATGCAAGATCTTGT	1 682	54°C	Cl427 evolved Cl574 native Cl574 evolved Tn515 native Tn516 native Tn516 evolved
0.1cp 9EV-rev1	AAAATAAAACAACCCAACACAACCTC CGTCTGTTTATAATGTGTGGC	1 976	60°C	Tn515 evolved Tn517 evolved
0.1cp-fw1b 0.2144m-rev1	GAACAAGATCTTGCATTCGC GTGCATGAAACAAGTTGAG	662 1466	54°C	Tn515 native
0.1cp-fw2 0.2144m	GACATACTCCATACCTGC CATTGGATTGCGTCTTAGGTG	1478 2144	58°C	Tn516 native Tn516 evolved
0.1cp-fw2 0.4415m-rev2	GACATACTCCATACCTGC ACTGCTATCTCGCGTGCCA	1478 2532	56°C	Tn517 native Tn517 evolved
0.1870p 0.4415m-bis	GGACAAGCATCGAACCATGT GCAGCTGTTTCACGAGTG	1870 4278	55°C	Cl574 native Cl574 evolved
0.1870p-fw1 0.4415m-rev1	TGGCACGCGAGATAGCAG ACGCCTTGCACTTGCACTC	2514 4278	56°C	Tn515 native Tn515 evolved Tn516 native Tn517 evolved
Tn517-fw Tn516-rev	ACTTACTACGAACTCCACG GAGTTGGTTCGATAAGTAG	3791 4212	54°C	Tn517 evolved
0.3923p E.4809m	GCAAAGCGAGAGGATCAAGC GCATCACAGTTTACTCCGC	3923 4809	58°C	Tn515 evolved
Tn516-fw Tn516-rev	GAACTTTACTCCTCTCGCG GAGTTGGTTCGATAAGTAG	4148 4412	60°C	Tn516 native Tn516 evolved
0.4148p 0.6702Am	GAACTTTACTCCTCTCGCGTG TTTGGRTACAGTGCWGGAGC	4148 6702	60°C	Cl574 native Cl574 evolved
9EV-fw 9EV-R	CATAAAGGTATCAGCTACGCC GGACCATTTCGGTGCTCGC	4675 5090	60°C	Tn515 evolved
0.5793B-p 0.8072m	TYTCAAAYTTCTCCCTTAGTAG CAGCAAGCAGAGTGTGCGAG	5793 8072	60°C	Cl574 native Cl574 evolved
0.6197p3 0.6939m	CGTTATCGACAAGCAAG ACGTATTCACCATGTCTCG	6197 6939	50°C	Tn515 native Tn515 evolved
Tn515-fw Tn515-rev	GACATGGTGAATACGTGCTTCC AACTCGTAGCGCTGTGAATTCCG	6924 7259	64°C	Tn515 native Tn515 evolved
0.5793p-fw2 3prim-rev2	ACATAGTCGGAATCCACAG CGCAATGTGACATGAACCAC	7230 8669	58°C	Tn515 evolved
Evol-fw2 Evol-rev2	TTGAAAGGCAACTTGAAAGC TTCAGGGCTTGAAAGATTGC	7505 7842	56°C	Tn516 evolved
0.7852p LD-prim	GGCTGTTGGTGCATATATAG CACTGGCGGCCGCTCGAGCATGTA	7852 10080	62°C	Cl574 native Cl574 evolved
0.7852p-fw1 3prim-rev1	CATGTACATTGCGGCATC TGGTTTGGTTCGACTCCA	8656 9294	56°C	Cl427 evolved Tn515 evolved
0.7852p-fw2 3prim-rev	CGAACCAACCAGAGAGAC TGCTCCGACTGAAAACCAG	9283 10080	58°C	Cl427 evolved Tn515 evolved Tn516 native Tn516 evolved Tn517 evolved

Table S2: Primers designed to complete the full-length genomic sequence of various native and evolved LMV isolates. The position of the first nucleotide at the 5' of each primer is given according to LMV-0 sequence (X97704).

Salinas and Salinas 88 are near isogenic lines differing only by their status at the *mo1* locus (Ryder 1991).

Detection and sequencing of viral progeny

The appearance of symptoms on the upper-non-inoculated leaves was monitored until 14 weeks after inoculation. Symptoms were checked visually and viral infection was confirmed by DAS-ELISA assays (German-Retana et al. 2000; Clark and Adams 1977). The presence of the virus was confirmed by Reverse Transcription-PCR. Total RNAs were extracted from fresh symptomatic leaves as previously described (Bertheau Y, Fréchet D, Toth IK 2002). A coupled one-step RT-PCR was performed using AMV reverse transcriptase™ (Promega) and DyNAzyme II™ DNA polymerase (Finnzyme) and primers pairs 05762p and 06419m2 (CI-Cter) or 06197p3 and 06939m (VPg) (Table S2) collectively targeting the viral region involved in *mo1* resistance breaking (CI-Cter/VPg). The amplification products were sequenced on both DNA strands by Beckman Coulter Genomics France or GATC Biotech.

Determination of LMV full-length genomic sequences by Illumina deep sequencing

To determine the whole genome sequence, viral particles of five LMV isolates (CI427, CI574, Tn515, Tn516 and Tn517) before or after their evolution towards resistance-breaking on resistant lettuce were immunocaptured and cDNAs were synthesized and randomly amplified (Candresse, Svanella-Dumas et al. in preparation). One specific 9bp MID (Multiplex Identifier) tag was used for each sample. The PCR products were purified using the MinElute PCR Purification Kit (Qiagen). 150ng of each PCR product were pooled and sequenced as a bulk with additional samples using one lane of an Illumina GAIIx flow cell, in the "Plateforme Génome Transcriptome" (PGTB) of the "Centre de Génomique Fonctionnelle de Bordeaux" (<http://www.pgtb.u-bordeaux2.fr>). All analyses and manipulation of Illumina sequencing reads were performed using CLC Genomics Workbench 5.1 (<http://www.clcbio.com>). Sequencing reads were first demultiplexed in order to assign individual reads to the relevant sample. The adaptors containing the multiplexing tags were removed from the reads which were then screened and trimmed

on quality. Reads were finally assembled into contigs and scaffolds using a combination of de novo assembly and mapping on a LMV full-length reference genome (LMV-0, X97704).

Gaps in the assembled sequences were filled using PCR and specific primers designed from the sequences obtained (Table S3) on the cDNAs synthesized for the Illumina deep sequencing. The PCR were carried out using 5 µl of cDNA in a 50µl reaction volume, 0.2µM of each primer and 1 µl of 50X Advantage 2 Polymerase mix (Clontech) according to the manufacturer's recommendations. All amplification products were sequenced by Beckman Coulter Genomics, France.

Partial targeted sequencing of LMV isolates

Partial sequencing of targeted regions (listed in Table S2) of evolved LMV variants genome was performed: cDNAs were synthesized from 5µl of total RNAs using N6 and oligodT18 primers and the Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) according to the manufacturer's recommendations. In a second step, the PCR was carried out using the Taq DyNAzyme II™ DNA polymerase (Finnzyme) and the primers listed in Table S2.

Construction of point mutants in the CI-Cter region of LMV-0

A protocol using homologous recombination in yeast to assemble overlapping DNA fragments and adapted from Desbiez et al. (2012) was used. A cassette containing the 2µ yeast replication origin and a yeast selectable marker (Trp-1 promoter and gene) was inserted into a plasmid carrying the full-length infectious cDNA clone of LMV-0 (Abdul-Razzak et al. 2009), yielding the "acceptor" shuttle vector. This vector was further modified by deleting the CI-C-terminal region (nt 5512- nt 6017) and replacing it by a short sequence corresponding to a unique NotI restriction site. The resulting LMV-0-DeltaCI vector could then be linearized at this point. PCR-based site-directed mutagenesis was performed using mutagenic primers listed in Table S4 to introduce point mutations in the CI-Cterminus. The CI-region (nt 5416-6117nt) was amplified from an LMV-0 template through 2 overlapping mutagenic PCR reactions. When possible, a restriction site was introduced along with the mutation to facilitate the screening of mutated clones. PCR reaction were performed

Primer pair	Primer sequence (5'→3')	5' Position	Tm	Isolates
0.1cp-fw1 0.2144m-rev1	GCAGGAGGCTCATCAGC GTGCATGAAACAAGTTGAG	1 1466	54°C	CI574
0.1cp-fw1b 0.2144M-rev1	GAACAAGATCTTGCAATTCGC GTGCATGAAACAAGTTGAG	662 1466	54°C	Tn516 Tn517
0.4148p 0.6702Am-rev2	GAACTTTACTCTTCTCGCGTG CTATGATGTTGGTTGCCAC	4148 5003	56°C	CI427
Tn516-fw1 Tn516-rev1	CCATTCTTGATAGCGAGCACC CAATCTTGTTGATTGTTGCTGG	5061 5723	60°C	Tn517
0.5762p 0.6419m2	TTCCAAACAGTMACAGC CCATTGTTTTCCCTGTGAG	5762 6419	50°C	CI427 CI574 Tn515 Tn516 Tn517
0.6197p3 0.6939m	CGTTATCGACAAGCAAG ACGTATTCACCATGTCTCG	6197 6939	50°C	Tn515
0.7852p-fw1b 3prim-rev1	TTCATGTCACATTGCGGCA TGTTTTGGTTCTGACTCCA	8654 9294	56°C	CI574
0.7852p-fw2 3prim-rev	CGAACCAAACCAGAGAGAC TGTCTCCGACTGAAAACCAG	9283 10080	58°C	Tn515

Table S3. Primers designed for targeted sequencing of the genome of native and evolved LMV isolates. The position of the first nucleotide of the primer is given according to LMV-0 sequence (X97704). M= C, W= A or T and R= A or G.

with 0.1ng of LMV-0 plasmid template, using the Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) according to the manufacturer's recommendations and at a primer annealing temperature of $T_m - 2^\circ\text{C}$ in order to allow for mismatches. The primers T_m were calculated via the T_m calculator tool provided at www.neb.com/nebecomm/tech_reference/TmCalc/Default.asp#.UKIf02dRqLI. The two overlapping PCR fragments were further assembled together with NotI-linearized LMV-0-DeltaCI plasmid by homologous recombination in yeast.

Preparation of the competent cells *Saccharomyces cerevisiae* (YPH501, Sikorski and Hieter, 1989) was performed as described previously (Desbiez et al. 2012), with the following modifications: after growing the cells in YPD medium overnight until the $OD_{600\text{nm}}$ reached 0.7, the cells were centrifuged 10 min at 5000 rpm and the pellet washed with 10mL of sterile water (twice) before being resuspended in 500 μl of LiAc buffer (10mM Tris-HCl pH8; 1mM EDTA; 100mM lithium acetate). For each transformation, 100 μl of competent cells were mixed with 7 μl (70 μg) of denatured salmon sperm DNA, 700 μl of PEG-LiAc buffer (10mM Tris-HCl pH8; 1mM EDTA; 100mM lithium acetate; 40% w/v PEG 4000) and a maximum of 15 μl of PCR amplified products. The overlapping PCR fragments were previously purified on MSB® Spin PCRapace columns (Invitex) and the DNA content evaluated by spectrophotometry. An equimolar mix of the three DNA fragments is recommended for yeast transformation. After 2-hours incubation at 30°C under agitation, the yeast-DNA mix was submitted to a heat-shock at 42°C during 15 min. After 2 washes in 500 μL of water, cells were resuspended into 400 μl of water, plated on CAU selective medium (0.1% casamino acid containing no tryptophan, 0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.0025% adenine sulfate,

0.0025% uracil, 2% d-glucose, 2% bacto-agar) and grown at least 48h at 30°C .

Yeast colonies were inoculated in 5mL of liquid CAU medium, grown overnight and pelleted by 10 min centrifugation at 15000 g. Pellet was resuspended in 100 μl of resuspension buffer (67mM KH_2PO_4 ; pH 7.5) complemented with 50U of Zymolyase™ lyticase (Amsbio). After 1 h incubation at 37°C , 200 μl of lysis buffer (NaOH 0.2N; SDS 1%) were added to the solution. After 5 min of incubation at room temperature, 150 μl of neutralization solution were added (5M potassium acetate; 11.5 % acetic acid) and the solution was centrifuged 15 min at 15 000 g. The DNA-containing supernatant was then transferred in a new tube with 2 volumes of absolute ethanol and stored at -20°C for 1 h, for ethanol precipitation. After several washes with ethanol 70°C , the pellet was dried and resuspended in 50 μl of sterile water, and used for transformation of electrocompetent *E. coli* DH5-alpha (Invitrogen) according to standard protocols. Bacterial plasmid DNA corresponding to full-length cDNA clones of LMV-0 mutant was extracted by alkaline lysis and the screening was performed by restriction enzyme analysis.

Estimation of the competitiveness of LMV-0 recombinant mutants

Each viral inoculum was calibrated by semi-quantitative DAS-ELISA : crude homogenates from infected Trocadéro lettuce plants were calibrated and adjusted by dilution, as reported by Ayme et al. (Ayme et al. 2006). For competition assays, calibrated inocula were mixed at a 1:1 ratio and used to inoculate 18 susceptible lettuces in three independent tests. In parallel, 12 susceptible lettuces were inoculated with each individual mutant. Inoculated leaves were harvested at 7dpi, and the 3 expanded upper leaves of 6 plants infected by the two mutants were collected at 10, 15 and 20 dpi. Total RNA was extracted, the viral CI-Cter region amplified by RT-PCR

Primer pair	Sequence	Use
05762p 06419m	TTCCAAACAGTMACAGC CCATTGTTTTCCCTGTGAG	CI-Cter sequencing
06197p 06939m	CGTTATCGACAAAGCAAG ACGTATTCACCATGTCTCG	VPg sequencing
05416p 06117m	CAGTTCAAGTTGAAGGAATCAGACATC CTTGCCGTTTATTACCTTTCCTTGG	CI-Cter cloning
0mut5871p 0mut5871m	AAAAACT G CAGG T AGTCAGAGACAC CTGACT A CCTGCAGTTTTTGC	A602V mutagenesis
0mut5957p 0mut5957m	GACATGGAGACA A CGCAGAAATTGGCAGAG CTCTGCCAATTTCTG C TTGTCTCCATGTC	A627T mutagenesis
0mut5927p 0mut5927m	TGCCAGGCTGGA A CT A GTGACGGGGTTCC GGAACCCCGTCA T AGTTCCAGCCTGGCA	G617S mutagenesis

Table S4. Primers used in for polymerase chain reaction (PCR)-fusion-based mutagenesis experiments. The non-synonymous mutation is underlined and bold. Other bold nucleotides correspond to synonymous mutations (insertion of restriction site for cloning purpose). M= C or A

using the primers listed in Table S4 and the PCR products directly sequenced. Dual peaks in the sequence electrophoregrams were interpreted as reflecting the co-existence of the two viral genotypes in the viral population. In contrast, a single peak at a polymorphic site between the two competing genotypes suggested that one viral genotype predominated. In parallel, the viral accumulation in plants infected by individual mutants was estimated by DAS-ELISA to quantify viral accumulation in single infections.

Sequence comparisons and phylogenetic analyses

The nucleotide sequence from nt 5779 to nt 6919 and corresponding to the C-ter end of the CI, the 6K2 and the VPg region for a total of 81 selected LMV isolates (Candresse, Svanella-Dumas et al., manuscript in preparation) was aligned with the ClustalW (Thompson 1997) tool implemented in the MEGA5.0 software (Tamura et al., 2011). A maximum likelihood tree rooted on LMV isolates from the divergent Greek cluster used as an outgroup (Krause-Sakate et al., 2002) was prepared and used for all further analyses. Mutation events occurring along the tree were inferred using the “Infer ancestral sequences” tool of MEGA5. This option uses the Maximum Likelihood method to estimate the ancestral state of each node in a phylogenetic tree, for each nucleotide/residue of the alignment.

Detection of sites under diversifying selection was carried out using 4 different methods: Single Likelihood Ancestor Counting (SLAC), Internal Fixed Effect Likelihood (IFEL), Fast Unbiased Bayesian AppRoximation (FUBAR) and Mixed Effect Model of Episodic selection (MEME), implemented in the HyPhy package and available on the Datamonkey server (<http://www.datamonkey.org/>) (Pond and Frost, 2005b, 2005a; Pond et al., 2006; Delport et al., 2010; Murrell et al., 2012, 2013).

The possibility of co-variation between sites under diversifying selection pressure and other positions in the CI-VPg region was tested using the Spidermonkey tool (Poon et al., 2008) provided on Datamonkey server.

Results

Acquisition of specific mutations in the C-terminal region of the CI allows non-lettuce LMV isolates to adapt to mo1 resistance in lettuce

A study focused on the molecular and biological diversity of LMV isolates originating from various hosts, has identified wild or ornamental host-specific and geographically limited clusters of isolates with the large RoW cluster (Candresse, Svanella-Dumas et al., in preparation). Five isolates representative of these LMV clusters originating from wild lettuce or from the widely cultivated Cape daisy (*Dimorphoteca sp.*) (bold in Table S1) were propagated from their original host onto susceptible *mo1⁰* lettuce cv. Trocadéro. All inoculated plants displayed mosaic symptoms on the upper non-inoculated leaves as early as 11 days post inoculation (dpi). The five isolates were then inoculated to resistant *mo1¹* lettuce cv Mantilia. This was accompanied by the appearance of a few chlorotic spots on some plants, before appearance of a systemic mosaic at 27 dpi to 46 dpi (Figure 1). Therefore, the symptoms appeared much later than in susceptible Trocadéro lettuce and only in some of the inoculated resistant plants, suggesting a potential gain of virulence of non-lettuce LMV isolates in *mo1¹* lettuce.

In order to better characterize this potential propensity to evolve towards virulence, efforts were then focused on three isolates: CI574, Tn515 and Tn517. Each isolate infected 100% of susceptible lettuce plants (Table 1) but the rate of *mo11* resistant cv. Mantilia plants ultimately developing mosaic symptoms varied from 81% (CI574) to 17% and 22% for Tn517 and Tn515, respectively (Table 1). No symptoms were observed to

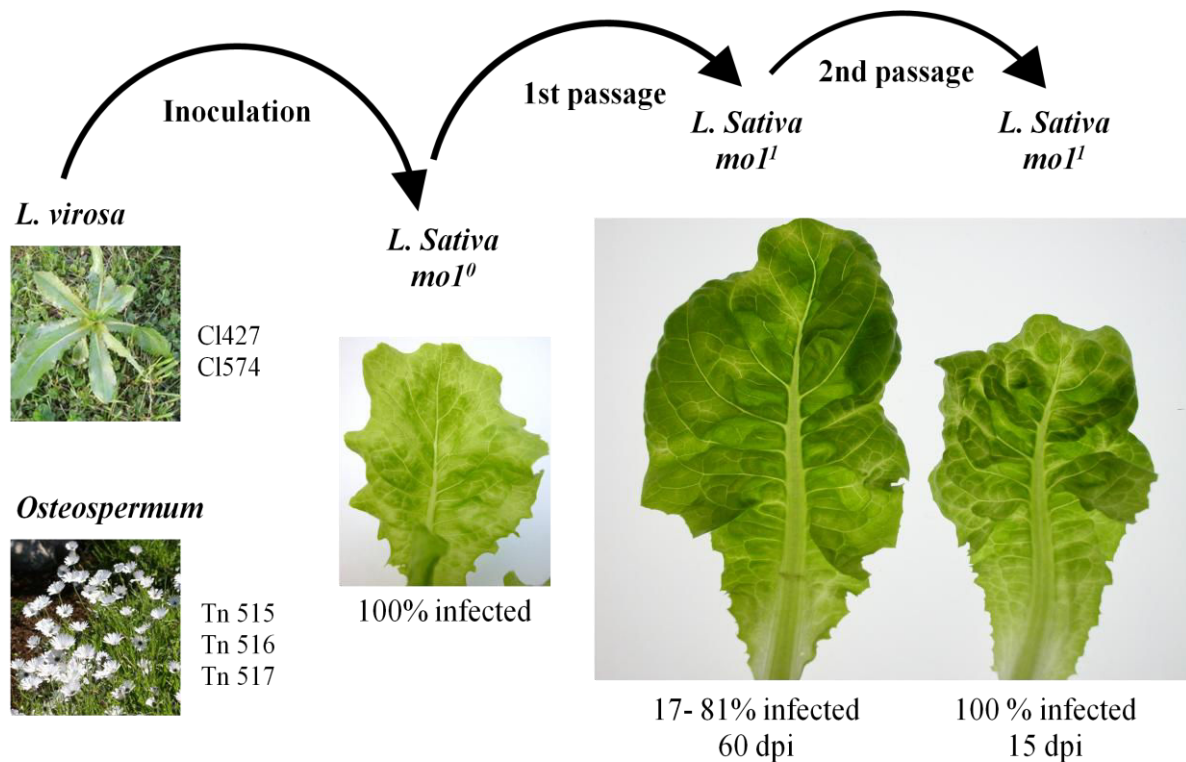


Figure 1: Evolution towards resistance-breaking of non-lettuce LMV isolates selected following inoculation of *moI¹* resistant lettuce plants.

Isolate	First passage: <i>moI⁰</i> inoculum			Second passage : <i>moI¹</i> inoculum		
	<i>moI⁰</i> (11 dpi)	<i>moI¹</i> (60 dpi)	<i>moI²</i> (60 dpi)	<i>moI⁰</i> (11 dpi)	<i>moI¹</i> (13 dpi)	<i>moI²</i> (17 dpi)
CI574	8/8	17/21	2/5 ^a	10/10 (3)	22/22 (2)	9/9 (2)
Tn515	8/8	4/18	3/7 ^a	8/8 (4)	21/21 (4)	15/15 (3)
Tn517	8/8	3/18	nd	16/16 (5)	26/26 (4)	13/13 (3)

Table 1: Proportion of infected plants of the susceptible (*moI⁰*) or resistant (*moI¹* and *moI²*) lettuce varieties, following inoculation with non-lettuce LMV isolates CI574, Tn515 and Tn517. The inoculum used had been propagated on *moI⁰* susceptible lettuce (First passage: *moI⁰* inoculum) or propagated a first time on resistant *moI¹* plants (Second passage: *moI¹* inoculum). For the first passage, at least two independent experiments were performed and the composite results are shown, except in ^a (one experiment, on *moI²* Salinas 88 plants). The number of independent plants used as sources of inoculum for the second passage is given between parentheses. The date of appearance of the symptoms is indicated (dpi). nd: not determined.

develop, even long after inoculation, in *mo12* resistant lettuce of the 8714132M line, and the absence of viral accumulation was confirmed by RT-PCR. However, in one experiment, the inoculation of isolates CI574 and Tn515 was carried on the *mo1²*-resistant lettuce cultivar Salinas 88 and resulted in the development of symptoms, appearing 30 dpi to 60 dpi, in some of the inoculated plants (Table 1). This was not tested for isolate Tn517.

The viral isolates present in the *mo1¹* symptomatic plants were then inoculated to *mo1⁰*, *mo1¹* and *mo1²* plants. Table 1 shows that 100% of plants were infected, whatever their resistance genotype, with severe symptoms appearing in *mo1¹* and *mo1²* plants much more rapidly (from 13 to 17 dpi) (Figure 1). Therefore, *mo1¹* resistance-breaking variants have been selected during the first passage on *mo1¹* resistant plants, and they are able to overcome not only *mo1¹* but also *mo1²* resistance.

The sequence of the viral isolates present in *mo1¹* Mantilia plants ultimately developing symptoms following the initial inoculation experiments was then analyzed in an effort to identify mutations associated with the gain of virulence. Initial efforts targeted the CI-Cter to VPg genomic region associated with resistance breaking (Abdul-Razzak et al., 2009). As shown in Table 2, during two independent experiments mutations could be detected after a first propagation in *mo1¹* at two positions in the CI-Cter sequence, depending on the isolate: a substitution of an alanine by a valine at position 602 (A602V) for CI574 and Tn515 (in each case in 3/4 of the sequenced progenies) and a substitution of an alanine by a threonine at position 627 (A627T) for Tn515 and Tn517 in respectively 1/4 and 1/3 of the sequenced progenies. Despite the presence of symptoms in the analyzed *mo1¹* lettuce plants, for each isolate, in at least one or two of the analyzed progenies no mutation could

be detected through RT-PCR sequencing of CI-Cter/VPg region (Table 2), the resistance-breaking variants being probably under-represented in the viral progeny, with the absence of visible dual peaks in the electrophoregrams (data not shown). The A602V mutation was also detected after propagation of the CI574 and Tn515 isolates in *mo1²* lettuce whereas no mutation was detected after propagation of all non-lettuce LMV isolates in susceptible lettuce (Table 2).

For the variants selected on *mo1¹* and re-inoculated on *mo1¹* or *mo1²* plants, previously identified mutations were detected in 100% of the sequenced progenies, revealing the fixation of the mutations (Table 3). Furthermore, additional mutations not detected in the inoculum were also detected in some cases after the second passage on resistant plants, affecting again amino acids at position 602 or 627 (Table 3). Overall, depending on the LMV isolate, different patterns of accumulation of mutations in the CI-Cter to VPg region can be observed. The simplest situation is that of CI574, for which the A602V mutation is the only one observed. This mutation was observed to be fixed in the progenies analyzed following a second passage in resistant plants. In the case of the Tn515 isolate, the same was observed for the A602V mutation but it was accompanied in some propagation lineages by the A627T mutation. Lastly, the Tn517 isolate represents the most complex situation since depending on the propagation lineage each of these two mutations could be observed alone or in combination (Table 3).

Sequencing of the RT-PCR-amplified CI-Cter/VPg region of the variants after their propagation in *mo1⁰* lettuce shows that mutations acquired during the first passage on *mo1¹* resistant plants are systematically retained (Table 3). Therefore, in the absence of selection pressure driven by the *mo1* allele, no reversion occurred. However, in a few

Isolate	<i>mo1</i> ⁰ (susceptible)		<i>mo1</i> ¹ (resistant)		<i>mo1</i> ² (resistant) ^a			
	A602	A627	A602	A627	A602	A627		
CI574	No mutation (5/5)		-	-	(1/4)	V	-	(2/2)
			V	-	(3/4)			
Tn515	No mutation (5/5)		-	-	(1/4)	V	-	(3/3)
			V	-	(2/4)			
			V	T	(1/4)			
Tn517	No mutation (4/4)		-	-	(2/3)			nd
			-	T	(1/3)			

Table 2: Mutations observed in the CI-Cter/VPg region of the viral progeny of non-lettuce LMV isolates, after their passaging in *mo1*⁰, *mo1*¹ or *mo1*² lettuce cultivars. The number of plants for which the sequenced progeny showed a particular haplotype and the total number of plants from which the progeny was characterized are indicated between parentheses. The results shown are derived from at least two independent inoculation experiments except in ^a (one experiment).

	From <i>mo1</i> ¹ to <i>mo1</i> ⁰				From <i>mo1</i> ¹ to <i>mo1</i> ¹				From <i>mo1</i> ¹ to <i>mo1</i> ²						
	Inoculum <i>mo1</i> ¹		Progeny <i>mo1</i> ⁰		Inoculum <i>mo1</i> ¹		Progeny <i>mo1</i> ¹		Inoculum <i>mo1</i> ¹		Progeny <i>mo1</i> ²				
	A602	A627	A602	A627	A602	A627	A602	A627	A602	A627	A602	A627			
CI574	^(c) V	-	V	-	(5/5)	^(a) -	-	V	-	(3/3)	^(b) V	-	V	-	(6/6)
						^(a) V	-	V	-	(3/3)					
Tn515	^(b) V	-	V	-	(2/3)	^(a) -	-	V	T	(3/3)	^(a) V	-	V	-	(1/3)
			V	T	(1/3)	^(b) V	-	V	-	(6/6)			V	T	(2/3)
	^(b) V	T	V	T	(4/4)	^(a) V	T	V	T	(3/3)	^(b) V	T	V	T	(6/6)
Tn517	^(b) -	-	V	-	(3/3)	^(a) -	T	-	T	(3/3)	^(b) -	T	-	T	(6/6)
								-	T	(3/9)					
	^(c) -	T	-	T	(5/5)	^(c) -	-	V	T	(4/9)	^(a) -	-	V	-	(3/3)
							V	-	(2/9)						

Table 3: Mutations observed in the CI-Cter/VPg region of non-lettuce LMV variants selected on *mo1*¹ resistant lettuce and of their progeny following passaging in *mo1*⁰, *mo1*¹ and *mo1*² lettuce cultivars. Variants selected in *mo1*¹ plants were re-propagated in two *mo1*⁰ plants and in three *mo1*¹ or *mo1*² plants. The number of independent plants used as inoculum (one^a, two^b or three^c, depending on how many variants were available following the selection step) and the corresponding sequence of the CI-Cter/VPg region are indicated in the column labeled “inoculum *mo1*¹”. The mutations observed after sequencing the CI-Cter/VPg region of the progenies are reported in the columns marked “progeny *mo1*⁰, *mo1*¹ or *mo1*²”. The number of plants for which the sequenced progeny showed a particular haplotype and the total number of plants from which the progeny was characterized are indicated between parentheses.

cases, some variants displayed additional mutations not detected after their first passage on *mo1¹* plants (Table 3). Indeed, one Tn515-derived variant was observed with an additional A627T mutation while three Tn517-derived variants were selected with an additional A602V mutation. As mentioned above, it is probable that those mutations were already present but under-represented in the parental population.

The *mo1²*-resistance-breaking variants derived from CI574 and Tn515 after a first passage on *mo1²* Salinas 88 (Table 1) were re-inoculated on both *mo1²* and susceptible lettuce, and 100% of *mo1²* plants displayed symptoms of mosaic as soon as 12 dpi. Therefore, similarly to the *mo1¹*-evolved isolates, the variants that emerged in *mo1²* by acquiring A602V mutation are stable during a second passage in *mo1²* and do not revert in *mo1⁰* (data not shown).

Full genome sequencing fails to identify additional mutations consistently associated with resistance-breaking

The complete genomic sequences of isolates CI427, CI574, Tn515, Tn516 and Tn517 before and after their evolution towards *mo1¹* resistance-breaking were determined using the Illumina deep-sequencing strategy as described in the Material and Methods section.

Besides the two coding mutations previously identified at positions 602 and 627 in the CI-Cter region, a total of 12 nucleotide changes were detected in one or the other of the complete sequences of the five evolved isolates as compared to their parental sequences (Table 4). While 7 of those mutations are silent, 5 of them introduce changes in the predicted amino-acid sequence of the P1, CI or NIb proteins (Table 4). In order to determine if these mutations were systematically associated with virulence gain, further targeted sequencing of each of the identified genomic regions was performed on several

independently evolved variants derived from each isolate. For isolate CI574, the viral progeny from 9 *mo1¹* plants displaying symptoms (besides those listed in Table 1) and from 3 *mo1⁰* plants, was sequenced, whereas at least two independent viral progenies from *mo1¹* plants displaying symptoms were checked for the other four non-lettuce isolates.

The results obtained show that besides the A602V and A627T mutations, none of the other mutations identified by full genome sequencing was observed in the independently evolved virulent variants, indicating that these mutations are not directly associated with the ability to overcome the *mo1¹* resistance and likely reflect genetic drift of the viral lineages sequenced.

Amino acid positions 617 and 621 of the LMV CI-Cter are under positive selection pressure

In order to try to identify amino acids under positive (divergent) selection pressure in the LMV CI-Cter to VPg region, we analyzed the nucleotide sequence (nt 5779-6919) of 81 LMV isolates sampled all over the world and originating from different hosts (Candresse, Svanella-Dumas et al., in preparation) was analyzed. GenBank accession numbers of these sequences are listed in Table S1.

As described above, a valine at position 602 and a threonine at position 627 in the CI protein are potentially involved in *mo1*-resistance-breaking by evolved variants of non-lettuce isolates. Previous analysis of multiple sequence alignments between virulent and avirulent LMV isolates had led to the identification of another amino acid of interest at position 621 (Abdul-Razzak et al., 2009). Analysis of the multiple alignment of the 81 LMV sequences revealed in addition that all non-lettuce isolates, irrespective of their resistance-breaking status, display a serine rather than the glycine at position 617 observed in the non-resistance breaking isolates from lettuce (data not shown). Hence,

Genomic region	P1					CI					VPg		Nb	CP
	807	922	937	980	1048	4523	5630	5883	5953	5957	6610	6646		
Nucleotide position	807	922	937	980	1048	4523	5630	5883	5953	5957	6610	6646	8685	9496
Amino acid position	235	na	na	293	na	149	518	602	na	627	na	na	404	na
CI427 native	-	-	-	-	-	G(A)	-	C(A)	-	-	-	-	-	-
CI427 <i>moI1</i> adapted	-	-	-	-	-	T(S)	-	T(V)	-	-	-	-	-	-
CI574 native	-	-	-	G(V)	G	-	-	C(A)	-	-	-	-	A(E)	-
CI574 <i>moI1</i> adapted	-	-	-	A(M)	A	-	-	T(V)	-	-	-	-	G(G)	-
Tn515 native	-	-	-	-	-	-	-	C(A)	G	G(A)	T	G	-	T
Tn515 <i>moI1</i> adapted	-	-	-	-	-	-	-	A(E)	*G/A	*G/A(A/T)	C	A	-	*T/C
Tn516 native	A(K)	-	-	-	-	-	-	-	-	G(A)	-	-	-	-
Tn516 <i>moI1</i> adapted	G(R)	-	-	-	-	-	-	-	-	A(T)	-	-	-	-
Tn517 native	-	A	C	-	-	-	G(G)	-	-	G(A)	-	-	-	-
Tn517 <i>moI1</i> adapted	-	T	T	-	-	-	T(C)	-	-	A(T)	-	-	-	-

Table 4: Accumulated nucleotide changes and encoded amino acid (aa) changes in the genome of five *moI1* adapted LMV isolates in comparison with their non-adapted parental isolates. In the case of coding mutations, the corresponding amino acid is indicated in parentheses. The amino acid positions are numbered according to the genome sequence of LMV-0 (X97704) after maturation of the polyprotein, with the viral protein concerned indicated at the top of the table. (-): no difference between native and evolved isolates. (*): both nucleotides are present at the same position in the viral progeny.

This position appears also as a potential candidate for being involved in *mo1*-breaking. Different tools available via the Datamonkey online software were used to try to identify amino acids under positive selection pressure in the LMV CI-Cter to VPg region, as described in the Materials and Methods section. A divergent selection was detected at position 617 with the FUBAR (prob = 0,82) and IFEL (p-value = 0,0097) models. In both cases, only the 617 codon was identified. This is consistent with the observation of 7 non-synonymous mutation events and only 2 synonymous mutation events at this position in the LMV phylogeny reconstructed using MEGA 5 (Tamura et al., 2011).

The MEME model is a new feature implemented in Datamonkey, aiming to detect episodic divergent selection, acting on a specific sub-branch of the phylogenetic tree. This method revealed that codon 621 may have undergone a positive selection (p-value 0,0067). In fact, 6 non-synonymous mutation events are observed at this position along the phylogenetic tree, for only 3 synonymous mutation events. Another position was predicted to be under positive selection by MEME, codon 639 of the CI sequence (p-value = 0.0723) but no positive selection signal could be detected for positions 602 and 627.

Overall, both amino acids 617 and 621 appear to have evolved under divergent selection pressure in the field. While the pressure imposed on 621 appears to have occurred at (a) specific step(s) during LMV evolution, the selection pressure on position 617 appears to have been active throughout LMV evolution.

Partial resistance-breaking triggered by mutations in the CI-Cter

The next objective of this study was to establish whether the amino acids at codons 602, 617, 621 and 627 of the CI were molecular 'signatures' or key genetic determinants of the ability to overcome *mo1* resistance alleles.

Each of the four mutations A602V, G617S, S621T and A627T were introduced alone or in combination in a LMV-0 avirulent background (Figure S1). The full-length cDNA clones obtained were all infectious in susceptible lettuce and their resistance-breaking properties were tested after mechanical inoculation on *mo1*¹ and *mo1*² lettuce plants. Two of the mutants used, LMV-0-A602V and LMV-0-S621T, have been previously described (Abdul-Razzak et al., 2009). It is to be noted that in all cases, symptom appearance on susceptible lettuce occurred as soon as 10 dpi, while infected resistant lettuces displayed symptoms later, 20 to 30 dpi. Such a delay in symptoms appearance is also observed for some resistance-breaking isolates such as LMV-E (German-Retana et al., 2000). Correlation between symptom appearance and virus accumulation was confirmed by semi-quantitative DAS-ELISA tests, carried out between 30 and 60 days post-inoculation. Irrespective of the virus or mutant used and despite calibration of the viral inoculum, LMV accumulation level in systemic leaves showed high variability in both susceptible and resistant lettuce cultivars, within and between the independent experiments. Hence, no quantitative meaningful comparisons could be obtained.

It should be stressed that evolution of LMV-0 towards resistance-breaking has never been observed over the years. Similarly, in the experiments reported here no resistance-breakdown events were observed when LMV-0 was inoculated to resistant lettuce, even after 60 dpi (Table 5), and the sequence of the CI-Cter region was stable in LMV-0 progenies in susceptible lettuce.

Accumulation of the LMV-0-A627T mutant was detected only once in *mo1*¹ and twice in *mo1*² plants, in only one of the five independent experiments performed (Table 5). Similar to the erratic behavior of the A627T mutant, the double mutants with A627T and

>LMV-0	CAAACCATTCTAGAGAGAACCTGCAAAAACTACAAGCAGTCAGAGACACA
>LMV-0-A602V	CAAACCATTCTAGAGAGAACCTGCAAAAACTGCAAGGTAGTCAGAGACACA
>LMV-0-G617S	CAAACCATTCTAGAGAGAACCTGCAAAAACTACAAGCAGTCAGAGACACA
>LMV-0-S621T	CAAACCATTCTAGAGAGAACCTGCAAAAACTACAAGCAGTCAGAGACACA
>LMV-0-S621T	CAAACCATTCTAGAGAGAACCTGCAAAAACTACAAGCAGTCAGAGACACA
>LMV-0-A627T	CAAACCATTCTAGAGAGAACCTGCAAAAACTACAAGCAGTCAGAGACACA
>LMV-0-A602V-G617S	CAAACCATTCTAGAGAGAACCTGCAAAAACTGCAAGGTAGTCAGAGACACA
>LMV-0-A602V-S621T	CAAACCATTCTAGAGAGAACCTGCAAAAACTGCAAGGTAGTCAGAGACACA
>LMV-0-A602V-A627T	CAAACCATTCTAGAGAGAACCTGCAAAAACTGCAAGGTAGTCAGAGACACA
>LMV-0-G617S-S621T	CAAACCATTCTAGAGAGAACCTGCAAAAACTACAAGCAGTCAGAGACACA
>LMV-0-G617S-A627T	CAAACCATTCTAGAGAGAACCTGCAAAAACTACAAGCAGTCAGAGACACA
>LMV-0-A602V-G617S-S621T	CAAACCATTCTAGAGAGAACCTGCAAAAACTGCAAGGTAGTCAGAGACACA
>LMV-0-G617S-S621T-A627T	CAAACCATTCTAGAGAGAACCTGCAAAAACTACAAGCAGTCAGAGACACA
617 621	
>LMV-0	ATCATCAACTTCGAGTGCCAGGCTGGAAGTGGTGACGGGGGTTCCTTCGA
>LMV-0-A602V	ATCATCAACTTCGAGTGCCAGGCTGGAAGTGGTGACGGGGGTTCCTTCGA
>LMV-0-G617S	ATCATCAACTTCGAGTGCCAGGCTGGAAGTAGTGACGGGGGTTCCTTCGA
>LMV-0-S621T	ATCATCAACTTCGAGTGCCAGGCTGGAAGTGGTGACGGGGGTACCTTCGA
>LMV-0-A627T	ATCATCAACTTCGAGTGCCAGGCTGGAAGTGGTGACGGGGGTTCCTTCGA
>LMV-0-A602V-G617S	ATCATCAACTTCGAGTGCCAGGCTGGAAGTAGTGACGGGGGTTCCTTCGA
>LMV-0-A602V-S621T	ATCATCAACTTCGAGTGCCAGGCTGGAAGTGGTGACGGGGGTACCTTCGA
>LMV-0-A602V-A627T	ATCATCAACTTCGAGTGCCAGGCTGGAAGTGGTGACGGGGGTTCCTTCGA
>LMV-0-G617S-S621T	ATCATCAACTTCGAGTGCCAGGCTGGAAGTAGTGACGGGGGTACCTTCGA
>LMV-0-G617S-A627T	ATCATCAACTTCGAGTGCCAGGCTGGAAGTAGTGACGGGGGTTCCTTCGA
>LMV-0-A602V-G617S-S621T	ATCATCAACTTCGAGTGCCAGGCTGGAAGTAGTGACGGGGGTACCTTCGA
>LMV-0-G617S-S621T-A627T	ATCATCAACTTCGAGTGCCAGGCTGGAAGTAGTGACGGGGGTACCTTCGA
627	
>LMV-0	CATGGAGACAGCACAGAAATTGG
>LMV-0-A602V	CATGGAGACAGCACAGAAATTGG
>LMV-0-G617S	CATGGAGACAGCACAGAAATTGG
>LMV-0-S621T	CATGGAGACAGCACAGAAATTGG
>LMV-0-A627T	CATGGAGACAACGCAGAAATTGG
>LMV-0-A602V-G617S	CATGGAGACAGCACAGAAATTGG
>LMV-0-A602V-S621T	CATGGAGACAGCACAGAAATTGG
>LMV-0-A602V-A627T	CATGGAGACAACGCAGAAATTGG
>LMV-0-G617S-S621T	CATGGAGACAGCACAGAAATTGG
>LMV-0-G617S-A627T	CATGGAGACAACGCAGAAATTGG
>LMV-0-A602V-G617S-S621T	CATGGAGACAGCACAGAAATTGG
>LMV-0-G617S-S621T-A627T	CATGGAGACAACGCAGAAATTGG

Figure S1: Nucleotide sequence alignment of the CI C-terminal region of recombinant viruses derived from LMV-0 (nt 5847 to 5973 in genomic sequence).

Mutated nucleotides are highlighted and the corresponding amino acid codon underlined. At position 602, the GCA codon (Alanine) was mutated into GTA (Valine) and 2 synonymous mutations were introduced as well to design a PstI restriction site for cloning purpose. At position 617, the GGT codon (Glycine) was replaced by AGT (Serine), introducing a SpeI restriction site. At position 621, the TCC codon (Serine) was mutated into an ACC codon (Threonine), introducing a KpnI restriction site. At position 627, the GCA codon (Alanine) was replaced by an AGC codon (Threonine).

either A602V or G617S were observed to accumulate in *mo1*¹ or *mo1*² plants in only one of our four independent experiments performed and, as a consequence, were not studied further.

Infection of *mo1* resistant plants by the single mutant LMV-0-S621T was reproducibly observed (respectively 30.5 and 70 % of *mo1*¹ and *mo1*² plants infected), while LMV-0-A602V and LMV-0-G617S were never observed to accumulate in resistant plants (Table 5). The CI-Cter to VPg region of the viral progeny was sequenced, in order to identify potential additional mutations but was shown to be stable in susceptible and in *mo1*¹ plants. In only one progeny from *mo1*² plants was the threonine at position 621 (ACC) replaced once by an isoleucine (ATC) (1/5 analyzed progenies) (Table 6).

Consistent with the properties of single mutants, all double or triple mutants carrying the Serine-to-Threonine mutation at position 621 (S621T) accumulated in *mo1*¹ and *mo1*² plants (Table 5), although in all cases the proportion of infected *mo1*¹ plants was reproducibly lower than that of *mo1*² plants.

The modifications introduced in the CI-Cter region of the double mutant LMV-0-G617S-S621T were stable in susceptible lettuce. In *mo1*¹ plants, the A602V (codon GCA into GTA) and A627T (codon GCA replaced by ACA) substitutions independently appeared in one each (variants 1 and 2, respectively) of the 4 analyzed progenies (Table 6). In *mo1*² plants, the introduced serine 617 (AGT) was replaced by an asparagine (AAT) in variants 3 and 5 (respectively observed in two and one of the 13 characterized progenies) while the threonine at position 621 (ACC) was replaced by an isoleucine (ATC) in variant 5 (1/13 progenies). The A627T substitution was detected in the progenies of variants 3 and 4 (respectively observed twice and once in the 13 analyzed progenies).

For the triple LMV-0-G617S-S621T-A627T mutant, the modifications introduced in the CI-Cter region were stable in susceptible lettuce. However, in *mo1*¹ plants, in one of the three progenies sequenced an additional mutation at position 100 of the VPg was observed (serine AGT to glycine GGT, Table 6). In *mo1*² plants, the above mentioned substitution of the introduced serine 617 by an asparagine was detected in variant 2, which was observed in two of the four characterized progenies (Table 6).

Very interestingly, despite the fact that the corresponding single mutants (LMV-0-A602V or LMV-0-G617S) did not accumulate in *mo1*¹ and *mo1*² plants, the double mutant LMV-0-A602V-G617S was observed to accumulate in respectively 51.2% and 75% of inoculated *mo1*¹ and *mo1*² plants (Table 5). The triple mutant LMV-0-A602V-G617S-S621T reproducibly accumulated in more *mo1*² plants and less *mo1*¹ plants than the LMV-0-A602V-G617S (respectively 21.7% and 84.4 % of inoculated *mo1*¹ and *mo1*² plants, Table 5) even though no statistical significance could be assessed from the overall infection rate due to lack of a common reference throughout the different experiments.

In susceptible plants, reversion events occurred at position 602 (the introduced valine reverted to alanine) in the progenies of both the double LMV-0-A602V-G617S and triple LMV-0-A602V-G617S-S621T mutants (2/8 sequences) after three successive passages on *mo1*⁰ lettuce (Table 6). In *mo1*¹ plants, the A627T substitution appeared in one of the nine analyzed progenies of LMV-0-A602V-G617S, in addition to a mutation at position 156 of the VPg (tyrosine to valine). Mutation at position 100 (serine to glycine GGT) of the VPg were also observed in the progenies of LMV-0-A602V-G617S (one out of nine analyzed progenies) and LMV-0-A602V-G617S-S621T (one out of three progenies). Both 617S

LMV clone	Susceptible <i>mo1</i> ⁰	Resistant <i>mo1</i> ¹	Resistant <i>mo1</i> ²
LMV-0	100%	0	0
LMV-0-A602V	100%	0/46 (0)	0/46 (0)
LMV-0-G617S	100%	0/34 (0)	0/34 (0)
LMV-0-S621T	100%	11/36 (30.5)	28/40 (70)
LMV-0-A627T	100%	1/17 (6)	2/17 (12)
LMV-0-A602V-G617S	100%	22/43 (51.2)	30/40 (75)
LMV-0-A602V-S621T	100%	7/27 (25.9)	8/25 (32)
LMV-0-A602V-A627T	100%	3/39 (7.7)	2/41 (4.8)
LMV-0-G617S-S621T	100%	7/31 (22.5)	12/31 (39)
LMV-0-G617S-A627T	100%	0/19 (0)	2/22 (26.6)
LMV-0-A602V-G617S-S621T	100%	10/46 (21.7)	38/45 (84.4)
LMV-0-G617S-S621T-A627T	100%	3/4 (75)	4/4 (100)

Table 5: Proportion of susceptible or resistant lettuce plants infected by LMV-0 or by its mutant derivatives as assessed by DAS-ELISA at 60 days post inoculation. The percentage of infected plants is given between parentheses. The values shown correspond to the accumulated data from at least four independent inoculation experiments.

and 617N were also detected in the CI-Cter region of LMV-0-A602V-G617S variant 2 (Table 6). In *mo1*² plants the introduced serine 617 was replaced by an asparagine in LMV-0-A602V-G617S variant 3 (representing two of the 18 characterized progenies) and LMV-0-A602V-G617S-S621T variants 2 and 3 (respectively twice and once in the 11 characterized progenies). Furthermore, the threonine at position 621 was replaced by an isoleucine in the progeny of LMV-0-A602V-G617S-S621T variant 3 (1/11 progenies).

Altogether those results show that the infection of resistant lettuces by the LMV-0-derived mutants is not correlated with the accumulation of additional mutations in the CI-Cter region, as the majority of viral progenies displayed a sequence identical to the inoculated virus.

Competitiveness of resistance-breaking LMV-0 mutants in susceptible lettuce

For viruses and other plant pathogens, gains of virulence on resistant genotypes are frequently associated with fitness loss in susceptible genotypes (Ayme et al., 2007). To investigate the possible fitness cost associated with each mutation, competition tests were performed between the parental LMV-0 isolate and its mutant derivatives. Each mutant was inoculated singly or in mixed infection (1:1 ratio) with its parent, as described in Material and Methods. Viral accumulation (single infections) and the continued presence of the two inoculated viruses (mixed infections) in the systemically infected leaves were monitored at 10, 15 and 20 dpi. As the outcome of the competition was the same at 10, 15 and 20 dpi, the results presented in Figure 2 correspond to the compilation of the results obtained during 3 independent experiments, regardless of the harvesting time. In the single infection assays, no reproducible significant differences of accumulation of the mutant viruses were

observed as compared with the LMV-0 parent (data not shown).

When LMV-0 and LMV-0-A602V were co-inoculated (Figure 2A, tests 1, 2 and 3), in 38 out of the 41 plants, LMV-0-A602V was excluded and LMV-0 was the only virus detected after analysis of the electrophoregrams. In only 3 plants could both viruses still be detected up to 20 dpi. The presence of both viruses in all the inoculated leaves was verified at 5 dpi. This suggests that in a LMV-0 background, the A602V mutation is associated with a high fitness cost in susceptible lettuce plants.

In the case of the G617S mutation, the 4 independent experiments performed led to variable results (Figure 2B). However, in all experiments prolonged co-infection by the two viruses was observed (in a total of 35/64 plants), and single infection involving either the parent virus or the G617S mutant were also observed in a number of plants. These results suggest that the G617S mutation does not significantly affect the competitiveness of the mutant as compared to LMV-0 in susceptible lettuce.

A similar situation was observed with the S621T mutation (Figure 2C), since LMV-0 was observed alone in the systemic leaves in only nine plants out of a total of 48, whereas in 13 plants, LMV-0-S621T was the only virus detected and in 26 plants both viruses were still observed in co-infection.

Competition assays performed between LMV-0-G617S and LMV-0-A602V-G617S resulted in the counter-selection of the double mutant (Figure 2D).

Discussion

In this study, we showed that the propagation of five non-lettuce LMV isolates in *mo1*¹ and *mo1*² plants was accompanied by a gain of virulence correlated with the accumulation of mutations at positions 602 and/or 627 in the CI-C-terminal region, in all the independently selected virulent variants. Those mutations

Codon position	Susceptible <i>mo1</i> ⁰				Resistant <i>mo1</i> ¹					Resistant <i>mo1</i> ²			
	A602	G617	S621	A627	A602	G617	S621	A627	VPg S100	A602	G617	S621	A627
LMV-0-S621T	-	-	T	-	-	-	T	-	-	-	-	T	-
Evolved (1/5)	[Greyed out]									-	-	I	-
LMV-0-A602V-G617S	V	S	-	-	V	S	-	-	-	V	S	-	-
Reverted	A	S	-	-	[Greyed out]								
Evolved 1 ^a (1/9)	[Greyed out]				V	S	-	T	-	[Greyed out]			
Evolved 2 (1/9)	[Greyed out]				V	S/N	-	-	G	[Greyed out]			
Evolved 3 (2/18)	[Greyed out]									V	N	-	-
LMV-0-G617S-S621T	-	S	T	-	-	S	T	-	-	-	S	T	-
Evolved 1 (1/4)	[Greyed out]				V	S	T	-	-	[Greyed out]			
Evolved 2 (1/4)	[Greyed out]				-	S	T	T	-	[Greyed out]			
Evolved 3 (2/13)	[Greyed out]									-	N	T	T
Evolved 4 (1/13)	[Greyed out]									-	S	T	T
Evolved 5 (1/13)	[Greyed out]									-	N	I	-
LMV-0-A602V-G617S-S621T	V	S	T	-	V	S	T	-	-	V	S	T	-
Reverted	A	S	T	-	[Greyed out]								
Evolved 1 (1/3)	[Greyed out]				V	S	T	-	G	-	-	-	-
Evolved 2 (2/11)	[Greyed out]									V	N	T	-
Evolved 3 (1/11)	[Greyed out]									V	N	I	-
LMV-0-G617S-S621T-A627T	V	S	T	-	-	S	T	T	-	-	S	T	T
Evolved 1 (1/3)	[Greyed out]				-	S	T	T	G	[Greyed out]			
Evolved 2 (2/4)	[Greyed out]									-	N	T	T

Table 6: Summary of the amino acid changes observed in the CI-Cter to VPg genome region of LMV-0 mutants after passaging in susceptible or in resistant lettuce cultivars. The amino acid numbering is according to the genome sequence of LMV-0 (X97704). The position of the amino acids corresponds to the position in the CI protein or in the VPg sequence after maturation of the polyprotein. Mutations in susceptible plants (*mo1*⁰) were observed after 3 successive passages while changes in resistant plants (*mo1*¹ and *mo1*²) occurred during the first passage and were observed 60 days post inoculation. The number of independent clones acquiring the mutation is indicated between brackets. ^a An additional Y156V mutation is present in the VPg protein sequence.

were never selected in susceptible lettuce, in the absence of selection pressure. Whole genome sequencing of native and evolved isolates showed that no other mutation could be consistently associated with adaptation to the *mo1*¹ resistance. Such parallel evolution made both the A602V and A627T substitutions very interesting candidates for *mo1* virulence determinants, together with amino acid candidates at position 617 and 621 identified through the polymorphism analysis of the CI-Cter/VPg region of LMV isolates sampled worldwide. The role in *mo1*-breaking of each of those four amino acids was studied through reverse genetics experiments performed on an infectious cDNA clone of an avirulent LMV-0 isolate. We previously showed that the A602V substitution was not sufficient to confer virulence to LMV-0, in contrast to the S621T substitution, which conferred resistance-breaking properties (Abdul-Razzak et al., 2009). The experiments reported here show that the double mutation A602V-G617S is also sufficient to confer virulence to LMV-0, revealing a new mutational pathway and confirming that the C-terminus of the CI is directly involved in the overcoming of eIF4E-mediated resistance in lettuce.

Eventhough the statistical significance of the observation cannot be demonstrated, it is remarkable that for almost every mutant tested the rate of infection was lower in *mo1*¹ than in *mo1*² plants. Hence, mutations in the LMV-CI trigger only partial resistance-breaking with different efficiency for the two resistance allele. This emphasizes the possible cooperation between CI-Cter and VPg regions of LMV for complete *mo1*-resistance overcoming. In this study, the observed emergence of S100G mutation in the VPg of LMV-0 derived mutants progenies infecting *mo1*¹ lettuce argues in favor of this hypothesis.

The CI-Cter-VPg sequence of the large majority of the analyzed progenies of LMV-0 mutants was stable after propagation in

susceptible or resistant plants. However, an additional mutation at VPg position 100 was observed for some progenies of three mutants upon propagation in *mo1*¹, and for some mutants a proportion of the progenies acquired additional mutations in the CI sequence. In *mo1*¹ plants these additional mutations involved positions 602 or 627. In *mo1*² plants, besides position 627, mutations were observed at the two positions predicted to be under positive selection, 617 and 621. These results demonstrate the existence of differential mutational pathways, depending on the plant genotype. It is tempting to attribute this difference to the *mo1* allele present, but we cannot exclude an effect of the genetic background of the lettuce varieties used. Such a genetic background effect could explain why non-lettuce isolates were able to evolve towards resistance-breakdown in Salinas 88 plants but not in the early flowering line 8714132M, although both varieties carry the same *mo1*² allele. The effect of the host genetic background on the probability of appearance of resistance-breaking mutants of PVY and on the speed of fixation of these mutants was previously demonstrated by Quenouille et al. (2013). In the present study, it seems that the infection rate of LMV-0 resistance-breaking mutants and the stability of the resistance-breaking mutations in their progenies depend on both the allele at the *mo1* locus and the lettuce genetic background.

We also showed that LMV adaptation to *mo1* resistance depends on the viral genetic background. Indeed, in the non-lettuce isolate Tn517, the S617-T627 combination of mutations confer full resistance-breaking properties, contrarily to the situation in LMV-0. Similarly, variants with the V602-S617 and derived from CI574 infected 100% of the resistant plants while the corresponding mutations introduced in LMV-0 only allowed accumulation in 51% (*mo11*) to 75% (*mo12*) of

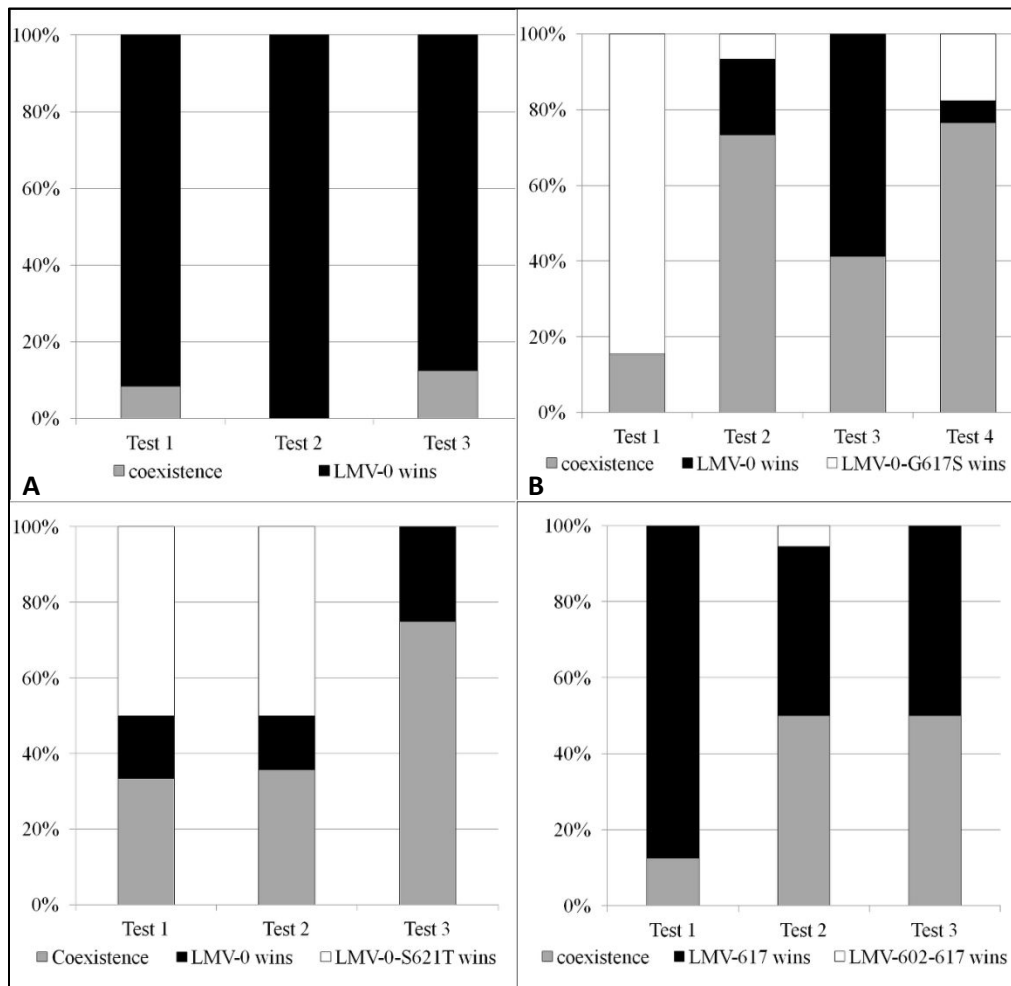


Figure 2: Outcome of the competitions between co-inoculated LMV isolates in the susceptible lettuce cultivar Trocadéro.

The graphs show the percentages of plants in which only one of the co-inoculated viruses was detected, or in which both viral isolates could still be detected at 10 to 20 days post inoculation. The combinations of competing viral isolates were: (A) LMV-0 vs LMV-0-A602V, (B) LMV-0 vs LMV-0-G617S, (C) LMV-0 vs LMV-0-S621T and (D) LMV-0-G617S vs LMV-0-A602V-G617S.

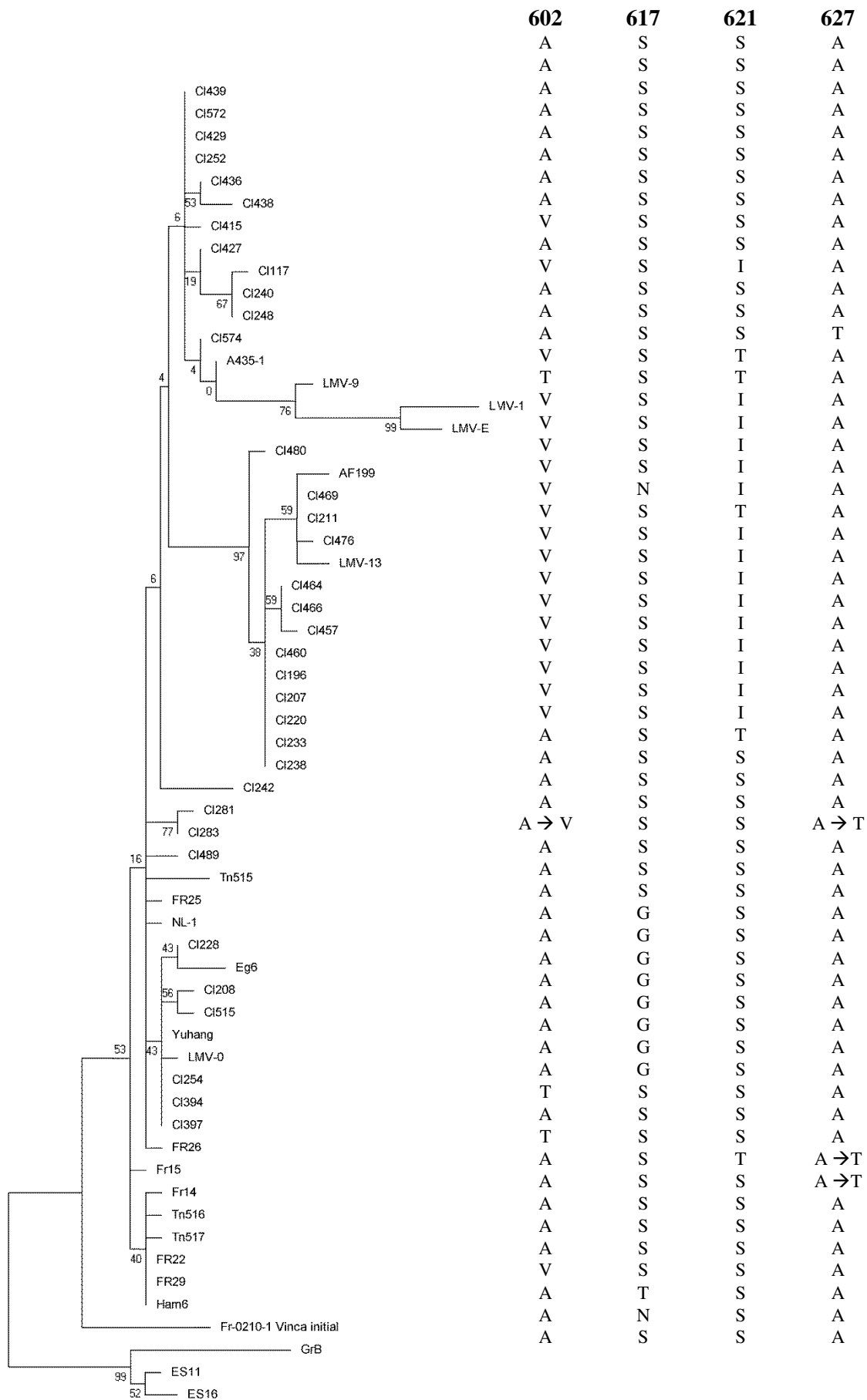
inoculated plants. Those results are in good agreement with those of Montarry et al. (2011) who showed that the viral genetic background surrounding the pathogenicity locus had a strong impact on the ability of PVY to evolve towards resistance-breaking since exchanging the CI cistron of a PVY isolate could confer to the resulting chimera an enhanced capacity break an eIF4E-mediated resistance in pepper. The mechanistic basis of this enhanced evolution capacity is unknown, but does not involve an increase in the global mutation rate of the virus.

The evolutionary constraints acting on the two virulence factors of LMV, CI-Cter and VPg was estimated from 81 sequences deposited in GenBank. The ω ratio was generally low, indicating that these virulence factors were globally under negative selection and that most amino acid changes were deleterious. However CI amino acid 617 was found to be under significant positive selection ($\omega > 1$), suggesting a role of this codon in the virus adaptation. In the course of all previous assays (Redondo et al., 2001; German-Retana et al., 2008a; Abdul-Razzak et al., 2009) and in the present study, the LMV-0 isolate never evolved towards resistance-breaking in *mo1*¹ or *mo1*² lettuce, contrary to the non-lettuce isolates which acquired mutations at positions 602 and/or 627. LMV-0 differs in particular by the presence of a Glycine at position 617 and the nature of the amino acid at this position seems to be cluster-specific. Presence of a glycine at this position (617G) is a common feature of lettuce LMV isolates belonging to the COMMON cluster, 617N is associated with the resistance-breaking MOST cluster and related isolates (Krause-Sakate et al., 2002) while 617S is associated with the rest of LMV clusters which essentially regroup non-lettuce isolates. Strikingly, none of the 617G-containing isolates tested so far was able to evolve towards resistance-breaking while 617S-containing isolates were (Candresse, Svanella-

Dumas et al., in preparation). In addition, in the CI-sequence of the 81 LMV isolates analyzed, the amino acids V/T602, T/N621, and T627, that tend to be associated with resistance-breaking, were never associated with G617, but always combined to S/N617. This leads to the hypothesis that S617 would be correlated with the “evolvability” of LMV towards virulence against *mo1* resistance, in association with other genetic determinants in the genome as discussed above. That this mutation alone is, however, not sufficient is clearly demonstrated by the observation that the single mutant LMV-0-G617S did not infect resistant lettuces and that no virulent variants emerged in its progeny.

Furthermore, the glycine at position 617 seems to be associated with adaptation of LMV to cultivated lettuce (*Lactuca sativa*). Indeed, on the basis of the CI-VPg phylogenetic tree rooted on the LMV Greek cluster, the ancestral codon at position 617 appears to be AGT (serine), suggesting that the acquisition of the GGT codon (glycine) is a posterior event specific to lettuce isolates. In the LMV COMMON cluster, only two isolates do not have the GGT codon at position 617 but AGT, and these are the only isolates from ornamental plants, strengthening the hypothesis that the GGT codon at position 617 could be associated with adaptation to lettuce. From a structural point of view, the replacement at position 617 of a small hydrophobic glycine by a large hydrophilic serine able to establish more hydrogen bonds, has the potential to impact the CI-Cter three dimensional folding. Unfortunately, no crystal structure has yet been obtained for the CI of any potyvirus and modeling is complicated by lack of close homologs of the potyviral CI (Sorel et al., 2014). Analysis of the CI-Cter sequence of LMV-0 with I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) predicted this region to consist of three intertwined α -helices, with the 617

Figure S2: LMV maximum likelihood phylogenetic tree based on CI-Cter-VPg sequence



0.005

amino acid located in a loop while the 3 other positions of interest (amino acids 602, 621 and 627) are embedded into the helices.

In order to understand why the *mo1* resistance remained durable in the field despite the virulent LMV variants that could be selected in our laboratory experiments, we studied the fitness of resistance-breaking LMV mutants. Indeed, the fitness cost associated with mutations involved in virulence has been reported to be important in predicting the resistance durability in several plant–virus pathosystems (Lecoq et al. 2004; Boyd 2006). We clearly demonstrated that the mutant LMV-0-A602V has a lower competitiveness than LMV-0. As a consequence, if such a mutation appears in a susceptible lettuce, the resulting virus would be counter-selected. These results match the observation of reversion events affecting A602V mutation in susceptible plants (Table 6). No clear competitiveness cost or improvement seems to be linked to G617S or S621T mutations. Moreover, the V602A reversion in LMV-0-A602V-G617S and LMV-0-A602V-G617S-S621T progenies after propagation in susceptible lettuce, tends to demonstrate that the addition of mutation G617S does not compensate the competitiveness cost of A602V in susceptible lettuce. This is in agreement with our results on the outcome of competition assays performed between LMV-0-G617S and LMV-0-A602-G617S that resulted in the counter-selection of the double mutant. It has been shown that the nature (transition or transversion) and the fitness cost of mutations are determinant in the capacity of resistance-breaking pathogens to appear and to accumulate (Ayme et al. 2007; Janzac et al. 2009; Fabre et al. 2009). In our case, the S621T mutation is a transversion (pyrimidin T to purin A) and consequently would be expected to have a lower probability to occur than a transition, preventing it from emerging in a viral population. Analysis of the LMV CI-

ter to VPg sequence alignment revealed a high transition/transversion ratio ($R = 8.98$, i. e. 18 times more transitions than transversions because when the two kinds of substitution are equally probable, there are twice as many possible transversions as transitions). Furthermore, COMMON LMV isolates, infecting lettuce crops and carrying a G617 are unlikely to evolve towards virulence, and consequently do not potentially endanger the *mo1* resistance durability. On the other hand, non-lettuce isolates proved to be able to infect susceptible lettuce and to evolve towards *mo1* resistance-breaking, representing a potential threat for *mo1* resistances durability. According to the analysis of LMV natural diversity very few exchanges between non-lettuce and lettuce compartments occurred. This lack of exchange between compartments could be attributed to a preference of insect vectors to feed on either weeds or cultivated lettuce. Furthermore, the non-lettuce isolates that evolved towards virulence are not seedborne in resistant lettuce (Candresse, Svanella-Dumas et al., in preparation). However we cannot exclude the hypothesis that in the field, the adaptation of LMV isolates to resistant lettuce could have also a consequence on aphid transmission efficiency, a feature that was not assessed in this study.

The majority of eIF4E-resistance breakdowns have been associated to date with mutations in the central region of VPg (Moury et al. 2004; Yeam et al. 2007; Charron et al. 2008). However besides the CI protein in the lettuce-LMV pathosystem, the P1 protein in the pea-Clover yellow vein virus (CIYVV) pathosystem was also described as involved in virulence against an eIF4E-mediated resistance (Nakahara et al. 2010). As for other potyviruses, the VPg of LMV was shown to interact with lettuce eIF4E in vitro (Michon et al. 2006; Roudet-Tavert et al. 2007; German-Retana et al. 2008a) and in vivo (German-Retana,

unpublished results). Recently, we demonstrated that the C-terminal end of LMV-CI is also able to interact with both the VPg and lettuce eIF4E with significant interaction for each combination considered (CI from virulent or avirulent virus isolates; eIF4E from susceptible or resistant lettuce) (Tavert-Roudet et al. 2012). Furthermore, binding of the CI-Cter region to the two resistance allelic forms of eIF4E or the susceptible one, is not affected by mutation S621T in the LMV-0 CI-Cter (Tavert-Roudet et al. 2012). Altogether these data indicate that eIF4E-mediated resistance breaking is under complex control in the lettuce/LMV pathosystem, and the mechanism proposed by Charon et al. (2008) postulating that susceptibility results from physical interaction between plant eIF4E and viral VPg, resistance results from disruption of the interaction mediated by amino acid changes in eIF4E; and resistance breakdown results from restoration of the interaction mediated by amino acid changes in the VPg, has been so far only demonstrated in pepper (*Capsicum spp.*).

The C-terminal region of the potyvirus CI protein was shown to be involved in the elicitation of defensive responses mediated by R genes and in interactions with host factors determining recessive resistance in different plant-potyvirus pathosystems (Jenner et al. 2000; Jenner 2002; Abdul-Razzak et al. 2009; Chowda-Reddy et al. 2011; Fujiwara et al. 2011). Moreover, CI has been shown to be an important determinant of the symptoms caused by potyviruses in productive infections (Chu et al. 1997; Redondo et al. 2001; Krause-Sakate et al. 2005; Faurez and Baldwin 2012). Therefore, the highly variable C-terminal part of the CI protein carries virulence determinants towards numerous plant resistances for different potyviruses (Sorel et al. 2014). This variability could be interpreted as a mean of adaptation to new hosts through interaction of the CI C-terminal region with host factors.

The C-terminus of LMV CI is probably part of a complex network of viral and cellular protein cooperation, involving VPg, eIF4E and possibly HC-Pro as well (Roudet-Tavert et al. 2007) and the translation initiation factor eIF4G, shown to be required for LMV infection in *Arabidopsis thaliana* (Nicaise et al. 2007). Such interactions should be crucial for eIF4E recruitment to different processes of the viral infection. The VPg of potyviruses is expected to contribute to both genome replication (Puustinen and Mäkinen 2004) and translation (Eskelin et al. 2011), which are mutually exclusive processes. In this context, mutually exclusive interactions of VPg with CI or cellular eIF4E might conceivably be associated with replication and translation, respectively. In such a scenario, eIF4E-mediated resistance would be hypothesized to interfere with replication and/or translation either by a defect on VPg/eIF4E interactions (overcome by mutations in VPg) or by interference of CI in this interaction (overcome either by VPg or CI mutations); since mutations in P1 can also suppress eIF4E-based resistance, P1 would be expected to be involved in any of these interactions.

Furthermore, there is abundant evidence of a close relationship between replication complexes and viral movement (Tilsner and Oparka 2012), thus eIF4E-based resistance could act at the level of virus cell-to-cell movement as well, as it has also been postulated for some pea and lettuce resistance genes (Gao et al. 2004; German-Retana et al. 2003). In lettuce, the *mo1²* allele restricts the intercellular movement of the avirulent isolate LMV-0 and affects its loading and unloading from the phloem (German-Retana et al. 2003). The eIF4E/LMV CI interaction could therefore contribute somehow to the cell-to-cell and long-distance movement process. More effort, however, is still needed to understand this network and the underlying function(s) that

are associated with the viral and host protein interactions involved.

Acknowledgements

This work was performed within the framework of collaborative programs with Chili and Tunisia coordinated by O. Le Gall and T. Candresse. M. Sorel was supported by a fellowship from the French Ministry of Education. We thank E. Hébrard, and B. Moury for fruitful discussion, and R. Krause-Sakate, M. Rosales and H. Fakhfakh for assistance in LMV isolate sampling in Chili and Tunisia. We thank A. Poque and T. Mauduit for taking care of the plants.

References

- Abdul-Razzak, A, Guiraud, T, Peypelut, M, Walter, J, Houvenaghel, M-C, Candresse, T, Le Gall, O, German-Retana, S. 2009. Involvement of the cylindrical inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against Lettuce mosaic potyvirus. *Mol. Plant Pathol.* 10: 109–113.
- Adams, MJ, Antoniw, JF, Fauquet, CM. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Arch. Virol.* 150: 459–79.
- Adams, MJ, King, AM, Lefkowitz, E, Carstens, EB. 2011. Part II: The viruses - Family Potyviridae. In: *Virus Taxonomy - Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, p 1069–1090.
- 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.
- Ala-Poikela, M, Goytia, E, Haikonen, T, Rajamäki, M-L, Valkonen, JPT. 2011. Helper component proteinase of the genus Potyvirus is an interaction partner of translation initiation factors eIF(iso)4E and eIF4E and contains a 4E binding motif. *J. Virol.* 85: 6784–94.
- Ammar, E, Rodriguez-Cerezo, E, Shaw, J, Pirone, T. 1994. Association of virions and coat protein of tobacco vein mottling potyvirus with cylindrical inclusions in tobacco cells. *Phytopathology* 84: 520–524.
- Andrade, M, Abe, Y, Nakahara, K, Uyeda, I. 2009. The *cyv-2* resistance to Clover yellow vein virus in pea is controlled by the eukaryotic initiation factor 4E. *J. Gen. Plant Pathol.* 75: 241–249.
- Andrade, M, Sato, M, Uyeda, I. 2007. Two Resistance Modes to Clover yellow vein virus in Pea Characterized by a Green Fluorescent Protein-Tagged Virus. *Phytopathology* 97: 544–50.
- Arbatova, J, Lehto, K, Pehu, E, Pehu, T. 1998. Localization of the P1 protein of potato Y potyvirus in association with cytoplasmic inclusion bodies and in the cytoplasm of infected cells. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 10: 2319–23.
- Atabekov, JG, Rodionova, NP, Karpova, O V, Kozlovsky, S V, Poljakov, VY. 2000. The movement protein-triggered in situ conversion of potato virus X virion RNA from a nontranslatable into a translatable form. *Virology* 271: 259–63.
- Ayme, V. 2005. Mécanismes de contournement des résistances et évolution a priori de leur durabilité dans l'interaction Piment (*Capsicum annum* L.) - Virus Y de la pomme de terre (PVY). 175pp.
- Ayme, V, Petit-Pierre, J, Souche, S, Palloix, A, Moury, B. 2007. Molecular dissection of the potato virus Y VPg virulence factor reveals complex adaptations to the *pvr2* resistance allelic series in pepper. *J. Gen. Virol.* 88: 1594–601.
- Ayme, V, Souche, S, Caranta, C, Jacquemond, M, Chadoeuf, J, Palloix, A, Moury, B. 2006. Different mutations in the genome-linked protein VPg of potato virus Y confer virulence on the *pvr2(3)* resistance in pepper. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 19: 557–63.
- Beauchemin, C, 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. *J. Virol.* 81: 10905–10913.
- Bertheau Y, Fréchon D, Toth IK, HL. 2002. DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR). In: M. C. M. PEROMBELON & J. M. VAN DER WOLF, editor. *Methods for the detection and quantification of Erwinia carotovora subsp. atroseptica (Pectobacterium carotovorum subsp.*

- atrosepticum) on potatoes: a laboratory manual. Scottish Crop Research Institute Occasional Publication No. 10, p 47–48.
- Bilgin, DD, Liu, Y, Schiff, M, Dinesh-Kumar, SP. 2003. P58IPK, a Plant Ortholog of Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase PKR Inhibitor, Functions in Viral Pathogenesis. *Dev. Cell* 4: 651–661.
- Blom, N, Gammeltoft, S, Brunak, S. 1999. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* 294: 1351–1362.
- Den Boon, J a, Ahlquist, P. 2010. Organelle-like membrane compartmentalization of positive-strand RNA virus replication factories. *Annu. Rev. Microbiol.* 64: 241–56.
- Boyd, LA. 2006. Can the durability of resistance be predicted? *J. Sci. Food Agric.* 86: 2523–2526.
- Brault, V, Uzest, M, Monsion, B, Jacquot, E, Blanc, S. 2010. Aphids as transport devices for plant viruses. *C. R. Biol.* 333: 524–538.
- Bruylants, G, Wouters, J, Michaux, C. 2005. Differential scanning calorimetry in life science: thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design. *Curr. Med. Chem.* 12: 2011–20.
- Calder, VL, Ingerfeld, M. 1990. The roles of the cylindrical inclusion protein of a potyvirus in the induction of vesicles and in cell-to-cell spread. *J. Struct. Biol.* 105: 62–66.
- 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.
- Charron, C, Nicolai, M, Gallois, J-L, Robaglia, C, Moury, B, Palloix, A, Caranta, C. 2008. Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *Plant J.* 54: 56–68.
- Chen, S, Das, P, Hari, V. 1994. In situ localization of ATPase activity in cells of plants infected by maize dwarf mosaic potyvirus. *Arch. Virol.* 134: 433–439.
- Chiba, S, Kondo, H, Miyanishi, M, Andika, IB, Han, CG, Tamada, T. 2010. The Evolutionary History of Beet necrotic yellow vein virus Deduced from Genetic Variation, Geographical Origin and Spread, and the Breaking of Host Resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24: 207–218.
- Chisholm, ST, Mahajan, SK, Whitham, S a, Yamamoto, ML, Carrington, JC. 2000. Cloning of the Arabidopsis RTM1 gene, which controls restriction of long-distance movement of tobacco etch virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 489–94.
- Choi, I-R, Stenger, DC, French, R. 2000. Multiple Interactions among Proteins Encoded by the Mite-Transmitted Wheat Streak Mosaic Tritimovirus. *Virology* 267: 185–198.
- Chowda-Reddy, R V, Sun, H, Hill, JH, Poysa, V, Wang, A. 2011. Simultaneous mutations in multi-viral proteins are required for soybean mosaic virus to gain virulence on soybean genotypes carrying different R genes. *PLoS One* 6: e28342.
- Chu, M, Lopez-Moya, JJ, Llave-Correas, C, Pirone, TP. 1997. Two Separate Regions in the Genome of the Tobacco Etch Virus Contain Determinants of the Wilting Response of Tabasco Pepper. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 472–480.
- Chung, BY-W, Miller, WA, Atkins, JF, Firth, AE. 2008. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 5897–902.
- Clark, MF, Adams, a N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475–83.
- Contreras-Paredes, C a, Silva-Rosales, L, Daròs, J-A, Alejandri-Ramírez, ND, Dinkova, TD, Alejandri-Ramirez, ND. 2012. The absence of eukaryotic initiation factor eIF(iso)4E affects the systemic spread of a Tobacco etch virus isolate in Arabidopsis thaliana. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26: 461–70.
- Cosson, P, Sofer, L, Le, QH, Léger, V, Schurdi-Levraud, V, Whitham, S a, Yamamoto, ML, Gopalan, S, Le Gall, O, Candresse, T, Carrington, JC, Revers, F. 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. *Plant Physiol.* 154: 222–32.

- 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. *J. Virol.* 83: 10460–71.
- Cronin, S, Verchot, J, Haldeman-Cahill, R, Schaad, MC, Carrington, JC. 1995. Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* 7: 549–59.
- Culver, JN. 1997. Viral Avirulence Genes. In: Stacey, G, Keen, N, editors. *Plant-microbe Interactions 2 SE - 6*. Springer US, p 196–219.
- Dangl, J, Horvath, D, Staskawicz, B. 2013. Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Deployment. *Science (80-.)*. 341: 746–751.
- David-Ferreira, J, Borges, M. 1958. Virus na célula vegetal obseracoes ao microscopio electronico I-Virus Y da batateira. *Bol. da Soc. Broteriana* 32: 329–332.
- Decroocq, V, Salvador, B, Sicard, O, Glasa, M, Cosson, P, Svanella-Dumas, L, Revers, F, García, JA, Candresse, T. 2009. The Determinant of Potyvirus Ability to Overcome the RTM Resistance of *Arabidopsis thaliana* Maps to the N-Terminal Region of the Coat Protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22: 1302–1311.
- Decroocq, V, Sicard, O, Alamillo, JM, Lansac, M, Eyquard, JP, García, JA, Candresse, T, Le Gall, O, Revers, F. 2006. Multiple Resistance Traits Control Plum pox virus Infection in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19: 541–549.
- Delpont, W, Poon, AFY, Frost, SDW, Kosakovsky Pond, SL. 2010. Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinforma.* 26 : 2455–2457.
- Desbiez, C, Chandeysson, C, Lecoq, H, Moury, B. 2012. A simple, rapid and efficient way to obtain infectious clones of potyviruses. *J. Virol. Methods* 183: 94–7.
- Diaz-Pendon, JA, Truniger, V, Nieto, C, Garcia-Mas, J, Bendahmane, A, Aranda, MA. 2004. Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Mol. Plant Pathol.* 5: 223–233.
- Dinant, S, Lot, H. 1992. Lettuce mosaic virus. *Plant Pathol.* 41: 528–542.
- Dolja, V V, Haldeman, R, Robertson, NL, Dougherty, WG, Carrington, JC. 1994. Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO J.* 13: 1482–91.
- Dolja, V V, 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.
- Dougherty, WG, Hiebert, E. 1980. Translation of potyvirus RNA in a rabbit reticulocyte lysate: Identification of nuclear inclusion proteins as products of tobacco etch virus RNA translation and cylindrical inclusion protein as a product of the potyvirus genome. *Virology* 104: 174–182.
- Dunoyer, P, Thomas, C, Harrison, S, Revers, F, Maule, A. 2004. A Cysteine-Rich Plant Protein Potentiates Potyvirus Movement through an Interaction with the Virus Genome-Linked Protein VPg A Cysteine-Rich Plant Protein Potentiates Potyvirus Movement through an Interaction with the Virus Genome-Linked Protein VPg. 78.
- Duprat, A, Caranta, C, Revers, F, Menand, B, Browning, KS, Robaglia, C. 2002. The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant J.* 32: 927–934.
- Eagles, RM, Balmori-Melián, E, Beck, DL, Gardner, RC, Forster, RL. 1994. Characterization of NTPase, RNA-binding and RNA-helicase activities of the cytoplasmic inclusion protein of tamarillo mosaic potyvirus. *Eur. J. Biochem.* 224: 677–84.
- Edwardson, J, Christie, R, Ko, N. 1984. Potyvirus cylindrical inclusions - Subdivision IV. *Phytopathology* 74: 1111–1114.
- Edwardson, JR. 1966. Cylindrical Inclusions in the Cytoplasm of Leaf Cells Infected with Tobacco Etch Virus. *Science (80-.)*. 153: 883–884.

- Edwardson, JR. 1992. Inclusion bodies. In: Barnett Jr., O, editor. *Potyvirus Taxonomy SE - 3*. Springer Vienna, p 25–30.
- Edwardson, JR. 1974. Some Properties of the Potato Virus Y-group. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Edwardson, JR, Christie, RG. 1978. Use of Virus-Induced Inclusions in Classification and Diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 16: 31–55.
- Elena, SF, Bedhomme, S, Carrasco, P, Cuevas, JM, de la Iglesia, F, Lafforgue, G, Lalić, J, Pròsper, A, Tromas, N, Zwart, MP. 2011. The evolutionary genetics of emerging plant RNA viruses. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 24: 287–93.
- English, JJ, Davenport, GF, Elmayer, T, Vaucheret, H, Baulcombe, DC. 1997. Requirement of sense transcription for homology-dependent virus resistance and trans-inactivation. *Plant J.* 12: 597–603.
- Eskelin, K, Hafrén, A, Rantalainen, KI, Mäkinen, K. 2011. Potyviral VPg enhances viral RNA translation and inhibits reporter mRNA translation in planta. *J. Virol.*
- Eskelin, K, Suntio, T, Hyvärinen, S, Hafren, a, Mäkinen, K. 2010. Renilla luciferase-based quantitation of Potato virus A infection initiated with *Agrobacterium* infiltration of *N. benthamiana* leaves. *J. Virol. Methods* 164: 101–10.
- Fabre, F, Bruchou, C, Palloix, A, Moury, B. 2009. Key determinants of resistance durability to plant viruses: Insights from a model linking within- and between-host dynamics. *Virus Res.* 141: 140–149.
- Fairman-Williams, ME, Guenther, U, Jankowsky, E. 2010. SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20: 313–324.
- Faurez, F, Baldwin, T. 2012. Identification of new Potato virus Y (PVY) molecular determinants for the induction of vein necrosis in tobacco. *Mol. plant ...* 13: 948–959.
- Fernández, a, Guo, HS, Sáenz, P, Simón-Buela, L, Gómez de Cedrón, M, García, J a. 1997. The motif V of plum pox potyvirus CI RNA helicase is involved in NTP hydrolysis and is essential for virus RNA replication. *Nucleic Acids Res.* 25: 4474–80.
- Fernández, A, Laín, S, García, JA. 1995. RNA helicase activity of the plum pox potyvirus CI protein expressed in *Escherichia coli*. Mapping of an RNA binding domain. *Nucleic Acids Res.* 23 : 1327–1332.
- Flor, HH. 1971. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9: 275–296.
- Fraser, RSS. 1992. The genetics of plant-virus interactions: implications for plant breeding. *Euphytica* 63: 175–185.
- Fujiwara, A, Inukai, T, Kim, BM, Masuta, C. 2011. Combinations of a host resistance gene and the CI gene of turnip mosaic virus differentially regulate symptom expression in *Brassica rapa* cultivars. *Arch. Virol.* 156: 1575–81.
- Gabrenaite-Verkhovskaya, R, Andreev, I a, Kalinina, NO, Torrance, L, Taliansky, ME, Mäkinen, K. 2008. Cylindrical inclusion protein of potato virus A is associated with a subpopulation of particles isolated from infected plants. *J. Gen. Virol.* 89: 829–38.
- Le Gall, O. 2011. Chapter 9 : Plant resistances to viruses mediated by translation initiation factors. In: Caranta, C, Aranda, M a, Tepfer, M, Lopez-Moya, JJ, editors. *Recent Advances in Plant Virology.*, p 177.
- Gallois, J-L, Charron, C, Sánchez, F, Pagny, G, Houvenaghel, M-C, Moretti, A, Ponz, F, Revers, F, Caranta, C, German-Retana, S. 2010. Single amino acid changes in the turnip mosaic virus viral genome-linked protein (VPg) confer virulence towards *Arabidopsis thaliana* mutants knocked out for eukaryotic initiation factors eIF(iso)4E and eIF(iso)4G. *J. Gen. Virol.* 91: 288–93.
- Gao, Z, Eysers, S, Thomas, C, Ellis, N, Maule, a. 2004. Identification of markers tightly linked to sbm recessive genes for resistance to Pea seed-borne mosaic virus. *Theor. Appl. Genet.* 109: 488–94.
- García-Ruiz, H, Takeda, A, Chapman, EJ, Sullivan, CM, Fahlgren, N, Brempelis, KJ, Carrington, JC. 2010. *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection. *Plant Cell* 22: 481–96.

- German-Retana, S, Candresse, T, Alias, E, Delbos, RP, Le Gall, O. 2000. Effects of green fluorescent protein or beta-glucuronidase tagging on the accumulation and pathogenicity of a resistance-breaking Lettuce mosaic virus isolate in susceptible and resistant lettuce cultivars. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 13: 316–24.
- German-Retana, S, Redondo, E, Tavert-Roudet, G, Le Gall, O, Candresse, T. 2003. Introduction of a NIa proteinase cleavage site between the reporter gene and HC-Pro only partially restores the biological properties of GUS- or GFP-tagged LMV. *Virus Res.* 98: 151–162.
- German-Retana, S, Walter, J, Doublet, B, Roudet-Tavert, G, Nicaise, V, Lecampion, C, Houvenaghel, M-C, Robaglia, C, Michon, T, Le Gall, O. 2008a. Mutational analysis of plant cap-binding protein eIF4E reveals key amino acids involved in biochemical functions and potyvirus infection. *J. Virol.* 82: 7601–12.
- German-Retana, S, Walter, J, Le Gall, O. 2008b. Lettuce mosaic virus : from pathogen diversity to host interactors. *Mol. Plant Pathol.* 9: 127–136.
- Goldbach, R, Wellink, J, Verver, J, Kammen, A, Kasteel, D, Lent, J. 1994. Adaptation of positive-strand RNA viruses to plants. *Arch. Virol. supplementum* 9: 87–97.
- Gómez de Cedrón, M, Osaba, L, López, L, García, JA. 2006. Genetic analysis of the function of the plum pox virus CI RNA helicase in virus movement. *Virus Res.* 116: 136–45.
- Goodman, AG, Fornek, JL, Medigeshi, GR, Perrone, L a, Peng, X, Dyer, MD, Proll, SC, Knoblauch, SE, Carter, VS, Korth, MJ, Nelson, J a, Tumpey, TM, Katze, MG. 2009. P58(IPK): a novel “CIHD” member of the host innate defense response against pathogenic virus infection. *PLoS Pathog.* 5: e1000438.
- Gorbalenya, E, Koonin, E V. 1993. Helicases : amino acid sequence comparisons relationships and of Medical. *Current* 3: 419–429.
- 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. *J. Virol.* 86: 9255–65.
- Graybosch, R, Hellmann, GM, Shaw, JG, Rhoads, RE, Hunt, AG. 1989. Expression of a potyvirus non-structural protein in transgenic tobacco. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160: 425–432.
- Guo, D, Rajamäki, ML, Saarma, M, Valkonen, JP. 2001. Towards a protein interaction map of potyviruses: protein interaction matrixes of two potyviruses based on the yeast two-hybrid system. *J. Gen. Virol.* 82: 935–9.
- Hafrén, A, Eskelin, K, Mäkinen, K. 2013. Ribosomal protein P0 promotes Potato virus A infection and functions in viral translation together with VPg and eIF(iso)4E. *J. Virol.* 87: 4302–12.
- Haikonen, T, Rajamäki, M-L, Tian, Y-P, Valkonen, JPT. 2013. Mutation of a Short Variable Region in HCpro Protein of Potato virus A Affects Interactions with a Microtubule-Associated Protein and Induces Necrotic Responses in Tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26: 721–733.
- Hajimorad, MR, Eggenberger, a L, Hill, JH. 2008. Adaptation of Soybean mosaic virus avirulent chimeras containing P3 sequences from virulent strains to Rsv1-genotype soybeans is mediated by mutations in HC-Pro. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 21: 937–46.
- Hajimorad, MR, Wen, R-H, Eggenberger, a L, Hill, JH, Maroof, M a S. 2011. Experimental adaptation of an RNA virus mimics natural evolution. *J. Virol.* 85: 2557–64.
- Hart, J, Griffiths, P. 2013. A series of eIF4E alleles at the Bc-3 locus are associated with recessive resistance to Clover yellow vein virus in common bean. *Theor. Appl. Genet.* 126: 2849–2863.
- Hayes, A, Jeong, S, Gore, M, Yu, Y. 2004. Recombination within a nucleotide-binding-site/leucine-rich-repeat gene cluster produces new variants conditioning resistance to soybean mosaic virus in soybeans. *Genetics* 166: 493–503.
- Hébrard, E, Bessin, Y, Michon, T, Longhi, S, Uversky, VN, Delalande, F, Van Dorsselaer, A, Romero, P, Walter, J, Declerck, N, Fargette, D. 2009. Intrinsic disorder in

- Viral Proteins Genome-Linked: experimental and predictive analyses. *Viol. J.* 6: 23.
- Hiebert, E, McDonald, JG. 1973. Characterization of some proteins associated with viruses in the potato Y group. *Virology* 56: 349–361.
- Hiebert, E, Purcifull, DE, Christie, RG, Christie, SR. 1971. Partial purification of inclusions induced by tobacco etch virus and potato virus Y. *Virology* 43: 638–646.
- Hipper, C, Brault, V, Ziegler-Graff, V, Revers, F. 2013. Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. *Front. Plant Sci.* 4.
- Huet, H, Gal-On, A, Meir, E, Lecoq, H, Raccah, B. 1994. Mutations in the helper component protease gene of zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility. *J. Gen. Virol.* 75 : 1407–1414.
- Immink, R, Tonaco, I, de Folter, S, Shchennikova, A, van Dijk, A, Busscher-Lange, J, Borst, J, Angenent, G. 2009. SEPALLATA3: the “glue” for MADS box transcription factor complex formation. *Genome Biol.* 10: R24.
- Janzac, B, Fabre, F, Palloix, A, Moury, B. 2009. Constraints on evolution of virus avirulence factors predict the durability of corresponding plant resistances. *Mol. Plant Pathol.* 10: 599–610.
- Jenner, C. 2002. Mutations in Turnip mosaic virus P3 and Cylindrical Inclusion Proteins Are Separately Required to Overcome Two Brassica napus Resistance Genes. *Virology* 300: 50–59.
- Jenner, CE, Sánchez, F, Nettleship, SB, Foster, GD, Ponz, F, Walsh, J a. 2000. The cylindrical inclusion gene of Turnip mosaic virus encodes a pathogenic determinant to the Brassica resistance gene TuRB01. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 13: 1102–8.
- Jiang, J, Laliberté, J-F. 2011. The genome-linked protein VPg of plant viruses-a protein with many partners. *Curr. Opin. Virol.* 1: 347–54.
- Jiménez, I, López, L, Alamillo, JM, Valli, a, García, J a. 2006. Identification of a plum pox virus CI-interacting protein from chloroplast that has a negative effect in virus infection. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 19: 350–8.
- Kadaré, G, Haenni, A. 1997. Virus-encoded RNA helicases. *J. Virol.* 71: 2583–2590.
- Kang, B-C, Yeam, I, Jahn, MM. 2005. Genetics of plant virus resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 581–621.
- Kasschau, KD, Carrington, JC. 1998. A Counterdefensive Strategy of Plant Viruses: Suppression of Posttranscriptional Gene Silencing. *Cell* 95: 461–470.
- 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, Carrington, JC. 1995. Requirement for HC-Pro Processing during Genome Amplification of Tobacco Etch Potyvirus. *Virology* 209: 268–273.
- Kasschau, KD, Cronin, S, Carrington, JC. 1997. Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology* 228: 251–62.
- Kekarainen, T, Savilahti, H, Valkonen, JPT. 2002. Functional genomics on potato virus A: virus genome-wide map of sites essential for virus propagation. *Genome Res.* 12: 584–94.
- Kelley, LA, Sternberg, MJE. 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.* 4: 363–371.
- Ben Khalifa, M, Simon, V, Fakhfakh, H, Moury, B. 2012. Tunisian Potato virus Y isolates with unnecessary pathogenicity towards pepper: support for the matching allele model in eIF4E resistance-potyvirus interactions. *Plant Pathol.* 61: 441–447.
- Khan, MA, Miyoshi, H, Gallie, DR, Goss, DJ. 2008. Potyvirus Genome-linked Protein, VPg, Directly Affects Wheat Germ in Vitro Translation: INTERACTIONS WITH TRANSLATION INITIATION FACTORS eIF4F AND eIFiso4F . *J. Biol. Chem.* 283 : 1340–1349.
- Khatabi, B, Fajolu, O, Wen, R-H, Hajimorad, MR. 2012. of North American isolates of Soybean mosaic virus for gain of virulence

- on Rsv-genotype soybeans with special emphasis on resistance-breaking determinants on. *Mol. Plant Pathol.* 13: 1077–1088.
- Klein, P, Klein, R, Rodriguez-Cerezo, E. 1994. Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. *Virology* 204: 759–769.
- Kodama, Y, Wada, M. 2009. Simultaneous visualization of two protein complexes in a single plant cell using multicolor fluorescence complementation analysis. *Plant Mol. Biol.* 70: 211–7.
- Kostrub, CF, Lei, EP, Enoch, T. 1998. Use of gap repair in fission yeast to obtain novel alleles of specific genes. *Nucleic Acids Res.* 26: 4783–4.
- Krause-Sakate, R, Le Gall, O, Fakhfakh, H, Peypelut, M, Marrakchi, M, Varveri, C, Pavan, M a, Souche, S, Lot, H, Zerbini, FM, Candresse, T. 2002. Molecular and Biological Characterization of Lettuce mosaic virus (LMV) Isolates Reveals a Distinct and Widespread Type of Resistance-Breaking Isolate: LMV-Most. *Phytopathology* 92: 563–72.
- Krause-Sakate, R, Redondo, E, Richard-Forget, F, Jadão, AS, Houvenaghel, M-C, German-Retana, S, Pavan, MA, Candresse, T, Zerbini, FM, Le Gall, O. 2005. Molecular mapping of the viral determinants of systemic wilting induced by a Lettuce mosaic virus (LMV) isolate in some lettuce cultivars. *Virus Res.* 109: 175–80.
- Laín, S, Martín, MT, Riechmann, JL, García, JA. 1991. Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection: nucleic acid-stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicase-like protein. *J. Virol.* 65: 1–6.
- Laín, S, Riechmann, J, Martín, MT, García, JA. 1989. Homologous potyvirus and flavivirus proteins belonging to a superfamily of helicase-like proteins. *Gene* 82: 357–362.
- Laín, S, Riechmann, JL, García, JA. 1990. RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic Acids Res.* 18: 7003–7006.
- Lakatos, L, Csorba, T, Pantaleo, V, Chapman, EJ, Carrington, JC, Liu, Y-P, Dolja, V V, Calvino, LF, Lopez-Moya, JJ, Burgyan, J. 2006. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J* 25: 2768–2780.
- Langenberg, WG. 1991. Cylindrical inclusion bodies of wheat streak mosaic virus and three other potyviruses only self-assemble in mixed infections. *J. Gen. Virol.* 72: 493–497.
- Langenberg, WG. 1993. Structural Proteins of Three Viruses in the Potyviridae Adhere Only to Their Homologous Cylindrical Inclusions in Mixed Infections. *J. Struct. Biol.* 110: 188–195.
- Langenberg, WG. 1986. Virus Protein Association with Cylindrical Inclusions of Two Viruses that Infect Wheat. *J. Gen. Virol.* 67: 1161–1168.
- Langenberg, WG, Purcifull, DE. 1989. Interactions between pepper ringspot virus and cylindrical inclusions of two potyviruses. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* 102: 53–58.
- Lawson, RH, Hearon, SS. 1971. The association of pinwheel inclusions with plasmodesmata. *Virology* 44: 454–456.
- Lawson, RH, Hearon, SS, Smith, FF. 1971. Development of pinwheel inclusions associated with sweet potato russet crack virus. *Virology* 46: 453–463.
- Lecoq, H, Moury, B, Desbiez, C, Palloix, A, Pitrat, M. 2004. Durable virus resistance in plants through conventional approaches: a challenge. *Virus Res.* 100: 31–39.
- Lellis, AD, Kasschau, KD, Whitham, SA, Carrington, JC. 2002. Loss-of-Susceptibility Mutants of *Arabidopsis thaliana* Reveal an Essential Role for eIF(iso)4E during Potyvirus Infection. *Curr. Biol.* 12: 1046–1051.
- Léonard, S, Plante, D, Wittmann, S, Daigneault, N, Fortin, MG, Laliberté, JF. 2000. Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *J. Virol.* 74: 7730–7.
- Licitra, EJ, Liu, JO. 1996. A three-hybrid system for detecting small ligand–protein receptor interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 : 12817–12821.
- Linder, P. 2004. Molecular biology. The life of RNA with proteins. *Science* 304: 694–5.

- López, L, Urzainqui, a, Domínguez, E, García, J a. 2001. Identification of an N-terminal domain of the plum pox potyvirus CI RNA helicase involved in self-interaction in a yeast two-hybrid system. *J. Gen. Virol.* 82: 677–86.
- Maiti, IB, Murphy, JF, Shaw, JG, Hunt, AG. 1993. Plants that express a potyvirus proteinase gene are resistant to virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90 : 6110–6114.
- Maroof, M a. S, Tucker, DM, Skoneczka, J a., Bowman, BC, Tripathy, S, Tolin, S a. 2010. Fine Mapping and Candidate Gene Discovery of the Soybean Mosaic Virus Resistance Gene, Rsv4. *Plant Genome J.* 3: 14.
- Merits, A, Guo, D, Järvekülg, L, Saarma, M. 1999. Biochemical and genetic evidence for interactions between potato A potyvirus-encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex. *Virology* 263: 15–22.
- Merits, A, Rajamäki, M-L, Lindholm, P, Runeberg-Roos, P, Kekarainen, T, Puustinen, P, Mäkeläinen, K, Valkonen, JPT, Saarma, M. 2002. Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells. *J. Gen. Virol.* 83: 1211–1221.
- Michon, T, Estevez, Y, Walter, J, German-Retana, S, Le Gall, O. 2006. The potyviral virus genome-linked protein VPg forms a ternary complex with the eukaryotic initiation factors eIF4E and eIF4G and reduces eIF4E affinity for a mRNA cap analogue. *FEBS J.* 273: 1312–22.
- Montarry, J, Doumayrou, J, Simon, V, Moury, B. 2011. Genetic background matters : a plant-virus gene-for-gene interaction is strongly influenced by genetic contexts. *Mol. Plant Pathol.* 12: 911–920.
- Moury, B, Caromel, B, Johansen, E, Simon, V, Chauvin, L, Jacquot, E, Kerlan, C, Lefebvre, V. 2011. The Helper Component Proteinase Cistron of Potato virus Y Induces Hypersensitivity and Resistance in Potato Genotypes Carrying Dominant Resistance Genes on Chromosome IV. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24: 787–797.
- Moury, B, Morel, C, Johansen, E, Guilbaud, L, Souche, S, Ayme, V, Caranta, C, Palloix, A, Jacquemond, M. 2004. Mutations in potato virus Y genome-linked protein determine virulence toward recessive resistances in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 17: 322–9.
- Murrell, B, Moola, S, Mabona, A, Weighill, T, Sheward, D, Kosakovsky Pond, SL, Scheffler, K. 2013. FUBAR: A Fast, Unconstrained Bayesian AppRoximation for Inferring Selection. *Mol. Biol. Evol.* 30 : 1196–1205.
- Murrell, B, Wertheim, JO, Moola, S, Weighill, T, Scheffler, K, Kosakovsky Pond, SL. 2012. Detecting Individual Sites Subject to Episodic Diversifying Selection. *PLoS Genet* 8: e1002764.
- Nagyová, A, Kamencayová, M, Glasa, M, Šubr, Z. 2012. The 3'-proximal part of the Plum pox virus P1 gene determinates the symptom expression in two herbaceous host plants. *Virus Genes* 44: 505–512.
- Nakahara, KS, Shimada, R, Choi, S-H, Yamamoto, H, Shao, J, Uyeda, I. 2010. Involvement of the P1 cistron in overcoming eIF4E-mediated recessive resistance against Clover yellow vein virus in pea. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 23: 1460–9.
- Nicaise, V, Gallois, J-L, Chafiai, F, Allen, LM, Schurdi-Levraud, V, Browning, KS, Candresse, T, Caranta, C, Le Gall, O, German-Retana, S. 2007. Coordinated and selective recruitment of eIF4E and eIF4G factors for potyvirus infection in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 581: 1041–6.
- Nicaise, V, German-retana, S, Sanjua, R, Dubrana, M, Mazier, M, Maisonneuve, B, Candresse, T, Caranta, C, Legall, O. 2003. The Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Controls Lettuce Susceptibility to the Potyvirus Lettuce mosaic virus. *Plant Physiol.* 132: 1272–1282.
- Oh, C-S, Carrington, JC. 1989. Identification of essential residues in potyvirus proteinase HC-pro by site-directed mutagenesis. *Virology* 173: 692–699.
- Otulak, K, Garbaczewska, G. 2012. Cytopathological potato virus Y structures during Solanaceous plants infection. *Micron* 43: 839–50.

- Pallas, V, García, JA. 2011. How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *J. Gen. Virol.* 92: 2691–705.
- Palloix, A, Ayme, V, Moury, B. 2009. Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytol.* 183: 190–199.
- Palukaitis, P, Carr, JP. 2008. plant resistance responses to viruses. 153–171.
- Pierce, MM, Raman, CS, Nall, BT. 1999. Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods* 19: 213–21.
- Pond, SLK, Frost, SDW. 2005a. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinforma.* 21 : 2531–2533.
- Pond, SLK, Frost, SDW. 2005b. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Mol. Biol. Evol.* 22: 1208–22.
- Pond, SLK, Frost, SDW, Grossman, Z, Gravenor, MB, Richman, DD, Brown, AJL. 2006. Adaptation to Different Human Populations by HIV-1 Revealed by Codon-Based Analyses. *PLoS Comput Biol* 2: e62.
- Poon, AFY, Lewis, FI, Frost, SDW, Kosakovsky Pond, SL. 2008. Spidermonkey: rapid detection of co-evolving sites using Bayesian graphical models. *Bioinforma.* 24 : 1949–1950.
- Puig, O, Caspary, F, Rigaut, G, Rutz, B, Bouveret, E, Bragado-Nilsson, E, Wilm, M, Séraphin, B. 2001. The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification. *Methods* 24: 218–229.
- Purcifull, DE, Hiebert, E, McDonald, JG. 1973. Immunochemical specificity of cytoplasmic inclusions induced by viruses in the potato Y group. *Virology* 55: 275–279.
- Puustinen, P, Mäkinen, K. 2004. Uridylylation of the potyvirus VPg by viral replicase N1b correlates with the nucleotide binding capacity of VPg. *J. Biol. Chem.* 279: 38103–10.
- Quenouille, J, Montarry, J, Palloix, A, Moury, B. 2013. Farther, slower, stronger: how the plant genetic background protects a major resistance gene from breakdown. *Mol. Plant Pathol.* 14: 109–118.
- Rajamäki, M-L, Kelloniemi, J, Alminaitte, A, Kekarainen, T, Rabenstein, F, Valkonen, JPT. 2005. A novel insertion site inside the potyvirus P1 cistron allows expression of heterologous proteins and suggests some P1 functions. *Virology* 342: 88–101.
- Rajamäki, M-L, Valkonen, JPT. 2009. Control of nuclear and nucleolar localization of nuclear inclusion protein a of picorna-like Potato virus A in *Nicotiana* species. *Plant Cell* 21: 2485–502.
- Rajamäki, M-L, Valkonen, JPT. 2002. Viral genome-linked protein (VPg) controls accumulation and phloem-loading of a potyvirus in inoculated potato leaves. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 15: 138–49.
- Redondo, E, Krause-Sakate, R, Yang, S-J, Lot, H, Le Gall, O, Candresse, T. 2001. Lettuce mosaic virus Pathogenicity Determinants in Susceptible and Tolerant Lettuce Cultivars Map to Different Regions of the Viral Genome. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 804–810.
- Revers, F, Lot, H, Souche, S, Le Gall, O, Candresse, T, Dunez, J. 1997a. Biological and molecular variability of lettuce mosaic virus isolates. *Phytopathology* 87: 397–403.
- Revers, F, Yang, SJ, Walter, J, Souche, S, Lot, H, Le Gall, O, Candresse, T, Dunez, J. 1997b. Comparison of the complete nucleotide sequences of two isolates of lettuce mosaic virus differing in their biological properties. *Virus Res.* 47: 167–177.
- Riechmann, JL, Laín, S, García, JA. 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J. Gen. Virol.* 73 : 1–16.
- Roberts, IM, Wang, D, Findlay, K, Maule, a J. 1998. Ultrastructural and temporal observations of the potyvirus cylindrical inclusions (CIs) show that the CI protein acts transiently in aiding virus movement. *Virology* 245: 173–81.
- Rodríguez-Cerezo, E, Ammar, ED, Pirone, TP, Shaw, JG. 1993. Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *J. Gen. Virol.* 74: 1945–1949.

- Rodríguez-Cerezo, E, Findlay, K, Shaw, JG, Lomonossoff, GP, Qiu, SG, Linstead, P, Shanks, M, Risco, C. 1997. The coat and cylindrical inclusion proteins of a potyvirus are associated with connections between plant cells. *Virology* 236: 296–306.
- 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.
- Roudet-Tavert, G, Michon, T, Walter, J, Delaunay, T, Redondo, E, Le Gall, O. 2007. Central domain of a potyvirus VPg is involved in the interaction with the host translation initiation factor eIF4E and the viral protein HcPro. *J. Gen. Virol.* 88 : 1029–1033.
- Ruffel, S, Dussault, M-H, Palloix, A, Moury, B, Bendahmane, A, Robaglia, C, Caranta, C. 2002. A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J.* 32: 1067–75.
- Sáenz, P, Cervera, MT, Dallot, S, Quiot, L, Quiot, J-B, Riechmann, JL, García, JA. 2000. Identification of a pathogenicity determinant of Plum pox virus in the sequence encoding the C-terminal region of protein P3+6K1. *J. Gen. Virol.* 81 : 557–566.
- Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual - Volume 1.* NY: CSH Laboratory Press.
- Schaad, MC, Anderberg, RJ, Carrington, JC. 2000. Strain-specific interaction of the tobacco etch virus NIa protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. *Virology* 273: 300–6.
- Schaad, MC, Jensen, PE, Carrington, JC. 1997a. Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J.* 16: 4049–59.
- Schaad, MC, Lellis, AD, Carrington, JC. 1997b. VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *J. Virol.* 71 : 8624–8631.
- Scholthof, KG, Adkins, S, Czosnek, H, Palukaitis, P, Jacquot, E, Hohn, T, Hohn, B, Saunders, K, Candresse, T, Ahlquist, P, Hemenway, C, Foster, GD. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 12: 938–954.
- Schwer, B. 2001. A new twist on RNA helicases: DExH/D box proteins as RNPsases. *Nat. Struct. Biol.* 8: 113–6.
- Seo, J-K, Lee, S-H, Kim, K-H. 2009. Strain-specific cylindrical inclusion protein of soybean mosaic virus elicits extreme resistance and a lethal systemic hypersensitive response in two resistant soybean cultivars. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 22: 1151–9.
- Seo, J-K, Sohn, S-H, Kim, K-H. 2011. A single amino acid change in HC-Pro of soybean mosaic virus alters symptom expression in a soybean cultivar carrying Rsv1 and Rsv3. *Arch. Virol.* 156: 135–41.
- Shand, K, Theodoropoulos, C, Stenzel, D, Dale, JL, Harrison, MD. 2009. Expression of Potato virus Y cytoplasmic inclusion protein in tobacco results in disorganization of parenchyma cells, distortion of epidermal cells, and induces mitochondrial and chloroplast abnormalities, formation of membrane whorls and atypical lipid a. *Micron* 40: 730–736.
- Siemering, KR, Golbik, R, Sever, R, Haseloff, J. 1996. Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr. Biol.* 6: 1653–1663.
- Sikorski, RS, Hieter, P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 19–27.
- Spetz, C, Valkonen, JPT. 2004. Potyviral 6K2 protein long-distance movement and symptom-induction functions are independent and host-specific. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 17: 502–10.
- Suh, SJ, Bowman, BC, Jeong, N, Yang, K, Kastl, C, Tolin, S a., Maroof, M a. S, Jeong, S-C. 2011. The Rsv3 Locus Conferring Resistance to Soybean Mosaic Virus is Associated with a Cluster of Coiled-Coil Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat Genes. *Plant Genome J.* 4: 55.

- Sun, L, Bian, J, Andika, IB, Hu, Y, Sun, B, Xiang, R, Kondo, H, Chen, J. 2013. Nucleocytoplasmic shuttling of VPg encoded by wheat yellow mosaic virus requires association with the coat protein. *J. Gen. Virol.* .
- Syller, J. 2005. The roles and mechanisms of helper component proteins encoded by potyviruses and caulimoviruses. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 67: 119–130.
- Tamura, K, Peterson, D, Peterson, N, Stecher, G, Nei, M, Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731–2739.
- Tavert-Roudet, G, Abdul-Razzak, a, Doublet, B, Walter, J, Delaunay, T, German-Retana, S, Michon, T, Le Gall, O, Candresse, T. 2012. The C terminus of lettuce mosaic potyvirus cylindrical inclusion helicase interacts with the viral VPg and with lettuce translation eukaryotic initiation factor 4E. *J. Gen. Virol.* 93: 184–93.
- Tena Fernández, F, González, I, Doblas, P, Rodríguez, C, Sahana, N, Kaur, H, Tenllado, F, Praveen, S, Canto, T. 2013. The influence of cis-acting P1 protein and translational elements on the expression of Potato virus Y helper-component proteinase (HCPro) in heterologous systems and its suppression of silencing activity. *Mol. Plant Pathol.* 14: 530–41.
- Thompson, JD, Gibson, TJ, Plewniak, F, Jeanmougin, F, Higgins, DG. 1997. The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Res.* 25 : 4876–4882.
- Tilsner, J, Oparka, KJ. 2012. Missing links? — The connection between replication and movement of plant RNA viruses. *Curr. Opin. Virol.* 2: 705–711.
- Tomlinson, JA. 1962. CONTROL OF LETTUCE MOSAIC BY THE USE OF HEALTHY SEED. *Plant Pathol.* 11: 61–64.
- Tribodet, M, Glais, L, Kerlan, C, Jacquot, E. 2005. Characterization of Potato virus Y (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVYN isolates in infected *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. *J. Gen. Virol.* 86 : 2101–2105.
- Truniger, V, Aranda, M a. 2009. Recessive resistance to plant viruses. Elsevier.
- Urcuqui-Inchima, S, Haenni, A-L, Bernardi, F. 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res.* 74: 157–175.
- Valli, A, Martín-Hernández, AM, López-Moya, JJ, García, JA. 2006. RNA Silencing Suppression by a Second Copy of the P1 Serine Protease of Cucumber Vein Yellowing Ipomovirus, a Member of the Family Potyviridae That Lacks the Cysteine Protease HCPro. *J. Virol.* 80 : 10055–10063.
- Verchot, J, Carrington, JC. 1995. Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. *J. Virol.* 69: 3668–74.
- Verchot, J, Koonin, E V, Carrington, JC. 1991. The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology* 185: 527–535.
- 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.
- Voinnet, O, Rivas, S, Mestre, P, Baulcombe, D. 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33: 949–56.
- Wang, A, Krishnaswamy, S. 2012. Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. *Mol. Plant Pathol.*: 1–9.
- Wang, X, Kohalmi, SE, Svircev, A, Wang, A, Sanfaçon, H, Tian, L. 2013. Silencing of the Host Factor eIF(iso)4E Gene Confers Plum Pox Virus Resistance in Plum. *PLoS One* 8: e50627.
- Weber, G. 1953. Rotational Brownian Motion and Polarization of the Fluorescence of Solutions. In: *Advances in Protein Chemistry Volume 8 SE - Advances in Protein Chemistry.* Elsevier, p 415–459.

- Wei, T, Huang, T-S, McNeil, J, Laliberté, J-F, Hong, J, Nelson, RS, Wang, A. 2010a. Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant potyvirus replication. *J. Virol.* 84: 799–809.
- Wei, T, Wang, A. 2008. Biogenesis of Cytoplasmic Membranous Vesicles for Plant Potyvirus Replication Occurs at Endoplasmic Reticulum Exit Sites in a COPI- and COPII-Dependent Manner. *J. Virol.* 82: 12252–12264.
- Wei, T, Zhang, C, Hong, J, Xiong, R, Kasschau, KD, Zhou, X, Carrington, JC, Wang, A. 2010b. Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathog.* 6: e1000962.
- Weinthal, D, Tzfira, T. 2009. Imaging protein-protein interactions in plant cells by bimolecular fluorescence complementation assay. *Trends Plant Sci.* 14: 59–63.
- Weintraub, M, Ragetli, HWJ. 1970. Distribution of viruslike particles in leaf cells of *Dianthus barbatus* infected with carnation vein mottle virus. *Virology* 40: 868–881.
- Wen, R-H, Hajimorad, MR. 2010. Mutational analysis of the putative pipo of soybean mosaic virus suggests disruption of PIPO protein impedes movement. *Virology* 400: 1–7.
- Wen, R-H, Khatabi, B, Ashfield, T, Saghai Maroof, M a, Hajimorad, MR. 2013. The HC-Pro and P3 cistrons of an avirulent Soybean mosaic virus are recognized by different resistance genes at the complex Rsv1 locus. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 26: 203–15.
- Wittmann, S, Chatel, H, Fortin, MG, Laliberté, JF. 1997. Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* 234: 84–92.
- Wittner, A, Palkovics, L, Balázs, E. 1998. *Nicotiana benthamiana* plants transformed with the plum pox virus helicase gene are resistant to virus infection. *Virus Res.* 53: 97–103.
- Wroblewski, T, Tomczak, A, Michelmore, R. 2005. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol. J.* 3: 259–73.
- YanHong, Q, DongMei, L, Tao, Z, ZaiFeng, F. 2009. Immuno-localization of the CI protein of Sugarcane mosaic virus in the phloem cells of maize. *Acta Phytopylacica Sin.* 36: 234–238.
- Yeam, I, Cavatorta, JR, Ripoll, DR, Kang, B-C, Jahn, MM. 2007. Functional dissection of naturally occurring amino acid substitutions in eIF4E that confers recessive potyvirus resistance in plants. *Plant Cell* 19: 2913–28.
- Yoshii, M, Nishikiori, M, Tomita, K, Yoshioka, N, Kozuka, R, Naito, S, Ishikawa, M. 2004. The *Arabidopsis Cucumovirus* Multiplication 1 and 2 Loci Encode Translation Initiation Factors 4E and 4G. *J. Virol.* 78 : 6102–6111.
- You, Y, Shirako, Y. 2012. Influence of amino acid at position 132 in VPg on replication and systemic infection of Barley yellow mosaic virus. *Virus Res.* 166: 121–124.
- Zechmann, B, Müller, M, Zellnig, G. 2003. Cytological modifications in zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)-infected Styrian pumpkin plants. *Arch. Virol.* 148: 1119–1133.
- Zhang, C, Hajimorad, MR, Eggenberger, AL, Tsang, S, Whitham, S a, Hill, JH. 2009. Cytoplasmic inclusion cistron of Soybean mosaic virus serves as a virulence determinant on Rsv3-genotype soybean and a symptom determinant. *Virology* 391: 240–8.
- Zhang, Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9: 40.
- Zilian, E, Maiss, E. 2011. Detection of plum pox potyviral protein–protein interactions in planta using an optimized mRFP-based bimolecular fluorescence complementation system. *J. Gen. Virol.* 92: 2711–2723.

Résultats supplémentaires

Au sein de cet axe de recherche, d'autres tests de compétition ont été réalisés mais n'ont pas été intégrés dans l'article. Il s'agit de tests réalisés sur laitue résistante *mo1*² visant à mettre en compétition le LMV-0-S621T et le LMV-0-A602V-G617S entre eux. Le nombre de répétitions n'étant pas suffisant et les résultats redondants avec les conclusions tirées du taux d'infection de chacun de ces virus sur laitue *mo1*², il n'a pas été jugé utile de les signaler.

En effet, les tests présentés dans la Figure 1.1 présentent des résultats contradictoires puisque dans deux cas le double mutant LMV-0-A602V-G617S est le virus majoritairement trouvé dans les feuilles systémiques alors que dans le premier car c'est le simple mutant LMV-0-S621T qui se trouve majoritaire dans les feuilles systémiques. Dans les trois cas un mélange des deux virus est détecté dans les feuilles inoculées, indiquant que les deux virus ont bien été capables d'établir des foyers d'infection primaire.

De même, lors de chaque test de compétition l'accumulation virale a également été comparée. Pour cela, chaque virus compétiteur était parallèlement inoculé seul dans 12 laitues trocadero. Les trois premières feuilles de chacune de ces plantes ont été prélevées simultanément aux prélèvements des compétitions puis la charge virale a été estimée par DAS-ELISA semi-quantitatif. Ces résultats, malgré une variabilité inter-plantes, n'ont révélé aucune différence significative d'accumulation entre le LMV-0 et les clones mutés LMV-0-A602V et LMV-0-S621T (Figure 1.2). Cependant, de façon reproductible le virus LMV-0-G617S a été détecté à un niveau plus bas que le LMV-0. Il semblerait donc qu'un coût de fitness soit tout de même imposé au LMV-0 en plante sensible lorsqu'il acquiert la mutation G617S, mais que celui-ci ne soit pas révélé par les tests de compétition.

Ainsi, le LMV-0-G617S s'accumule reproductiblement à un niveau plus bas que le LMV-0 en plante sensible lorsqu'il est seul mais sa mise en compétition au sein d'une plante ne résulte jamais au même résultat. Une hypothèse émise lors de discussions avec R. Froissart (CIRAD, Montpellier) stipule que la mutation G617S pourrait générer un goulet d'étranglement, ne laissant qu'une faible portion non représentative de la population virale atteindre les feuilles systémiques. Ce goulet serait responsable du caractère aléatoire de l'issue de la compétition entre LMV-0 et LMV-0-G617S mais également de la faible accumulation virale de ce dernier. Cette hypothèse pourrait être confirmée par mesure de l'accumulation virale totale dans les

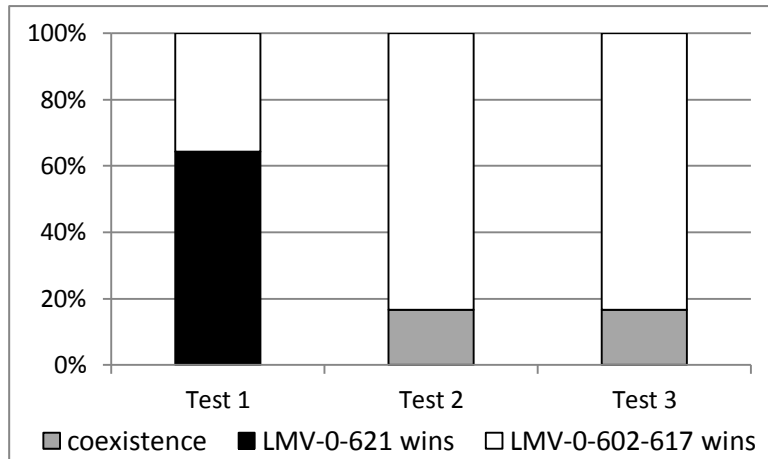


Figure 1.1 : Graphique représentant l'issue de 3 tests mettant en compétition LMV-0-S621T et LMV-0-A602V-G617S dans des laitues *mo1*²

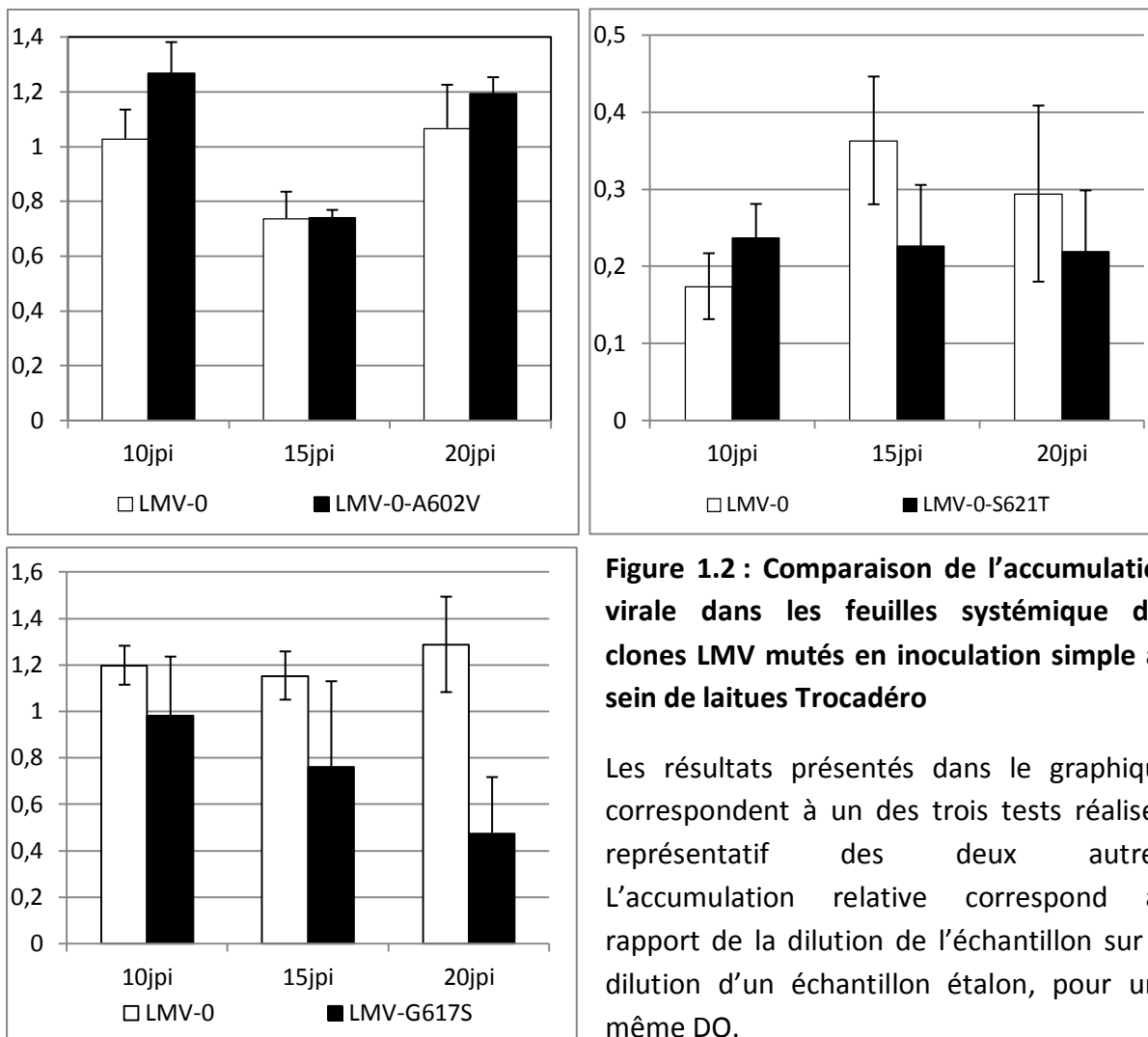


Figure 1.2 : Comparaison de l'accumulation virale dans les feuilles systémique des clones LMV mutés en inoculation simple au sein de laitues Trocadéro

Les résultats présentés dans le graphique correspondent à un des trois tests réalisés, représentatif des deux autres. L'accumulation relative correspond au rapport de la dilution de l'échantillon sur la dilution d'un échantillon étalon, pour une même DO.

laitues auxquelles les 2 virus ont été inoculés, comparativement à l'accumulation en inoculation simple.

Les mutations identifiées sont bien impliquées dans le contournement des résistances *mo1*, en coopération avec le fond génétique du virus

Parmi les 4 mutations candidates identifiées au sein de la diversité naturelle du LMV, trois d'entre elles ont un effet sur le phénotype de contournement du LMV-0, la mutation S621T et la combinaison A602V-G617S sont suffisantes à l'acquisition de la virulence sur laitues *mo1*¹ et *mo1*². En revanche, l'introduction de la mutation A627T seule ou en combinaison avec G617S (comme c'est le cas dans les isolats non-laitue évolués) dans le LMV-0 ne lui confère pas la capacité de contourner les résistances *mo1*. Cependant, cette mutation est apparue spontanément durant l'infection de laitues résistantes par plusieurs des clones contournants. Ainsi, elle semble tout de même posséder un rôle dans l'adaptation du virus à l'allèle d'*eIF4E*.

La détection d'une pression de sélection positive sur les positions 617 et 621 souligne leur importance dans l'adaptation du virus aux contraintes de l'hôte, alors que la position 602 dont la mutation engendre un coût de fitness, est plutôt soumise à une sélection purificatrice visant à conserver une très faible diversité à cette position. La position 627, quant à elle, n'est polymorphe qu'au sein du LMV-9 qui présente l'acide aminé 627T.

Aucune donnée structurale n'est disponible pour la région C-terminale de la CI puisque celle-ci est très variable, sans homologie avec des protéines dont la structure a été résolue, et n'a pas encore pu être cristallisée. Nous ne pouvons donc pas tirer de conclusions quant aux possibles implications structurales de ces différentes mutations. Cependant d'après la séquence de la CI-Cter, les logiciels Phire² et I-Tasser ont prédit une organisation de cette région en 3 hélices. D'après la modélisation I-Tasser, ces trois hélices seraient entremêlées (Figure 1.3). De façon intéressante, l'acide aminé 617 et possiblement l'acide aminé 621 se trouveraient dans une boucle située entre 2 hélices. Par ailleurs, l'alignement de séquences CI-Cter de plusieurs potyvirus, comme celle présentée dans la revue de synthèse bibliographique, montre que le LMV comme le TuMV possèdent 8 acides aminés de plus que

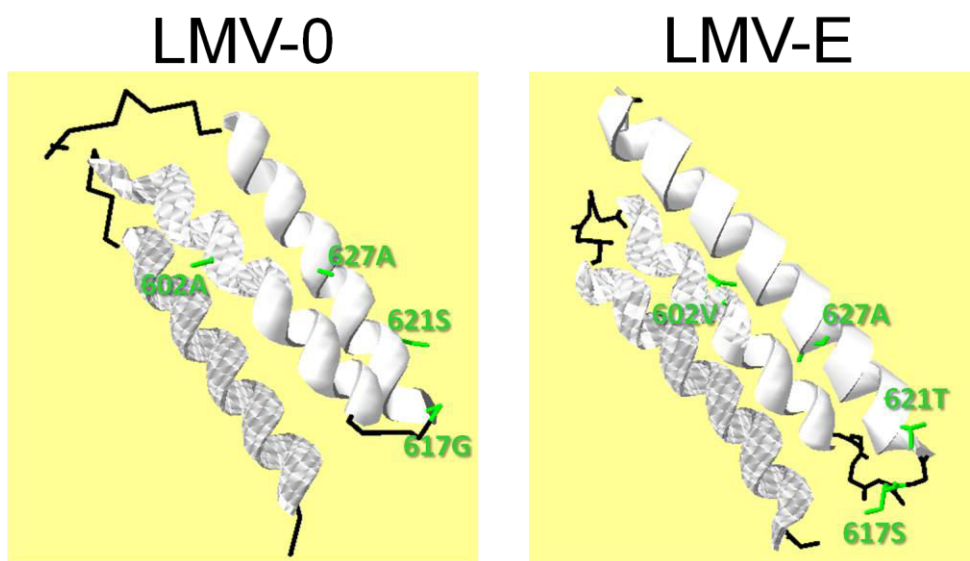


Figure 1.3 : Modélisation de la structure 3D de la région CI-Cter du LMV par I-TASSER
Les acides aminés d'intérêt sont signalés en vert.

la majorité des autres potyvirus. De façon surprenante, cette région coïncide avec la portion de la CI qui contient les acides aminés 617 et 621. Ainsi, il est probable que l'implication de la CI-Cter dans le contournement des résistances associées à eIF4E soit confinée à ces quelques espèces de potyvirus possédant ce trait particulier. Ceci expliquerait pourquoi la CI n'avait jusqu'alors jamais été identifiée comme facteur de virulence vis-à-vis des résistances de ce type.

Chapitre 2

Les fonctions de la CI dans le mouvement de cellule à cellule et dans le contournement des résistances mo1 sont-elles liées ?

Contexte de l'étude

- I. Les mutations de contournement sont-elles impliquées dans le mouvement du virus ?
- II. La région C-terminale de la CI du LMV participe-t-elle au recrutement de la protéine aux plasmodesmes ?

Contexte de l'étude

La résistance $mo1^2$ affecte le mouvement du virus

Le mouvement du LMV au sein de plantes sensibles et résistantes a été observé précédemment au laboratoire grâce à l'utilisation de virus marqués dérivés de LMV-0 et LMV-E : ces virus comportent une insertion de la séquence codant pour l'un ou l'autre des gènes rapporteurs *GUS* ou *GFP* au sein de leur génome entre les séquences P1 et HcPro (German-Retana et al., 2003). L'introduction d'un site de clivage reconnu par la protéase virale NIa en aval du gène marqueur permet l'excision de la protéine marqueur qui se trouve ainsi exprimée sous forme libre dans les cellules infectées. Le pouvoir infectieux de ces virus taggués n'est pas modifié sur plante sensible par rapport aux virus non marqués (German-Retana et al., 2003).

Il a été observé que le LMV-0-GUS-clvHC ou le LMV-0-GFP-clvHC établissent des foyers d'infection sur plante sensible Salinas ($mo1^0$) comme sur plante résistante Salinas 88 ($mo1^2$), mais que ceux-ci diffèrent par leur surface au cours du temps. En effet, le LMV-0 semble avoir un mouvement de cellule à cellule ralenti sur plante résistante (German-Retana et al., 2008a). De plus, des expériences de greffage ont permis de révéler une inhibition du chargement et du déchargement du phloème du LMV-0 dans les plantes résistantes. Ainsi, l'incapacité du LMV-0 à établir une infection systémique chez Salinas 88 semble être liée à l'accumulation de blocages à ces trois étapes, ces blocages étant liés uniquement à la présence d'un allèle de résistance du gène *mo1* codant pour une forme mutée d'eIF4E, puisque les cultivars Salinas et Salinas 88 sont quasi-isogéniques excepté pour l'allèle au locus *mo1*. Ainsi, le facteur eIF4E de la laitue pourrait être impliqué dans le mouvement du LMV au sein de la plante. Cependant, il ne peut être exclu que le ralentissement global du mouvement du virus soit aussi corrélé à une diminution de la réplication de celui-ci. En effet, l'impact de la résistance *mo1* sur la réplication du virus n'a jamais pu être testé, du fait de la grande difficulté expérimentale d'obtenir des protoplastes issus des différents cultivars de laitue en vue de les infecter.

La CI est impliquée dans le mouvement du virus

Comme précédemment décrit dans la revue bibliographique, la protéine CI est essentielle au mouvement de cellule à cellule des potyvirus. Elle est recrutée aux plasmodesmes *via* son interaction avec la protéine P3N-PIPO et γ forme des structures coniques, lesquelles pourraient permettre de diriger la forme de mouvement du virus vers les plasmodesmes et de faciliter son passage au travers de ceux-ci. Selon les diverses études de génétique inverse menées sur plusieurs pathosystèmes, il semblerait que les régions N-terminale et C-terminale de la CI soient impliqués à des degrés différents dans ce processus. La nécessité ou non de l'activité hélicase de la région centrale de la CI

pour le mouvement du virus n'a pu être mise en évidence, du fait de l'incapacité actuelle de dissocier mouvement et réplication mais cette hypothèse ne peut être exclue.

La CI-Cter est impliquée dans le contournement de la résistance conférée par eIF4E

Les travaux entrepris au laboratoire ces dernières années, par Anas Abdul-razzak et Thomas Guiraud (Abdul-Razzak et al., 2009), et dont la continuation fait l'objet du Chapitre 1 de cette thèse ont permis de démontrer que la protéine CI du LMV et plus particulièrement la région C-terminale de celle-ci est un facteur de virulence vis-à-vis de la résistance *mo1*, conférée par des mutations au sein de la protéine eIF4E de la laitue. Quatre acides aminés ont été identifiés comme participant au contournement des résistances *mo1* chez la laitue. Cependant, les rouages de ce contournement partiel sont encore inconnus.

Aux vues de ces faisceaux d'informations, une hypothèse peut être posée : la résistance *mo1* bloquerait, ou limiterait, le mouvement du virus au sein de la plante et ce blocage serait levé par l'acquisition des mutations de contournement au sein de la CI-Cter. Cette hypothèse permettrait à la fois d'attribuer une fonction claire à la résistance conférée par *eIF4E* chez la laitue et également d'établir une fonction hypothétique pour la région C-terminale de la CI des potyvirus.

Pour éprouver cette théorie, nous avons suivi 2 axes de façon parallèle dans ce chapitre : I) d'une part, l'effet des mutations de contournement dans la CI-Cter sur le mouvement du virus au sein des plantes résistantes *mo1*¹ et *mo1*² versus *mo1*⁰ a été évalué par étiquetage à la GFP des virus mutants contournants d'intérêt, permettant le suivi de l'expansion des foyers d'infection sur plante sensible et résistante ; II) d'autre part, la possible implication de la CI-Cter dans le mouvement du virus et plus particulièrement l'adressage aux plasmodesmes par l'interaction avec P3N-PIPO a été examinée par observation de la localisation subcellulaire de la CI et de la CI-Cter, étiquetées avec la GFP, en présence de la protéine P3N-PIPO ou de l'ensemble des partenaires viraux.

1. Les mutations de contournement mises en évidence dans la CI-Cter du LMV sont-elles impliquées dans le mouvement du virus ?

1.1 Mise au point du protocole expérimental

1.1.a Obtention des clones marqués à la GFP

Les clones mutants d'intérêt sélectionnés en vue du suivi du mouvement de cellule à cellule sont le LMV-0-A602V, LMV-0-A602V-G617S, LMV-0-S621T et le LMV-0-A602V-G617S-S621T. Ceux-ci sont tous dérivés du clone LMV-0-K7, contenant l'ADNc complet infectieux du LMV-0 cloné dans un

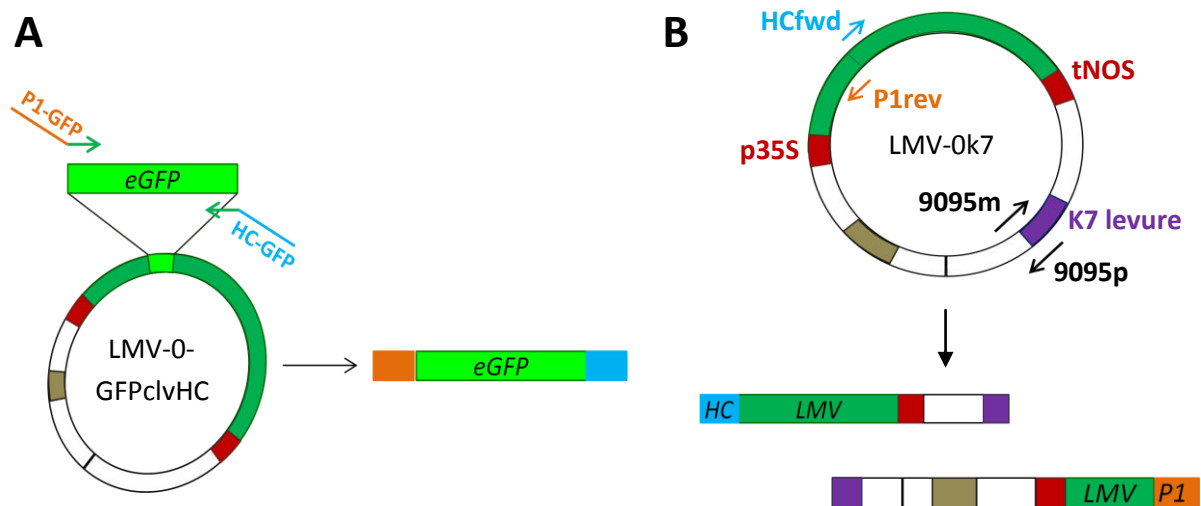


Figure 2.11 : Réactions de PCR chevauchantes réalisées pour le clonage de la région codant pour la GFP, entre les régions P1 et Hc-Pro dans le plasmide LMV-0k7.

(A) Amplification par PCR de la région codant pour eGFP avec des amorces aux extrémités flottantes, P1-GFP et HC-GFP. (B) Amplification du vecteur LMV-0k7 lors de deux PCR « longue distance », réalisées avec les couples d’amorces P1rev/9095p et Hcfwd/9095m respectivement, permettant d’obtenir deux fragments chevauchant au niveau de la zone 9095 de la séquence du LMV-0-K7 (en violet sur la figure).

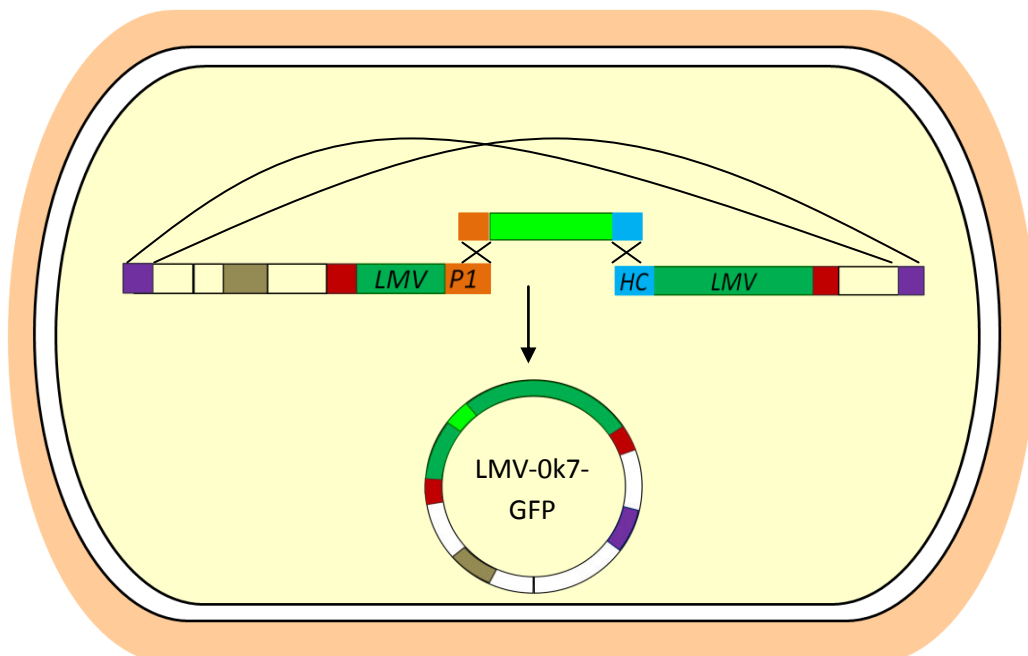


Figure 2.2 : Assemblage des produits de PCR par recombinaison homologue chez la levure *S. cerevisiae* pour reconstituer un clone d’ADNc complet de LMV exprimant la GFP.

vecteur navette capable de se répliquer dans *E. Coli* comme dans *S. cerevisiae* et d'être exprimé chez la plante (promoteur 35S et terminateur NOS). Le clone ayant servi à la construction du LMV-0-K7 comporte des mutations vis-à-vis de la séquence du LMV-0 publiée dans GenBank (Revers et al., 1997, accession n° X97704.2), et par conséquent avec celle du LMV-0-GFPclvHC décrit par German-Retana et al. (2003). C'est pourquoi un nouveau clone de LMV-0 marqué à la GFP a également été généré : le LMV-0K7-GFP.

L'introduction de la séquence codant pour l'eGFP (Siemering et al., 1996) entre les séquences P1 et HcPro est réalisée par recombinaison homologue chez la levure (cf matériel et méthode III.A). La séquence eGFP du LMV-0-GFPclvHC est amplifiée par PCR à l'aide d'amorces introduisant de part et d'autre du produit d'amplification de courtes séquences de 30 nt homologues à celles de la fin de la P1 et du début de HcPro, et en introduisant un site de clivage reconnu par la Nla en aval de l'eGFP, conformément à ce décrit par German-Retana et al. (2003) (Figure 2.1). La région correspondant au vecteur de clonage est quant à elle amplifiée par 2 PCR divergentes au niveau de la jonction P1-HcPro et chevauchantes à leur autre extrémité (figure 2.1 et Tableau M.3). La recombinaison homologue est alors réalisée par co-transformation de ces 3 produits d'amplification dans la levure YPH 501 (Figure 2.2). Les plasmides ainsi obtenus ont été vérifiés par digestion enzymatique et séquençage de la région CI-Cter, puis inoculés par biolistique sur laitue sensible.

I.1.b Détermination de la fenêtre de temps pour l'observation des foyers d'infection

Dans l'optique d'établir une cinétique de l'accroissement des foyers d'infection, il a été choisi d'observer lesdits foyers à plusieurs temps après inoculation. Pour déterminer la fenêtre d'étude la plus appropriée, les premières observations ont été réalisées tous les jours de 1 à 7 jours post-inoculation (jpi), puis à 10jpi et 15jpi. Les observations faites à 1 jpi (12 et 24 heures post inoculation) et 2 jpi ont été réalisées à partir de portions de feuille prélevées, observées au microscope à épifluorescence. Elles visent à quantifier le nombre de cellules fluorescentes par foyer alors que les observations suivantes ont été réalisées à l'aide d'une loupe binoculaire couplée à une lampe UV et un filtre GFP (Excitation 450-490nm, Réception 500-550nm) dans le but d'estimer la surface de chaque foyer fluorescent à l'aide du logiciel d'analyse d'image ImageJ. Ces dernières observations sont réalisées sur la feuille entière, sans la couper de la plante.

Dans les figures 2.3 et 2.4 sont présentés les résultats de l'un des tests visant à comparer les foyers d'infection générés par le LMV-0k7-GFP et le LMV-0-S621T-GFP. Les histogrammes représentent la distribution à un temps précoce (12, 24 ou 48 hpi) des foyers observés selon le nombre de cellules fluorescentes qu'ils contiennent (figure 2.3). Le graphique représente l'évolution de la surface des

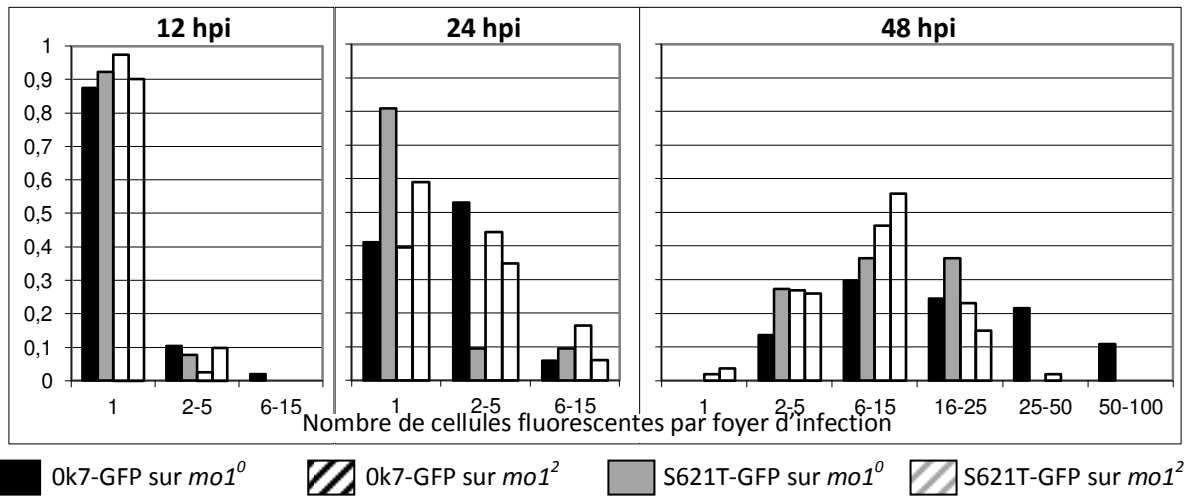


Figure 2.3 : Exemple de comptage à trois temps précoces d'infection, du nombre de cellules fluorescentes par foyer d'infection sur plante sensible (Salinas) ou résistantes (Salinas 88)

Les feuilles de laitues sensibles et résistantes inoculées avec le LMV-Ok7-GFP ou le LMV-S621T-GFP ont été observées au microscope à épifluorescence 12hpi, 24hpi et 48hpi. La proportion de foyers d'infection contenant 1, 2 à 5, 6 à 15 ou d'avantage de cellules fluorescentes, a été estimée. Pour chaque combinaison virus/genotype de plante l'axe des ordonnées indique la proportion de foyers entrant dans chaque catégorie précisée en abscisses (depuis les foyers unicellulaires jusqu'aux foyers possédant une centaine de cellules infectées).

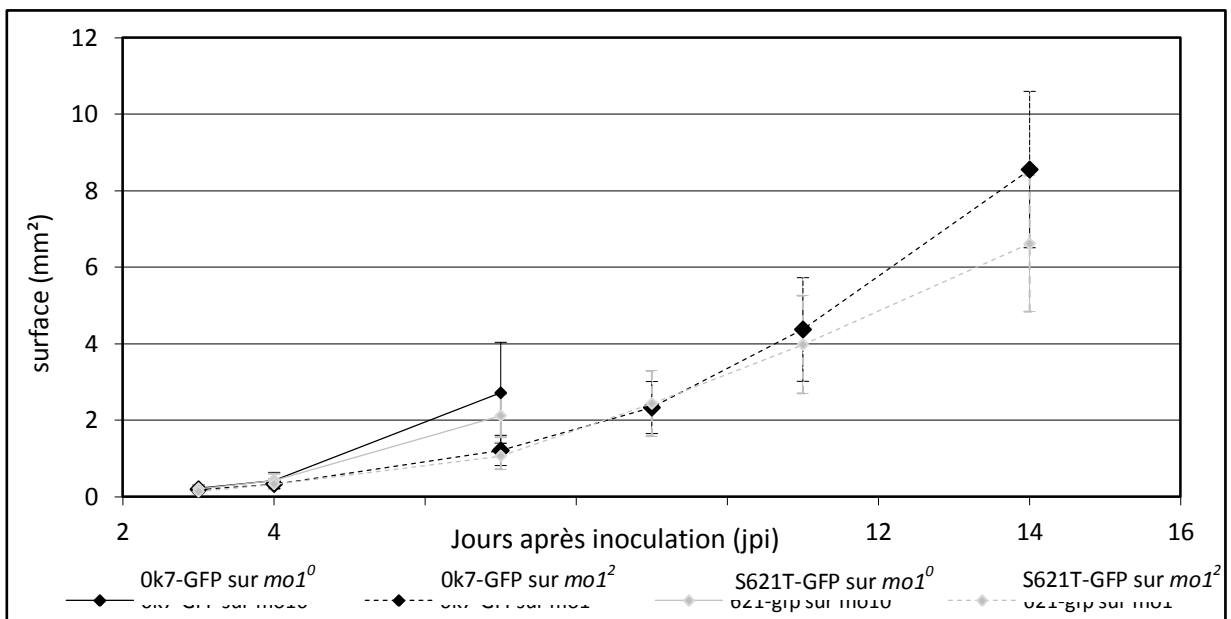


Figure 2.4 : Exemple d'observation de la surface des foyers d'infection induits entre 3 et 15 jours post-inoculation

La surface des foyers d'infection a été mesurée à partir de photos prises sous lampe UV, au grossissement le plus adapté à chaque point de temps. Les données présentées ici correspondent à la moyenne des surfaces obtenues pour tous les foyers (30 foyers observés au minimum dans chaque cas). Le logiciel d'image utilisé est Image J. Au-delà de 7jpi, sur plante sensible, des foyers d'infection individualisés ne sont plus observables.

foyers d'infection en fonction du temps (de 3jpi à 14jpi), pour les quatre conditions observées (figure 2.4). Il faut noter que nous ne pouvons pas maîtriser le nombre total de foyers induits par chaque virus (même si l'inoculum a été calibré au départ). En effet ce nombre peut varier selon la quantité de blessures créées sur la feuille inoculée par frottement plus ou moins vigoureux ou par une hétérogénéité de distribution de l'abrasif lors de l'inoculation mécanique. Dans le cas des histogrammes, nous ne tenons donc pas compte du nombre total de foyers induits par chaque virus : il est représenté pour chaque condition (un virus donné, à un temps donné, sur un cultivar donné) la fraction de foyers correspondant à chaque catégorie (en fonction du nombre de cellules fluorescentes). On peut alors comparer les catégories majoritaires pour chaque cultivar infecté, en fonction du virus. Bien que celles-ci varient, les différences observées à ces temps précoces ne sont pas drastiques. Elles semblent indiquer néanmoins un possible retard de propagation du virus sur plante résistante puisqu'on n'y dénombre pas de foyers d'infection de plus de 50 cellules. Ces observations à des temps précoces d'infection se sont avérées coûteuses (séances payantes de microscopie d'une durée de 4 heures nécessaires pour chaque observation) pour un gain d'informations assez faible par rapport à celles obtenues lors des observations à la loupe binoculaire. Celles-ci étaient destinées principalement au dénombrement de foyers unicellulaires potentiellement plus nombreux sur plantes résistantes ; cependant ces foyers unicellulaires se sont avérés difficiles à détecter et à discriminer d'une simple nécrose, contrairement aux foyers plus étendus. Ainsi, il est apparu inutile de poursuivre ces observations précoces afin de se concentrer sur les calculs de surface des foyers d'infection. En effet, ceux-ci ont donné des résultats reproductibles lors d'expériences indépendantes. On observe alors que l'écart entre les surfaces des foyers d'infection s'amplifie à mesure qu'ils grandissent, il paraît donc intéressant de suivre ces foyers le plus longtemps possible. Cependant, passé 10 jpi la fluorescence observée dans les foyers diminue ce qui rend leurs contours moins nets. Sur plante sensible l'évaluation de la surface des foyers d'infection au-delà de 7jpi fut rendue impossible par le nombre trop élevé de foyers, qui finissent par se rejoindre, alors que le nombre de foyers d'infection établis sur laitue résistante est invariablement moins élevé et se retrouvent très rarement en contact les uns avec les autres.

Enfin, pour vérifier la capacité des virus mutés marqués à la GFP à contourner les résistances *mo1*, conformément à ce qui avait été décrit pour le LMV-E-GFPclvHC (German-Retana et al., 2003), les feuilles systémiques ont été observées après 20 jpi sous une lampe UV. Alors que des symptômes corrélés à la présence de fluorescence apparaissent dès 7 jpi sur les plantes sensibles Salinas, aucune fluorescence ne fut observée sur les plantes résistantes Salinas 88 lorsque celles-ci avaient été manipulées au préalable afin d'observer les feuilles inoculées, même lorsque celles-ci étaient inoculées par le virus muté LMV-0-S621T-GFP. Cependant, lorsque les plantes étaient restées en

serre sans manipulation extérieure, on pouvait distinguer dès 20jpi de faibles « percées » fluorescentes, provenant d'une veinure de la feuille (figure 2.6).

Afin d'obtenir des images satisfaisantes, un temps d'exposition de 4sec fut nécessaire lors de la prise de photos. Les conditions de contraste et de gain n'ont pu être standardisées du fait de la trop grande variation d'intensité de fluorescence selon les cas. En effet, comme précisé précédemment, les foyers d'infection perdent en fluorescence à mesure que la feuille vieillit, mais des différences d'intensité de fluorescence ont également été observées entre les virus et les cultivars de laitue pour un même temps d'infection. En effet, les foyers d'infection se développant sur plante sensible *mo1⁰* sont très fluorescents alors que ceux observés sur laitue résistante *mo1¹* comme *mo1²* semblent l'être moins. Il fut alors impossible de conserver les mêmes réglages de prise de vue pour toutes les observations. Pour un réglage adapté aux foyers sur plantes sensibles, certains foyers sur plante résistante sont à peine visibles et ne peuvent être analysés sous ImageJ car ils ne se différencient pas assez du bruit de fond. Pour un réglage adapté aux foyers sur plantes résistantes, certains foyers sur plantes sensibles apparaissent fortement surexposés, entraînant le risque de surestimer la surface des foyers lors de l'analyse d'image.

I.1.c Design expérimental

Suite à ces différents tests, nous avons pu établir une marche à suivre concernant ces expériences de suivi de mouvement de cellule à cellule. Cette démarche fût appliquée à toutes les expériences ultérieures, qui se sont avérées reproductibles.

L'inoculum utilisé pour ces expériences provient donc de laitues Salinas au préalable inoculées par biolistique avec les virus marqués d'intérêt. Ces inocula sont calibrés par ELISA semi-quantitatif afin d'équilibrer les concentrations des virus. Une partie de l'inoculum calibré est prélevée pour l'inoculation des plantes résistantes, l'autre est diluée d'un facteur deux afin d'inoculer les plantes sensibles en limitant le nombre de foyers afin d'éviter qu'ils ne se rejoignent trop vite. Chaque virus est inoculé sur 12 plantes sensibles et 24 plantes résistantes (*mo1¹* ou *mo1²*) : 12 destinées à l'observation des feuilles inoculées et 12 destinées à l'observation des feuilles systémiques. Les observations sont faites à la loupe binoculaire, à partir de 3 jpi, et tous les deux jours jusqu'à confluence des foyers d'infection (entre 10 et 15 jpi). Pour chaque observation, deux feuilles inoculées prélevées sur deux plantes pour chaque condition sont observées à la loupe binoculaire, sous UV. Chaque foyer détecté sur ces feuilles est pris en photo en vue d'une analyse d'image ultérieure, avec un temps d'exposition de 4sec. Les réglages visant à modifier le gain ou le contraste des images sont modifiés le moins possible entre les cultivars et sont conservés pour un même cultivar.

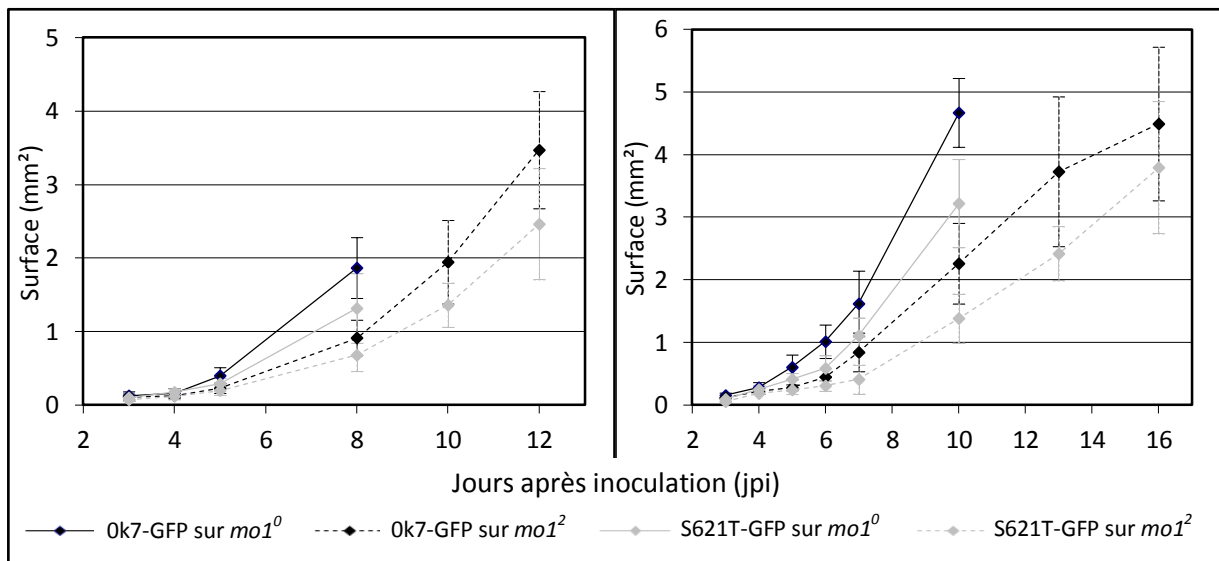


Figure 2.5 : Suivi de la surface des foyers d'infection induits par LMV-Ok7-GFP et LMV-0-S621T-GFP sur laitue sensible (Salinas) et résistante (Salinas 88).

Les résultats obtenus pour deux tests indépendants sont présentés ici. La surface des foyers d'infection a été mesurée à partir de photos prises sous lampe UV. Sont représentées sur les graphiques les moyennes des dites surfaces. Le logiciel d'image utilisé est Image J.

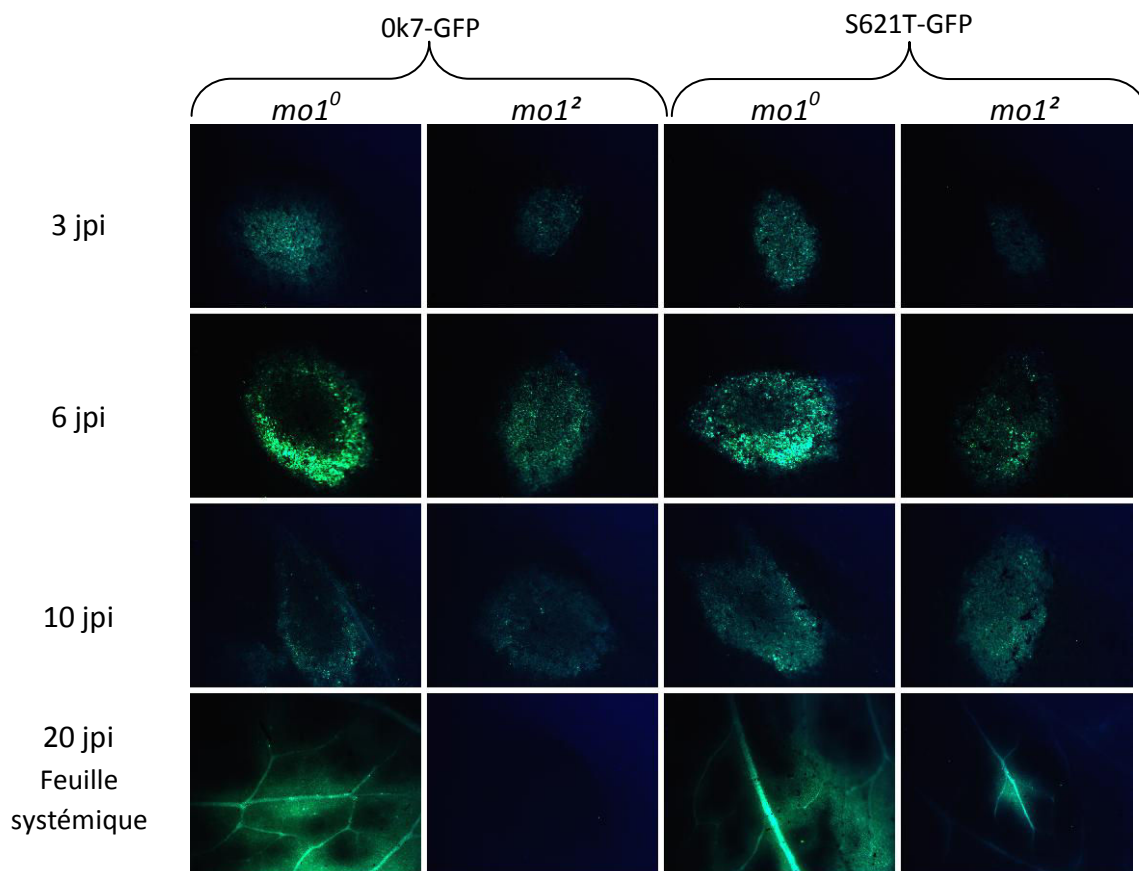


Figure 2.6 : Photos illustrant l'évolution des foyers d'infection induits par LMV-OK7 et LMV-0-S621T de 3 à 10 jpi sur feuilles inoculées et à 20 jpi sur feuilles systémiques sur plante sensible (Salinas *mo1*⁰) et résistante (Salinas 88 *mo1*²)

Les feuilles systémiques des plantes résistantes sont ensuite observées à 20 jpi pour vérifier l'absence ou la présence de fluorescence respectivement pour les plantes inoculées avec le LMV-0k7-GFP ou les virus mutés contournants.

I.2 Résultats

LMV-0k7-GFP vs LMV-0-S621T-GFP

La comparaison des foyers d'infection engendrés par les virus LMV-0k7-GFP et LMV-0-S621T-GFP sur plantes *mo1⁰* et *mo1²* a été entreprise lors de quatre expériences indépendantes (dont une avec un nombre très restreint de foyers d'infection, non présentée ici, mais donnant des résultats similaires), dont les deux expériences tests ayant permis de définir la fenêtre d'observation adéquate. Les résultats de ces expériences sont présentés dans les figures 2.5 et 2.6.

La surface des foyers d'infection présents sur une même feuille est variable, ce qui a donné lieu à l'établissement d'écart-type assez importants. Cependant, la comparaison des quatre combinaisons (virus/génotype de laitue) donne des résultats reproductibles : I) le LMV-0k7-GFP produit des foyers d'infection plus petits sur plante résistante *mo1²* que sur *mo1⁰*, conformément aux observations de German-Retana et al. (2003) ; II) le LMV-0-S621T-GFP produit lui aussi des foyers d'infection plus petits sur plante résistante *mo1²* que sur *mo1⁰* ; III) Globalement, les foyers d'infection induits par le LMV-0-S621T sur plante sensible sont plus petits que ceux induits par le LMV-0k7-GFP. Cette différence de surface observée fut confirmée statistiquement par un test de *Student* dès 5 jpi. Ces résultats semblent donc indiquer que la mutation de contournement S621T ne confère pas au virus une amélioration de son mouvement de cellule à cellule en contexte de résistance. L'établissement d'une infection en systémie par ce virus a été vérifié par observation de fluorescence, couplée à de faibles symptômes, et par séquençage de la descendance virale dans les feuilles systémiques fluorescentes, confirmant que le LMV-0-S621T-GFP est contournant, comme le virus correspondant non marqué.

Ainsi, bien que le mouvement de cellule à cellule soit toujours ralenti, le virus LMV-0-S621T-GFP a retrouvé sa capacité à atteindre les feuilles systémiques. Il semblerait donc que cette mutation ait un rôle dans le mouvement à longue distance du virus.

LMV-0k7-GFP vs LMV-0-A602V-G617S-GFP

Trois expériences visant à comparer les foyers d'infection engendrés par LMV-0k7-GFP et LMV-0-A602V-G617S-GFP sur *mo1⁰* et *mo1²* ont été menées de façon indépendante. Seules deux d'entre elles sont pleinement exploitables puisque lors de la troisième expérience, les inoculations de LMV-

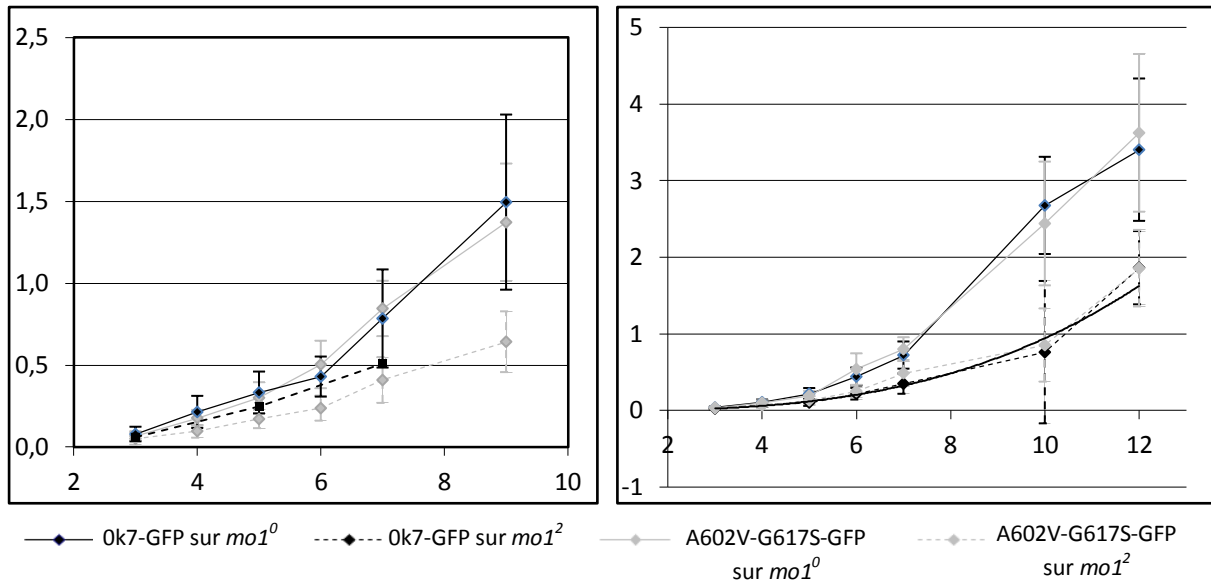


Figure 2.7 : Suivi de la surface des foyers d'infection induits par LMV-Ok7-GFP et LMV-O-A602V-G617S-GFP sur laitue sensible et résistante

Les résultats obtenus pour deux tests indépendants sont présentés ici. La surface des foyers d'infection a été mesurée à partir de photos prises sous lampe UV. Sont représentées sur les graphiques les moyennes des dites surfaces. Le logiciel d'image utilisé est Image J.

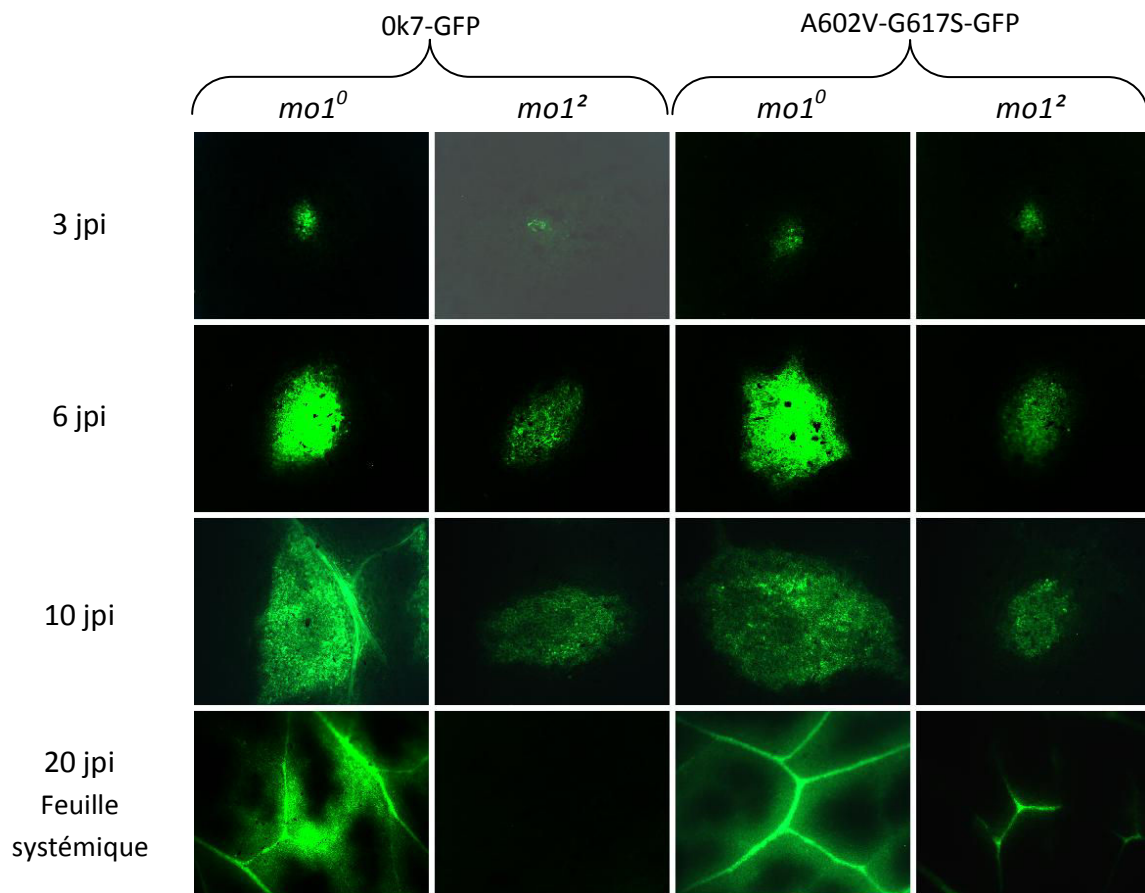


Figure 2.8 : Photos illustrant l'évolution des foyers d'infection induits par LMV-Ok7 et LMV-O-A602V-G617S-GFP de 3 à 10 jpi sur feuilles inoculées et à 20 jpi sur feuilles systémiques

0k7-GFP n'ont pas donné lieu à des foyers d'infection. Ainsi, pour la troisième expérience, nous ne disposons que de la comparaison plante sensible/plante résistante pour le virus contournant LMV-0-A602V-G617S-GFP.

Malgré une variabilité intra-expérience importante, les résultats des 3 expériences tendent à nouveau vers la même conclusion : les foyers d'infection provoqués par le virus mutants sont plus petits sur plante résistante que sur plante sensible (Figure 2.7 et 2.8). Ainsi, le mouvement de cellule à cellule n'est pas restauré en plante résistante, malgré la double mutation de contournement. Cependant, il semblerait que pour un même cultivar, LMV-0-A602V-G617S-GFP et LMV-0k7-GFP se déplacent à la même vitesse puisqu'aucune différence statistiquement significative n'a pu être décelée (Figure 2.7). Ceci indiquerait donc que LMV-0-A602V-G617S-GFP se déplacerait mieux de cellule à cellule que le simple mutant LMV-0-S621T, dont le mouvement était retardé vis-à-vis du virus natif. Ceci serait à confirmer par la réalisation d'une expérience supplémentaire, ainsi que par la comparaison au sein d'une même expérience des foyers induits par LMV-0-S621T-GFP et LMV-0-A602V-G617S-GFP.

Pour ce double mutant également, une infection systémique a pu être détectée par observation de fluorescence corrélée à la présence de symptômes et séquençage de la descendance virale. Ainsi, le mouvement à longue distance du virus est également restauré par la double mutation A602V-G617S au sein de la CI du LMV.

LMV-0k7-GFP vs LMV-0-A602V-G617S-S621T-GFP

Sur les quatre expériences menées, deux d'entre elles ne sont pas exploitables, par manque de foyers d'infection observables. Ainsi, je ne présente ici que les résultats obtenus pour les 2 expériences dont les résultats sont satisfaisants.

A nouveau, les résultats (figures 2.9 et 2.10) indiquent une baisse de la surface des foyers d'infection sur plantes résistantes, pour LMV-0k7-GFP comme pour LMV-0-A602V-G617S-S621T. Le triple mutant est néanmoins capable d'établir une infection faible en systémie, à l'instar des deux autres virus contournants étudiés.

Quel est le phénotype au sein de laitues portant l'allèle *mo1*¹ ?

Si le phénotype de l'infection par le LMV-0-GFPclvHC a été étudié sur laitue sensible et sur laitue *mo1*², nous ne disposons d'aucune information concernant l'établissement de foyers d'infection sur laitue *mo1*¹. En effet, il est communément admis que l'allèle de résistance *mo1*² est moins « stringent » que *mo1*¹ et qu'il confère une tolérance au virus alors que l'allèle *mo1*¹ confère une résistance totale en systémie. En effet, au laboratoire des tests ELISA ont permis de détecter le LMV-0 en faible quantité en systémie dans des plantes *mo1*², et de façon sporadique, ce qui ne fut jamais

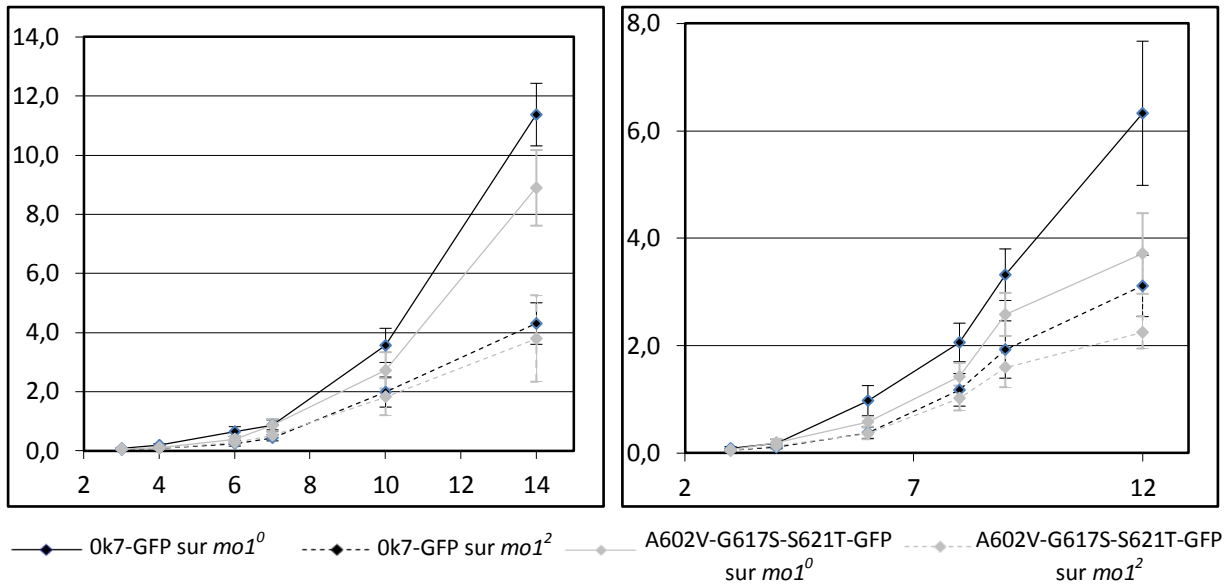


Figure 2.9 : Suivi de la surface des foyers d'infection induits par LMV-0k7-GFP et LMV-0-A602V-G617S-S621T-GFP sur laitue sensible et résistante

Les résultats obtenus pour deux tests indépendants sont présentés ici. La surface des foyers d'infection a été mesurée à partir de photos prises sous lampe UV. Sont représentées sur les graphiques les moyennes des dites surfaces. Le logiciel d'image utilisé est Image J.

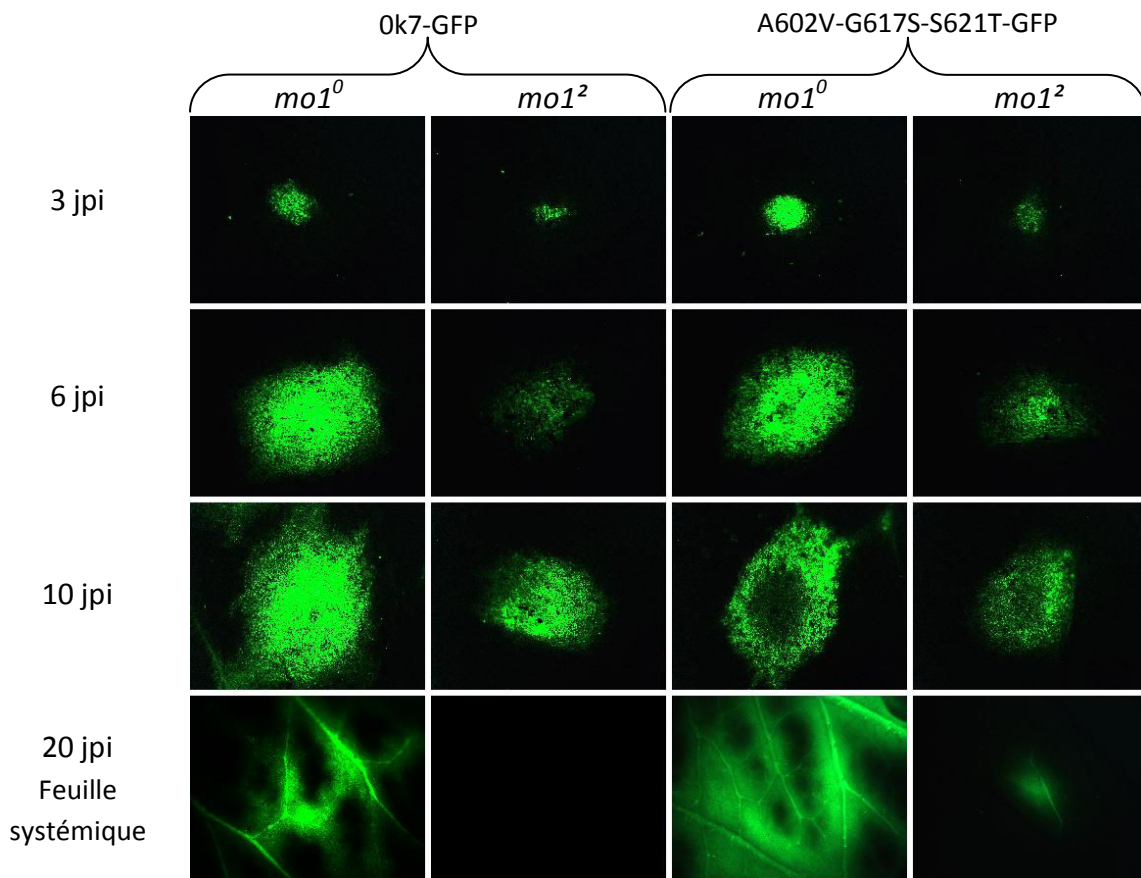


Figure 2.10 : Photos illustrant l'évolution des foyers d'infection induits par LMV-0k7 et LMV-0-A602V-G617S-S621T-GFP de 3 à 10 jpi sur feuilles inoculées et à 20 jpi sur feuilles systémiques

le cas sur *mo1¹*. De plus, comme il a été indiqué précédemment, pour une même mutation de contournement, le taux d'infection est plus important sur plante *mo1²* que *mo1¹* (voir chapitre 1). Cependant, des expériences antérieures, visant à exprimer *via* le virus LMV-0 une copie non mutée du gène *eIF4E* de laitue ont permis de restaurer la capacité d'induire une infection systémique sur plante résistante *mo1¹* et *mo1²* (German-Retana et al., 2008a). Ces données indiquent que même en contexte de résistance *mo1¹*, le génome du LMV-0 est traduit et se réplique, de sorte à exprimer la protéine eIF4E conférant la sensibilité. Cependant, aucune donnée ne permettait d'établir si le LMV-0 était également capable d'établir des foyers multicellulaires sur *mo1¹*. Cette question fut l'objet d'une expérience visant à comparer les foyers d'infection induits par LMV-0k7-GFP et LMV-0-A602V-G617S-GFP sur *mo1⁰* et *mo1¹*.

Les résultats présentés ici (Figure 2.11) démontrent clairement que le LMV-0 est capable d'établir des foyers d'infection multicellulaires sur plante sensible comme sur plante *mo1¹*, malgré un retard de mouvement sur cette dernière. De même, le LMV-0-A602V-G617S-GFP semble toujours ralenti dans les plantes résistantes mais est capable d'établir une infection systémique.

Bien que ces résultats soient préliminaires, ceux-ci vont dans le même sens que ceux obtenus sur plante résistante *mo1²*, ce qui porte à croire que les deux allèles de résistance, bien qu'induisant un phénotype de résistance au LMV-0 différent, reposent tous deux sur le blocage du mouvement systémique du virus. Des expériences supplémentaires furent entreprises, afin de comparer au sein d'une même expérience, deux virus contournants et le LMV-0k7-GFP sur les trois cultivars de laitue. Celle-ci aurait permis de déterminer si le ralentissement du mouvement de cellule à cellule est plus important sur plantes *mo1¹* que *mo1²*, infligeant un niveau de résistance supplémentaire. Malheureusement, les conditions de cultures ne furent pas propices à l'établissement d'un nombre suffisant de foyers pour fournir des données exploitables sur le plan statistique. Les images obtenues pour les foyers d'infection induits par LMV-0k7-GFP, LMV-S621T-GFP et LMV-A602V-G617S-S621T-GFP lors d'une même expérience, ont tout de même été analysées et semblent mettre en évidence un ralentissement du mouvement de cellule à cellule plus important sur laitues *mo1¹* que sur *mo1²*. Ces expériences mériteraient donc d'être répétées dans le but de confirmer ce résultat.

La résistance au LMV conférée par eIF4E chez la laitue bloquerait, en particulier, le mouvement à longue distance du virus

Les différentes expériences menées précédemment conduisent toutes à la même conclusion : la résistance conférée par eIF4E chez la laitue (*mo1*) reposerait à la fois sur le ralentissement du mouvement de cellule à cellule et sur le blocage du mouvement à longue distance du virus. En outre, les variations d'intensité de fluorescence observées ainsi que la diminution du nombre de foyers établis sur plante résistante semblent indiquer que la réplication du virus serait elle aussi diminuée

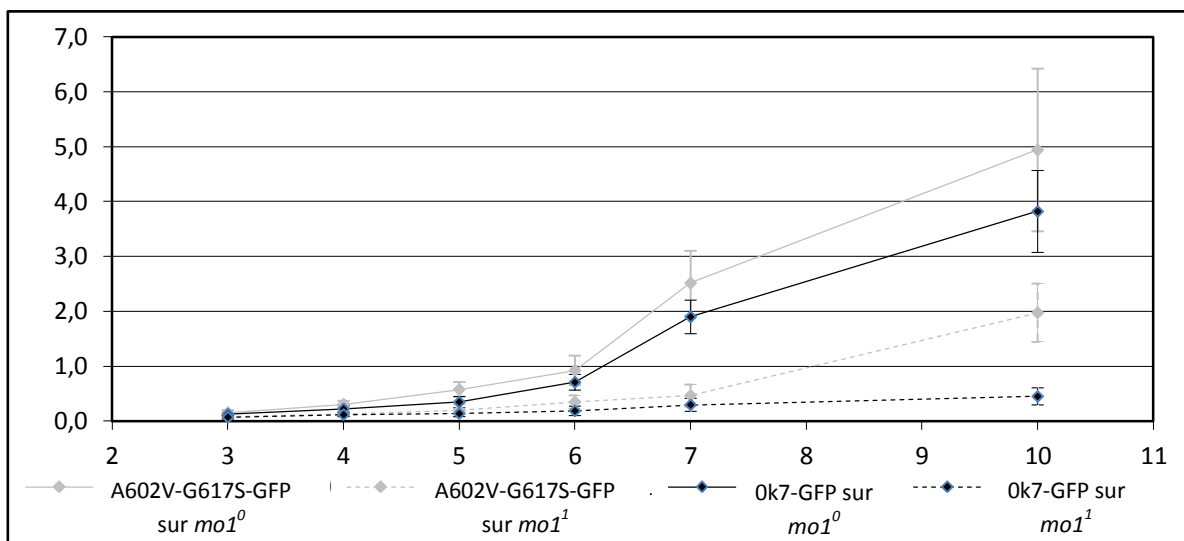


Figure 2.11 : Suivi de la surface des foyers d'infection induits par de LMV-Ok7-GFP et LMV-O-A602V-G617S-GFP sur laitue sensible (Salinas) et résistante $mo1^1$ (Mantilia)

La surface des foyers d'infection est mesurée à partir de photos prises sous lampe UV et les moyennes obtenues sont reportées en ordonnées. Le logiciel d'analyse d'image utilisé est Image J.

dans les laitues résistantes, bien que ceci ne repose que sur des considérations non chiffrées et demanderait confirmation.

Nous avons démontré dans le premier chapitre que l'acquisition de mutations dans la CI-Cter du LMV permet le contournement partiel de ladite résistance *mo1* et dans cette étude nous démontrons en outre que ces mutations de contournement n'améliorent pas le mouvement de cellule à cellule (ni semble-t-il la réplication) du virus mais restaurent son mouvement à longue distance. Ces mutations ne permettraient donc de contourner qu'un seul des blocages imposés par la résistance *mo1*. Ceci pourrait expliquer le fait que le contournement observé ne soit que partiel. Ainsi, les LMV mutants ne sont pas capables d'atteindre les feuilles systémiques à toutes les occasions puisque pour cela il faut que les rares foyers d'infection établis puissent rejoindre une nervure avant que la feuille en question n'entre en sénescence. Ceci est d'autant plus compliqué que leur mouvement et leur réplication semblent limités. Pour éprouver cette théorie, une étude de la corrélation entre le nombre de foyers établis par feuille et le taux de contournement observé devrait être menée sur laitues *mo1*¹ et *mo1*².

II. La région C-terminale de la CI du LMV, qui porte les déterminants de virulence vis-à-vis des résistances *mo1*, participe-t-elle au recrutement de la protéine au niveau des plasmodesmes ?

II.1 Les régions N-terminales et C-terminales de la CI sont impliquées dans le mouvement du virus

Les expériences de génétique inverse menées par Carrington et al. (1998) ont montré que des mutations dans la CI-Nter ou dans la CI-Cter perturbaient le mouvement de cellule à cellule ou à longue distance du virus. Par la suite, il fut démontré que la région N-ter en question et plus particulièrement les acides aminés dont la mutation bloquait le mouvement de cellule à cellule du virus (DD3,4 et KK101,102) étaient impliqués dans l'auto-interaction de la CI et que les mutants obtenus étaient alors incapables de former des inclusions cylindriques (Gómez de Cedrón et al., 2006). Plus tard il a été montré que la protéine CI DD3,4 était en revanche toujours capable d'interagir avec la protéine P3N-PIPO (Wei et al., 2010b). La région N-terminale de la CI ne semblerait donc pas impliquée dans l'interaction de la protéine avec P3N-PIPO.

La protéine P3N-PIPO quant à elle est aussi directement impliquée dans le mouvement du virus (Wen and Hajimorad, 2010) puisque l'introduction de mutations STOP dans le cadre de lecture de la PIPO du SMV ne perturbe pas la réplication mais restreint fortement le mouvement du virus, sans l'abolir. Il est probable que cette implication soit liée à son interaction avec la CI, puisque P3N-PIPO permettrait le recrutement des inclusions de CI au niveau des plasmodesmes (Wei et al., 2010b). D'après les récentes données apportées par Zilian et Maiss (2011), les interactions CI-CI et CI-CP du

PPV ont elles aussi lieu au niveau de quelques « points » proches de la membrane, possiblement des plasmodesmes, bien qu'aucun marqueur des plasmodesmes n'ait été utilisé dans cette étude. Parallèlement, l'interaction entre la CI et P3N-PIPO se fait au niveau de nombreux « points » à proximité de la membrane d'après les observations réalisées au microscope confocal. Ceci suggérerait que l'interaction CI-P3N-PIPO, ne soit pas essentielle au recrutement aux plasmodesmes de la CI, mais améliore fortement celui-ci. Enfin, le recrutement de la P3N-PIPO est quant à lui dépendant de l'interaction de cette protéine avec la protéine de l'hôte PCaP1 (Vijayapalani et al., 2012), en l'absence de laquelle le mouvement du TuMV est drastiquement réduit.

Ainsi, le domaine par lequel la CI interagit avec P3N-PIPO doit jouer un rôle clé dans le mouvement du virus mais celui-ci n'a pas encore été mis en évidence. Nous avons émis l'hypothèse que l'interaction puisse avoir lieu au niveau de la CI-Cter. Nous avons testé cette hypothèse *via* des expériences de localisation subcellulaire des différents partenaires. Il s'agit de la CI, la CI-Cter et de la P3N-PIPO du LMV, taggués avec la GFP ou la RFP et exprimés transitoirement chez *N. Benthamiana* par agroinfiltration.

Ces expériences ont été réalisées avec l'appui de Monika Fecury-Moura (étudiante en thèse de l'Université de Botucatu, Brésil) et d'Anaïs Pitarch (stage de fin d'étude Montpellier SupAgro).

II.2 Obtention des vecteurs binaires permettant l'expression transitoire *in planta* des protéines CI, CI-Cter et P3N-PIPO du LMV

Au préalable de la thèse, la région codante de la CI du LMV avaient été clonée au sein du vecteur d'entrée Gateway pDONR 221, avec ou sans codon STOP, et celle de la CI-Cter avec codon stop avait été clonée dans le vecteur pENTR. La séquence CI-Cter sans codon STOP fut clonée dans le vecteur pENTR par Marie-Christine Houvenaghel en janvier 2013 et la région codante de la P3N-PIPO le fut lors de la venue de Monika, avec l'assistance d'Elise Thalineau (Master 1 BBP, Université de Bordeaux).

Cette protéine résultant d'un décalage du cadre ouvert de lecture lors de la traduction de la protéine P3, le clonage de celle-ci nécessitait l'ajout d'un nucléotide afin de recréer ce décalage. Il s'agissait d'introduire une Adénine en position 543 de la séquence P3. Ceci a été réalisé par deux PCR mutagène chevauchantes au niveau de la mutation à introduire (Matériel et Méthode III.G), permettant d'amplifier d'une part la région codant pour la P3-Nter et d'autre part la partie codant pour PIPO.

Les six constructions ont été obtenues : deux possédant la séquence codante de P3N-PIPO fusionnée en N-ter ou C-ter avec la RFP (vecteurs pB7WGF2 et pB7FWG2), deux avec la séquence CI entière fusionnée en N-ter ou Cter avec la GFP (vecteurs pGWB706 et pGWB705) et deux avec la séquence

CI-Cter fusionnée en N-ter ou Cter avec la GFP également. Ces vecteurs recombinants ont été vérifiés par séquençage dans la région de recombinaison entre la séquence d'intérêt et le vecteur afin de s'assurer que le cadre de lecture n'ait pas été décalé par un événement d'insertion ou de délétion.

Aucune mutation ne fut détectée pour les vecteurs contenant la P3N-PIPO, en revanche, dans la construction permettant une fusion en C-ter de la GFP avec la CI entière, une mutation fut décelée. Il s'agit d'une délétion d'une Adénine dans la zone de recombinaison, conduisant au décalage du cadre de lecture, et donc à la non traduction de la GFP. De façon très singulière, une autre mutation fut décelée dans la même région, mais au niveau de la séquence du vecteur, dans le vecteur pENTR CI-Cter sans codon stop. Ces mutations se trouvent donc dans la région correspondant aux amorces utilisées pour le clonage de ces séquences. La séquence des dites amorces a été vérifiée et elles ne possèdent pas l'une ou l'autre de ces mutations. En outre, les clonages de la CI entière et de la CI-Cter n'ont pas été réalisés au même moment et le vecteur utilisé n'est pas le même (pDONR vs pENTR).

Le clonage de la CI-Cter sans codon STOP dans le vecteur pENTR fut entrepris à nouveau et permit l'obtention d'un nouveau vecteur « valide ». Le clonage de la CI entière dans le vecteur pDONR ayant été très laborieux lors de la thèse d'Anas Abdul-razzak, plutôt que de repasser par cette étape nous avons choisi de réaliser une mutagénèse dirigée sur le pDONR-CI-STOP à l'endroit de la mutation afin de rétablir le bon cadre de lecture. Pour cela, nous avons utilisé le kit QuickChange® II Site-directed Mutagenesis (Agilent) (Matériel et Méthodes III.E). Les amorces mutagènes ont été désignées de sorte à ré-introduire cette Adénine au sein de la suite de Thymine qui présente la séquence et à introduire un site de coupure BamH1 pour faciliter le criblage des plasmides. Suite à cette mutagénèse, nous avons obtenu très peu de colonies (12) et les plasmides de six d'entre elles ont été extraits : pour un seul de ces plasmides le profil de digestion indiquait l'insertion du site de coupure BamH1. Lorsque celui-ci a été séquençé dans la région d'intérêt nous avons pu noter la persistance de la délétion présente dans le plasmide d'origine, alors que la mutagénèse a eu lieu, du fait de l'insertion du site de coupure BamH1. Par manque de temps, ces tentatives de mutagénèse ne furent pas poursuivies et pour cette raison, nous n'avons pu observer que la CI entière fusionnée en N-ter avec la GFP.

II.3 Relocalisation de la CI du LMV en présence de la protéine P3N-PIPO seule ou en contexte d'infection virale

D'après les travaux de l'équipe d'Aiming Wang (Wei et al., 2010b), la co-expression de la P3N-PIPO du TuMV avec la CI du même virus entraîne la relocalisation de cette dernière au niveau des plasmodesmes. Nous avons donc souhaité dans un premier temps reproduire ce résultat avec les protéines de LMV en expression transitoire chez *N. Benthamiana* et dans la laitue (dans un contexte

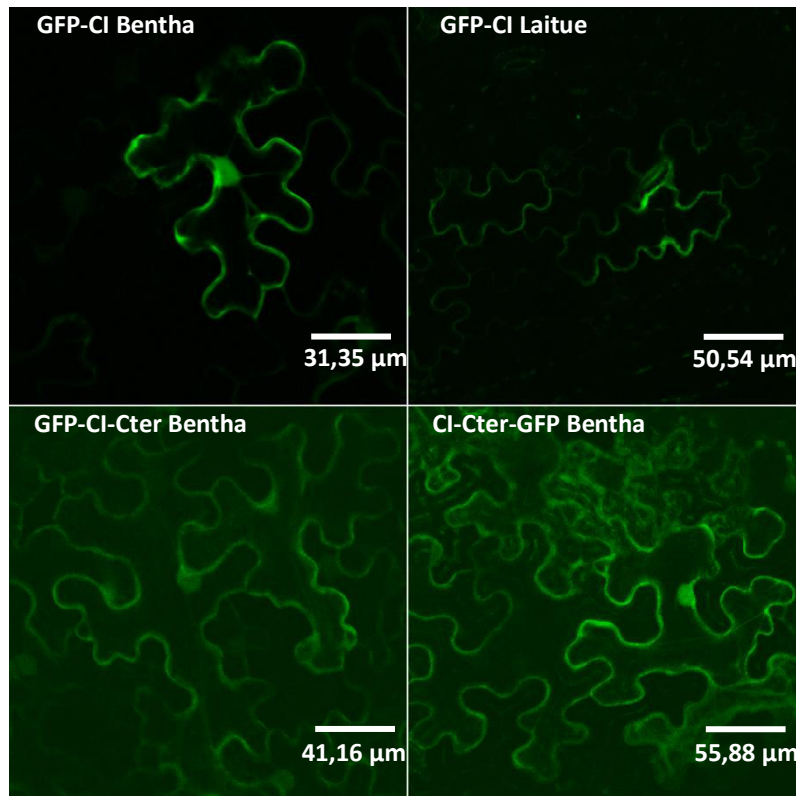


Figure 2.12 : Localisations subcellulaires de la CI et de la CI-Cter du LMV fusionnées à la GFP

La CI entière est étiquetée à son extrémité N-terminale avec la GFP et a été observée dans des cellules épidermiques de *N. benthamiana* et de laitue Trocadéro. La CI-Cter est étiquetée à son extrémité N-terminale ou C-terminales à la GFP et a été observée dans des cellules épidermiques de *N. benthamiana*. Les observations sont faites à 48 hpa.

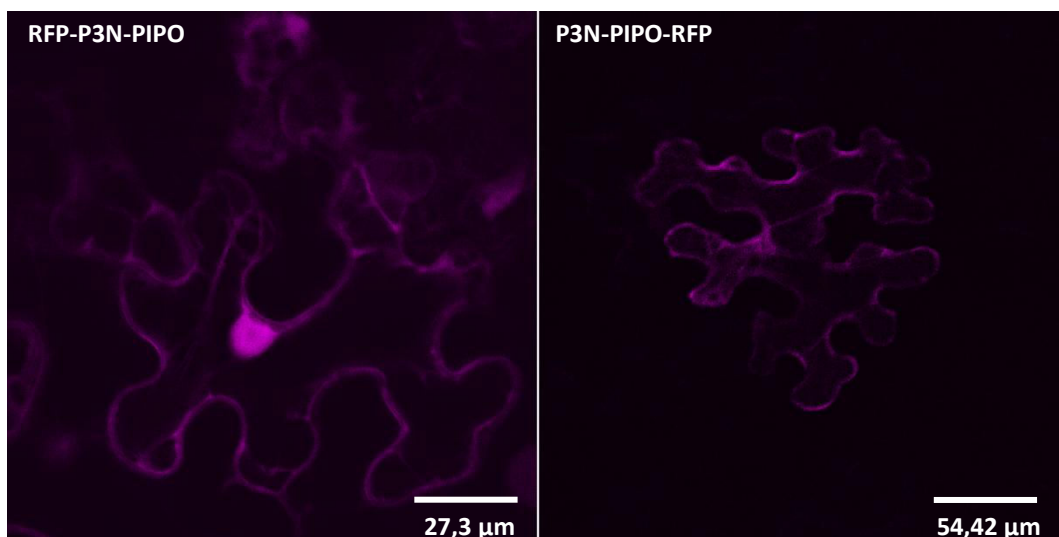


Figure 2.13 : Localisation subcellulaire de la protéine P3N-PIPO étiquetée en N-ter et C-ter avec la GFP

Observations 48h après agroinfiltration de feuilles de *N. benthamiana*.

de sensibilité ou de résistance). Nous avons également suivi quelle était la localisation de la CI en condition d'infection virale et donc en présence de tous les partenaires viraux.

Pour cela, des plantes saines ont été co-agroinfiltrées avec le vecteur GFP-CI et le vecteur P3N-PIPO-RFP ou RFP-P3N-PIPO. Plusieurs ratios ont été testés pour ces co-agroinfiltrations : un ratio de 1:1 (CI:PIPO) dans un premier temps puis un ratio de 5:1, conformément à ce qui a été fait dans l'article de référence.

Nos observations indiquent que la GFP-CI tout comme la CI-Cter exprimée seule est localisée principalement dans le cytoplasme des cellules épidermiques transformées, mais également dans le noyau de celles-ci (Figure 2.12). La protéine P3N-PIPO-RFP ou RFP-P3N-PIPO semble présenter la même localisation (Figure 2.13), ce qui est en contradiction avec les résultats de Wei et al. (2010) qui situent la P3N-PIPO du TuMV essentiellement au niveau de la membrane plasmique. De même, lorsque ces deux protéines sont exprimées simultanément dans une même cellule, aucune relocalisation de la GFP-CI n'est observée, quelque soit le ratio utilisé (Figure 2.14). Il est à noter que lors des co-agroinfiltrations peu de cellules exprimant les deux protéines ont pu être observées, probablement du fait de la faible efficacité de transformation par les agrobactéries.

Ainsi, nous n'avons pas reproduit les résultats précédemment obtenus pour les protéines du TuMV. Nous avons contacté Aiming Wang qui nous a envoyé les plasmides permettant l'agroinfiltration de la P3N-PIPO fusionnée à la GFP et la CI fusionnée à la RFP, afin que ces constructions nous tiennent lieu de contrôle positif. Malheureusement, la CI fusionnée à la RFP n'a pas pu être observée lors du test que nous avons réalisé. Malgré tout, nous avons pu observer à plusieurs occasions la P3N-PIPO-GFP du TuMV seule et remarquer que la localisation de celle-ci dans nos expériences est cytoplasmique plutôt qu'associée à la membrane. Il est donc possible que I) nos conditions expérimentales soient différentes de celles adoptées par l'équipe d'Aiming Wang lors de leurs observations ou II) que la relocalisation de la CI du LMV nécessite d'autres facteurs viraux pour avoir lieu.

Nous avons donc également décidé d'observer la localisation subcellulaire de la GFP-CI ou de la P3N-PIPO fusionnée à la RFP en condition de plante infectée. Pour cela, nous disposons du LMV-0k7-GFP précédemment évoqué et du LMV-0k7-Mcherry, généré lors de cette thèse selon la même stratégie visant à insérer la séquence de la Mcherry (excitation : 587nm, émission : 610nm) entre les séquences P1 et HC-Pro (Matériel et Méthodes III.A). L'agroinfiltration de la GFP-CI a donc été réalisée dans des *N. benthamiana* au préalable inoculées avec le LMV-0k7-Mcherry tandis que les constructions P3N-PIPO ont été agroinfiltrées dans des plantes inoculées par du LMV-0k7-GFP (20 jpi). Seules sont observées les cellules dans lesquelles les 2 signaux de fluorescence sont détectables, à 48h après agroinfiltration. Grâce à 5 expériences indépendantes et reproductibles, nous avons observé que la CI du LMV est relocalisée au niveau des plasmodesmes lors de l'infection virale

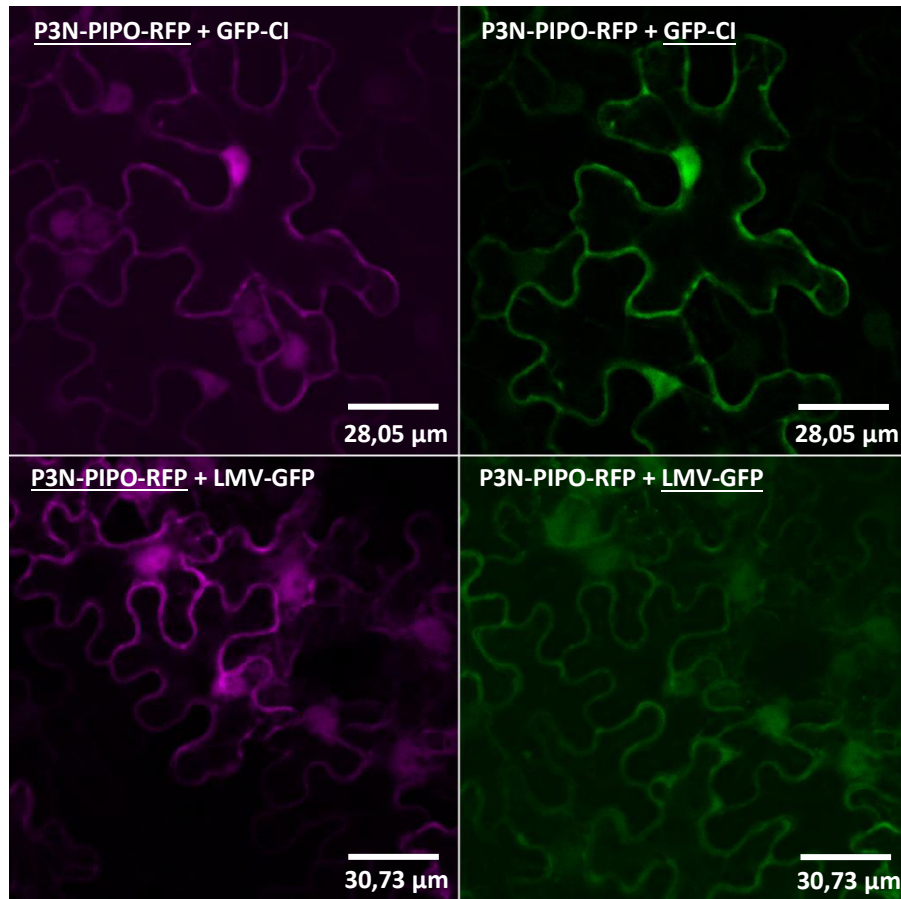


Figure 2.14 : Localisation subcellulaire de P3N-PIPO-RFP en présence de GFP-CI ou au sein d'une cellule infectée par le LMV-OK7-GFP

La fluorescence observée est émise par la construction dont le nom est souligné pour chaque photo. Les observations sont faites 48 hpa.

(Figure 2.15). Ceci a été confirmé par marquage des feuilles observées à l'aniline blue, mettant en évidence les dépôts de callose importants au niveau des plasmodesmes. En revanche, aucune relocalisation de la protéine P3N-PIPO ne fut observée en contexte d'infection par le LMV-0k7GFP (Figure 2.14). Il est à noter que la GFP exprimée sous forme libre par ce dernier, ou agroinfiltrée seule en tant que contrôle dans des cellules infectées n'adopte pas cette localisation plasmodesmale.

Toutes ces observations ont été faites sur des feuilles infectées en systémie par le virus, généralement les feuilles 3 et 4 en partant de la plus jeune. Les différentes observations rapportant l'établissement aux plasmodesmes des structures coniques de CI (Lawson et al., 1971; Calder and Ingerfeld, 1990; Langenberg, 1993; Rodríguez-Cerezo et al., 1997; Roberts et al., 1998) ont été réalisées à des temps précoces d'infection, voire directement au front d'infection, au sein des organes inoculés. C'est pourquoi nous avons essayé de nous placer également au front d'infection, en réalisant simultanément l'inoculation mécanique et l'agroinfiltration sur les feuilles de *N. benthamiana*. Les observations ont été faites 48h après l'inoculation mais aucune information n'a pu être extraite de celles-ci, du fait du nombre important de nécroses causées à la fois par l'inoculation mécanique et par l'infiltration. Il apparaît donc que le meilleur moyen de visualiser la CI et la PIPO au front d'infection soit leur expression *via* le virus.

Nous avons enfin souhaité étudier ce phénomène de relocalisation au sein de cellules de laitues afin, à terme, de pouvoir analyser l'effet des mutations du gène *mo1* sur celle-ci par agroinfiltration de laitues sensibles et résistantes. Les conditions d'agroinfiltration pour la laitue varient de celles employées pour la transformation des plants de *benthamiana*, aussi une optimisation du processus fut nécessaire. A ce jour, nous avons pu visualiser la GFP-CI dans les laitues saines, où sa localisation demeure cytoplasmique et nucléaire. Cependant, nous n'avons pas pu observer la localisation de la CI en condition infectée puisque les agroinfiltrations sont optimales sur plantes très jeunes, or les plantes infectées sont nécessairement plus vieilles puisqu'elles ne sont agroinfiltrables que 10 jours après l'inoculation.

II.4 Résultats préliminaires : relocalisation de la CI-Cter en conditions d'infection

Afin de déterminer si l'interaction avec la P3N-PIPO et la relocalisation de la CI aux plasmodesmes reposent sur la région CI-Cter, les mêmes expériences de relocalisation en conditions d'infection ont été réalisées avec la CI-Cter du LMV fusionnée en Nter ou en Cter avec la GFP.

Les résultats présentés ici sont très préliminaires puisqu'ils ont été observés à une seule occasion. De plus, l'efficacité de transformation lors de ces agroinfiltrations est apparue assez faible puisque seules de petits îlots de cellules, voire des cellules isolées exprimaient la construction GFP.

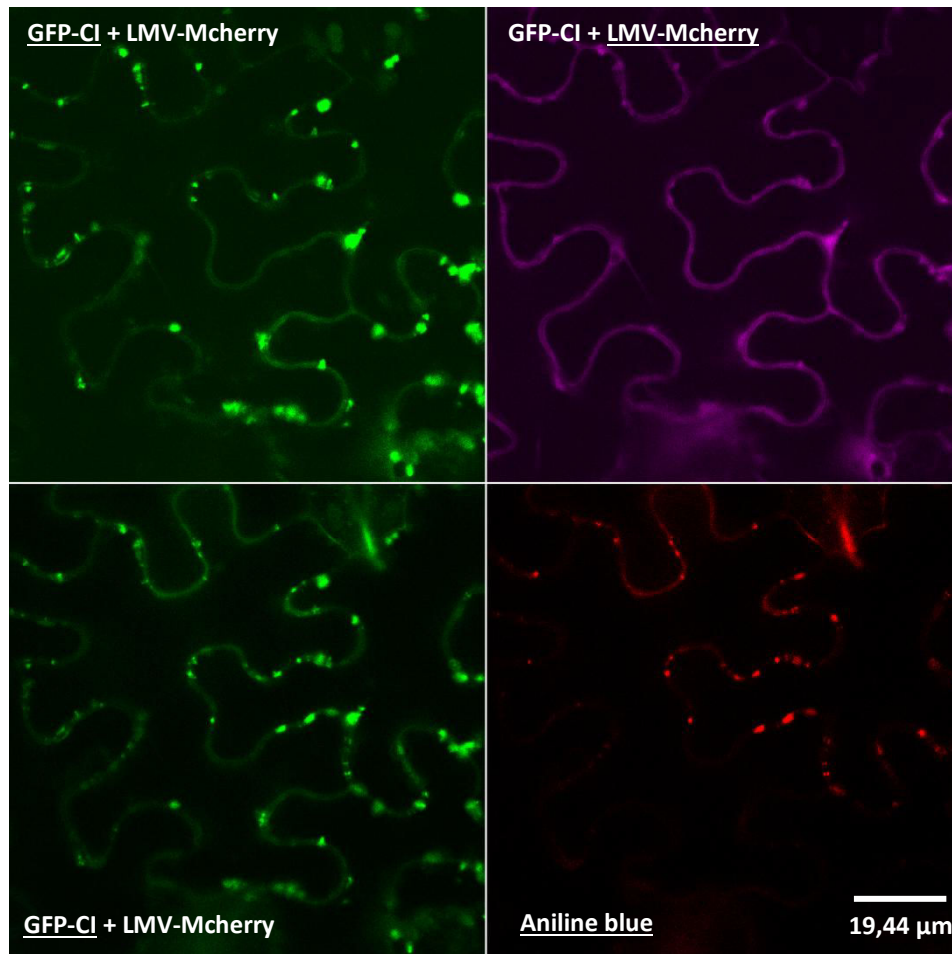


Figure 2.15 : Localisation de la GFP-CI dans des cellules de *N. benthamiana* infectées par du LMV-OK7-Mcherry

Les plasmodesmes sont marqués par ajout d'aniline blue (en rouge sur la photo).

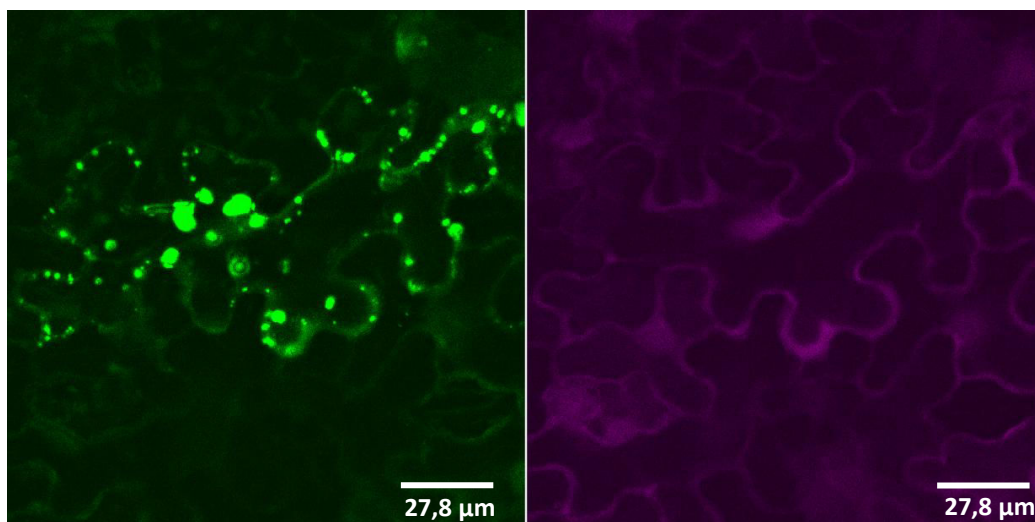


Figure 2.16 : Localisation de la CI-Cter-GFP dans des cellules de *N. benthamiana* infectées au préalable par LMV-OK7-Mcherry

Les photos ont été prises de manière séquentielle pour éviter la visualisation dans le canal « Mcherry » de signaux de fluorescence liée à la GFP qui est très forte à certains endroits.

Cependant, lors de cette expérience, la CI-Cter-GFP et la GFP-CI-Cter ont toutes deux été observées au sein de « spots » situés le long de la membrane (Figure 2.16). Bien que ce profil soit très similaire à celui obtenu lors de l'adressage aux plasmodesmes, nous ne pouvons conclure clairement qu'il s'agit des plasmodesmes puisque le marquage à l'aniline blue n'a pas pu être effectué : du fait de la très faible densité de cellules transformées, nous n'avons pas pu observer de cellules transformées ayant également intégré le marquage aniline blue.

Il apparaît donc très important de reproduire ces résultats, avec une meilleure efficacité de transformation, puisque ceux-ci pourraient mettre en évidence le rôle de la CI-Cter dans l'interaction de la protéine avec PIPO.

II.5 Le Western Blot : mise au point laborieuse

Pour toute expérience d'expression transitoire chez la plante d'une protéine étiquetée, la validation des observations réalisées en confocal nécessite la vérification de l'expression de la protéine de fusion. Plus particulièrement, il est nécessaire de s'assurer que le fluorophore fusionné à la protéine n'est pas clivé ultérieurement dans la cellule végétale, donnant lieu à l'observation de la localisation sub-cellulaire du fluorophore ou de produits de dégradation et non plus de la protéine d'intérêt.

Nous n'avons pas dérogé à la règle et avons donc entrepris systématiquement à partir des feuilles observées une extraction des protéines totales que nous avons soumises à une électrophorèse SDS-PAGE suivie d'un Western blot.

Dans un premier temps, les morceaux de feuille déposés entre lame et lamelle ont été récupérés et broyés dans 200µl de tampon LOB 5X (Loading Buffer, Matériel et Méthodes VI.C). Le broyat ainsi obtenu a été clarifié par centrifugation, chauffé à 95°C pendant 5 min, puis déposé sur gel d'acrylamide. Après migration, les protéines ont été transférées sur membrane de nitrocellulose puis révélées par Western Blot. Plusieurs anticorps primaires ont été utilisés : un anticorps anti-CI-Cter (dirigé contre cette protéine exprimée en système *E. coli*) disponible au laboratoire (nous ne disposons pas d'anticorps anti-CI entière) et un anticorps anti-GFP commercial. L'anticorps secondaire utilisé était couplé à la peroxydase, permettant une révélation colorimétrique des protéines. Les westerns blots ainsi obtenus ne révélaient aucune bande lorsque nous utilisons l'anticorps anti-CI, et une bande aspécifique avec l'anticorps anti-GFP : cette bande était également présente dans les feuilles non infiltrées.

Dans l'optique de concentrer le contenu protéique avant d'effectuer l'électrophorèse, les feuilles entières ont été prélevées, et non plus les morceaux observés au microscope confocal. Celles-ci ont été broyées à sec dans l'azote liquide jusqu'à obtention d'une poudre qui a été par la suite resuspendue dans un tampon d'extraction des protéines (Matériel et Méthodes VI.C). La solution ainsi obtenue a été clarifiée par centrifugation puis le surnageant a été récupéré et mélangé au

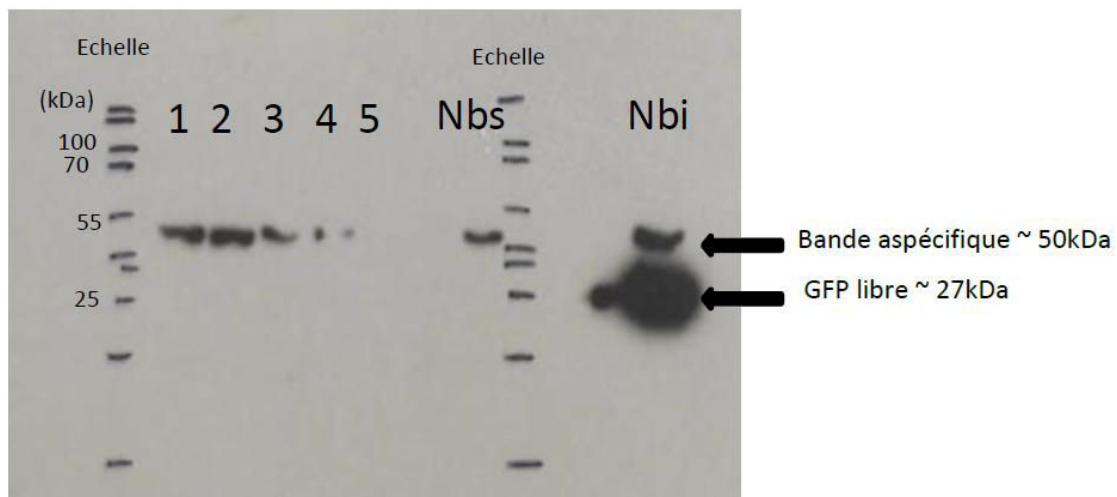


Figure 2.17 : Exemple de résultats obtenus en Western Blot avec l'anticorps Anti-GFP TP401

Le marqueur de taille utilisé est le Page Ruler (ThermoScientific). Nbs et Nbi signifient *N. benthamiana* sain et infecté avec le LMV-OK7-GFP. Les constructions sont numérotées de 1 à 5 : 1) GFP-CI en condition saine, 2) GFP-CI en condition d'infection, 3) GFP-CI-Cter en condition d'infection, 4) RFP-VPg + GFP-CI, 5) VPg-RFP + GFP-CI.

Les tailles attendues sont les suivantes : GFP libre = 27 kDa ; CI fusionnée à la GFP = 100 kDa ; CI Cter fusionnée à la GFP = 60 kDa ; CI = 71,63 kDa ; CI-Cter = 30,28 kDa.

tampon LOB additionné de β -mercaptoéthanol. Après dénaturation à 95°C pendant 10min, l'extrait protéique a été déposé sur gel de polyacrylamide. Après migration et transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose, celles-ci ont été révélées à nouveau avec l'anticorps anti-GFP pour les constructions CI et avec un anticorps commercial anti-RFP pour les constructions PIPO, puis par l'anticorps secondaire lié à la peroxydase. La révélation cette fois-ci n'a pas été réalisée par un procédé colorimétrique mais par chimioluminescence (Matériel et Méthodes VI.C), ce qui permet une sensibilité accrue.

Malgré ces améliorations du protocole, nous n'avons pas pu détecter les protéines de fusion alors que la GFP libre fut détectée dans des extraits de plante infectée avec le LMV-0k7-GFP ou agroinfiltrées avec une construction GFP seule (Figure 2.17). Ainsi, pour rendre possible la détection des protéines il est nécessaire d'améliorer la transformation des cellules végétales pour augmenter l'expression des protéines recombinantes. Dans ce but, de nouvelles souches d'agrobactéries sont actuellement transformées avec les plasmides d'intérêt.

II.6 La région C-terminale de la CI du LMV participerait au mouvement du virus en permettant l'interaction CI-PIPO

Lors de nos observations de la localisation subcellulaire des protéines CI et P3N-PIPO du LMV, nous avons pu démontrer de façon reproductible que la CI exprimée seule se situe dans le cytoplasme et le noyau des cellules alors qu'elle est relocalisée au niveau des plasmodesmes lors de l'infection virale. Cette relocalisation n'a pas été observée en présence uniquement de la P3N-PIPO que nous avons clonée. Plusieurs explications à ce constat sont envisageables : I) dans le cas du LMV, la protéine P3N-PIPO à elle seule n'est pas suffisante à la relocalisation, ce mécanisme étant dépendant d'un autre facteur viral, II) les conditions d'agroinfiltration que nous avons adoptées ne sont pas optimales pour observer une relocalisation, par exemple la fusion en N-terminal de la GFP à la CI peut empêcher celle-ci, ou le taux d'expression de l'une ou l'autre des protéines n'est pas adéquat, III) la séquence P3N-PIPO que nous avons clonée ne donnerait pas naissance à une PIPO fonctionnelle, l'introduction du décalage du cadre de lecture reposant sur des données bibliographiques, des prédictions bioinformatiques et non expérimentales. Concernant ce dernier point, notre stratégie de clonage a été validée après discussion avec A. Miller, le co-auteur découvreur de PIPO (voir Annexe 3).

Le résultat le plus intéressant et le plus préliminaire de cette étude repose sur l'observation de la relocalisation de la CI-Cter aux plasmodesmes en condition d'infection. Si ces résultats sont confirmés, il s'agirait de la première étude mettant en évidence la région de la CI potentiellement impliquée dans l'interaction avec P3N-PIPO. Pour la première fois également, un rôle mécanistique serait attribué à la région C-terminale de la CI.

Il est donc primordial de reproduire ces résultats mais également de réaliser des expériences de BiFC entre la P3N-PIPO et la CI-Cter du LMV afin de déterminer s'il s'agit d'une interaction directe. A cette fin, les séquences codantes de la P3N-PIPO et de la CI-Cter sont actuellement en cours de transfert dans les vecteurs de BiFC.

En parallèle de ces études, nous avons le souhait d'exprimer les protéines d'intérêt étiquetées *via* le virus. Pour cela, des clones de LMV-0k7 dont la CI ou la VPg était étiquetée en N-ter ou en C-ter avec un fluorophore ont été générés. Ces clones s'avèrent non infectieux, démontrant que l'étiquetage de ces protéines CI et VPg au sein du virus est délétère pour le cycle viral. Pour contourner cet obstacle, Amandine Bordat et Marie-Christine Houvenaghel travaillent actuellement à la synthèse de clones exprimant une copie surnuméraire de la VPg ou de la P3N-PIPO étiquetée avec la Mcherry. Cette copie est insérée entre les séquences P1 et HC-Pro, puisque ce site est permissif. Il n'est malheureusement pas possible de réaliser la même manœuvre avec la CI entière puisque l'insertion d'une séquence aussi longue serait préjudiciable pour le virus. En revanche, nous envisageons tout de même d'avoir recours à cette technique pour introduire une CI-Cter-GFP surnuméraire. Dans le cas où ces clones seraient viables, ces outils ouvriraient alors de nombreuses possibilités concernant la visualisation de ces protéines *in-planta* et dans des conditions les plus proches possibles d'une infection virale. Nous nous affranchirions alors de l'agroinfiltration et pourrions observer ces protéines au sein de laitues sensibles et résistantes, au front d'infection comme dans les feuilles systémiques.

Chapitre 3

La VPg du LMV agit-elle de concert avec la CI pour contourner les résistances $mo1$ de la laitue ?

Contexte de l'étude

- I. Le contournement de l'allèle de résistance $mo1^2$ est-il indépendant de la VPg ?
- II. La localisation subcellulaire de la VPg est-elle modifiée en condition d'infection ?

Contexte de l'étude

Pathosystème LVM/Laitue : deux déterminants de virulence

Bien que l'objet de cette thèse soit l'étude du rôle de la CI-Cter dans le contournement de la résistance conférée par eIF4E, il est nécessaire de prendre en compte la particularité de notre pathosystème d'étude, mise en évidence par A Abdul-razzak (2009) : la CI-Cter mais également la VPg sont impliquées dans le contournement de cette résistance. Il a été démontré lors de cette même étude que la VPg du LMV-E, virulent envers *mo1*¹ et *mo1*², ne conférait au LMV-0 (avirulent) que la capacité d'infecter des laitues *mo1*¹, contrairement à la CI-Cter du LMV-E qui elle conférait la capacité d'infecter les deux types de laitues résistantes. Il semble donc que la VPg du LMV soit suffisante (mais pas nécessaire) au contournement de *mo1*¹ et que la CI-Cter soit nécessaire et suffisante au contournement de *mo1*². Deux hypothèses sont envisageables pour expliquer ces observations : I) la VPg et la CI-Cter agissent de façon indépendante pour le contournement des résistances *mo1*, II) la VPg et la CI agissent de concert pour contourner la résistance et sont dépendantes l'une de l'autre pour assurer un contournement effectif. Dans le premier cas, le phénotype de contournement de *mo1*² associé à la CI-Cter ne serait pas influencé par la VPg alors que dans le second cas la modification de la séquence VPg pourrait modifier le phénotype de contournement lié à la CI en contexte *mo1*².

CI, VPg et eIF4E interagissent deux à deux

Le premier argument en faveur de la deuxième hypothèse repose sur la démonstration faite au laboratoire d'interactions deux à deux entre la CI, la VPg et eIF4E de laitue (Michon et al., 2006; Roudet-Tavert et al., 2007; German-Retana et al., 2008a; Tavert-Roudet et al., 2012). Ces trois interactions ont été démontrées *in-vitro* par ELISA, mais aussi *in-planta* par BiFC pour les interactions CI-Cter-eIF4E (Tavert-Roudet et al., 2012) et VPg-eIF4E (non publié). Aucune information n'est à ce jour disponible quant à la possibilité que ces trois protéines forment un complexe ternaire. Il est également possible que les interactions CI-eIF4E et VPg-eIF4E soient mutuellement exclusives et interviennent alors dans le recrutement de l'ARN viral soit pour la réplication soit pour la traduction. Néanmoins, les données de BiFC ont permis de déterminer que ces interactions ont toutes deux lieux dans le cytoplasme et le noyau de la cellule.

Certains isolats de LMV issus de la diversité naturelle ne contournent qu'un seul des deux allèles de résistance *mo1*

Un deuxième argument en faveur d'une coopération CI-Cter-VPg dans le contournement de la résistance *mo1* est l'existence dans la diversité naturelle d'isolats de LMV possédant les déterminants de contournement identifiés dans la CI-Cter mais décrits dans la littérature comme incapables d'infecter des laitues *mo1*². C'est par exemple le cas du LMV-1, dont la CI-Cter possède les acides aminés 602V et 617S mais ne semble infecter que des laitues *mo1*¹ (Dinant and Lot, 1992; Revers et al., 1997, tests effectués sur Mantilia et Salinas 88 à 4 semaines après inoculation), ou des isolats LMV FR26 et Vinca (provenant de plantes ornementales) possédant eux aussi la combinaison 602V-617S mais ne contournent pas les résistances *mo1* (travaux de L. Svanella, Figure 3.2). De tels isolats tendent à démontrer à nouveau l'importance du fond génétique du virus qui peut interférer avec les mutations dans la CI. L'hypothèse la plus vraisemblable est alors que la VPg de ces isolats n'est pas compatible avec un contournement des résistances et qu'une coopération CI-VPg est nécessaire.

Intégrer la VPg dans le paysage

Ce dernier chapitre de ma thèse s'intéresse donc à la place de la VPg au sein du processus de contournement des résistances *mo1*. Ceci est réalisé en parallèle de travaux menés par G. Tavert-Roudet visant à identifier les acides aminés de la VPg responsables du contournement dans le but, *in fine*, d'avoir une description plus précise de la complémentarité CI-VPg.

Pour cela, mes travaux se sont articulés autour de deux axes : d'une part l'étude de la complémentarité/antagonisme de CI-Cter et VPg, par la réalisation d'un virus chimère et d'autre part l'étude de la localisation de la VPg en condition saine et en condition d'infection, en présence de différents allèles d'eIF4E.

I. Le contournement de l'allèle de résistance *mo1*² est-il indépendant de la VPg ?

I.1 Obtention d'un virus LMV-0-A602V-G617S comportant la VPg du LMV-1

Comme énoncé plus haut, le LMV-1 est un isolat de LMV, récolté sur laitue résistante *mo1*¹ et dont le phénotype de contournement est contrasté : cet isolat est capable d'infecter des laitues *mo1*¹ et *mo1*⁰ mais pas *mo1*². Néanmoins, le séquençage de sa région CI-Cter révèle la présence de la combinaison 602V-617S, démontrée comme suffisante en fond génétique LMV-0 pour le contournement des résistances *mo1*¹ et *mo1*². L'hypothèse que nous avons formulée suite à cette observation stipule que la VPg du LMV-1 pourrait interférer avec le contournement de *mo1*² associé à la CI-Cter. Pour éprouver cette hypothèse, un virus LMV-0-A602V-G617S dont la VPg a été substituée par la VPg du LMV-1 a donc été généré, par recombinaison homologue chez la levure, de façon similaire à l'obtention des mutants dans la CI. La séquence VPg du LMV-1 a été amplifiée à partir d'un extrait ADNc généré par L. Svanelle et destiné au séquençage du génome complet, puis intégré au sein du LMV-0-A602V-G617S, lui-même amplifié en deux PCR divergentes autour de la VPg et chevauchantes à leur autre extrémité. Un des clones obtenus et vérifié par séquençage fut utilisé pour toutes les expériences : nous le nommerons LMV-0-A602V-G617S-VPg1.

I.2 Comportement du LMV-0-A602V-G617S-VPg1 sur laitues sensibles et résistantes

Le clone ainsi obtenu a été dans un premier temps propagé sur laitue sensible (Salinas) par inoculation biolistique avant de réaliser des inoculations mécaniques à partir des laitues infectées sur les 3 cultivars Salinas, Mantilia (*mo1*¹) et Salinas 88 (*mo1*²).

Trois expériences indépendantes ont été réalisées, avec l'inoculation contrôle de LMV-0-A602V-G617S. Lors de ces trois expériences, le LMV-0-A602V-G617S-VPg1 fut inoculé sur deux laitues sensibles et 3 à 5 laitues résistantes *mo1*¹ et *mo1*². Quel que soit le cultivar de laitue inoculé, 100% des plantes ont manifesté des symptômes, avec des délais d'apparition différents : les symptômes sur plante sensible sont apparus dès 10 jours après inoculation, sur Mantilia entre 20 et 30 jours et sur Salinas 88 plus tard (environ 40 jours). Le LMV-0-A602V-G617S, quant à lui, a provoqué des symptômes quasi-simultanément sur Mantilia et Salinas 88, aux alentours de 30 jours post-inoculation. Le virus chimérique obtenu est donc infectieux sur laitue sensible et infecte plus rapidement les laitues *mo1*¹ alors qu'il présente un retard d'infection sur *mo1*². Ce retard d'infection a conduit à une mauvaise interprétation lors de la première expérience, pour laquelle les feuilles

Mutations CI/VPg	Expérience 1			Expérience 2			Expérience 3		
	CI	VPg G100	VPg Y161	CI	VPg G100	VPg Y161	CI	VPg G100	VPg Y161
Salinas	-	G/S (1/2)	- (2/2)	-	G/S (2/2)	Y/H (2/2)	-	S (3/3)	Y/H (3/3)
Mantilia	-	- (4/4)	- (4/4)	-	- (4/4)	Y/H (1/4)	-	- (1/1)	- (1/1)
Salinas 88	-	ND	ND	-	- (3/3)	- (3/3)	-	- (3/3)	H (3/3)

Figure 3.1 : Mutations détectées dans la région CI-Cter-VPg dans la descendance du virus chimérique LMV-0-A602V-G617S-VPg1 propagé sur laitues sensible et résistantes

L'absence de mutations est symbolisée par un -. L'acide aminé muté est spécifié en code à une lettre et le nombre d'événements de mutation sur le nombre total de séquences obtenues est indiqué entre parenthèses. ND : Non Déterminé, les plantes ont été récoltées avant la possible apparition de symptômes.

CI		Infecte
LMV-0mut	IGDMIRSRYSTNHSRENLQKLVVVRDTIINFECQAGTSDGGSFDMETAQKLAEEYGCIDVIYHQ	<i>mo1⁰, mo1¹ et mo1²</i>
LMV-1	LGDMIRSRYSTNHSRENLQKLVVVRDTIINFECQAGTSDGGSFDMETAQKLAEEYGCIDVIYHQ	<i>mo1⁰ et mo1¹</i>
FR 26	IGDMIRSRYSTNHSRENLQKLVVVRDTIINFECQAGTSDGGSFDMETAQKLAEEYGCIDVIYHQ	<i>mo1⁰</i>
Vinca	IGDMIRSRYSTNHSRENLQKLVVVRDTIINFECQAGTSDGGSFDMETAQKLAEEYGCIDVIYHQ	<i>mo1⁰</i>
VPg		
LMV-0	GKGKRQR-QKLRYSRQARDNKVGVIEVYGDDATMEHYFGAAYTEKGGKSGKTKMGTKNRRFVNMYGYNPEDFSFIRFLDPL	
LMV-1	GKGKRQR-QKLRYSRQARDNKVGVIEVYGDDATMEHYFGAAYTEKGGKSGKTKMGTKNRRFVNMYGYNPEDFSFIRFLDPL	
FR 26	GKGKRQR-QKLRYSRQARDNKVGVIEVYGDDATMEHYFGAAYTEKGGKSGKTKMGTKNRRFVNMYGYNPEDFSFIRFLDPL	
Vinca	GKGKRQR-QKLRYSRQARDNKVGVIEVYGDDATMEHYFGAAYTEKGGKSGKTKMGTKNRRFVNMYGYNPEDFSFIRFLDPL	
TuMV	AKGKRQR-QKLFNRNARDNKMGREVGDDDTIEHFFGDAYTKKGGKSGRTRIGHKNRKFINMYGFDPEDFSFAVRVFDPL	
PVY	GKNKSKRIQALKFRHARDKRAGFEIDNNDTIEEFFGSAYRKKGGKGGTTVGMGKSSRRFINMYGFDPEYSFIQFVDPL	
100		
LMV-0	TGKTMDEQVFSDSLQVDAFVSKERLKLSEGEIESEHMRN--GIRAYLVKNLTTAALEIDMTPHNSCQLGAKTNNIAGYV	
LMV-1	TGKTMDEQVFSDSLQVDAFVSKERLKLSEGEIESEHMRN--GIRAYLVKNLTTAALEIDMTPHNSCQLGAKTNNIAGYV	
FR 26	TGKTMDEQVFSDSLQVDAFVSKERLKLSEGEIESEHMRN--GIRAYLVKNLTTAALEIDMTPHNSCQLGAKTNNIAGYV	
Vinca	TGKTMDEQVFSDSLQVDAFVSKERLKLSEGEIESEHMRN--GIRAYLVKNLTTAALEIDMTPHNPLQLGAKTNNIAGFA	
TuMV	TGATLDDNPLDITLVQEHFGNIRMDLLGEDELDSNEIRVNKTIQAYYMNKTKGALKVDLTPHPIPLKVCDLHATIAGF	
PVY	TGRQIEENVYADIRDIQERFSEVVRKKMVENDDLEMQALGSNTTIHAYFRKDWCDKALKIDLMPHNPLKVCCKTNGIAKFP	
161		
LMV-0	DREYELRQTGEARVVAPALIPKDNPIITDEDIPVKHE	
LMV-1	DREYELRQTGEARVVAPALIPKDNPIITDEDIPVKHE	
FR 26	DREYELRQTGEARVVAPALIPKDNPIITDEDIPVKHE	
Vinca	DREYELRQTGEARVVAPALIPKDNPIITDEDIPVKHE	
TuMV	ERENELRQTGKAQPINIDEVPRAN---NELVPVDHE	
PVY	ERELELRQTGPAVEVDVKDIPAQE-----VEHE	

Figure 3.2 : Alignement des séquences protéiques de CI-Cter d'isolats de LMV et de VPg de plusieurs potyvirus

Les acides aminés soulignés sont impliqués dans le contournement des résistances conférées par eIF4E chez la laitue (dans la CI, LMV-0mut = LMV-0-A602V-G617S), chez le piment (dans la VPg du PVY, Ayme et al., 2007; Ben Khalifa et al., 2012) et eIF(iso)4E chez *A. Thaliana* (dans la VPg du TuMV, Gallois et al., 2010). Les acides aminés sont numérotés par rapport à la séquence de la CI et de la VPg du LMV (X97704.2). Les séquences VPg du TuMV et du PVY sont extraites de GenBank (numéro d'accès NP_734219.1 et NP_734252.1 respectivement).

systémiques des laitues ont été prélevées dès l'apparition des symptômes sur Mantilia, considérant que le virus chimérique n'était pas infectieux sur Salinas 88.

Après l'apparition des symptômes, la descendance virale a été analysée par séquençage de la région CI-Cter-VPg dans le but de détecter d'éventuelles mutations. Les résultats sont présentés dans la figure 3.1. Aucune mutation supplémentaire n'a été détectée dans la CI-Cter de ces virus. Cependant deux positions dans la VPg se sont révélées polymorphes dans les trois expériences indépendantes. D'une part la nature de l'acide aminé 100, s'est avérée variable après propagation dans la laitue sensible puisque lors des trois expériences indépendantes la descendance virale contenait soit un mélange de virus natif (100G) et mutant (100S) soit uniquement des virus mutants 100S. Il est à noter que le LMV-0 et le LMV-1 diffèrent à cette position puisque dans la VPg du LMV-0 une Serine est présente (100S) alors qu'une Glycine est présente dans la VPg de LMV-1 (100G) (Figure 3.2). D'autre part la position 161, qui ne présente pas de polymorphisme dans la diversité naturelle du LMV, a subi des mutations à plusieurs occasions, deux fois sur plante sensible (population en mélange 161Y/H), une fois sur laitue *mo1*¹ et une fois sur la totalité des laitues *mo1*² de l'expérience.

*1.3 La VPg du LMV-1 n'abolit pas le contournement de l'allèle *mo1*² mais le ralentit*

D'après nos résultats, le LMV-0-A602V-G617S auquel nous avons substitué la VPg par celle codée par LMV-1, est toujours capable d'infecter des laitues *mo1*². Cependant, nous avons noté que le délai d'infection sur ces dernières est allongé de façon reproductible. Cela remet alors en question les observations antérieures selon lesquelles le LMV-1 n'infecte pas les laitues *mo1*², puisqu'il est imaginable que la durée pendant laquelle le suivi des symptômes a été réalisé ait été trop courte. En effet, les inoculations de LMV-1 décrites dans Revers et al. (1997) n'ont été suivies que pendant 4 semaines, ce qui semble insuffisant pour observer l'apparition de symptômes sur les plantes *mo1*². Nous ne disposons pas au laboratoire de LMV-1 sous forme de virus à inoculer, aussi nous n'avons pas pu intégrer ce contrôle dans nos expériences.

Ainsi, alors que les mutants dans la CI de LMV-0 (en particulier LMV-0-A602V-G-617S) infectaient les laitues *mo1*¹ et *mo1*² avec des efficacités d'infection différentes mais dans un laps de temps identique, le virus chimérique semble infecter les deux cultivars résistants avec la même efficacité (100%) mais avec un décalage dans le temps. Ceci indique que cette VPg semble améliorer le contournement des résistances *mo1*, puisque celui-ci ne semble plus être partiel mais complet.

Cependant, pour tirer de solides conclusions, plusieurs expériences contrôle sont manquantes. Les inoculations de LMV-0-A602V-G617S-VPg1 doivent être reconduites, en parallèle d'inoculations avec le LMV-0-A602V-G617S mais aussi de LMV-1 dont il nous faudrait obtenir une souche auprès de M. Hervé Lot, et de LMV-0-VPg1 qui permettrait de déterminer avec certitude si la VPg du LMV-1 seule est capable dans un premier temps de permettre l'infection de laitues *mo1*¹. De plus, il apparaît nécessaire de conduire ces expériences d'inoculation sur un nombre plus grand de plantes, afin de confirmer le caractère total du contournement des résistances associé au LMV-0-A602V-G617S-VPg1.

Néanmoins, nous pouvons tout de même tirer des informations concernant les mutations apparues dans la VPg du virus chimérique. Les séquences protéiques de la VPg du LMV-0 et du LMV-1 divergent aux sept positions 70, 90, 100, 145, 148, 156 et 180 (Figure 3.2), dont deux (90 et 100) sont des positions candidates pour le contournement des résistances *mo1* et sont actuellement étudiées par génétique inverse par G. Tavert-Roudet. Au niveau du codon 100 de la VPg de clones mutants du

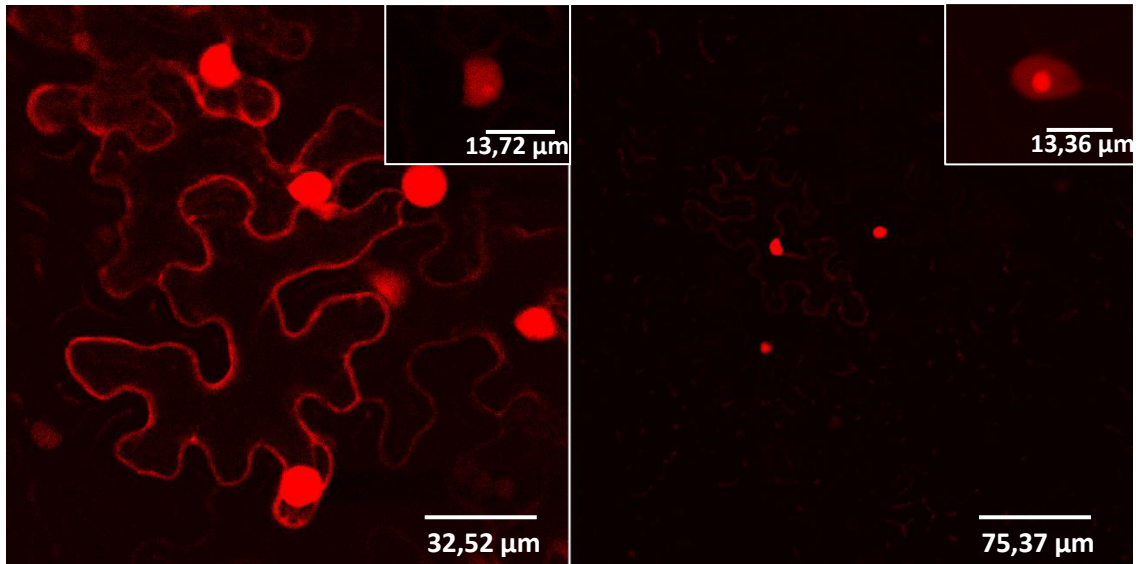


Figure 3.3 : Observation au microscope confocal de la localisation subcellulaire de la VPg

La VPg exprimée dans des feuilles de *N. benthamiana* après transformation transitoire par agroinfiltration, est fusionnée à la RFP en N-ter (photo de gauche) ou en C-ter (photo de gauche). L'encart en haut à droite représente un noyau et son nucléole marqué à la VPg-RFP, à un grossissement plus élevé.

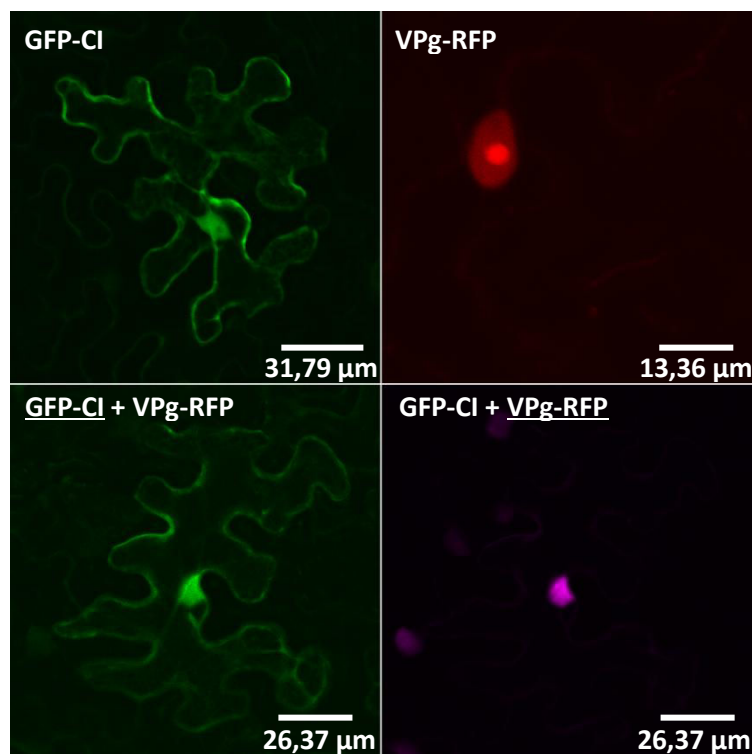


Figure 3.4 : Observation de la colocalisation entre la GFP-CI et la VPg-RFP du LMV

LMV-0, la substitution de la Sérine par une Glycine a été observée à plusieurs occasions en contexte de résistance *mo1*¹ (cf Chapitre 1). Ceci suggérerait que cette position serait importante pour la stabilisation du virus mutant dérivé de LMV-0 et portant les mutations de contournement dans la CI-Cter. Ici, la mutation est inverse : la Glycine est substituée par une Sérine, et elle apparaît lors de l'infection de laitues sensibles, mais pas en contexte de résistance. Ces données tendent donc à confirmer le rôle clef joué par l'acide aminé 100 de la VPg dans le contournement de la résistance *mo1*¹ puisque la Sérine semble « adaptée » aux cultivars sensibles alors que la Glycine est sélectionnée en plante résistante. De plus, par alignement des séquences VPg du LMV et du PVY (Figure 3.2), il apparaît que la position 101 de la VPg du PVY, démontrée par Ayme et al. (2007) comme impliquée dans la virulence envers l'allèle résistant *pvr2*³ du gène codant pour eIF4E chez le piment, correspond à la position 100 de la VPg du LMV.

Enfin, le codon 161 de la VPg du LMV est également instable dans la descendance du LMV-0-A602V-G617S-VPg1 puisque la substitution du Tryptophane par une Histidine est apparue à plusieurs occasions, sur laitue sensible comme résistante. L'étude de la diversité naturelle du LMV n'a révélé aucun polymorphisme à cette position, en revanche l'alignement de la VPg du LMV avec celle du TuMV (Figure 3.2) montre que l'acide aminé 161 chez le LMV correspondrait à la position 163 de la VPg du TuMV. Ce parallèle est intéressant puisque la mutation R163Y dans la VPg du TuMV a été démontrée par Gallois et al. (2010) comme étant suffisante pour permettre au virus d'infecter des *A. thaliana* KO pour les gènes *eIF(iso)4E* et *eIF(iso)4G*.

Ainsi, ces résultats méritent d'être répétés et renforcés mais ils semblent démontrer une réelle coopération entre la CI-Cter et la VPg du LMV pour contourner les résistances conférées par eIF4E chez la laitue.

II. La localisation subcellulaire de la VPg est-elle modifiée en présence de la CI ou en condition d'infection ?

Afin de suivre la localisation subcellulaire de la VPg du LMV-0, exprimée seule ou en compagnie des autres partenaires viraux, celle-ci a été clonée dans les vecteurs d'agroinfiltration permettant sa fusion à la RFP en N-ter (vecteur pB7WGF2) ou en C-ter (vecteur pB7FWG2), utilisés également pour l'étiquetage de la P3N-PIPO (cf Chapitre 2).

Des expériences d'agroinfiltration pour la VPg-RFP et RFP-VPg ont donc été réalisées dans des *N. benthamiana* saines ou infectées au préalable avec le LMV-0K7-GFP, avec ou sans co-transformation de la GFP-CI, et les feuilles transformées ont été observées 48h après agroinfiltration au microscope confocal. L'observation des constructions RFP-VPg et VPg-RFP exprimées seules en plante saine a révélé que, malgré une différence en terme d'intensité de fluorescence, les deux protéines de fusion présentent la même localisation : elles se situent principalement dans le noyau des cellules, plus particulièrement dans le nucléole, mais également dans le cytoplasme. Les mêmes observations ont été faites après expression transitoire de RFP-VPg dans la laitue Trocadéro. Ceci est en accord avec les données de la littérature qui décrivent la localisation nucléaire de la VPg de plusieurs potyvirus (Beauchemin and Laliberté, 2007; Wei and Wang, 2008; Rajamäki and Valkonen, 2009; Zilian and Maiss, 2011; Sun et al., 2013). Ainsi, malgré l'absence de résultats de Western Blot (cf Chapitre 2) permettant de confirmer l'expression de la protéine de fusion, nous sommes assez confiants

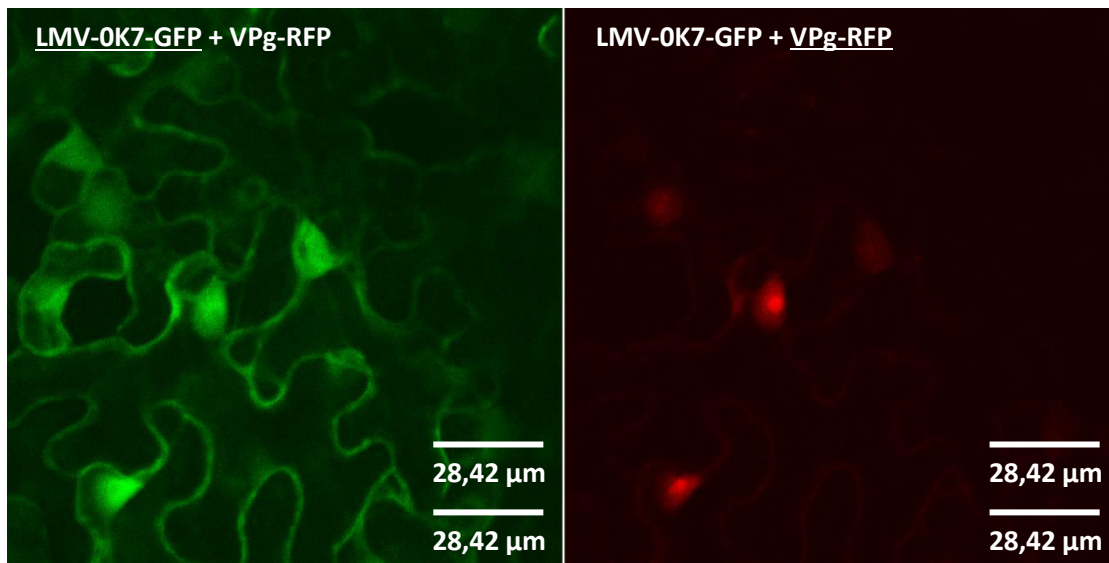


Figure 3.5 : Observation de la localisation de la VPg-RFP dans une cellule infectée par le LMV-0K7-GFP

concernant la validité de ces constructions et avons démontré que l'étiquetage en N-ter ou C-ter de la protéine VPg du LMV ne modifie pas sa localisation.

Lors de la co-expression de GFP-CI et VPg-RFP dans des cellules de *N. benthamiana*, aucune relocalisation particulière de la CI ou de la VPg n'a été observée en comparaison de la localisation de chacune des deux protéines seule (Figure 3.4). La CI étant présente dans le noyau mais pas dans le nucléole, sur certaines photos il semblerait que la VPg est moins présente dans le nucléole lorsqu'elle est co-exprimée avec la CI mais cela ne concerne pas la totalité des cellules. De même, lorsque la VPg-RFP est exprimée au sein de cellules infectées par le LMV-OK7-GFP, elle présente la même localisation nucléo-cytoplasmique (Figure 3.5).

Ainsi, ces expériences préliminaires n'ont pas apporté d'informations supplémentaires sur « l'articulation » CI-VPg dans le contournement des résistances conférées par eIF4E. A terme, le but serait, tout comme pour les expériences de co-localisation présentées dans le Chapitre 2, de réaliser ces expériences chez les différents génotypes de laitue (sensible et résistantes), afin de comparer l'effet de l'allèle d'eIF4E sur la localisation des protéines. Pour le moment, malgré nos efforts menés pour améliorer l'expression transitoire de protéines marquées à l'aide de fluorophores chez la laitue, le niveau d'expression obtenu est trop faible pour mener à bien ces expériences. De plus, Amandine Bordat vient d'obtenir des clones de LMV exprimant une copie surnuméraire de la VPg étiquetée avec la mcherry. Cette copie a été insérée entre les séquences P1 et HC-Pro (site permissif). Dans le cas où ces clones seraient viables, ces outils permettront de visualiser la fusion mcherry-VPg *in planta* et dans des conditions les plus proches possibles d'une infection virale.

Nous disposons à ce jour de vecteurs permettant l'expression d'eIF4E de laitue de type sensible (eIF4E0) ou résistante (eIF4E1 et 2) en fusion avec la RFP, dont la localisation est inchangée avec ou sans la GFP-CI. Il faudrait disposer d'un troisième fluorophore pour mener des expériences de co-localisation en intégrant les trois partenaires : eIF4E, CI et VPg. La conduite d'expériences de BiFC démontrant l'interaction CI-Cter-VPg au sein de laitues sensibles et résistantes nous renseignerait sur la capacité de ces deux facteurs viraux d'interagir en présence d'un allèle d'eIF4E résistant.

Enfin, la question de l'établissement d'un complexe ternaire VPg-eIF4E-CI-Cter reste entière et il paraît crucial d'y répondre. Ceci pourrait être résolu par exemple par des essais de BiFC multicolore (Kodama and Wada, 2009; Weinthal and Tzfira, 2009). Plusieurs pistes ont été suivies ces dernières années au laboratoire pour démontrer l'existence d'un tel complexe. Celle de la calorimétrie isotherme à titration (Isothermal Titration Calorimetry ou ITC) (Bruylants et al., 2005 ; Bartik, 2005) a été envisagée. Cette technique de microcalorimétrie peut se révéler utile pour mettre en évidence et quantifier une compétition entre deux ligands. Mais cette technique nécessite la compatibilité des tampons de resuspension des protéines exprimées en système hétérologue, et l'optimisation de la purification de la CI en conditions non dénaturantes n'a pas pu être réalisée au laboratoire. Une autre approche par co-purification, permettant de donner accès à des complexes pré-formés *in vivo*, et donc particulièrement susceptibles de représenter une réalité biologique, surtout en condition d'infection virale, a été menée, basée sur le Tandem Affinity Purification Tag (Puig et al., 2001). La protéine eIF(iso)4E a été étiquetée à son extrémité N-terminale (avec la GFP, et/ou une étiquette de type TAP) et exprimée par transgénèse dans un mutant d'*A. thaliana* KO pour le facteur natif. Des essais de co-purification ont été réalisés, afin d'identifier les composants des complexes par analyse en spectrométrie de masse, mais n'ont rien donné (J. Walter, communication personnelle).

Discussion et perspectives

- I. Deux combinaisons de mutations sont associées au contournement des résistances *mo1* chez la laitue
- II. Le contournement de la résistance *mo1* serait associé à la restauration du mouvement en systémie du virus
 - III. L'effet des mutations dans la CI-Cter sur le contournement des résistances *mo1* est modulé par le fond génétique du virus
- IV. Comment expliquer la durabilité de la résistance conférée par eIF4E chez la laitue ?

Les travaux réalisés lors des thèses de Thomas Guiraud (2004) et Anas Abdul-razzak (2010) au sein du laboratoire de virologie ont mis en évidence la complexité du processus de contournement de la résistance conférée par eIF4E dans le pathosystème LMV/Laitue. En effet, si de nombreuses études attribuent le contournement des résistances eIF4E à des mutations dans la protéine VPg, ces travaux ont démontré pour la première fois l'implication de la CI dans le contournement.

Cette thèse s'inscrit donc dans la continuité de ces travaux et visait à caractériser les positions en acides aminés de la CI dont la mutation est responsable du contournement des résistances *mo1*. Cette caractérisation, réalisée en parallèle de l'étude de la diversité naturelle du LMV menée par L. Svanella, s'est attachée au taux de contournement engendré, à la possible complémentarité des mutations et à l'étape du cycle viral concernée par celles-ci, dans l'optique d'élucider la fonction de la région CI-C-terminale dans l'infection virale. Cette dualité entre expériences de génétique inverse et étude de la biologie d'isolats issus de la diversité naturelle du LMV a permis à la fois de valider la pertinence des essais en serre et d'intégrer ces résultats expérimentaux dans un contexte plus agronomique.

I - Deux combinaisons de mutations dans la région C-terminale de la CI permettent au LMV d'acquérir la virulence vis-à-vis du gène majeur de résistance *mo1* chez la laitue.

L'inoculation d'isolats de LMV issus de mauvaises herbes et de plantes ornementales a permis l'identification au préalable de ma thèse de 3 acides aminés potentiellement impliqués dans le contournement des résistances *mo1*. Parmi eux, les acides aminés 602V/T et 627T semblent directement associés au contournement puisqu'ils sont apparus dans la CI des isolats ayant évolué vers la virulence sur laitue *mo1*¹. L'acide aminé 617S quant à lui est commun à tous les isolats capables d'évoluer ainsi que ceux appartenant au groupe Most, mais diffère chez le LMV-0, suggérant une corrélation entre la présence d'une sérine en position 617 et la capacité du virus à évoluer vers la virulence. Ces trois acides aminés s'ajoutent au 621T identifié précédemment (Abdul-Razzak et al., 2009) et qui s'est avéré suffisant pour conférer au LMV-0 la capacité d'infecter des laitues résistantes.

L'introduction des mutations aux positions 602, 617, 621 et 627, seules et en combinaison dans la séquence du LMV-0, a permis de confirmer les résultats concernant la simple mutation 621T et de découvrir une autre voie de contournement des résistances *mo1* impliquant la double mutation 602V-617S. De façon intéressante, chaque voie de contournement permet de contourner à la fois *mo1*¹ et *mo1*², mais avec des efficacités différentes. En effet, dans tous les cas les virus contournants

ont infecté un plus grand nombre de laitues *mo1²* que *mo1¹*. De même, différents taux d'infection sont associés à chaque combinaison de mutations. En particulier, l'association des mutations 621T et 602V-617S confère au LMV-0 un taux d'infection sur *mo1²* plus élevé que les mutations séparées et à l'inverse diminue le taux d'infection sur *mo1¹*. Dans nos expériences, la mutation A627T dans un fond génétique de LMV-0 n'a pas été clairement associée au contournement de la résistance.

Des expériences ont été menées au laboratoire afin de corréliser les données biologiques (contournement de la résistance ou pas) aux interactions entre protéines, notamment en ELISA semi-quantitatif (Tavert-Roudet et al., 2012). Ces expériences *in vitro* ont montré que la région C-terminale de la CI du LMV-0, bien que ne comportant pas les acides aminés associés à la virulence identifiés dans cette étude, est capable d'interagir avec eIF4E, qu'il s'agisse de la forme codée par l'allèle de sensibilité (eIF4E^o) ou de résistance (eIF4E¹ et eIF4E²). Le signal d'interaction entre la CI-Cter de LMV-0 semble même plus fort avec les formes eIF4E¹ et eIF4E² et la mutation S621T ne modifie pas cette interaction. Nous pouvons donc difficilement envisager que la résistance puisse être la conséquence d'une interruption de l'interaction entre les protéines CI-Cter et eIF4E, comme cela a pu être montré dans le cas de la VPg et eIF4E pour le TuMV, le TEV et le PVY (Wittmann et al., 1997; Léonard et al., 2000; Schaad et al., 2000; Charron et al., 2008). La CI est en effet intégrée dans un système d'interaction à trois partenaires, faisant intervenir également la VPg. Dans l'hypothèse de l'établissement d'un complexe à trois partenaires ou plus, il est possible que les mutations dans la CI-Cter permettent de stabiliser ledit complexe ou à l'inverse de le rendre plus transitoire pour améliorer sa dynamique. L'addition de chacune de ces trois mutations (602V, 617S et 621T) pourrait donc, en contexte *mo1²*, améliorer les constantes d'association du complexe VPg-CI-eIF4E et au contraire, affaiblir ou « figer » le complexe formé en présence d'un allèle *mo1¹*.

Pour répondre à cette question, il paraît essentiel de déterminer l'existence ou non d'un tel complexe ternaire, par BiFC multi-couleur *in planta* (Weinthal and Tzfira, 2009; Kodama and Wada, 2009) ou par triple hybride chez la levure (Licitra and Liu, 1996; Immink et al., 2009), mais aussi d'en caractériser les constantes biochimiques en présence d'une forme d'eIF4E conférant la sensibilité (eIF4E^o) ou la résistance au LMV (eIF4E¹ et eIF4E²). Une des expériences envisagées au laboratoire fait appel à l'anisotropie de fluorescence. Il s'agit de marquer une des protéines interagissantes avec une sonde fluorescente et d'observer la dépolarisation de cette lumière lorsque l'on ajoute une à une les autres protéines partenaires. En cas d'interaction, le complexe formé sera de taille plus importante et la dépolarisation sera amoindrie (Weber, 1953). Par la suite, des expériences d'ultracentrifugation et d'ITC (Isothermal Titration Calorimetry) sont envisagées, toujours pour visualiser l'interaction et pour en déterminer les paramètres thermodynamiques (Pierce et al., 1999; Bruylants et al., 2005).

Enfin, trois de ces mutations font intervenir une sérine ou une thréonine, c'est pourquoi nous nous sommes demandés si cela ne permettrait pas la phosphorylation de ces résidus, dans un but de régulation. La recherche par bioinformatique (NetPhos et Scansite) de sites susceptibles d'être phosphorylés a permis d'identifier la 617S et la 627T comme potentiellement phosphorylées (Annexe 1), avec cependant une faible probabilité.

Un des résultats importants de cette étude est qu'elle démontre que les mutations de contournement dans la CI-C-terminale du LMV ne permettent qu'un contournement partiel des résistances *mo1* chez la laitue. De plus le cumul des mutations semble améliorer le taux de contournement dans les laitues *mo1*² et être privilégié au sein de la diversité naturelle du LMV. La question qui se pose est donc : comment expliquer ce phénomène ?

II- Le contournement de la résistance serait associé à la restauration du mouvement en systémie

Les études portant sur les résistances conférées par des mutations du facteur eIF4E montrent que le phénotype de la résistance varie selon le pathosystème, et que différentes étapes du cycle viral peuvent être affectées. Ainsi, chez le piment, les isolats de PVY non contournants ne sont pas détectés sur les feuilles inoculées, la résistance s'effectuant à un stade très précoce du cycle viral (Charron et al., 2008). Chez le pois, c'est le même allèle de résistance au locus *eIF4E* qui confère la résistance à trois espèces de potyvirus : le *Pea seed-borne mosaic virus* PSbMV (*sbm-1*), le *Bean yellow mosaic virus* BYMV-W (*wlm*) et le *Clover yellow vein virus* CIYVV (*cyv-2*) (Andrade et al., 2009). Toutefois, le mécanisme de la résistance est virus-dépendant : ainsi le PSbMV est restreint à une seule cellule après inoculation par biolistique d'un clone d'ADNc infectieux, alors que le CIYVV est capable de se déplacer de cellule en cellule (Andrade et al., 2007; Gao et al., 2004). Il est probable que les différents facteurs de virulence identifiés à ce jour vis-à-vis des résistances eIF4E (CI, VPg et P1) soient impliqués dans la restauration de différentes étapes du cycle viral. Nous nous sommes donc intéressés à l'étape du cycle viral qui pouvait être restaurée par l'introduction des mutations de contournement dans la CI du LMV.

En s'appuyant sur des exemples de la littérature démontrant que eIF4E pouvait interférer avec le mouvement du virus (German-Retana et al., 2003; Contreras-Paredes et al., 2012) et que la CI possède elle aussi un rôle dans ce mouvement (Roberts et al., 1998; Carrington et al., 1998; Wei et al., 2010b), nous avons choisi de tester l'hypothèse selon laquelle les mutations de la CI-Cter amélioreraient le mouvement de cellule à cellule du virus. Nous avons démontré que le mouvement

de cellule à cellule (et/ou réplication) est ralenti dans les laitues résistantes et que les mutations de la CI-Cter ne restaurent pas cette propagation de cellule à cellule. En revanche, le mouvement en systémie des virus mutés au sein de laitues résistantes est rétabli.

Les mécanismes qui gouvernent le mouvement systémique du virus *via* le phloème sont encore peu connus, en particulier peu de facteurs de l'hôte intervenant dans cette étape du cycle viral ont été identifiés (pour revue, voir Hipper et al., 2013). Les facteurs viraux connus pour interférer avec le mouvement à longue distance des potyvirus sont ceux codés par les gènes *RTM1*, *RTM2* et *RTM3* (Restricted TEV Movement) dont les allèles de résistance chez *Arabidopsis thaliana* bloquent le mouvement à longue distance du TEV (Chisholm et al., 2000), du LMV et du PPV (Decroocq et al., 2006; Cosson et al., 2010). Cependant il s'agit là d'une résistance dominante, contournée par des mutations dans la région N-terminale de la protéine CP (Decroocq et al., 2009), et qui s'appuie vraisemblablement sur le déclenchement de réactions de défense de la plante qui auraient lieu au niveau du phloème plutôt que sur l'interférence avec le mouvement du virus à proprement parler. Le seul facteur de l'hôte ayant été identifié en tant que facteur de sensibilité au virus et associé au mouvement à longue distance est la protéine PVIP (potyvirus VPg interacting protein, Dunoyer et al., 2004), dont la localisation nucléaire, l'interaction avec VPg et la présence d'un homéo-domaine portent à croire que ce facteur participe au mouvement à longue distance du virus de manière indirecte, par régulation de l'expression de gènes de l'hôte impliqués dans cette étape. Nos travaux ainsi que ceux de Contreras-Paredes et al. (2012) démontrent donc que le facteur eIF4E pourrait lui aussi être un facteur de sensibilité impliqué dans le mouvement à longue distance du virus, en coopération avec la CI. Ceci pourrait également se faire avec l'aide de la protéine HC-Pro, interacteur à la fois de eIF4E (Ala-Poikela et al., 2011) et de la CI (Guo et al., 2001), et qui intervient dans le mouvement à longue distance du virus (Cronin et al., 1995; Kasschau et al., 1997; Klein et al., 1994). Il a été démontré par ailleurs que le rôle de HC-Pro dans le mouvement systémique du virus reposait sur sa capacité à inhiber la réaction de silencing induite par le virus (Garcia-Ruiz et al., 2010). En outre, il a été démontré que la protéine P1, qui est elle aussi un déterminant de virulence vis-à-vis de la résistance eIF4E chez le pois (Nakahara et al., 2010), stimule l'inhibition du silencing lié à HC-Pro (Kasschau and Carrington, 1998; Rajamäki et al., 2005; Tena Fernández et al., 2013). Une hypothèse sur l'implication d'eIF4E dans la suppression du silencing a été avancée par Aiming Wang et Sowmya Krishnaswamy (2012), en relation avec la VPg, HC-Pro et P1 mais sans y intégrer la CI.

Un autre paramètre peut être aussi pris en considération dans l'effet des mutations de contournement sur le mouvement à longue distance, qui serait lié à la densité des foyers d'infection primaire observés sur les feuilles inoculées après inoculation mécanique. Lors des expériences visant à suivre l'évolution de la surface des foyers d'infection sur laitue sensible et résistante, j'ai pu

constater en effet que le nombre de foyers générés par le LMV-OK7-GFP sur laitue *mo1*² semblait systématiquement moins élevé que le nombre de foyers induits par les virus mutés contournants, alors que les inocula viraux étaient calibrés et équivalents. Les mutations de contournement augmenteraient donc en plus la probabilité de chargement dans le phloème des virus mutés, en favorisant l'établissement de foyers primaires. Le nombre de foyers étant plus élevé, la probabilité de « rencontrer » un vaisseau conducteur dans lequel se charger serait elle-même plus élevée. Dans ce cas, les mutations dans la CI seraient impliquées aussi dans les événements très précoces dans le cycle viral probablement liés aux premiers cycles de réplication ou de traduction.

Il faut aussi noter que ces résultats ont été obtenus par inoculation mécanique des virus, où de nombreuses blessures sont infligées à la feuille, ménageant un grand nombre de portes d'entrée pour le virus, ce qui ne correspond pas forcément à la réalité biologique d'une transmission par insecte vecteur.

Si la CI-Cter ne possède pas encore de fonction connue, la CI centrale possède une activité hélicase, nécessaire à la réplication du virus (voir revue Sorel et al. 2014 dans l'introduction de cette thèse). Il ne peut être exclu que la CI-Cter intervienne en tant qu'unité régulatrice de l'activité hélicase de la protéine, auquel cas il serait intéressant d'évaluer l'effet des mutations de contournement sur cette activité, que la protéine soit seule ou en interaction avec VPg ou eIF4E. De telles expériences furent envisagées au cours de ma thèse, en collaboration avec Juan-Antonio García (Madrid), mais annulées par manque de temps. En effet, pour mener à bien des tests d'activité hélicase *in vitro*, cela suppose de produire et de purifier un grand nombre de protéines recombinantes afin de disposer de plusieurs lots de protéines indépendants, car selon Juan-Antonio Garcia, les résultats des tests d'activité hélicase *in vitro* peuvent varier selon les lots. De même, n'ayant pas pu réaliser d'expériences de transfection de protoplastes de laitue sensible et résistante avec les clones d'ADNc complets de LMV-0 et des mutants virulents, nous ne pouvons pas conclure sur l'impact de la présence de forme mutée d'eIF4E sur le taux de réplication virale. Une alternative à l'infection de protoplastes serait la co-infiltration de virus exprimant la R-luciférase et d'agrobactéries comportant la F-luciférase, comme cela a été fait par Eskelin et al. (2010) pour le PVA. Cette méthode permet de quantifier « *in planta* » l'accumulation virale dans une cellule donnée de manière relative à l'expression du rapporteur *F-luc*. Mais pour cela nous avons besoin d'un virus LMV qui soit inoculable par agroinfiltration pour ensuite le marquer à la luciférase. Ce virus est en cours d'obtention au laboratoire afin de s'affranchir du tir par biolistique et de simplifier les co-inoculations.

III - Modulation du rôle des mutations de contournement de la résistance *mo1* par le fond génétique du virus

Comme énoncé plus haut, la réalisation de ces expériences de génétique inverse en parallèle de l'étude de la diversité naturelle du LMV a permis de valider la pertinence des essais en serre puisque les mutations acquises lors de nos essais correspondent à des positions polymorphes dans la diversité naturelle. Une étude récente menée par Hajimorad et al. (2011) a en outre montré clairement pour le SMV que les expériences menées au laboratoire « mimaient » la réalité de ce qui se passait en conditions naturelles.

Cependant, nos travaux ont également montré que les mutations de la CI ne peuvent être considérées indépendamment du fond génétique du virus dans lequel elles sont introduites. Deux exemples illustrent cette réflexion : le cas du LMV-0-A627T et celui du LMV-1. En effet, la mutation 627T qui semble suffisante au contournement des résistances *mo1* dans les isolats non-laitue Tn516 et 517, ne l'est pas lorsqu'elle est introduite dans le génome du LMV-0. A l'inverse, la double mutation 602V-617S confère au LMV-0 la capacité d'infecter des laitues résistantes alors que le LMV-1 qui possède cette même combinaison n'infecte pas les laitues *mo1*² dans le laps de temps étudié. Ceci indique que d'autres facteurs viraux ou d'autres régions de la CI sont associées au contournement de la résistance conférée par eIF4E. Le premier candidat à cette interférence est la VPg, principal déterminant de virulence vis-à-vis des résistances liées à eIF4E dans de nombreux pathosystèmes (Léonard et al., 2000; Moury et al., 2004; Khan et al., 2008; Gallois et al., 2010). Si les résultats issus de l'analyse biologique du virus LMV-0-A602V-G617S-VPg1 obtenus dans cette thèse sont en demi-teinte du fait de l'absence d'un contrôle LMV-1 à intégrer dans nos expériences, elles ont tout de même permis de révéler que la VPg du LMV-1 possède des déterminants de virulence qui ont amélioré le contournement du LMV-0-A602V-G617S sur laitue *mo1*¹ mais retardé l'infection de celui-ci sur laitue *mo1*². Parmi les positions de la VPg qui présentent un polymorphisme entre LMV-0 et LMV-1, deux présentent un intérêt particulier puisqu'elles se situent dans la région centrale de la protéine, démontrée comme impliquée dans l'interaction avec le facteur eIF4E (Roudet-Tavert et al., 2007) : les positions 90 et 100. La mutation de cette dernière est d'ailleurs responsable du contournement par le PVY de la résistance eIF4E chez le piment (Ayme et al., 2007; Ben Khalifa et al., 2012). Sa réversion au sein du virus chimérique vers la Sérine du LMV-0 en plante sensible et sa mutation au sein des virus LMV-0 mutés vers une Glycine indiquent que cette position possède un rôle clé dans l'adaptation du virus à l'allèle d'eIF4E de l'hôte. Une autre position d'intérêt a pu être décelée par nos expériences : la position 161 dont la mutation Y vers H est apparue à plusieurs reprises au sein de la VPg de la descendance du LMV-0-A602V-G617S-VPg1, indépendamment du fond

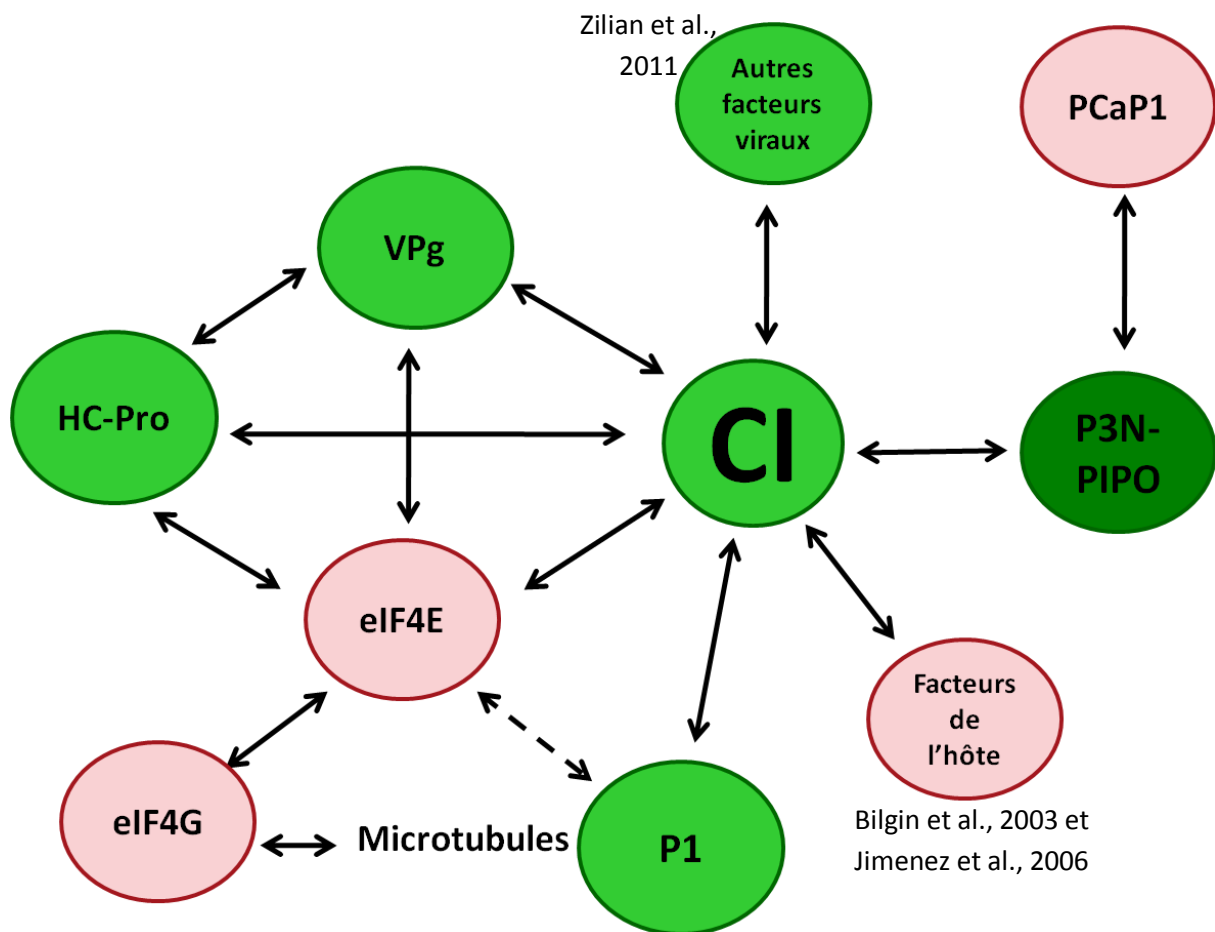


Figure C1 : Représentation schématique du réseau d'interactions faisant intervenir la CI et ayant de possibles implications dans le contournement des résistances associées à eIF4E

Les interactions représentées ici ont été démontrées pour des pathosystèmes différents, aussi certaines d'entre elles n'ont pas été vérifiées dans le cas du pathosystème LMV/Laitue. Les interactions observées au sein de ce pathosystème sont : VPg-eIF4E (Michon *et al.*, 2006 ; Roudet-tavert *et al.* 2007), CI-eIF4E et CI-VPg (Roudet-Tavert *et al.* 2012) et VPg-HC-Pro (Roudet-Tavert *et al.*, 2007). Les interactions CI-HC-Pro et CI-P1 ont été démontrées dans le cadre d'études de double hybride sur des protéines du PVA (Guo *et al* 2001), et des interactions mutuelles entre CI, P1, HC-Pro et P3 ont été démontrées pour le tritimovirus WSMV (Choi *et al.*, 2000). L'interaction entre HC-Pro et eIF4E ou eIF(iso)4E de *N. tabacum* et de pomme de terre a été démontré pour le PVA, le PVY et le TEV par Ala-Poikela *et al.* (2011). Enfin, l'interaction qui s'établit entre la CI et P3N-PIPO a été démontrée par Wei *et al* (2010b) dans le pathosystème TuMV/*N. benthamiana*. Suite à ce travaux, Vijayapalani *et al* (2012) démontrèrent que l'ancrage de P3N-PIPO aux plasmodesmes d'*A. thaliana* se fait par interaction de celle-ci avec la protéine de l'hôte PCaP1.

génétique de la laitue sur laquelle il se multipliait. Aucun polymorphisme n'est connu à cette position au sein de la diversité naturelle du LMV, cependant cette mutation fait écho à la mutation N163Y de la VPg du TuMV qui permet l'infection d'*A. thaliana* KO pour le gène *eIF(iso)4E* (Gallois et al., 2010). Ainsi nos résultats, en plus de démontrer la complémentarité des contournements associés à la CI-Cter et à la VPg, ont permis de démontrer l'importance de deux positions de la VPg dans ce contournement, au-delà du pathosystème laitue/LMV.

L'effet des mutations à ces positions dans la VPg du LMV-0 ainsi que d'autres positions candidates obtenues grâce à l'analyse de la diversité moléculaire et biologique d'isolats du LMV, est actuellement étudié en génétique inverse par G. Tavert-Roudet. Les résultats qui en découleront permettront de décrire avec plus de précision la complémentarité entre la CI et la VPg en sélectionnant les mutations d'intérêt à insérer dans la VPg de LMV-0 mutés dans leur CI, ou inversement.

Malgré cela, d'autres régions du génome viral peuvent influencer le contournement des résistances *eIF4E*. En effet, la P1 ayant été récemment démontrée comme responsable du contournement de la résistance *eIF4E* chez le pois (Nakahara et al., 2010) mais aussi la région centrale de la CI peuvent vêtir une certaine importance. En particulier, la présence d'une CI chimérique dans des clones de PVY confère au virus une meilleure capacité d'évolution vers la virulence en favorisant l'acquisition de mutations de contournement dans la VPg (Montarry et al., 2011). Un phénomène comparable a été observé au laboratoire par Elise Redondo lors de sa thèse (2001) : des clones de LMV-0 dont la région centrale de la CI a été substituée par la région correspondante du LMV-E sont capables d'évoluer vers la virulence sur laitue résistante, contrairement au LMV-0. La reprise de ces travaux par L. Svanella a mis en évidence que cette évolution vers la virulence s'opère à nouveau par l'acquisition de mutations dans la CI-Cter, de façon reproductible, au niveau des quatre positions précédemment identifiées (602, 617, 621 et 627). Ces résultats confortent l'importance de ces acides aminés mais indiquent également que la CI centrale pourrait être impliquée dans le contournement.

En outre, la protéine CI fait partie d'un complexe réseau d'interactions schématisé en Figure C1, dont chaque partenaire est un potentiel modulateur de son activité ou du contournement des résistances *eIF4E*.

IV – Comment expliquer la durabilité de la résistance conférée par *mo1* chez la laitue ?

L'ensemble de ces travaux a été réalisé dans une optique fondamentale visant à comprendre ce qui régit l'établissement d'une infection virale au sein de laitues résistantes, en déterminant les acides

aminés de la CI impliqués, mais aussi l'étape du cycle viral probablement concernée. En outre, ces travaux peuvent être mis en perspective avec les données de diversité naturelle du LMV et apporter des informations pour la compréhension de la durabilité des résistances *mo1* chez la laitue.

En effet, nos données de génétique inverse ont montré qu'une seule mutation dans le génome du LMV-0 (S621T) suffit pour le contournement de la résistance *mo1* chez la laitue. Il apparaît donc facile pour le virus de devenir virulent, d'autant plus que nous avons par ailleurs montré qu'aucun coût de fitness ne semble associé à cette mutation. Or, aucun isolat variant dérivé du LMV-0 n'a émergé dans les populations naturelles du LMV en conditions de culture. Une hypothèse est que la transversion nécessaire à cette mutation (changement d'une pyrimidine vers une purine) est beaucoup moins fréquente qu'une transition (changement d'une purine vers une purine ou pyrimidine vers pyrimidine) comme cela a été estimé pour le PVY (Ayme, thèse de doctorat, 2005). Il faut noter par ailleurs que le coût de fitness évalué au sein de laitues sensibles dans nos expériences ne prend en compte ni la capacité du virus à être transmis par le puceron ni par la graine. Nos conditions d'expérimentations ne reflètent donc pas totalement la réalité des conditions au champ et pourrait expliquer pourquoi nous n'avons pas vu émerger de LMV-0-S621T ou le LMV-0-A602V-G617S en conditions d'infection naturelle au champ.

De plus, comme le montrent les données de diversité naturelle, la mutation G617S pourrait être nécessaire à l'acquisition par le virus d'autres mutations de contournement. Ceci porte donc à deux le nombre de mutations à acquérir avant de devenir virulent. Bien que l'introduction de la mutation G617S dans le génome du LMV-0 ne soit pas suffisante pour conférer au virus la capacité d'évoluer vers la virulence en contexte de résistance, il est troublant de noter que tous les isolats testés, possédant une Glycine en 617 sont incapables d'évoluer vers la virulence et que ceux possédant une sérine le sont. Il est donc cohérent de voir que les isolats du groupe Most (*mo1*-breaking, seed transmitted) possèdent cette 617S, combinée aux deux autres mutations de contournement aux positions 602 et 621. Ces isolats récoltés principalement en Amérique du sud sont capables de se multiplier sur les variétés *mo1*¹ et *mo1*² et d'être transmis par la graine, provoquant des symptômes sévères que ce soit sur les variétés sensibles et les variétés résistantes (Krause-Sakate et al., 2002; Svanella et al., en préparation). L'émergence au niveau mondial des LMV-Most pourrait donc entraîner des dommages économiques en s'attaquant aux cultures mais aussi en favorisant l'apparition d'isolats recombinants aux propriétés biologiques et épidémiologiques inédites et potentiellement dommageables. Tout ceci souligne l'importance du contrôle du LMV-Most par des mesures prophylactiques strictes telles que la certification des graines sans virus, qui pour l'instant se montrent efficaces.

La question qui se pose est de déterminer l'origine de ces isolats de type Most. Selon nos résultats il est peu probable qu'un isolat appartenant au groupe COMMON ait été capable d'évoluer vers la virulence sur laitue résistante. Ainsi les isolats Most pourraient résulter de l'évolution d'isolats non laitue vers le contournement. Cependant, l'organisation en clusters de l'arbre phylogénétique LMV semble indiquer qu'il existe très peu d'échanges entre compartiments laitue, mauvaises herbes et plantes ornementales. Nous manquons de données concernant les insectes vecteurs présents sur ces différentes plantes, aussi il serait intéressant d'étudier cet aspect qui conditionne la possibilité de transfert d'isolats non laitue vers des laitues cultivées.

En parallèle de cette thèse, un projet financé par le département SPE (DIDYPOT) mené par B. Moury (INRA-Avignon), et le groupe Etiologie de notre laboratoire, visait à étudier le rôle potentiel joué par les plantes hôtes non cultivées (adventices) dans les épidémies de potyvirus (et en particulier le rôle de moteur évolutif que ces hôtes peuvent avoir en sélectionnant des variants viraux potentiellement virulents). L'analyse de la diversité des populations de potyvirus (quatre prélèvements réalisés sur deux sites géographiques près de Bordeaux et d'Avignon, aux abords de champs de laitues et de piments) a montré qu'aucun isolat de LMV n'a été détecté dans les plantes adventices (détection réalisée en ELISA ou par métagénomique), contrairement à la détection d'isolats de PVY dans plusieurs espèces d'aventices. Toutefois, des isolats de LMV ont déjà été détectés sur des *Osteospermum* dans des massifs ornementaux en France, et des rares exemples de contournement de résistance (*mo1¹*) ont été décrits pour les isolats LMV-1 et LMV-9, probablement issus du compartiment non cultivé, mais n'ont pas été accompagnés de véritable épidémie.

Tous ces résultats vont dans le sens d'une faible probabilité d'émergence d'isolats virulents de LMV à partir d'aventices, en contexte de culture en France. De plus, le système de certification des graines en France est considéré comme fiable et très peu d'épidémies sont liées à l'import de graines infectées. Il serait alors intéressant de mener ce genre d'études dans d'autres régions géographiques où l'utilisation de graines certifiées n'est pas systématique, et où la production de graines de laitues est artisanale. Ce genre de situation est présent en particulier au Chili, important producteur de graines, où ont été détectés les isolats non-laitue capables d'évoluer vers la virulence en contexte de résistance dans nos expériences menées au laboratoire. Ces conditions mettant en présence plantes adventices infectées et laitues cultivées constitueraient alors un beau modèle d'étude des échanges entre compartiment cultivé et compartiment sauvage.

Matériel et Méthodes

- I. Matériel biologique et conditions de culture
 - II. Manipulation d'acides nucléiques
 - III. Détection et quantification des virus
 - IV. Tests de compétition
- V. Expression transitoire de protéines *in planta*
 - VI. Outils bioinformatiques

I- Matériel biologique et conditions de culture

A) Virologie

Matériel végétal et viral

Les expériences réalisées lors de cette thèse l'ont été sur des plantes cultivées en serre, à une température maintenue proche de 25°C et un éclaircissement de 16h par jour. Deux variétés sensibles de laitue (*Lactuca sativa*) ont été utilisées lors de ce travail : les laitues Trocadéro et Salinas, ne possédant aucun gène de résistance connu au LMV. L'analyse du phénotype de contournement des résistances des clones recombinants de LMV a été réalisée par inoculation de plante résistantes Mantilia (résistance *mo1*¹) et Salinas 88 (résistance *mo1*²).

La plante modèle utilisée pour les expériences d'agroinfiltration est *Nicotiana benthamiana*, également sensible au LMV.

Seul un isolat de LMV issu de la diversité naturelle a été utilisé lors de cette étude : le LMV-0, isolat modèle, qui n'infecte que les plantes sensibles, fourni par H. Lot (INRA, Montfavet).

Propagation de virus par inoculation mécanique

Les feuilles de jeunes plants de laitue sont inoculées par frottement avec un broyat de feuilles infectées dans 3 volumes p/v de tampon Na₂HPO₄ 25mM, DIECA 0.2%, de carborundum et de charbon végétal. Le matériel nouvellement infecté peut alors être utilisé pour une nouvelle inoculation ou conservé à 4°C après lyophilisation.

Propagation de virus par inoculation biolistique

L'infection virale d'une plante peut être recréée artificiellement après avoir fait pénétrer un ADN plasmidique viral dans les cellules végétales. Le plasmide contenant le génome du virus cloné sous forme d'ADNc et sous contrôle d'un promoteur de transcription 35S et d'un terminateur de transcription NOS, est inoculé par biolistique. L'ADNc est alors transcrit en ARN viral, donnant lieu à la traduction des protéines virales et à l'infection de la plante.

Cette inoculation est réalisée par bombardement biolistique *in-planta*, en projetant sous pression d'Hélium des billes d'or enrobées d'ADN plasmidique. Cette technologie ainsi que le protocole de préparation du matériel sont fournis par Bio-Rad. 5mg de billes d'or de 1 µm de diamètre sont suspendues dans 100µl de spermidine (50mM) puis mises en présence de 1µg d'ADN plasmidique. Le-dit ADN est précipité sur les billes d'or par ajout, sous agitation, de 100µl de CaCl₂ (1M) et incubation 10min à température ambiante. Après 3 rinçages avec 1ml d'éthanol absolu, les billes

Antibiotique	Concentration finale	Sélectionne
Ampicilline	100 µg/ml	LMV-0k7 et dérivés
Kanamycine	50 µg/ml	pDONR, pENTR
Streptomycine	50 µg/ml	pB7WGR2, pB7RWG2, pGWB706, pGWB705 <i>E. coli</i>
Spectinomycine	50 µg/ml	pB7WGR2, pB7RWG2, pGWB706, pGWB705 <i>A. tumefaciens</i>
Rifampicine	50 µg/ml	Chromosome bactérien <i>A. tumefaciens</i>
Gentamycine	20 µg/ml	Plasmide Ti pMP90 <i>A. tumefaciens</i>

Tableau M.1 : Récapitulatif des antibiotiques utilisés lors de la thèse

Sur ce tableau sont détaillés les vecteurs porteurs de la résistance à l'antibiotique cité et la concentration à utiliser au sein du milieu de culture pour la sélection des colonies transformées.

sont resuspendues dans 600µl d'une solution de PVP-éthanol (50µg/ml). La solution ainsi obtenue est introduite dans un tube en plastique « Tefzel Tubbing » qui est séché sous flux d'azote. Le tube ainsi couvert d'or est découpé en une dizaine de cartouches qui sont insérées dans le barillet d'un pistolet à particule « Helios Gene Gun ». Lors du bombardement, les particules d'or sont propulsées sur le tissu végétal par un flux d'hélium à 180psi.

B) Microbiologie

Milieux de culture

Tous les milieux de culture ont été préparés avec de l'eau bidistillée MilliQ puis autoclavés à 121°C pendant 20min. Les antibiotiques sont ajoutés après refroidissement du milieu afin d'éviter l'inactivation de ceux-ci par la chaleur, selon les concentrations précisées dans le Tableau M.1.

Les bactéries sont cultivées en milieu riche LB (Lysogeny Broth) à 37°C pour *E. coli* et 28°C pour *A. tumefaciens*. Les cultures liquides sont agitées à 180 rpm dans des récipients pouvant accueillir au moins 3 fois le volume de culture, pour assurer une bonne oxygénation du milieu. Les milieux solides sont obtenus par ajout de 15g/l de bacto-agar.

Les cultures de levure sont incubées en milieu YPD (1% « yeast extract Difco™, 2% bacto peptone Difco™, 2% D-glucose) à 30°C. Après transformation, les levures sont sélectionnées sur milieu minimum (Minimal SD Base, Clontech) supplémenté en acides aminés, excepté le tryptophane (0,074% -Trp Do supplement, Clontech). Les cultures liquides sont maintenues sous agitation soutenue (200 rpm) dans des récipients laissant passer l'air pour libérer les gaz issus de la fermentation.

Souches microbiologiques

Toutes les souches bactériennes ou de levures sont conservées à longue durée sous la forme de stocks glycérolés préparés à partir de culture liquide à saturation dans laquelle on ajoute du glycérol à 15% final avant de les placer à -80°C dans des cryotubes. Avant utilisation, les cultures sont ré-étalées sur milieu solide et cultivées à la température adéquate.

Bactéries utilisées pour le clonage

La bactérie Gram (-) *Escherichia coli* a été utilisée comme organisme de clonage lors de ce travail. Les souches employées, XL1-blue, DH10B et DH5α présentent les géotypes et caractéristiques suivants : XL1-blue (Stratagene): *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZ_M15 Tn10 (Tetr)]*.

Cette souche de bactérie, propagée en routine au laboratoire et rendue électro-compétente, est utilisée pour la majorité des transformations réalisées lors de ce travail, particulièrement pour propager l'ADN plasmidique extrait de levure, suite à la recombinaison homologue

ElectroMAX DH10B (Invitrogen) : F⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74recA1 end A1 ara D139 Δ(ara, leu)7697 galU galKλ⁻ rpsL nupG

Cette souche commerciale électro-compétente à taux de transformation très élevé, est utilisée en second recours lorsque les transformations de XL1 ne donnent pas lieu à un taux d'efficacité de transformation satisfaisant.

DH5α (Invitrogen) : supE44 DlacU169 (f80lacZ DM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1.

Cette souche commerciale chimio-compétente est utilisée pour les transformations par choc thermique des produits de ligation.

Bactéries utilisées pour la transformation de plantes

Agrobacterium tumefaciens est une bactérie phytopathogène qui a pour particularité de posséder un plasmide de transfert (plasmide Ti) contenant des gènes tumoraux, situés entre une bordure droite et une bordure gauche. Lors de l'infection de la plante par *A. tumefaciens*, au niveau de blessures, la bactérie, par le biais des protéines codées par ses gènes de virulence, excise le matériel génétique situé entre les bordures droite et gauche du plasmide T et les introduit au sein du génome de la plante, de manière directionnelle. La souche d'agrobactérie utilisée lors de cette étude est une souche nommée C58C1, possédant un plasmide pMP90 « désarmé », dépourvu de ses gènes tumoraux, mais qui contient les gènes de virulence et présente la résistance à la gentamycine. Le chromosome bactérien possède le gène de résistance à la rifampicine. Une fois transformée avec un plasmide binaire contenant la séquence d'ADN d'intérêt délimitée par les bordures gauche et droite, la bactérie est alors capable de transférer cette séquence vers le génome végétal en utilisant les gènes de virulence apportés en *trans* par le plasmide helper.

Levures utilisées pour la recombinaison homologue

La souche de levure utilisée pour assurer la recombinaison homologue d'ADN double brin chevauchant est *Saccharomyces cerevisiae* YPH501, auxotrophique pour le tryptophane (Sikorski and Hieter, 1989).

II- Manipulation d'acides nucléiques

A) Les ADN polymérase ADN dépendantes

Différentes ADN polymérase ont été utilisées lors de cette étude, en fonction du type de produit PCR à obtenir. Les conditions d'amplification utilisées correspondent à celles préconisées par le fournisseur

La Dynazyme II est une polymérase thermostable utilisée en routine. Elle est dérivée de l'ADN polymérase de *Thermus brockianus* et possède une activité polymérase 5'→3' mais aussi exonucléase 5'→3' et n'a pas de système de « proof-reading ».

La Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes) est dérivée de l'ADN polymérase de type *Pyrococcus* à laquelle un domaine de fixation à l'ADN a été rajouté pour augmenter son efficacité de synthèse.

La *Pfu* ADN polymérase (Stratagene) isolée de *Pyrococcus furiosus* possède une activité exonucléasique correctrice 3'→5' qui rend la polymérisation plus fiable

L'avantage HD (Clontech) est une polymérase à haute fidélité qui possède un mécanisme de proof-reading lié à son activité exonucléase 3'→5'. Sa haute spécificité est de plus assurée par sa liaison à un anticorps dit « Hot Start », qui inhibe la polymérisation à température ambiante afin d'éviter la production de fragments suite à une mauvaise hybridation des amorces. Elle est capable théoriquement de synthétiser des fragments allant jusqu'à 22kb.

La PrimeStar® GXL (TaKaRa) est également une enzyme à haute fidélité permettant l'amplification de fragments allant jusqu'à 30kb en théorie. Elle bénéficie également du système « Hot Start ».

B) Purification de produits PCR

Lorsque le produit PCR obtenu se présente sous la forme d'une bande nette après migration sur gel d'agarose, celui-ci peut être purifié sur colonne à l'aide du kit MSB® Spin PCRapace (Stratec) afin de le débarrasser du tampon, des amorces et des dNTP restants.

Lorsque plusieurs bandes sont visibles sur gel d'agarose après PCR, la bande correspondant au fragment d'intérêt peut être purifiée sur gel. Pour cela, un gel d'agarose avec de grands puits est réalisé, afin de charger dans un seul puits la totalité de la réaction de PCR. Après migration et séparation nette du fragment d'intérêt et des fragments parasites, le gel est découpé sur une table UV. Le fragment PCR contenu dans ce morceau de gel peut alors être extrait en utilisant le kit GeneClean® (MP Biomedicals). Cette technique a un très faible rendement, c'est pourquoi il sera toujours préférable dans un premier temps d'essayer d'optimiser les conditions de PCR afin de s'affranchir de ces bandes surnuméraires.

C) Digestion par des enzymes de restriction d'une matrice ADN

Les digestions enzymatiques d'ADN plasmidique ou de produits d'amplification PCR permettent de vérifier la validité de ces derniers. Elles sont réalisées avec les enzymes de restriction adéquates, sur

Nom du clone obtenu	Vecteur de clonage	Utilisation	Disponible/généré
Vecteurs Gateway			
pDONR-CI-STOP	pDONR 221	Vecteurs d'entrée	Disponible
pENTR CI-Cter-STOP	pENTR-D-TOPO		Disponible
pENTR CI-Cter-mut			Généré
pENTR PIPO-STOP			Généré*
pENTR PIPO-mut			Généré*
pENTR VPg-STOP			Disponible
pENTR-VPg-mut			Disponible
pENTR-4E1-STOP			Disponible
pENTR-4E1-mut			Généré*
pENTR-4E2-STOP			Généré*
pENTR-4E2-mut			Généré*
GFP-CI			pGWB706
GFP-CI-Cter	pGWB706	Généré	
CI-Cter-GFP	pGWB705	Généré	
RFP-PIPO	pB7WGR2	Généré*	
PIPO-RFP	pB7RWG2	Généré*	
RFP-VPg (LR31)	pB7WGR2	Disponible	
VPg-RFP (LR43)	pB7RWG2	Disponible	
RFP-4E1	pB7WGR2	Généré*	
RFP-4E2	pB7WGR2	Généré*	
PIPO-TuMV-GFP	pGWB705	Fourni par A. Wang	
Clones ADNc complet			
LMV-OK7	LMV-OK7	Biologie, Evolution, Compétition	Disponible
LMV-0-A602V			Disponible
LMV-0-G617S			Généré
LMV-0-S621T			Disponible
LMV-0-S627T			Disponible
LMV-0-A602V-G617S			Généré
LMV-0-A602V-S621T			Disponible
LMV-0-A602V-A627T			Disponible
LMV-0-G617S-S621T			Disponible
LMV-0-G617S-A627T			Disponible
LMV-0-A602V-G617S-S621T			Disponible
LMV-0-G617S-S621T-A627T			Généré
LMV-0-A602V-G617S-VPg-LMV1			Complémentarité VPg/CI
LMV-0-A602V-G617S-S621T-A627T		Non infectieux (2 clones)	Généré
LMV-0-A602V-G617S-S627T		Non infectieux (1 clone)	Généré
LMV-OK7-GFP		Localisation du virus /suivi du mouvement	Généré
LMV-OK7-mcherry		Généré	
LMV-0-A602V-GFP		Suivi du mouvement	Généré
LMV-0-S621T-GFP			Généré
LMV-0-A602V-G617S-GFP			Généré
LMV-0-A602V-G617S-S621T-GFP			Généré

Tableau M.2 : Récapitulatif des clones utilisés lors de cette thèse

Les vecteurs marqués d'un astérisque ont été générés avec l'aide de Monika Fecury-Moura lors de sa venue au laboratoire.

500ng d'ADN, en présence de 2 unités d'enzymes et après 1h d'incubation à la température préconisée.

III- Techniques de clonage et de transformation

L'ensemble des vecteurs utilisés lors de cette thèse est détaillé dans le Tableau M.2.

A) Obtention des clones d'ADNc complet infectieux - Recombinaison homologue chez la levure

Les clones infectieux de LMV et leurs mutants dérivés sont obtenus par PCR mutagène couplée à la recombinaison homologue chez la levure. Cette stratégie de clonage repose sur la capacité de la levure à reconnaître des coupures de l'ADN au niveau de zones chevauchantes. La recombinaison homologue, appelée aussi « gap repair » consiste donc en la réparation de ces coupures par réassociation des fragments chevauchants (Kostrub et al., 1998) (Figure M.1). Ces fragments chevauchants sont générés ici par PCR.

Mutagenèse dirigée dans la CI

La séquence CI-Cter mutée est obtenue par deux PCR mutagènes chevauchantes (« PCR CI », A et B Figure M.1.) sur environ 30nt au niveau de la mutation à insérer. Lorsque cela était possible, des mutations synonymes ont été introduites dans le but de générer des sites de reconnaissance par des enzymes de restriction pour faciliter le criblage ultérieur des clones obtenus. Les deux PCR A et B de 455 pb et 246 pb respectivement sont donc réalisées en parallèle à l'aide de la polymérase Phusion™ de Thermo Scientific® avec une température de 2°C au-dessous de la température de fusion des amorces et un temps d'élongation de 45sec.

Le reste du vecteur LMV-0K7 est amplifié par 2 PCR longue-distance chevauchantes entre elles (C et D Figure M.1) et avec les deux « PCR CI » sur une longueur d'environ 30nt. Ces PCR d'environ 8kb sont réalisées avec la polymérase Advantage® HD (Clontech) ou la polymérase Primestar® GXL (Takara), à la température d'hybridation dictée par le Tm des amorces (Tableau M.3) et avec une élongation de 9min à 68°C.

Chacun des fragments PCR est purifié séparément avec le kit MSB® Spin PCRapace (Invitex) afin de permettre leur dosage par mesure de la densité optique à 260 nm, en vue de la transformation des levures.

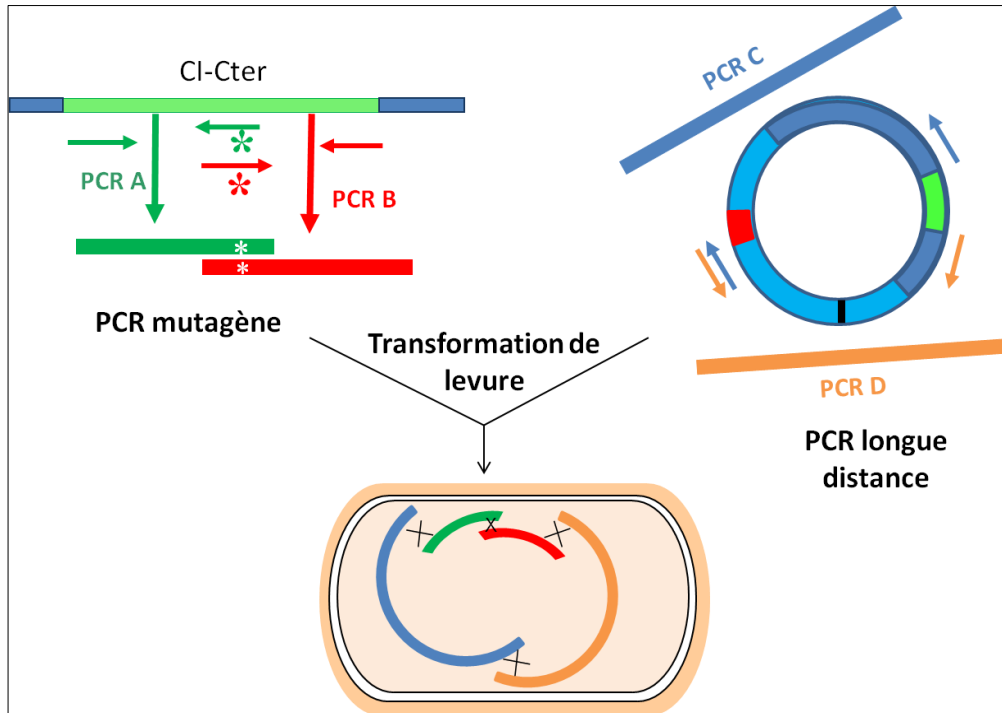


Figure M.1 : Stratégie de mutagénèse dirigée couplée à la recombinaison chez la levure

Les produits de la PCR mutagène (mutation représentée par un astérisque) et des PCR longue distance visant à amplifier le vecteur sont co-transformés dans la levure qui va reconnaître les zones de chevauchement et permettre ainsi de « religuer » les fragments ensemble par recombinaison homologue.

Insertion de séquence au sein d'un clone complet d'ADNc de LMV

Afin d'insérer des séquences exogènes au sein des vecteurs dérivés du LMV-0K7, codant pour la GFP, la mcherry ou la VPg du LMV-1, chacune de ces séquences est amplifiée avec des amorces dont les extrémités flottantes sont complémentaires des régions du génome du LMV encadrant l'insertion (Figures 2.1, Chapitre 2). Ceci est réalisé à l'aide de la polymérase haute fidélité Phusion™ avec un temps d'élongation correspondant à la taille du fragment à obtenir (pour une vitesse d'élongation de 1kb/min).

Le vecteur est quant à lui amplifié sous forme de deux PCR chevauchantes entre elles et avec les extrémités flottantes des amorces sus-citées (Figure 2.1), ménageant une ouverture dans le plasmide au niveau du site d'insertion. Il s'agit de réactions de PCR longue distance réalisées avec la polymérase Advantage® HD (Clontech) ou la polymérase Primestar® GXL (Takara).

Chacun des fragments PCR est purifié séparément avec le kit MSB® Spin PCRapace (Invitex) afin de permettre leur dosage en vue de la transformation des levures.

Transformation de levures

Le mélange des trois ou quatre fragments ADN chevauchant obtenus par PCR est transféré dans la souche de levure YPH501 par transformation par choc thermique dans un tampon « LiAc » (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM acétate de lithium).

La veille, une pré-culture de 5mL de levure est préparée avec du milieu YPD non sélectif et placée à 30°C sous agitation (250 rpm) Le jour même, 25 ml de milieu YPD sontensemencés avec cette pré-culture puis placés à 30°C sous agitation. Lorsque la DO_{600nm} de la culture atteint une valeur de 0.7, la culture est centrifugée à 5000 rpm pendant 8 min. Après deux lavages avec 10 mL d'eau distillée stérile autoclavée, le culot est repris dans 500 mL de tampon « LiAc ». Après centrifugation à 5000 rpm pendant 5 min, le culot est à nouveau repris dans 500 mL de tampon « LiAc ».

Pour la transformation des levures, le mélange suivant est constitué : 70 µg d'ADN entraîneur (solution d'ADN de sperme de saumon « Stratagene » dénaturé au préalable par chauffage), 15 µL d'ADN correspondant au mélange (même concentration molaire pour chaque fragment), 100 mL de levures resuspendues dans le tampon « LiAc », et 700 mL de tampon « PEG/LiAc » [10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA, 100 mM acétate de lithium, 40 % (p/v) de polyéthylène glycol (PEG)]. L'ensemble est homogénéisé par pipetages successifs, puis incubé pendant 2 h à 30°C sous agitation forte à 250 rpm. La transformation se fait alors par choc thermique pendant 15 min à 42°C. Les levures sont ensuite centrifugées 5 min à 5000 rpm, lavées avec 400 mL d'eau distillée stérile autoclavée puis centrifugées 5 min à 5000 rpm. Le culot est repris dans 400 mL d'eau distillée stérile autoclavée. Un

Couple d'amorces	Sequence	Utilisation	Tm (°C)
05762p 06419m	TTCCAAACAGTMACAGC CCATTGTTTTCCCTGTGAG	Séquençage Cl-Cter	56
06197p 06939m	CGTTATCGACAAAGCAAG ACGTATTCACCATGTCTCG	Séquençage VPg	56
05416p 06117m	CAGTTCAAGTTGAAGGAATCAGACATC CTTTGCCGTTTATTACCTTTCCTTGG	Amplification Cl-Cter	55
0mut5871p 0mut5871m	AAAAACT G CAG G TAGTCAGAGACAC CTGACT A CC T GCAGTTTTTGC	Mutagenèse A602V	55
0mut5957p 0mut5957m	GACATGGAGACA A CGCAGAAATTGGCAGAG CTCTGCCAATTTCTG C GTGTCTCCATGTC	Mutagenèse A627T	55
0mut5927p 0mut5927m	TGCCAGGCTGGA A CTAGTGACGGGGTTCC GGAACCCCGTCA C TAGTTCCAGCCTGGCA	Mutagenèse G617S	55
pENTRP3p FusPIPOm	<u>CACCATGGGGGA</u> ACCAGATAAAAGCACCC CCATGAGATAACTTTTTTCTTATGAGTTTATTCTTCTG	Mutagenèse PIPO amont	60
pENTpipomutm FusPIPOp	ACTCTCTTACTGCGCCTGAGC CAGAAGAATGAACTCATA A AGAAAAAAGTTATCTCATGG	Mutagenèse PIPO aval	60
pENTpipostop FusPIPOp	CTAACTCTTACTGCGCCTG A GC CAGAAGAATGAACTCATA A AGAAAAAAGTTATCTCATGG	Mutagenèse PIPO aval	60
P54mutAp P54mutAm	ATCGATGTCATTTATCACCAGGA T CCAGCT AGCTGGATC C TGGTGAT A AAATGACATCGAT	Mutagenèse Quickchange	55
P1rev 09095p	GTATTGAACCATACGGTGCCTGATGGAG GCGGATCCAAAGGATAATATCATCACAGAG	PCR longue distance	68
Hcfwd 9095m	AGCGACGTCGCACGAAACTTCTGGAACGGA CTCTGTGATGATATTATCCTTTGGATCCGC	PCR longue distance	68
P1GFpp HCclivGFpm	<u>CTCCATCACGCACCGTATGGTTCAATACAGT</u> GATGTAAGTAAAGG AGAAGAACTTTTCA <u>TGCGACGTCTCCGACTGGTGGTATACTTCGTCTTTGTATAGTTCA</u> TCCATGC	Amplification GFP	60
P1mcherry HCclivmcherrym	<u>CTCCATCACGCACCGTATGGTTCAATACAGT</u> GATGTAGTGAGCAA GGGCGAGGAGGATA <u>TGCGACGTCTCCGACTGGTGGTATACTTCGTCTTTGTACAGCTCG</u> TCCATGC	Amplification mcherry	60
6k2rev 14500p	TTGGTGTGGA A CTGCATCAGC TCCACACCTCCGTTACA	PCR longue distance	58
Profwd 14500rev	AGCAAAACACTGTT C AGGGGC TGTAAGCGGAGGTGTGGAGAC	PCR longue distance	62
Vpgaval VPgamont	GCCCTGAACAGTGT T TGCTTTCGTGCTTACAGGGAT GCTGATGCAGTTCGACACCAAGGCAAAGGTAAACGGCAA	Amplification VPg LMV-1	60

Tableau M.3 : Amorces utilisées lors de la thèse

Les « mismatch » entre la séquence de l'amorce et celle de la matrice sont soulignés en noir.

volume de 250 mL de ces cellules est ensuite étalé avec des billes de verre (\varnothing 0.45 μ m) sur une boîte de Pétri contenant du milieu sélectif CAU dépourvu de tryptophane puis placé dans une étuve à 30°C.

Extraction d'ADN plasmidique à partir de culture de levures

L'ADN plasmidique des levures transformées est extrait en vue de l'utiliser pour transformer des bactéries *E. Coli* afin d'en obtenir un plus grand nombre de copies.

Les plasmides sont extraits à partir d'une culture de levure en phase stationnaire (2 mL de milieu sélectif ensemencé à partir d'une colonie de levure) ayant poussé à 30°C sous agitation à 250 rpm pendant 24h. Les cellules sont sédimentées par centrifugation pendant 5 min à 15000 g à température ambiante. Le surnageant est éliminé avant de resuspendre le culot de levures avec 100 μ l de tampon de resuspension (67mM KH₂PO₄ à pH 7,5, stérile) par agitation au vortex. La paroi des cellules est digérée pendant 1h à 37°C suite à l'ajout de 50 U de Zymolyase® (amsbio). La réaction de digestion est stoppée par l'ajout de tampon de lyse (NaOH 0.2N et SDS 1%) qui va conduire à l'éclatement des cellules. Les débris cellulaires sont « culottés » par centrifugation à 4°C durant 10 à 15min à 15000g. Le surnageant est transféré dans un microtube propre et l'ADN contenu est précipité par ajout de 2 volumes d'éthanol absolu froid. La précipitation est favorisée en plaçant les tubes à -20°C pendant une heure. L'ADN précipité est alors concentré par centrifugation de 5min à 4°C à vitesse maximale. Le surnageant est éliminé et le culot rincé à l'éthanol 70% puis séché. Enfin, l'ADN est solubilisé dans 15 μ l d'eau MilliQ stérile avant d'être utilisé pour transformer des bactéries XL1 par électroporation.

B) Mutation ponctuelle d'un vecteur d'intérêt – Protocole Quick Change® II site-directed mutagenesis

Le kit Quick Change® II (Agilent) permet d'insérer au sein d'un vecteur de petite taille une mutation ponctuelle par PCR mutagène amplifiant la totalité du vecteur puis ligation du produit PCR au sein de la bactérie XL1 (Figure M.2). Les deux amorces de la PCR, d'environ 30nt, sont chevauchantes et encadrent le nucléotide à muter. Ainsi, suite à la PCR réalisée à l'aide de la polymérase *PfuUltra*, nous obtenons des produits d'amplification de la longueur du vecteur qui a servi de matrice de PCR et aux extrémités chevauchantes. Le programme de PCR ne compte que 18 cycles avec une température d'hybridation de 55°C et une élongation à 68°C de 1min/kb.

Le produit d'amplification est par la suite soumis à une digestion enzymatique par l'enzyme de restriction Dpn1. Cette enzyme coupe exclusivement des molécules d'ADN méthylées au sein desquelles elle reconnaît la séquence GATC. Cette digestion permet alors d'éliminer le vecteur ayant servi de matrice à la PCR sans altérer les produits d'amplification PCR qui ne sont pas méthylés.

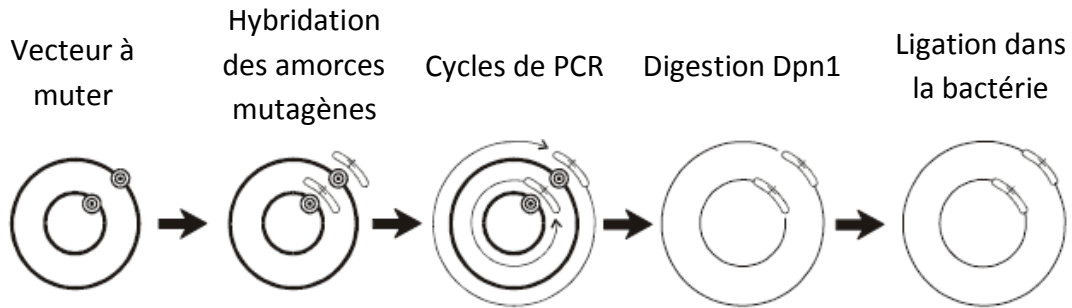


Figure M.2 : Stratégie QuickChange® mutagenesis (Agilent)

Ceci est le schéma fourni par Agilent, décrivant la stratégie de mutagenèse. La position à muter est symbolisée par des cercles concentriques, le vecteur est tracé en trait noir épais alors que le fragment PCR est tracé en trait noir fin.

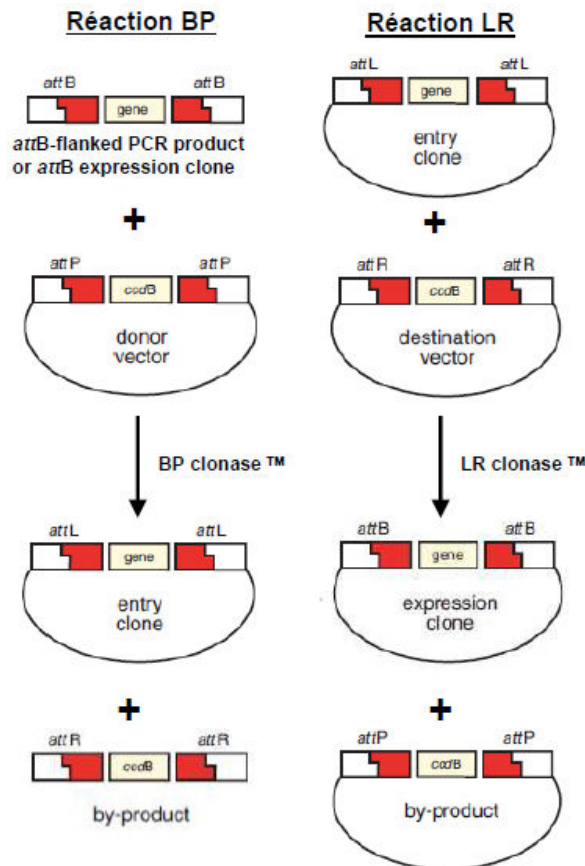


Figure M.3 : Illustration de la méthode Gateway™

Schémas disponibles sur le site d'Invitrogen, expliquant le principe des réactions de BP et LR clonage pour le transfert d'une séquence codante vers un clone d'entrée ou de destination.

Enfin, 1µL du produit d'amplification est utilisé pour transformer les bactéries XL1 Blue par choc thermique 45sec à 42°C. C'est au sein de la bactérie que le fragment PCR est reliqué en un vecteur entier porteur de la mutation. Les bactéries transformées alors sont sélectionnées par étalement sur milieu gélosé LB contenant l'antibiotique approprié.

C) **Extraction d'ADN plasmidique à partir de cultures de bactéries**

Les plasmides sont extraits par la méthode de la lyse alcaline (Sambrook et al., 1989) à partir d'une culture bactérienne en phase stationnaire. Les plasmides recombinants destinés au séquençage ou à un stockage de longue durée, sont extraits à l'aide du kit Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega). Cette méthode, plus rapide, basée sur la chromatographie sur colonnes de silice permet d'obtenir un plus grand niveau de pureté.

D) **Obtention de vecteurs agroinfiltrables - Technologie Gateway® (Invitrogen™)**

Les expériences de localisation subcellulaire des protéines d'intérêt ont été réalisées par agroinfiltration de vecteurs permettant l'expression de la protéine fusionnée à un fluorophore. Ces vecteurs sont issus de la technologie Gateway qui repose sur l'insertion de la séquence codante d'intérêt dans un vecteur dit « d'entrée », et le transfert de cette séquence depuis le vecteur d'entrée vers n'importe quel vecteur dit « de destination » par simple recombinaison (Figure M.3). Ceci permet d'éviter les clonages à répétition.

Vecteur d'entrée

Lors de mon arrivée en thèse, plusieurs vecteurs de destination recombinants étaient déjà disponibles (Tableau M.2) mais certains d'entre eux durent être clonés. C'est le cas de la séquence codant pour la fusion P3N-PIPO avec ou sans codon STOP à son extrémité 3'. Ce clonage nécessite d'introduire un nucléotide supplémentaire dans la séquence d'intérêt, afin de recréer artificiellement le décalage du cadre de lecture donnant lieu à la traduction de P3N-PIPO (Annexe 3). Ceci a été réalisé par deux PCR mutagènes chevauchantes au niveau de la mutation à insérer comme décrit plus haut (voir Tableau M.3). Les fragments chevauchants ainsi obtenus (563 et 249 nucléotides) sont ensuite réunis en un seul (777 nucléotides) par réalisation d'une PCR fusion. Pour cela, les fragments sont purifiés sur colonne à l'aide du kit MSB® spin PCRapace (Invitex) puis dilués d'un facteur 100 avant d'être utilisés conjointement comme matrice d'une PCR réalisée avec les amorces permettant d'amplifier la séquence entière à cloner, à l'aide de la polymérase Phusion® high-fidelity (Thermo Fischer Scientific), dans un volume final de 20µl, selon les conditions du fournisseur. Il est à noter que l'amorce sens utilisée pour cette PCR fusion possède en 5' la séquence CACC qui permettra le clonage directionnel du fragment dans le vecteur d'entrée, et que deux amorces antisens ont été

générées, avec ou sans codon STOP. Les fragments à bords francs ainsi obtenus, l'un avec et l'autre sans codon STOP, sont alors clonés dans le vecteur d'entrée pENTR-D-TOPO, par « TOPO-cloning ». Ceci consiste à ajouter le fragment PCR dans un mélange réactionnel de 6µl contenant le vecteur pENTR-D-TOPO linéarisé et associé à l'enzyme Topoisomérase I extraite du *Vaccinia* virus. Le vecteur linéarisé possède une extrémité cohésive complémentaire de la séquence CCAC insérée en 5' du fragment PCR à cloner. Lorsqu'il y a appariement de ces deux régions, la topoisomérase permet la ligation du vecteur et du fragment ensemble. Un volume de 2µl du produit de cette réaction est par la suite utilisé pour transformer *E. Coli* (One Shot® Chemically Competent) par choc thermique 30 sec à 42°C. Les bactéries ayant intégré le vecteur recombinant sont sélectionnées par étalement sur milieu gélosé LB + 50µg/ml kanamycine.

Vecteur de destination

Une fois les constructions d'intérêt introduites dans les vecteurs d'entrée, celles-ci peuvent être transférées vers les vecteurs de destination destinés à l'expression transitoire des protéines fusionnées dans la plante. Il s'agit des vecteurs pB7WGR2 et pB7RWG2 permettant la fusion de la RFP en N-ter ou C-ter de la protéine et des vecteurs pGWB706 et pGWB705 permettant la fusion en N-ter ou C-ter de la GFP. Ces vecteurs de destination sont des plasmides Ti d'*Agrobacterium* dits « désarmés » puisqu'ils ne possèdent plus l'ADN-T de la bactérie mais encore les bordures droites et gauches encadrant le promoteur 35S et la séquence du fluorophore et le site de clonage contenant le gène létal *ccdb*. Lors du transfert depuis le vecteur d'entrée vers le vecteur de destination, la séquence d'intérêt est insérée à la place du gène *ccdb* par recombinaison entre les régions attL1 et attL2 du vecteur d'entrée et attR1 et attR2 du vecteur de destination (Figure M.3). Cette réaction de recombinaison s'effectue au sein d'un mélange réactionnel de 16µl contenant 150ng de clone d'entrée et de vecteur de destination, 4µl de tampon LR Clonase™ et 4µl de mix enzymatique LR Clonase™ (Invitrogen®). Le mélange est homogénéisé par vortexage puis centrifugé brièvement avant d'être incubé 1h à 25°C. La réaction est enfin stoppée par l'ajout de 2µl de solution de Protéinase K et incubation 10min à 37°C. Un volume de 1µl de ce mélange réactionnel est par la suite utilisé pour transformer des bactéries *E. Coli* DH10B™ ElectroMAX™ (Invitrogen) par électroporation avec 20µL de bactéries, 1µl de réaction LR et 60µl de glycérol 10%. Les bactéries possédant le plasmide ayant intégré la séquence d'intérêt sont sélectionnées par étalement sur milieu gélosé LB + streptomycine 50µg/ml.

IV- Détection et quantification du virus

A) Test DAS-ELISA

Tampon de coating	
Na ₂ CO ₃	15 mM
NaHCO ₃	30 mM
Tampon PBS-Tween	
NaCl	136,9 mM
KH ₂ PO ₄	1,47 mM
KCl	KCl mM
NA ₂ HPO ₄	8,1 mM
Tween 20	0,05 % (v/v)
Tampon substrat (pH 9,8)	
Diéthanolamine (pH ajusté au HCl)	9,7 % (v/v)

Tableau M.4 : Récapitulatif des tampons utilisés pour la détection du virus par DAS-ELISA

La méthode d'Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (Clark and Adams, 1977) a été utilisée pour détecter dans les feuilles infectées en systémie la présence des clones de LMV recombinants et quantifier de manière relative leur accumulation dans les variétés de laitue résistantes et sensibles. La composition des tampons utilisés lors d'un test ELISA est donnée dans le Tableau M.4. Le test ELISA est réalisé à partir de feuilles infectées en systémie broyées dans 3 volumes (p/v) de PBS-Tween-PVP puis clarifiés par centrifugation. Dans le cas de test ELISA semi-quantitatif, le broyat est dilué en une série de dilutions de 1/2 à 1/1000.

La première étape de « coating » consiste à déposer au fond des puits des plaques ELISA un anticorps dirigé contre la capsid du LMV. Ce coating se fait par incubation durant 3 h à 37°C en présence de 100 µl de tampon de « coating » contenant l'anticorps primaire dilué au 1/500ème. Après 3 lavages successifs avec une solution de PBS-Tween, 100µl de broyats de feuilles sont déposés dans chaque puits, en doublons. Les plaques sont ensuite placées à 4°C durant toute la nuit. Le lendemain, la plaque est rincée à trois reprises au PBS-Tween avant d'y ajouter l'anticorps secondaire, qui correspond à l'anticorps anti-CP du LMV couplé à la phosphatase alcaline, dilué au 1/500ème dans du PBS-Tween-PVP supplémenté en ovalbumine (0,2% P/V). L'hybridation de l'anticorps conjugué est réalisée à 37°C pendant 3h puis la plaque est à nouveau rincée au PBS-Tween. Le substrat de révélation (paranitrophénylphosphate, Sigma) est préparé extemporanément par dissolution de pastilles dans le tampon substrat (2 pastilles pour 12ml) puis distribué dans les puits de la plaque (100µl par puits). En présence de la phosphatase alcaline, le substrat est transformé en un produit coloré jaune (paranitrophénol) dont l'absorbance à 405nm est mesurée à l'aide du spectrophotomètre multivolume Epoch. La révélation se fait à l'obscurité et à température ambiante. La vitesse de coloration varie selon la concentration en virus, de 1 à 4h.

B) Extraction des ARN totaux selon la méthode de Bertheau

Il s'agit d'une adaptation du protocole décrit par Bertheau et al. (2002). Les feuilles infectées sont broyées dans un sachet en plastique en présence de 4 volumes (p/v) de PBS-Tween [NaCl 136,9 mM, KH₂PO₄ 1,47 mM, KCl 2,68 mM, Na₂HPO₄ 8,1 mM, K Tween 20 0,05 % (v/v)], additionné de PVP 25K 2 % (p/v), et de DIECA 20 mM. Ce broyat est clarifié par centrifugation de 10 min à 13000 rpm, puis 200 µL du broyat clarifié est prélevé et additionné de 20µL de SDS 10 % afin de provoquer en particulier la décapsidation des virions et de libérer l'ARN viral des protéines qui y sont liées par incubation de 15 min à 55°C. Suite à cette incubation, 100µl d'une solution d'acétate de potassium (Acétate de potassium 3M/acide acétique 5M) sont ajoutés afin de précipiter les protéines totales. Cette réaction est favorisée par une incubation d'au moins 5 min dans de la glace puis les protéines et autres débris cellulaires sont « culottés » par centrifugation de 5 min à 13000 rpm. Le surnageant

contenant les ARN est récupéré puis ajouté à un mélange de 700µl de solution de NaI 6M et de silice (5µg) et incubé 10min à température ambiante. Après 2 étapes de lavages avec une solution composée de 20 mM TrisHCl (pH 7,5), 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 50% éthanol, les ARN sont repris dans 300µL d'eau distillée stérile autoclavée.

C) RT-PCR couplée et découplée

Lors de cette étape les ARNs extraits vont être transcrits en ADN complémentaire puis amplifiés par PCR en une ou deux étapes.

La technique de PCR couplée à l'étape de transcription inverse a été utilisée pour la détection des ARNs viraux, à partir de 5 µl d'ARN totaux purifiés selon la méthode de Bertheau. Elle consiste à réaliser les deux étapes dans un même tampon compatible avec les deux enzymes. Pour ce faire, 1 unité de RTase Reverse-iT™ (ABgene) est ajoutée au mélange de PCR (Polymérase Dynazyme II, ThermoScientific). Les cycles PCR sont alors précédés d'une incubation à 42°C durant 1h.

Lorsque les échantillons étaient peu concentrés en ARN viral, la rétrotranscription et l'amplification ont été réalisées séparément, pour améliorer la sensibilité de détection. La synthèse des ADNc est réalisée à l'aide de l'enzyme RevertAid (ThermoScientific), en deux étapes. Un premier mélange réactionnel est préparé, contenant 5-10µl d'extrait d'ARN totaux, 1µl d'amorce polyT (dT18 100µM) et un volume d'eau (qsp 12,5µl). Ce mélange est incubé à 65°C pendant 5min dans un thermocycleur, puis les tubes sont placés dans la glace avant d'y ajouter le second mélange réactionnel contenant 4µl de tampon 5X RT fourni avec l'enzyme RevertAid, 2µl d'un mélange de dNTP 10mM, 1µl de RevertAid (200 U) et 0,5µl d'inhibiteur de RNase Ribolock (ThermoScientific, 20 U). Le reste du cycle consiste en une étape d'hybridation et élongation à 42°C pendant 1h puis une étape d'inactivation de l'enzyme à 70°C pendant 10min.

La réaction de PCR est effectuée à partir de la solution d'ADNc obtenue, avec la polymérase Phusion®. Le mélange réactionnel contient donc 5µL d'ADNc, 4µl de tampon 5X HD, 1µl de dNTP 10mM, 1µl de chaque solution d'amorce à 10µM et 0,2µl d'enzyme Phusion®. Le cycle de PCR comprend une étape de dénaturation de 10 sec à 98°C, d'hybridation de 30 sec au Tm des amorces et d'élongation à 72°C (à une vitesse de 30 sec/kb). Ce cycle est répété 40 fois puis une étape d'élongation finale de 5 min à 72°C est ajoutée.

Les produits de réaction PCR sont ensuite visualisés sur gel d'agarose. Pour des fragments dont la taille se situe entre 20nt et 5kb, un gel 1.1% d'agarose est utilisé. Pour des fragments plus long, la concentration en agarose est abaissée.

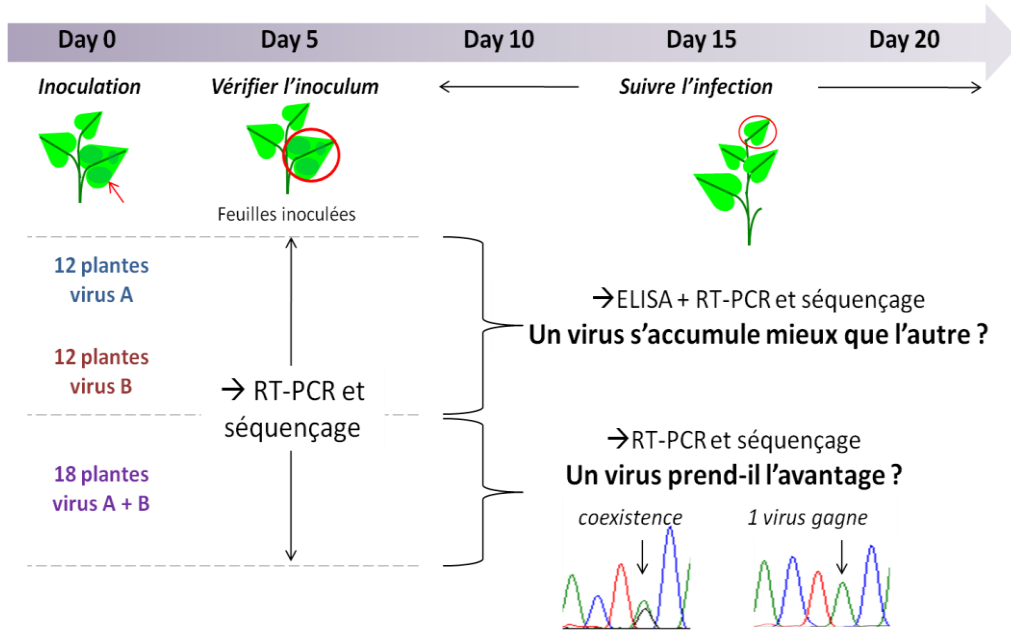


Figure M.5 : Déroulement d'un test de compétition

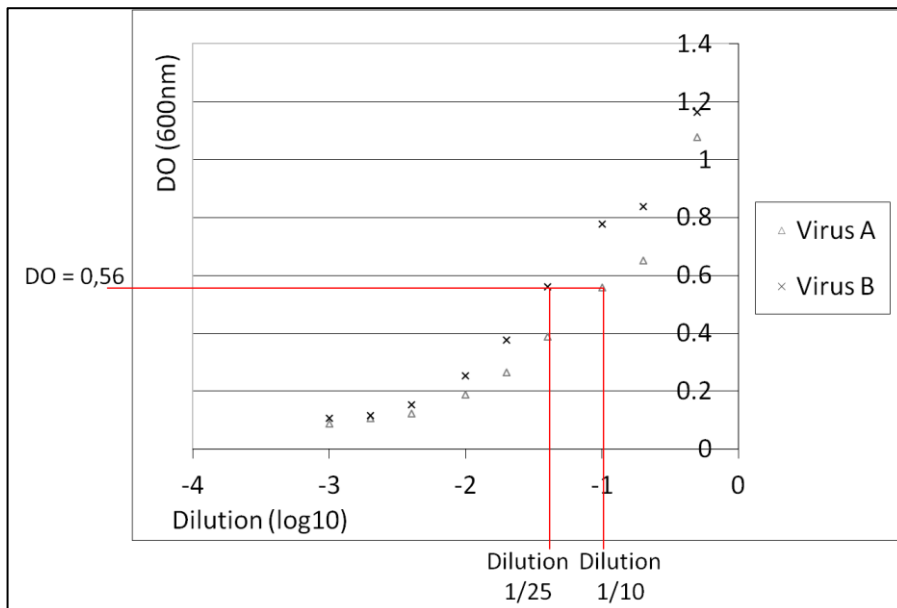


Figure M.6 : Calibration de l'inoculum par ELISA semi-quantitatif

Sur le graphique sont représentées les valeurs d'absorbance à 405nm obtenues pour chaque dilution des broyats des virus A et B. Ici, pour des facteurs de dilution différents on obtient une même valeur de DO (0,56). Pour comparer les concentrations en virus, nous faisons alors le rapport de la dilution du virus A sur la dilution du virus B. Dans ce cas, le virus B est 2,5 fois plus concentré que le virus A.

V- Tests de compétition

Les différentes étapes de ce test sont synthétisées dans la Figure M.5. Le suivi de la compétition se fait par prélèvement des feuilles inoculées à 5 jpi pour y vérifier la présence des deux virus dans le cas des co-inoculations, puis prélèvement des feuilles infectées en systémie à 10, 15 et 20 jpi pour les 3 types d'inoculation. Sont prélevées les 3 feuilles systémiques les plus jeunes, qui contiennent le plus de virus, afin d'optimiser la détection. Les ARN totaux sont extraits de ces feuilles puis une RT-PCR est réalisée sur l'extrait permettant d'amplifier la région correspondant à la CI de l'ensemble de la population virale présente dans la plante. Le produit d'amplification de 657 pb est ensuite séquencé.

Sont alors comptabilisées le nombre de plantes dans lesquelles le virus A ou B se trouve seul et celles dans lesquelles on détecte les deux virus. La coexistence des 2 virus au sein de la plante est révélée par la présence, sur l'électrophorégramme de séquençage, d'un double pic au niveau de la position divergente entre les deux virus.

A) Calibration de l'inoculum par ELISA semi-quantitatif

La calibration de l'inoculum qui précède le lancement du test de compétition est réalisée par ELISA semi-quantitatif. Pour cela dès le matin, on prélève 1g de feuille de laitues infectées avec les virus d'intérêt que l'on broie dans 2.5ml de tampon d'inoculation (Na_2HPO_4 25mM, DIECA 0.2%). Ce sont systématiquement les 3 feuilles les plus jeunes qui sont prélevées, pour avoir une concentration maximum en virus en vue d'une dilution ultérieure. Dans le cas d'un ELISA semi-quantitatif réalisé pour comparer des accumulations virales, les feuilles sont broyées dans 3 volumes de tampon de broyage ELISA.

Le broyat est clarifié par centrifugation à vitesse maximale pendant 10min. Une gamme de dilution de 0.5 à 0.001 est réalisée à partir du surnageant obtenu puis chaque dilution est déposée en double ou triple exemplaire sur une plaque 96 puits « tapissée » au-préalable d'anticorps primaire dirigé contre le LMV (dilution au $1/500^{\text{ème}}$). Dans le cas d'ELISA semi-quantitatif pour quantifier l'accumulation virale, une gamme étalon est réalisée à partir d'un broyat de feuille infectée avec un virus de référence (5 dilutions de 1/2 à 1/100). Les échantillons analysés ne sont dilués qu'au $1/10^{\text{ème}}$ et $1/25^{\text{ème}}$.

Un protocole ELISA accéléré est alors utilisé, en diminuant les temps d'incubation de sorte à obtenir les résultats le soir même et de procéder rapidement à l'inoculation des plantes.

Après mesure de l'absorbance à 405nm pour chaque puits, les valeurs de DO sont reportées sur un graphique représentant la DO en fonction du coefficient de dilution correspondant. Les courbes tracées sont linéaires dans un certain intervalle. C'est dans cet intervalle que nous évaluons les

concentrations de virus pour les deux échantillons dilués par comparaison du coefficient de dilution associé à une même valeur de DO. Ainsi, si l'échantillon A présente une DO de 0.8 pour une dilution d'un facteur 10 alors que l'échantillon B présente cette DO pour une dilution de facteur 5, nous pouvons en déduire que l'échantillon B est 2 fois moins concentré que l'échantillon A (Figure M. 6).

B) Inoculations simples et mixtes

Après estimation de la quantité relative de virus dans chaque broyat correspondant à chacun des deux virus à mettre en compétition, celles-ci sont équilibrées par dilution de l'échantillon le plus concentré en ajoutant du tampon d'inoculation. L'inoculum du test de compétition est alors préparé en mélangeant 750µl de chacun des deux broyats dans un même mortier. Ce mélange, après ajout de carborundum et de charbon actif, est utilisé pour inoculer 18 laitues. En parallèle, le volume restant de chaque broyat est utilisé pour inoculer séparément 12 plantes avec chaque virus.

VI- Expression transitoire de protéines *in planta*

A) Agroinfiltration de *N. benthamiana* et de la laitue

Les ADNc codant pour protéine CI, la région CI-Cter, la VPg et P3N-PIPO ont été clonés au sein de vecteurs gateway dérivés de plasmides binaires, permettant leur expression dans la plante *via* agroinfiltration et sont listés dans le Tableau M.2. Les agrobactéries transformées par ces plasmides sont infiltrées dans les plantes, ainsi les protéines virales seront exprimées transitoirement *in planta*. La technique par infiltration consiste à faire pénétrer dans les tissus foliaires une solution d'*Agrobacterium* transportant les vecteurs d'intérêt. La bactérie, au préalable incubée dans une solution d'agroinfiltration visant à activer ses gènes de virulence, va donc exciser la construction d'intérêt située entre les bordures droite et gauche du vecteur et l'intégrer au sein du génome de la plante afin de permettre son expression au sein des cellules épidermiques. L'infiltration des feuilles de *Nicotiana benthamiana* est réalisée suivant le protocole dérivé de English et al. (1997) et l'infiltration des feuilles de laitue est adaptée du protocole proposé par Wroblewski et al. (2005). Une pré-culture de 5 ml (LB + antibiotiques) d'*Agrobacterium* portant le plasmide d'intérêt est incubée la nuit à 28°C. Le lendemain, cette préculture sert à ensemercer une culture de 25 mL (LB + antibiotiques additionnés de 20 µM acétylsyringone et 10 mM MES), incubée une nuit à 28°C sous agitation. Après centrifugation du milieu de culture, le culot bactérien est rincé puis resuspendu dans la solution d'agroinfiltration (10 mM MES pH6,3, 10 mM MgCl₂ et 150 mM Acétylsyringone). La DO_{600nm} de la solution bactérienne est ajustée à 0,5 pour les agroinfiltrations de *N. benthamiana* et à 0.7 pour les agroinfiltrations de laitue. Après incubation pendant 2-3 heures à 20°C, l'infiltration ou la

Fluorophores	Excitation (% activation laser)	Réception
eGFP	488 nm (30%)	497-541 nm
RFP	543 nm (70%)	570-620 nm
Aniline blue	405 nm (80%)	436-486 nm

Tableau M.5 : Paramètres d'excitation et de réception du signal des fluorophores observés durant cette thèse

Les observations sont faites au microscope confocal SP2 de Leica. L'excitation de la eGFP est faite avec un laser Argon, celle de la RFP avec un laser He/Ne et celle de l'aniline blue avec une diode UV.

co-infiltration des souches d'*Agrobacterium* contenant les constructions est réalisée. Pour améliorer l'expression des transgènes dans la plante, un vecteur contenant la P19 du *Tomato bushy stunt virus* est co-infiltré (Voinnet et al. (2003). Pour cela, chacune des cultures est mélangée (v/v), puis, ce mélange (200-300 µL) est infiltré à l'aide d'une seringue sans aiguille sur la face inférieure d'une feuille, plus riche en stomates que la face supérieure.

Les plantes sont maintenues à l'humidité en chambre de culture à 25°.

B) Observations de fluorescence au microscope confocal

Pour visualiser l'expression *in vivo* des protéines, les échantillons sont observés au microscope confocal 48h après l'agroinfiltration (modèle Leica TCS SP2). Les échantillons sont analysés avec différents lasers émettant à des longueurs d'ondes distinctes (lasers Argon, Green He -Ne et une diode laser). Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission pour chaque fluorophore sont indiquées dans le Tableau M.5.

C) Visualisation des protéines de fusion exprimées dans la plante par Western Blot

Les feuilles agroinfiltrées et observées au microscope confocal sont prélevées après observation et plongées dans l'azote liquide. Les protéines totales sont ensuite extraites par broyage des feuilles, I) soit directement dans du tampon de charge (composition dans le tableau M.6) pour déposer directement sur gel d'acrylamide après clarification par centrifugation et dénaturation à 95°C pendant 10 min, II) soit dans 3ml de tampon d'extraction (Tableau M.6). Dans ce cas 25µl d'extrait sont prélevés et mélangés à 6µl de tampon de charge et 1.6µl de β-mercaptoéthanol. Les échantillons sont chauffés à 95°C pendant 10 min pour dénaturer complètement les protéines.

Electrophorèse en gel d'acrylamide

Les échantillons migrent dans un gel d'acrylamide à 12.5% composé d'un gel de concentration et d'un gel de séparation, plongé dans un tampon SDS-PAGE de migration (Tableau M.6). Le SDS permet la dénaturation et le chargement négatif de toutes les protéines. L'électrophorèse va alors permettre de séparer les protéines de l'échantillon selon leur taille. La migration est réalisée 15 minutes à 110V (fin du gel de concentration) puis à 130V durant au moins 45 minutes dans le gel de séparation. Chaque dépôt d'échantillon est réalisé en double, afin d'analyser pour l'un, les protéines totales en colorant le gel au bleu de Coomassie, et pour l'autre la présence des protéines d'intérêt par Western Blot.

Tampon d'extraction des protéines		Gel de séparation	
Tris HCl pH 7,5	0,01 M	Acrylamide/BisAcrylamide (37,5/1)	15 %
NaCl	0,05 M	SDS	0,1 %
Glycérol	5 % (v/v)	Tris HCl pH 8,8	375 mM
DTT	10 mM	APS	0,1 %
Nonidet 40	1X	Temed	0,08 %
Inhibiteur de protéases	1X	Gel de concentration	
PVPP	2 % (p/v)	Acrylamide/BisAcrylamide (37,5/1)	5 %
Eau	Qsp 3ml	SDS	0,1 %
Tampon de charge 5X		Tris HCl pH 6,8	125 mM
Tris HCl pH 6,8	60 mM	APS	0,1 %
Glycérol	25 % (v/v)	Tampon de migration	
SDS	2 % (v/v)	Tris-base	3 g/l
B-mercaptoéthanol	14,4 mM	Glycine	14,4 g/l
Bleu de Bromophénol	0,25 % (p/v)	SDS	2 %

Tableau M.6 : Composition des tampons utilisés pour la séparation des protéines sur gel d'acrylamide

Tampon de lavage TTBS		Tampon de transfert	
Tris pH 7,4	10 mM	Tris-base	3 g/l
NaCl	150 mM	Glycine	14,4 g/l
Tween 20	0,05 %	Méthanol	200 ml/l
Tampon d'hybridation			
Tampon de lavage	100 ml		
Lait en poudre	5g		
Tampon de révélation			
Tris pH 9,5	100 mM		
NaCl	250 mM		
MgCl ₂	1 mM		

Tableau M.7 : Composition des tampons immunologiques utilisés pour la détection des protéines

Coloration du gel au bleu de Coomassie

Après l'électrophorèse, le gel d'acrylamide est lavé 3 fois à l'eau puis placé dans la solution de coloration Instant Blue™ (Expedeon). Une fois qu'une coloration satisfaisante est obtenue, la réaction est arrêtée en plaçant le gel dans l'eau.

Immunoblotting

Les protéines du second gel vont être transférées sur une membrane de nitrocellulose (Protran® Whatman). Pour cela le gel est positionné sous du papier buvard imbibé de solution de transfert (Tableau M.7) et sur la membrane posée sur des papiers buvards également imbibés. Le transfert se fait grâce à un champ électrique appliqué par l'appareil Trans-Blot SD semidry transfer cell (Bio-Rad) (130mA durant 50minutes). Les protéines chargées négativement vont migrer du gel vers la membrane. Après la migration la membrane est rincée avec une solution de TTBS 1X (Tableau M.9).

La membrane est ensuite incubée toute la nuit à 4°C dans une solution de TTBS1X additionné de 3% de lait et contenant des anticorps primaires polyclonaux de lapin anti GFP TP401 (Biolabs) ou anti RFP 103675 (Invitrogen) dilués au 1/5000^{ème}. Les anticorps primaires en excès sont éliminés par 3 lavages successifs de 5minutes dans du TTBS 1X. La membrane est ensuite incubée 1h dans une solution de TTBS 1X contenant au 1/5000^{ème} de l'anticorps secondaire polyclonal dirigé contre les anticorps de lapin (HRP-Sigma) couplé à la phosphatase alcaline ou la peroxydase.

La révélation de la membrane se fait par réaction colorimétrique, en ajoutant le substrat de la phosphatase alcaline, le NBT-PCIP (Roche) dilué au 1/100^{ème}. Lorsque le signal observé est satisfaisant, la réaction est stoppée en transférant la membrane dans l'eau.

La révélation par bioluminescence se fait par incubation de la membrane pendant 5 minutes dans une solution substrat contenant un agent luminescent (kit « Supersignal West Pico chemiluminescent substrate » - ThermoScientific). La peroxydase des anticorps secondaires fixés va réagir avec cet agent et le produit de cette réaction va émettre de la luminescence. Un film radiographique est alors placé sur la membrane puis développé.

VII- Outils bioinformatiques

A) Alignement de séquences

Les séquences nucléotidiques et protéiques sont alignées avec l'aide du logiciel Molecular Evolutionary Genetics Analysis 5 (MEGA 5, Tamura et al., 2011) dans lequel est implémenté l'outil ClustalW.

Les analyses phylogénétiques réalisées lors de cette thèse se sont basées sur l'alignement de séquences CI-VPg (nt 5779-6919) obtenues pour 81 isolats de LMV par l'équipe d'étiologie et qui fera l'objet d'un article (Svanella et al., en préparation). Cet alignement a ensuite été converti en format

Fasta pour être soumis à différents programmes d'analyse. Un arbre phylogénétique a été construit à partir de cet alignement, par la méthode de maximum de vraisemblance associée au modèle Jones-Taylor-Thornton (JTT). Les valeurs de Bootstrap sont établies après 500 cycles de répétitions.

B) Détection de pressions de sélection

La détection de positions sous pression de sélection positive a été réalisée à l'aide de divers logiciels proposés sur le site Datamonkey. Il s'agit des outils Single Likelihood Ancestor Counting (SLAC), Internal Fixed Effect Likelihood (IFEL), Fast Unbiased Bayesian AppRoximation (FUBAR) et Mixed Effect Model of Episodic selection (MEME) (<http://www.datamonkey.org/>) (Pond and Frost, 2005b, 2005a; Pond et al., 2006; Delpont et al., 2010; Murrell et al., 2012, 2013). Ces méthodes reposent sur l'estimation du parameter ω , ou dN/dS qui rend compte du ratio entre le nombre de mutations non synonymes et synonymes au sein de l'alignement pour chacune des positions, en comparaison avec le rapport dN/dS moyen. La sélection est dite neutre lorsque $\omega=1$, négative lorsque $\omega<1$ et positive lorsque $\omega>1$.

C) Détection de co-variations entre la CI et la VPg

L'existence d'une covariation entre des positions de la CI et de la VPg a été estimée par l'outil Spidermonkey (Poon et al., 2008) disponible sur le site Datamokey. Cet outil détermine si pour une même branche de l'arbre phylogénétique, l'acquisition d'une mutation à une position A est corrélée (ou non) à une mutation à un site B.

D) Dédution de l'état ancestral

A partir de l'arbre phylogénétique établi, les événements de mutations sont repérés grâce à l'outil de reconstruction de l'état ancestral (ASR) disponible sur Datamonkey (Pond and Frost, 2005b).

E) Prédiction de sites de phosphorylation

La probabilité que les acides aminés mutés vers une sérine ou une thréonine soient sujets à une phosphorylation post-traductionnelle a été évaluée à l'aide de deux outils : NetPhos (Blom et al., 1999) disponible à l'adresse <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/> et ScanSite disponible à l'adresse <http://scansite.mit.edu/>.

F) Modélisation de structure 3D

La prédiction de structure 3D et 2D a été réalisée à l'aide des logiciels Phyre² (Kelley and Sternberg, 2009) et I-TASSER (Zhang, 2008).

Références bibliographiques

- Abdul-Razzak, A, Guiraud, T, Peypelut, M, Walter, J, Houvenaghel, M-C, Candresse, T, Le Gall, O, German-Retana, S. 2009. Involvement of the cylindrical inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against Lettuce mosaic potyvirus. *Mol. Plant Pathol.* 10: 109–113.
- Adams, MJ, Antoniw, JF, Fauquet, CM. 2005. Molecular criteria for genus and species discrimination within the family Potyviridae. *Arch. Virol.* 150: 459–79.
- Adams, MJ, King, AM, Lefkowitz, E, Carstens, EB. 2011. Part II: The viruses - Family Potyviridae. In: *Virus Taxonomy - Ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier, p 1069–1090.
- 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.
- Ala-Poikela, M, Goytia, E, Haikonen, T, Rajamäki, M-L, Valkonen, JPT. 2011. Helper component proteinase of the genus Potyvirus is an interaction partner of translation initiation factors eIF(iso)4E and eIF4E and contains a 4E binding motif. *J. Virol.* 85: 6784–94.
- Ammar, E, Rodriguez-Cerezo, E, Shaw, J, Pirone, T. 1994. Association of virions and coat protein of tobacco vein mottling potyvirus with cylindrical inclusions in tobacco cells. *Phytopathology* 84: 520–524.
- Andrade, M, Abe, Y, Nakahara, K, Uyeda, I. 2009. The *cyv-2* resistance to Clover yellow vein virus in pea is controlled by the eukaryotic initiation factor 4E. *J. Gen. Plant Pathol.* 75: 241–249.
- Andrade, M, Sato, M, Uyeda, I. 2007. Two Resistance Modes to Clover yellow vein virus in Pea Characterized by a Green Fluorescent Protein-Tagged Virus. *Phytopathology* 97: 544–50.
- Arbatova, J, Lehto, K, Pehu, E, Pehu, T. 1998. Localization of the P1 protein of potato Y potyvirus in association with cytoplasmic inclusion bodies and in the cytoplasm of infected cells. *J. Gen. Virol.* 79 (Pt 10: 2319–23.
- Atabekov, JG, Rodionova, NP, Karpova, O V, Kozlovsky, S V, Poljakov, VY. 2000. The movement protein-triggered in situ conversion of potato virus X virion RNA from a nontranslatable into a translatable form. *Virology* 271: 259–63.
- Ayme, V. 2005. Mécanismes de contournement des résistances et évolution a priori de leur durabilité dans l'interaction Piment (*Capsicum anuum* L.) - Virus Y de la pomme de terre (PVY). 175pp.
- Ayme, V, Petit-Pierre, J, Souche, S, Palloix, A, Moury, B. 2007. Molecular dissection of the potato virus Y VPg virulence factor reveals complex adaptations to the *pvr2* resistance allelic series in pepper. *J. Gen. Virol.* 88: 1594–601.
- Ayme, V, Souche, S, Caranta, C, Jacquemond, M, Chadoeuf, J, Palloix, A, Moury, B. 2006. Different mutations in the genome-linked protein VPg of potato virus Y confer virulence on the *pvr2(3)* resistance in pepper. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 19: 557–63.
- Beauchemin, C, 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. *J. Virol.* 81: 10905–10913.
- Bertheau Y, Fréchon D, Toth IK, HL. 2002. DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR). In: M .C. M. PEROMBELON & J. M. VAN DER WOLF, editor. *Methods for the detection and quantification of Erwinia carotovora subsp. atroseptica (Pectobacterium carotovorum subsp. atrosepticum) on potatoes: a laboratory manual.* Scottish Crop Research Institute Occasional Publication No. 10, p 47–48.
- Bilgin, DD, Liu, Y, Schiff, M, Dinesh-Kumar, SP. 2003. P58IPK, a Plant Ortholog of Double-Stranded RNA-Dependent Protein Kinase PKR Inhibitor, Functions in Viral Pathogenesis. *Dev. Cell* 4: 651–661.
- Blom, N, Gammeltoft, S, Brunak, S. 1999. Sequence and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* 294: 1351–1362.
- Den Boon, J a, Ahlquist, P. 2010. Organelle-like membrane compartmentalization of positive-strand RNA virus replication factories. *Annu. Rev. Microbiol.* 64: 241–56.
- Boyd, LA. 2006. Can the durability of resistance be predicted? *J. Sci. Food Agric.* 86: 2523–2526.

- Brault, V, Uzest, M, Monsion, B, Jacquot, E, Blanc, S. 2010. Aphids as transport devices for plant viruses. *C. R. Biol.* 333: 524–538.
- Bruylants, G, Wouters, J, Michaux, C. 2005. Differential scanning calorimetry in life science: thermodynamics, stability, molecular recognition and application in drug design. *Curr. Med. Chem.* 12: 2011–20.
- Calder, VL, Ingerfeld, M. 1990. The roles of the cylindrical inclusion protein of a potyvirus in the induction of vesicles and in cell-to-cell spread. *J. Struct. Biol.* 105: 62–66.
- 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.
- Charron, C, Nicolai, M, Gallois, J-L, Robaglia, C, Moury, B, Palloix, A, Caranta, C. 2008. Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *Plant J.* 54: 56–68.
- Chen, S, Das, P, Hari, V. 1994. In situ localization of ATPase activity in cells of plants infected by maize dwarf mosaic potyvirus. *Arch. Virol.* 134: 433–439.
- Chiba, S, Kondo, H, Miyanishi, M, Andika, IB, Han, CG, Tamada, T. 2010. The Evolutionary History of Beet necrotic yellow vein virus Deduced from Genetic Variation, Geographical Origin and Spread, and the Breaking of Host Resistance. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24: 207–218.
- Chisholm, ST, Mahajan, SK, Whitham, S a, Yamamoto, ML, Carrington, JC. 2000. Cloning of the Arabidopsis RTM1 gene, which controls restriction of long-distance movement of tobacco etch virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 489–94.
- Choi, I-R, Stenger, DC, French, R. 2000. Multiple Interactions among Proteins Encoded by the Mite-Transmitted Wheat Streak Mosaic Tritimovirus. *Virology* 267: 185–198.
- Chowda-Reddy, R V, Sun, H, Hill, JH, Poysa, V, Wang, A. 2011. Simultaneous mutations in multi-viral proteins are required for soybean mosaic virus to gain virulence on soybean genotypes carrying different R genes. *PLoS One* 6: e28342.
- Chu, M, Lopez-Moya, JJ, Llave-Correas, C, Pirone, TP. 1997. Two Separate Regions in the Genome of the Tobacco Etch Virus Contain Determinants of the Wilting Response of Tabasco Pepper. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 10: 472–480.
- Chung, BY-W, Miller, WA, Atkins, JF, Firth, AE. 2008. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105: 5897–902.
- Clark, MF, Adams, a N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475–83.
- Contreras-Paredes, C a, Silva-Rosales, L, Daròs, J-A, Alejandri-Ramírez, ND, Dinkova, TD, Alejandri-Ramírez, ND. 2012. The absence of eukaryotic initiation factor eIF(iso)4E affects the systemic spread of a Tobacco etch virus isolate in Arabidopsis thaliana. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26: 461–70.
- Cosson, P, Sofer, L, Le, QH, Léger, V, Schurdi-Levraud, V, Whitham, S a, Yamamoto, ML, Gopalan, S, Le Gall, O, Candresse, T, Carrington, JC, Revers, F. 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. *Plant Physiol.* 154: 222–32.
- 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. *J. Virol.* 83: 10460–71.
- Cronin, S, Verchot, J, Haldeman-Cahill, R, Schaad, MC, Carrington, JC. 1995. Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* 7: 549–59.
- Culver, JN. 1997. Viral Avirulence Genes. In: Stacey, G, Keen, N, editors. *Plant-microbe Interactions 2 SE - 6*. Springer US, p 196–219.
- Dangl, J, Horvath, D, Staskawicz, B. 2013. Pivoting the Plant Immune System from Dissection to Deployment. *Science (80-.)*. 341: 746–751.
- David-Ferreira, J, Borges, M. 1958. Virus na célula vegetal obseracoes ao microscopio electronico I- Virus Y da batateira. *Bol. da Soc. Broteriana* 32: 329–332.

- Decroocq, V, Salvador, B, Sicard, O, Glasa, M, Cosson, P, Svanella-Dumas, L, Revers, F, García, JA, Candresse, T. 2009. The Determinant of Potyvirus Ability to Overcome the RTM Resistance of *Arabidopsis thaliana* Maps to the N-Terminal Region of the Coat Protein. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22: 1302–1311.
- Decroocq, V, Sicard, O, Alamillo, JM, Lansac, M, Eyquard, JP, García, JA, Candresse, T, Le Gall, O, Revers, F. 2006. Multiple Resistance Traits Control Plum pox virus Infection in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 19: 541–549.
- Delport, W, Poon, AFY, Frost, SDW, Kosakovsky Pond, SL. 2010. Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinforma.* 26 : 2455–2457.
- Desbiez, C, Chandeysson, C, Lecoq, H, Moury, B. 2012. A simple, rapid and efficient way to obtain infectious clones of potyviruses. *J. Virol. Methods* 183: 94–7.
- Diaz-Pendon, JA, Truniger, V, Nieto, C, Garcia-Mas, J, Bendahmane, A, Aranda, MA. 2004. Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Mol. Plant Pathol.* 5: 223–233.
- Dinant, S, Lot, H. 1992. Lettuce mosaic virus. *Plant Pathol.* 41: 528–542.
- Dolja, V V, Haldeman, R, Robertson, NL, Dougherty, WG, Carrington, JC. 1994. Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO J.* 13: 1482–91.
- Dolja, V V, 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.
- Dougherty, WG, Hiebert, E. 1980. Translation of potyvirus RNA in a rabbit reticulocyte lysate: Identification of nuclear inclusion proteins as products of tobacco etch virus RNA translation and cylindrical inclusion protein as a product of the potyvirus genome. *Virology* 104: 174–182.
- Dunoyer, P, Thomas, C, Harrison, S, Revers, F, Maule, A. 2004. A Cysteine-Rich Plant Protein Potentiates Potyvirus Movement through an Interaction with the Virus Genome-Linked Protein VPg A Cysteine-Rich Plant Protein Potentiates Potyvirus Movement through an Interaction with the Virus Genome-Linked Protein VPg. 78.
- Duprat, A, Caranta, C, Revers, F, Menand, B, Browning, KS, Robaglia, C. 2002. The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant J.* 32: 927–934.
- Eagles, RM, Balmori-Melián, E, Beck, DL, Gardner, RC, Forster, RL. 1994. Characterization of NTPase, RNA-binding and RNA-helicase activities of the cytoplasmic inclusion protein of tamarillo mosaic potyvirus. *Eur. J. Biochem.* 224: 677–84.
- Edwardson, J, Christie, R, Ko, N. 1984. Potyvirus cylindrical inclusions - Subdivision IV. *Phytopathology* 74: 1111–1114.
- Edwardson, JR. 1966. Cylindrical Inclusions in the Cytoplasm of Leaf Cells Infected with Tobacco Etch Virus. *Science* (80-). 153: 883–884.
- Edwardson, JR. 1992. Inclusion bodies. In: Barnett Jr., O, editor. *Potyvirus Taxonomy SE - 3*. Springer Vienna, p 25–30.
- Edwardson, JR. 1974. Some Properties of the Potato Virus Y-group. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Edwardson, JR, Christie, RG. 1978. Use of Virus-Induced Inclusions in Classification and Diagnosis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 16: 31–55.
- Elena, SF, Bedhomme, S, Carrasco, P, Cuevas, JM, de la Iglesia, F, Lafforgue, G, Lalić, J, Prósper, A, Tromas, N, Zwart, MP. 2011. The evolutionary genetics of emerging plant RNA viruses. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 24: 287–93.
- English, JJ, Davenport, GF, Elmayan, T, Vaucheret, H, Baulcombe, DC. 1997. Requirement of sense transcription for homology-dependent virus resistance and trans-inactivation. *Plant J.* 12: 597–603.
- Eskelin, K, Hafrén, A, Rantalainen, KI, Mäkinen, K. 2011. Potyviral VPg enhances viral RNA translation and inhibits reporter mRNA translation in planta. *J. Virol.*

- Eskelin, K, Suntio, T, Hyvärinen, S, Hafren, a, Mäkinen, K. 2010. Renilla luciferase-based quantitation of Potato virus A infection initiated with Agrobacterium infiltration of *N. benthamiana* leaves. *J. Virol. Methods* 164: 101–10.
- Fabre, F, Bruchou, C, Palloix, A, Moury, B. 2009. Key determinants of resistance durability to plant viruses: Insights from a model linking within- and between-host dynamics. *Virus Res.* 141: 140–149.
- Fairman-Williams, ME, Guenther, U, Jankowsky, E. 2010. SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 20: 313–324.
- Faurez, F, Baldwin, T. 2012. Identification of new Potato virus Y (PVY) molecular determinants for the induction of vein necrosis in tobacco. *Mol. plant ...* 13: 948–959.
- Fernández, a, Guo, HS, Sáenz, P, Simón-Buela, L, Gómez de Cedrón, M, García, J a. 1997. The motif V of plum pox potyvirus CI RNA helicase is involved in NTP hydrolysis and is essential for virus RNA replication. *Nucleic Acids Res.* 25: 4474–80.
- Fernández, A, Laín, S, García, JA. 1995. RNA helicase activity of the plum pox potyvirus CI protein expressed in *Escherichia coli*. Mapping of an RNA binding domain. *Nucleic Acids Res.* 23 : 1327–1332.
- Flor, HH. 1971. Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9: 275–296.
- Fraser, RSS. 1992. The genetics of plant-virus interactions: implications for plant breeding. *Euphytica* 63: 175–185.
- Fujiwara, A, Inukai, T, Kim, BM, Masuta, C. 2011. Combinations of a host resistance gene and the CI gene of turnip mosaic virus differentially regulate symptom expression in *Brassica rapa* cultivars. *Arch. Virol.* 156: 1575–81.
- Gabrenaite-Verkhovskaya, R, Andreev, I a, Kalinina, NO, Torrance, L, Taliansky, ME, Mäkinen, K. 2008. Cylindrical inclusion protein of potato virus A is associated with a subpopulation of particles isolated from infected plants. *J. Gen. Virol.* 89: 829–38.
- Le Gall, O. 2011. Chapter 9 : Plant resistances to viruses mediated by translation initiation factors. In: Caranta, C, Aranda, M a, Tepfer, M, Lopez-Moya, JJ, editors. *Recent Advances in Plant Virology.*, p 177.
- Gallois, J-L, Charron, C, Sánchez, F, Pagny, G, Houvenaghel, M-C, Moretti, A, Ponz, F, Revers, F, Caranta, C, German-Retana, S. 2010. Single amino acid changes in the turnip mosaic virus viral genome-linked protein (VPg) confer virulence towards *Arabidopsis thaliana* mutants knocked out for eukaryotic initiation factors eIF(iso)4E and eIF(iso)4G. *J. Gen. Virol.* 91: 288–93.
- Gao, Z, Eysers, S, Thomas, C, Ellis, N, Maule, a. 2004. Identification of markers tightly linked to sbm recessive genes for resistance to Pea seed-borne mosaic virus. *Theor. Appl. Genet.* 109: 488–94.
- Garcia-Ruiz, H, Takeda, A, Chapman, EJ, Sullivan, CM, Fahlgren, N, Brempelis, KJ, Carrington, JC. 2010. *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection. *Plant Cell* 22: 481–96.
- German-Retana, S, Candresse, T, Alias, E, Delbos, RP, Le Gall, O. 2000. Effects of green fluorescent protein or beta-glucuronidase tagging on the accumulation and pathogenicity of a resistance-breaking Lettuce mosaic virus isolate in susceptible and resistant lettuce cultivars. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 13: 316–24.
- German-Retana, S, Redondo, E, Tavert-Roudet, G, Le Gall, O, Candresse, T. 2003. Introduction of a NIa proteinase cleavage site between the reporter gene and HC-Pro only partially restores the biological properties of GUS- or GFP-tagged LMV. *Virus Res.* 98: 151–162.
- German-Retana, S, Walter, J, Doublet, B, Roudet-Tavert, G, Nicaise, V, Lecampion, C, Houvenaghel, M-C, Robaglia, C, Michon, T, Le Gall, O. 2008a. Mutational analysis of plant cap-binding protein eIF4E reveals key amino acids involved in biochemical functions and potyvirus infection. *J. Virol.* 82: 7601–12.
- German-Retana, S, Walter, J, Le Gall, O. 2008b. Lettuce mosaic virus : from pathogen diversity to host interactors. *Mol. Plant Pathol.* 9: 127–136.
- Goldbach, R, Wellink, J, Verver, J, Kammen, A, Kasteel, D, Lent, J. 1994. Adaptation of positive-strand RNA viruses to plants. *Arch. Virol. supplementum* 9: 87–97.

- Gómez de Cedrón, M, Osaba, L, López, L, García, JA. 2006. Genetic analysis of the function of the plum pox virus CI RNA helicase in virus movement. *Virus Res.* 116: 136–45.
- Goodman, AG, Fornek, JL, Medigeshi, GR, Perrone, L a, Peng, X, Dyer, MD, Proll, SC, Knoblauch, SE, Carter, VS, Korth, MJ, Nelson, J a, Tumpey, TM, Katze, MG. 2009. P58(IPK): a novel “CIHD” member of the host innate defense response against pathogenic virus infection. *PLoS Pathog.* 5: e1000438.
- Gorbalenya, E, Koonin, E V. 1993. Helicases : amino acid sequence comparisons relationships and of Medical. *Current* 3: 419–429.
- 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. *J. Virol.* 86: 9255–65.
- Graybosch, R, Hellmann, GM, Shaw, JG, Rhoads, RE, Hunt, AG. 1989. Expression of a potyvirus non-structural protein in transgenic tobacco. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160: 425–432.
- Guo, D, Rajamäki, ML, Saarma, M, Valkonen, JP. 2001. Towards a protein interaction map of potyviruses: protein interaction matrixes of two potyviruses based on the yeast two-hybrid system. *J. Gen. Virol.* 82: 935–9.
- Hafrén, A, Eskelin, K, Mäkinen, K. 2013. Ribosomal protein PO promotes Potato virus A infection and functions in viral translation together with VPg and eIF(iso)4E. *J. Virol.* 87: 4302–12.
- Haikonen, T, Rajamäki, M-L, Tian, Y-P, Valkonen, JPT. 2013. Mutation of a Short Variable Region in HCpro Protein of Potato virus A Affects Interactions with a Microtubule-Associated Protein and Induces Necrotic Responses in Tobacco. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 26: 721–733.
- Hajimorad, MR, Eggenberger, a L, Hill, JH. 2008. Adaptation of Soybean mosaic virus avirulent chimeras containing P3 sequences from virulent strains to Rsv1-genotype soybeans is mediated by mutations in HC-Pro. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 21: 937–46.
- Hajimorad, MR, Wen, R-H, Eggenberger, a L, Hill, JH, Maroof, M a S. 2011. Experimental adaptation of an RNA virus mimics natural evolution. *J. Virol.* 85: 2557–64.
- Hart, J, Griffiths, P. 2013. A series of eIF4E alleles at the Bc-3 locus are associated with recessive resistance to Clover yellow vein virus in common bean. *Theor. Appl. Genet.* 126: 2849–2863.
- Hayes, A, Jeong, S, Gore, M, Yu, Y. 2004. Recombination within a nucleotide-binding-site/leucine-rich-repeat gene cluster produces new variants conditioning resistance to soybean mosaic virus in soybeans. *Genetics* 166: 493–503.
- Hébrard, E, Bessin, Y, Michon, T, Longhi, S, Uversky, VN, Delalande, F, Van Dorsseleer, A, Romero, P, Walter, J, Declerck, N, Fargette, D. 2009. Intrinsic disorder in Viral Proteins Genome-Linked: experimental and predictive analyses. *Virol. J.* 6: 23.
- Hiebert, E, McDonald, JG. 1973. Characterization of some proteins associated with viruses in the potato Y group. *Virology* 56: 349–361.
- Hiebert, E, Purcifull, DE, Christie, RG, Christie, SR. 1971. Partial purification of inclusions induced by tobacco etch virus and potato virus Y. *Virology* 43: 638–646.
- Hipper, C, Brault, V, Ziegler-Graff, V, Revers, F. 2013. Viral and cellular factors involved in phloem transport of plant viruses. *Front. Plant Sci.* 4.
- Huet, H, Gal-On, A, Meir, E, Lecoq, H, Raccah, B. 1994. Mutations in the helper component protease gene of zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility. *J. Gen. Virol.* 75 : 1407–1414.
- Immink, R, Tonaco, I, de Folter, S, Shchennikova, A, van Dijk, A, Busscher-Lange, J, Borst, J, Angenent, G. 2009. SEPALLATA3: the “glue” for MADS box transcription factor complex formation. *Genome Biol.* 10: R24.
- Janzac, B, Fabre, F, Palloix, A, Moury, B. 2009. Constraints on evolution of virus avirulence factors predict the durability of corresponding plant resistances. *Mol. Plant Pathol.* 10: 599–610.
- Jenner, C. 2002. Mutations in Turnip mosaic virus P3 and Cylindrical Inclusion Proteins Are Separately Required to Overcome Two Brassica napus Resistance Genes. *Virology* 300: 50–59.

- Jenner, CE, Sánchez, F, Nettleship, SB, Foster, GD, Ponz, F, Walsh, J a. 2000. The cylindrical inclusion gene of Turnip mosaic virus encodes a pathogenic determinant to the Brassica resistance gene TuRB01. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 13: 1102–8.
- Jiang, J, Laliberté, J-F. 2011. The genome-linked protein VPg of plant viruses—a protein with many partners. *Curr. Opin. Virol.* 1: 347–54.
- Jiménez, I, López, L, Alamillo, JM, Valli, a, García, J a. 2006. Identification of a plum pox virus CI-interacting protein from chloroplast that has a negative effect in virus infection. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 19: 350–8.
- Kadaré, G, Haenni, A. 1997. Virus-encoded RNA helicases. *J. Virol.* 71: 2583–2590.
- Kang, B-C, Yeam, I, Jahn, MM. 2005. Genetics of plant virus resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43: 581–621.
- Kasschau, KD, Carrington, JC. 1998. A Counterdefensive Strategy of Plant Viruses: Suppression of Posttranscriptional Gene Silencing. *Cell* 95: 461–470.
- 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, Carrington, JC. 1995. Requirement for HC-Pro Processing during Genome Amplification of Tobacco Etch Potyvirus. *Virology* 209: 268–273.
- Kasschau, KD, Cronin, S, Carrington, JC. 1997. Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology* 228: 251–62.
- Kekarainen, T, Savilahti, H, Valkonen, JPT. 2002. Functional genomics on potato virus A: virus genome-wide map of sites essential for virus propagation. *Genome Res.* 12: 584–94.
- Kelley, LA, Sternberg, MJE. 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nat. Protoc.* 4: 363–371.
- Ben Khalifa, M, Simon, V, Fakhfakh, H, Moury, B. 2012. Tunisian Potato virus Y isolates with unnecessary pathogenicity towards pepper: support for the matching allele model in eIF4E resistance-potyvirus interactions. *Plant Pathol.* 61: 441–447.
- Khan, MA, Miyoshi, H, Gallie, DR, Goss, DJ. 2008. Potyvirus Genome-linked Protein, VPg, Directly Affects Wheat Germ in Vitro Translation: INTERACTIONS WITH TRANSLATION INITIATION FACTORS eIF4F AND eIFiso4F. *J. Biol. Chem.* 283 : 1340–1349.
- Khatabi, B, Fajolu, O, Wen, R-H, Hajimorad, MR. 2012. of North American isolates of Soybean mosaic virus for gain of virulence on Rsv-genotype soybeans with special emphasis on resistance-breaking determinants on. *Mol. Plant Pathol.* 13: 1077–1088.
- Klein, P, Klein, R, Rodriguez-Cerezo, E. 1994. Mutational analysis of the tobacco vein mottling virus genome. *Virology* 204: 759–769.
- Kodama, Y, Wada, M. 2009. Simultaneous visualization of two protein complexes in a single plant cell using multicolor fluorescence complementation analysis. *Plant Mol. Biol.* 70: 211–7.
- Kostrub, CF, Lei, EP, Enoch, T. 1998. Use of gap repair in fission yeast to obtain novel alleles of specific genes. *Nucleic Acids Res.* 26: 4783–4.
- Krause-Sakate, R, Le Gall, O, Fakhfakh, H, Peypelut, M, Marrakchi, M, Varveri, C, Pavan, M a, Souche, S, Lot, H, Zerbini, FM, Candresse, T. 2002. Molecular and Biological Characterization of Lettuce mosaic virus (LMV) Isolates Reveals a Distinct and Widespread Type of Resistance-Breaking Isolate: LMV-Most. *Phytopathology* 92: 563–72.
- Krause-Sakate, R, Redondo, E, Richard-Forget, F, Jadão, AS, Houvenaghel, M-C, German-Retana, S, Pavan, MA, Candresse, T, Zerbini, FM, Le Gall, O. 2005. Molecular mapping of the viral determinants of systemic wilting induced by a Lettuce mosaic virus (LMV) isolate in some lettuce cultivars. *Virus Res.* 109: 175–80.
- Laín, S, Martín, MT, Riechmann, JL, García, JA. 1991. Novel catalytic activity associated with positive-strand RNA virus infection: nucleic acid-stimulated ATPase activity of the plum pox potyvirus helicase-like protein. *J. Virol.* 65: 1–6.
- Laín, S, Riechmann, J, Martín, MT, García, JA. 1989. Homologous potyvirus and flavivirus proteins belonging to a superfamily of helicase-like proteins. *Gene* 82: 357–362.

- Laín, S, Riechmann, JL, Garcíá, JA. 1990. RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucleic Acids Res.* 18: 7003–7006.
- Lakatos, L, Csorba, T, Pantaleo, V, Chapman, EJ, Carrington, JC, Liu, Y-P, Dolja, V V, Calvino, LF, Lopez-Moya, JJ, Burgyan, J. 2006. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J* 25: 2768–2780.
- Langenberg, WG. 1991. Cylindrical inclusion bodies of wheat streak mosaic virus and three other potyviruses only self-assemble in mixed infections. *J. Gen. Virol.* 72: 493–497.
- Langenberg, WG. 1993. Structural Proteins of Three Viruses in the Potyviridae Adhere Only to Their Homologous Cylindrical Inclusions in Mixed Infections. *J. Struct. Biol.* 110: 188–195.
- Langenberg, WG. 1986. Virus Protein Association with Cylindrical Inclusions of Two Viruses that Infect Wheat. *J. Gen. Virol.* 67: 1161–1168.
- Langenberg, WG, Purcifull, DE. 1989. Interactions between pepper ringspot virus and cylindrical inclusions of two potyviruses. *J. Ultrastruct. Mol. Struct. Res.* 102: 53–58.
- Lawson, RH, Hearon, SS. 1971. The association of pinwheel inclusions with plasmodesmata. *Virology* 44: 454–456.
- Lawson, RH, Hearon, SS, Smith, FF. 1971. Development of pinwheel inclusions associated with sweet potato russet crack virus. *Virology* 46: 453–463.
- Lecoq, H, Moury, B, Desbiez, C, Palloix, A, Pitrat, M. 2004. Durable virus resistance in plants through conventional approaches: a challenge. *Virus Res.* 100: 31–39.
- Lellis, AD, Kasschau, KD, Whitham, SA, Carrington, JC. 2002. Loss-of-Susceptibility Mutants of *Arabidopsis thaliana* Reveal an Essential Role for eIF(iso)4E during Potyvirus Infection. *Curr. Biol.* 12: 1046–1051.
- Léonard, S, Plante, D, Wittmann, S, Daigneault, N, Fortin, MG, Laliberté, JF. 2000. Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *J. Virol.* 74: 7730–7.
- Licitra, EJ, Liu, JO. 1996. A three-hybrid system for detecting small ligand–protein receptor interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93 : 12817–12821.
- Linder, P. 2004. Molecular biology. The life of RNA with proteins. *Science* 304: 694–5.
- López, L, Urzainqui, a, Domínguez, E, García, J a. 2001. Identification of an N-terminal domain of the plum pox potyvirus CI RNA helicase involved in self-interaction in a yeast two-hybrid system. *J. Gen. Virol.* 82: 677–86.
- Maiti, IB, Murphy, JF, Shaw, JG, Hunt, AG. 1993. Plants that express a potyvirus proteinase gene are resistant to virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90 : 6110–6114.
- Maroof, M a. S, Tucker, DM, Skoneczka, J a., Bowman, BC, Tripathy, S, Tolin, S a. 2010. Fine Mapping and Candidate Gene Discovery of the Soybean Mosaic Virus Resistance Gene, Rsv4. *Plant Genome J.* 3: 14.
- Merits, A, Guo, D, Järvekülg, L, Saarma, M. 1999. Biochemical and genetic evidence for interactions between potato A potyvirus-encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex. *Virology* 263: 15–22.
- Merits, A, Rajamäki, M-L, Lindholm, P, Runeberg-Roos, P, Kekarainen, T, Puustinen, P, Mäkeläinen, K, Valkonen, JPT, Saarma, M. 2002. Proteolytic processing of potyviral proteins and polyprotein processing intermediates in insect and plant cells. *J. Gen. Virol.* 83: 1211–1221.
- Michon, T, Estevez, Y, Walter, J, German-Retana, S, Le Gall, O. 2006. The potyviral virus genome-linked protein VPg forms a ternary complex with the eukaryotic initiation factors eIF4E and eIF4G and reduces eIF4E affinity for a mRNA cap analogue. *FEBS J.* 273: 1312–22.
- Montarry, J, Doumayrou, J, Simon, V, Moury, B. 2011. Genetic background matters : a plant-virus gene-for-gene interaction is strongly influenced by genetic contexts. *Mol. Plant Pathol.* 12: 911–920.
- Moury, B, Caromel, B, Johansen, E, Simon, V, Chauvin, L, Jacquot, E, Kerlan, C, Lefebvre, V. 2011. The Helper Component Proteinase Cistron of Potato virus Y Induces Hypersensitivity and Resistance in Potato Genotypes Carrying Dominant Resistance Genes on Chromosome IV. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 24: 787–797.

- Moury, B, Morel, C, Johansen, E, Guilbaud, L, Souche, S, Ayme, V, Caranta, C, Palloix, A, Jacquemond, M. 2004. Mutations in potato virus Y genome-linked protein determine virulence toward recessive resistances in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 17: 322–9.
- Murrell, B, Moola, S, Mabona, A, Weighill, T, Sheward, D, Kosakovsky Pond, SL, Scheffler, K. 2013. FUBAR: A Fast, Unconstrained Bayesian AppRoximation for Inferring Selection. *Mol. Biol. Evol.* 30 : 1196–1205.
- Murrell, B, Wertheim, JO, Moola, S, Weighill, T, Scheffler, K, Kosakovsky Pond, SL. 2012. Detecting Individual Sites Subject to Episodic Diversifying Selection. *PLoS Genet* 8: e1002764.
- Nagyová, A, Kamencayová, M, Glasa, M, Šubr, Z. 2012. The 3'-proximal part of the Plum pox virus P1 gene determinates the symptom expression in two herbaceous host plants. *Virus Genes* 44: 505–512.
- Nakahara, KS, Shimada, R, Choi, S-H, Yamamoto, H, Shao, J, Uyeda, I. 2010. Involvement of the P1 cistron in overcoming eIF4E-mediated recessive resistance against Clover yellow vein virus in pea. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 23: 1460–9.
- Nicaise, V, Gallois, J-L, Chafiai, F, Allen, LM, Schurdi-Levraud, V, Browning, KS, Candresse, T, Caranta, C, Le Gall, O, German-Retana, S. 2007. Coordinated and selective recruitment of eIF4E and eIF4G factors for potyvirus infection in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 581: 1041–6.
- Nicaise, V, German-retana, S, Sanjua, R, Dubrana, M, Mazier, M, Maisonneuve, B, Candresse, T, Caranta, C, Legall, O. 2003. The Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Controls Lettuce Susceptibility to the Potyvirus Lettuce mosaic virus. *Plant Physiol.* 132: 1272–1282.
- Oh, C-S, Carrington, JC. 1989. Identification of essential residues in potyvirus proteinase HC-pro by site-directed mutagenesis. *Virology* 173: 692–699.
- Otulak, K, Garbaczewska, G. 2012. Cytopathological potato virus Y structures during Solanaceous plants infection. *Micron* 43: 839–50.
- Pallas, V, García, JA. 2011. How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *J. Gen. Virol.* 92: 2691–705.
- Palloix, A, Ayme, V, Moury, B. 2009. Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytol.* 183: 190–199.
- Palukaitis, P, Carr, JP. 2008. plant resistance responses to viruses. 153–171.
- Pierce, MM, Raman, CS, Nall, BT. 1999. Isothermal titration calorimetry of protein-protein interactions. *Methods* 19: 213–21.
- Pond, SLK, Frost, SDW. 2005a. Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinforma.* 21 : 2531–2533.
- Pond, SLK, Frost, SDW. 2005b. Not so different after all: a comparison of methods for detecting amino acid sites under selection. *Mol. Biol. Evol.* 22: 1208–22.
- Pond, SLK, Frost, SDW, Grossman, Z, Gravenor, MB, Richman, DD, Brown, AJL. 2006. Adaptation to Different Human Populations by HIV-1 Revealed by Codon-Based Analyses. *PLoS Comput Biol* 2: e62.
- Poon, AFY, Lewis, FI, Frost, SDW, Kosakovsky Pond, SL. 2008. Spidermonkey: rapid detection of co-evolving sites using Bayesian graphical models. *Bioinforma.* 24 : 1949–1950.
- Puig, O, Caspary, F, Rigaut, G, Rutz, B, Bouveret, E, Bragado-Nilsson, E, Wilm, M, Séraphin, B. 2001. The Tandem Affinity Purification (TAP) Method: A General Procedure of Protein Complex Purification. *Methods* 24: 218–229.
- Purcifull, DE, Hiebert, E, McDonald, JG. 1973. Immunochemical specificity of cytoplasmic inclusions induced by viruses in the potato Y group. *Virology* 55: 275–279.
- Puustinen, P, Mäkinen, K. 2004. Uridylation of the potyvirus VPg by viral replicase N1b correlates with the nucleotide binding capacity of VPg. *J. Biol. Chem.* 279: 38103–10.
- Quenouille, J, Montarry, J, Palloix, A, Moury, B. 2013. Farther, slower, stronger: how the plant genetic background protects a major resistance gene from breakdown. *Mol. Plant Pathol.* 14: 109–118.

- Rajamäki, M-L, Kelloniemi, J, Alminaitė, A, Kekarainen, T, Rabenstein, F, Valkonen, JPT. 2005. A novel insertion site inside the potyvirus P1 cistron allows expression of heterologous proteins and suggests some P1 functions. *Virology* 342: 88–101.
- Rajamäki, M-L, Valkonen, JPT. 2009. Control of nuclear and nucleolar localization of nuclear inclusion protein in a of picorna-like Potato virus A in *Nicotiana* species. *Plant Cell* 21: 2485–502.
- Rajamäki, M-L, Valkonen, JPT. 2002. Viral genome-linked protein (VPg) controls accumulation and phloem-loading of a potyvirus in inoculated potato leaves. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 15: 138–49.
- Redondo, E, Krause-Sakate, R, Yang, S-J, Lot, H, Le Gall, O, Candresse, T. 2001. Lettuce mosaic virus Pathogenicity Determinants in Susceptible and Tolerant Lettuce Cultivars Map to Different Regions of the Viral Genome. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14: 804–810.
- Revers, F, Lot, H, Souche, S, Le Gall, O, Candresse, T, Dunez, J. 1997a. Biological and molecular variability of lettuce mosaic virus isolates. *Phytopathology* 87: 397–403.
- Revers, F, Yang, SJ, Walter, J, Souche, S, Lot, H, Le Gall, O, Candresse, T, Dunez, J. 1997b. Comparison of the complete nucleotide sequences of two isolates of lettuce mosaic virus differing in their biological properties. *Virus Res.* 47: 167–177.
- Riechmann, JL, Laín, S, García, JA. 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J. Gen. Virol.* 73 : 1–16.
- Roberts, IM, Wang, D, Findlay, K, Maule, a J. 1998. Ultrastructural and temporal observations of the potyvirus cylindrical inclusions (CIs) show that the CI protein acts transiently in aiding virus movement. *Virology* 245: 173–81.
- Rodríguez-Cerezo, E, Ammar, ED, Pirone, TP, Shaw, JG. 1993. Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *J. Gen. Virol.* 74: 1945–1949.
- Rodríguez-Cerezo, E, Findlay, K, Shaw, JG, Lomonosoff, GP, Qiu, SG, Linstead, P, Shanks, M, Risco, C. 1997. The coat and cylindrical inclusion proteins of a potyvirus are associated with connections between plant cells. *Virology* 236: 296–306.
- 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.
- Roudet-Tavert, G, Michon, T, Walter, J, Delaunay, T, Redondo, E, Le Gall, O. 2007. Central domain of a potyvirus VPg is involved in the interaction with the host translation initiation factor eIF4E and the viral protein HcPro. *J. Gen. Virol.* 88 : 1029–1033.
- Ruffel, S, Dussault, M-H, Palloix, A, Moury, B, Bendahmane, A, Robaglia, C, Caranta, C. 2002. A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J.* 32: 1067–75.
- Sáenz, P, Cervera, MT, Dallot, S, Quiot, L, Quiot, J-B, Riechmann, JL, García, JA. 2000. Identification of a pathogenicity determinant of Plum pox virus in the sequence encoding the C-terminal region of protein P3+6K1. *J. Gen. Virol.* 81 : 557–566.
- Sambrook, J, Fritsch, EF, Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual - Volume 1.* NY: CSH Laboratory Press.
- Schaad, MC, Anderberg, RJ, Carrington, JC. 2000. Strain-specific interaction of the tobacco etch virus NIa protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system. *Virology* 273: 300–6.
- Schaad, MC, Jensen, PE, Carrington, JC. 1997a. Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *EMBO J.* 16: 4049–59.
- Schaad, MC, Lellis, AD, Carrington, JC. 1997b. VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *J. Virol.* 71 : 8624–8631.
- Scholthof, KG, Adkins, S, Czosnek, H, Palukaitis, P, Jacquot, E, Hohn, T, Hohn, B, Saunders, K, Candresse, T, Ahlquist, P, Hemenway, C, Foster, GD. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 12: 938–954.
- Schwer, B. 2001. A new twist on RNA helicases: DEXH/D box proteins as RNPs. *Nat. Struct. Biol.* 8: 113–6.

- Seo, J-K, Lee, S-H, Kim, K-H. 2009. Strain-specific cylindrical inclusion protein of soybean mosaic virus elicits extreme resistance and a lethal systemic hypersensitive response in two resistant soybean cultivars. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 22: 1151–9.
- Seo, J-K, Sohn, S-H, Kim, K-H. 2011. A single amino acid change in HC-Pro of soybean mosaic virus alters symptom expression in a soybean cultivar carrying Rsv1 and Rsv3. *Arch. Virol.* 156: 135–41.
- Shand, K, Theodoropoulos, C, Stenzel, D, Dale, JL, Harrison, MD. 2009. Expression of Potato virus Y cytoplasmic inclusion protein in tobacco results in disorganization of parenchyma cells, distortion of epidermal cells, and induces mitochondrial and chloroplast abnormalities, formation of membrane whorls and atypical lipid a. *Micron* 40: 730–736.
- Siemering, KR, Golbik, R, Sever, R, Haseloff, J. 1996. Mutations that suppress the thermosensitivity of green fluorescent protein. *Curr. Biol.* 6: 1653–1663.
- Sikorski, RS, Hieter, P. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122: 19–27.
- Spetz, C, Valkonen, JPT. 2004. Potyviral 6K2 protein long-distance movement and symptom-induction functions are independent and host-specific. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 17: 502–10.
- Suh, SJ, Bowman, BC, Jeong, N, Yang, K, Kastl, C, Tolin, S a., Maroof, M a. S, Jeong, S-C. 2011. The Rsv3 Locus Conferring Resistance to Soybean Mosaic Virus is Associated with a Cluster of Coiled-Coil Nucleotide-Binding Leucine-Rich Repeat Genes. *Plant Genome J.* 4: 55.
- Sun, L, Bian, J, Andika, IB, Hu, Y, Sun, B, Xiang, R, Kondo, H, Chen, J. 2013. Nucleo-cytoplasmic shuttling of VPg encoded by wheat yellow mosaic virus requires association with the coat protein. *J. Gen. Virol.* .
- Syller, J. 2005. The roles and mechanisms of helper component proteins encoded by potyviruses and caulimoviruses. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 67: 119–130.
- Tamura, K, Peterson, D, Peterson, N, Stecher, G, Nei, M, Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731–2739.
- Tavert-Roudet, G, Abdul-Razzak, a, Doublet, B, Walter, J, Delaunay, T, German-Retana, S, Michon, T, Le Gall, O, Candresse, T. 2012. The C terminus of lettuce mosaic potyvirus cylindrical inclusion helicase interacts with the viral VPg and with lettuce translation eukaryotic initiation factor 4E. *J. Gen. Virol.* 93: 184–93.
- Tena Fernández, F, González, I, Doblas, P, Rodríguez, C, Sahana, N, Kaur, H, Tenllado, F, Praveen, S, Canto, T. 2013. The influence of cis-acting P1 protein and translational elements on the expression of Potato virus Y helper-component proteinase (HCPro) in heterologous systems and its suppression of silencing activity. *Mol. Plant Pathol.* 14: 530–41.
- Thompson, JD, Gibson, TJ, Plewniak, F, Jeanmougin, F, Higgins, DG. 1997. The CLUSTAL_X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools. *Nucleic Acids Res.* 25 : 4876–4882.
- Tilsner, J, Oparka, KJ. 2012. Missing links? — The connection between replication and movement of plant RNA viruses. *Curr. Opin. Virol.* 2: 705–711.
- Tomlinson, JA. 1962. CONTROL OF LETTUCE MOSAIC BY THE USE OF HEALTHY SEED. *Plant Pathol.* 11: 61–64.
- Tribodet, M, Glais, L, Kerlan, C, Jacquot, E. 2005. Characterization of Potato virus Y (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVYN isolates in infected *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. *J. Gen. Virol.* 86 : 2101–2105.
- Truniger, V, Aranda, M a. 2009. Recessive resistance to plant viruses. Elsevier.
- Urcuqui-Inchima, S, Haenni, A-L, Bernardi, F. 2001. Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Res.* 74: 157–175.
- Valli, A, Martín-Hernández, AM, López-Moya, JJ, García, JA. 2006. RNA Silencing Suppression by a Second Copy of the P1 Serine Protease of Cucumber Vein Yellowing Ipomovirus, a Member of the Family Potyviridae That Lacks the Cysteine Protease HCPro. *J. Virol.* 80 : 10055–10063.

- Verchot, J, Carrington, JC. 1995. Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. *J. Virol.* 69: 3668–74.
- Verchot, J, Koonin, E V, Carrington, JC. 1991. The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology* 185: 527–535.
- 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.
- Voinnet, O, Rivas, S, Mestre, P, Baulcombe, D. 2003. An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant J.* 33: 949–56.
- Wang, A, Krishnaswamy, S. 2012. Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement. *Mol. Plant Pathol.*: 1–9.
- Wang, X, Kohalmi, SE, Svircev, A, Wang, A, Sanfaçon, H, Tian, L. 2013. Silencing of the Host Factor eIF(iso)4E Gene Confers Plum Pox Virus Resistance in Plum. *PLoS One* 8: e50627.
- Weber, G. 1953. Rotational Brownian Motion and Polarization of the Fluorescence of Solutions. In: *Advances in Protein Chemistry Volume 8 SE - Advances in Protein Chemistry.* Elsevier, p 415–459.
- Wei, T, Huang, T-S, McNeil, J, Laliberté, J-F, Hong, J, Nelson, RS, Wang, A. 2010a. Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant potyvirus replication. *J. Virol.* 84: 799–809.
- Wei, T, Wang, A. 2008. Biogenesis of Cytoplasmic Membranous Vesicles for Plant Potyvirus Replication Occurs at Endoplasmic Reticulum Exit Sites in a COPI- and COPII-Dependent Manner. *J. Virol.* 82: 12252–12264.
- Wei, T, Zhang, C, Hong, J, Xiong, R, Kasschau, KD, Zhou, X, Carrington, JC, Wang, A. 2010b. Formation of complexes at plasmodesmata for potyvirus intercellular movement is mediated by the viral protein P3N-PIPO. *PLoS Pathog.* 6: e1000962.
- Weinthal, D, Tzfira, T. 2009. Imaging protein-protein interactions in plant cells by bimolecular fluorescence complementation assay. *Trends Plant Sci.* 14: 59–63.
- Weintraub, M, Ragetli, HWJ. 1970. Distribution of viruslike particles in leaf cells of *Dianthus barbatus* infected with carnation vein mottle virus. *Virology* 40: 868–881.
- Wen, R-H, Hajimorad, MR. 2010. Mutational analysis of the putative pipo of soybean mosaic virus suggests disruption of PIPO protein impedes movement. *Virology* 400: 1–7.
- Wen, R-H, Khatabi, B, Ashfield, T, Saghai Maroof, M a, Hajimorad, MR. 2013. The HC-Pro and P3 cistrons of an avirulent Soybean mosaic virus are recognized by different resistance genes at the complex Rsv1 locus. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 26: 203–15.
- Wittmann, S, Chatel, H, Fortin, MG, Laliberté, JF. 1997. Interaction of the viral protein genome linked of turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system. *Virology* 234: 84–92.
- Wittner, A, Palkovics, L, Balázs, E. 1998. *Nicotiana benthamiana* plants transformed with the plum pox virus helicase gene are resistant to virus infection. *Virus Res.* 53: 97–103.
- Wroblewski, T, Tomczak, A, Michelmore, R. 2005. Optimization of *Agrobacterium*-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and *Arabidopsis*. *Plant Biotechnol. J.* 3: 259–73.
- YanHong, Q, DongMei, L, Tao, Z, ZaiFeng, F. 2009. Immuno-localization of the CI protein of Sugarcane mosaic virus in the phloem cells of maize. *Acta Phytophylacica Sin.* 36: 234–238.
- Yeam, I, Cavatorta, JR, Ripoll, DR, Kang, B-C, Jahn, MM. 2007. Functional dissection of naturally occurring amino acid substitutions in eIF4E that confers recessive potyvirus resistance in plants. *Plant Cell* 19: 2913–28.
- Yoshii, M, Nishikiori, M, Tomita, K, Yoshioka, N, Kozuka, R, Naito, S, Ishikawa, M. 2004. The *Arabidopsis Cucumovirus* Multiplication 1 and 2 Loci Encode Translation Initiation Factors 4E and 4G. *J. Virol.* 78 : 6102–6111.
- You, Y, Shirako, Y. 2012. Influence of amino acid at position 132 in VPg on replication and systemic infection of Barley yellow mosaic virus. *Virus Res.* 166: 121–124.

- Zechmann, B, Müller, M, Zellnig, G. 2003. Cytological modifications in zucchini yellow mosaic virus (ZYMV)-infected Styrian pumpkin plants. *Arch. Virol.* 148: 1119–1133.
- Zhang, C, Hajimorad, MR, Eggenberger, AL, Tsang, S, Whitham, S a, Hill, JH. 2009. Cytoplasmic inclusion cistron of Soybean mosaic virus serves as a virulence determinant on Rsv3-genotype soybean and a symptom determinant. *Virology* 391: 240–8.
- Zhang, Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9: 40.
- Zilian, E, Maiss, E. 2011. Detection of plum pox potyviral protein–protein interactions in planta using an optimized mRFP-based bimolecular fluorescence complementation system. *J. Gen. Virol.* 92: 2711–2723.

Annexes

Annexe 1 : Détection de potentiels sites de phosphorylation au sein de la séquence CI-Cter

Annexe 2 : Arbre phylogénétique de la diversité LMV

Annexe 3 : Stratégie de clonage de P3N-PIPO du LMV

Annexe 1 : Détection de probables sites de phosphorylation au sein de la CI-Cter

Prédiction à l'aide du programme NetPhos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) :

Séquence C-ter de la CI LMV-0 (à partir de l'aa 482) : en rouge les aa potentiellement phosphorylés

```

RTTIDDAAKIPFMIKDVPEHLQEKLWETIQQYKGDAGFGRCTSANACKIAYTLSVSPFMIPATINKIDALMAEERQK
  ↓                ↓                ↓
score : 0.98          score : 0.59          score : 0.76

MEYFQTVTANTCTISNFSSIGDMIRSRYSTNHSRENLQKLQAVRDTIINFECQAGTGDGGSFDMETAQKLAEEYG
  ↓ ↓ ↓                ↓                ↓                ↓                ↓
scores : 0.87 ; 0.58 ; 0.695  score : 0.993 ; 0.977          score : 0.56                score : 0.64

CIDVIYHQ
  
```

Séquences Cter de la CI avec les 4 mutations (à partir de l'aa 482) :

```

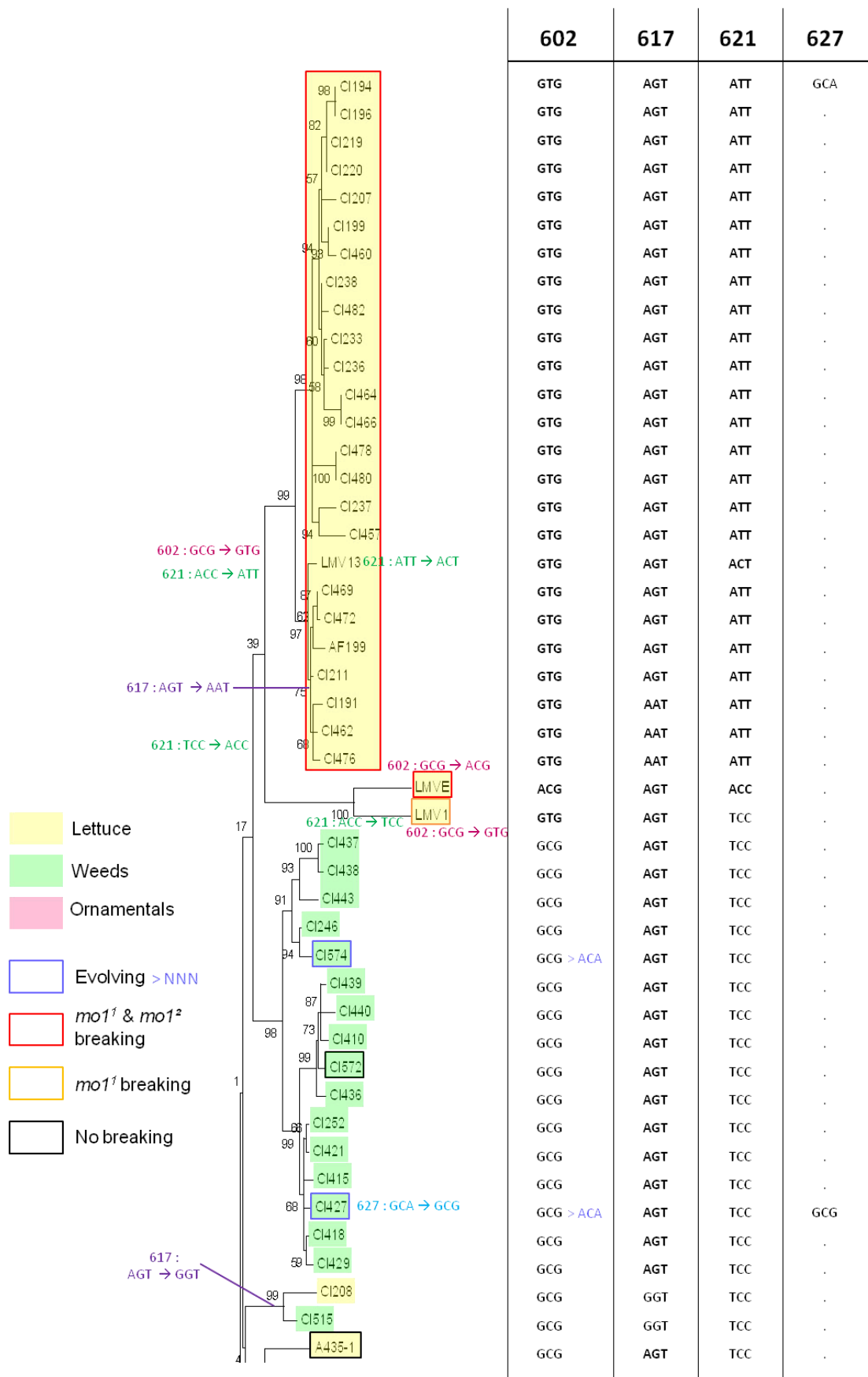
RTTIDDAAKIPFMIKDVPEHLQEKLWETIQQYKGDAGFGRCTSANACKIAYTLSVSPFMIPATINKIDALMAEERQK

MEYFQTVTANTCTISNFSSIGDMIRSRYSTNHSRENLQKLQVVRDTIINFECQAGTSDGGTFDMETTQKLAE
                                     ↙                ↘
EYGCIDVIYHQ                               617 : @ sur S           627 : @ sur T
                                             (score 0.758)         (score 0.988)
  
```

Prédiction à l'aide du programme Scansite (<http://scansite.mit.edu>) :

Phosphorylation de 621T (score 0,4798) et 627T (score 0,5684)

Annexe 2 : Arbre phylogénétique CI-VPg représentant la diversité naturelle du LMV (partie 1)



Annexe 3 : Stratégie de clonage de P3N-PIPO du LMV

Alignement nucléotidique

I- Placer la séquence PIPO au sein du génome LMV à partir des prédictions de Chung et al (2008)

TuMVV AUC UCC AUU UUG GAA AAA AGU UAU CUA CAA AUC UUG GAC GAA GCA UGG AAC GAG UUA AGU UGG UCG GAG CGC UGU
PIPO GGA AAA AAG UUA UCU ACA AAU CUU GGA CGA AGC AYG GAA CGA GUU AAG UUG GUC GGA GCG CUG UGC

LMV-E AAU GAA CUC AUA GAA AAA AGU UAU CUC AUG GAU UUG GAG GAC UCG UGG CGC GCA UUG CCA UUG UGU GGA AAA UUA
PIPO AGA AAA AAG UUA UCU CAU GGA UUU GGA GGA CUC GUG GCG CGC AUU GCC ATT GTG TGG AAA ATT ATC

LMV-0 AAU GAA CUC AUA GAA AAA AGU UAU CUC AUG GAU UUG GAG GAU UCG UGG CAC GCA CUA CCA UUG UGU GGA AAA UUA
PIPO AGA AAA AAG UUA UCU CAU GGA UUU GGA GGA UUC GUG GCA CGC ACU ACC AUU GUG UGG AAA AUU AUC

LMV-AF199 AAU GAA CUC AUA GAA AAA AGU UAU CUC AUG GAU UUG GAG GAC UCG UGG CAC GCA CUA CCA UUG UGU GGA AAA UUA
PIPO AGA AAA AAG TTA TCT CAT GGA TTT GGA GGA CTC GTG GCA CGC ACT ACC ATT GTG TGG AAA ATT ATC

Cet alignement nucléotidique est réalisé sur la portion nt 3320-3394 du génome viral, correspondant à la région comportant le décalage de lecture donnant lieu à la synthèse de PIPO sous forme de fusion avec P3-Nter. EN italique et en gras figure la séquence prédite de PIPO.

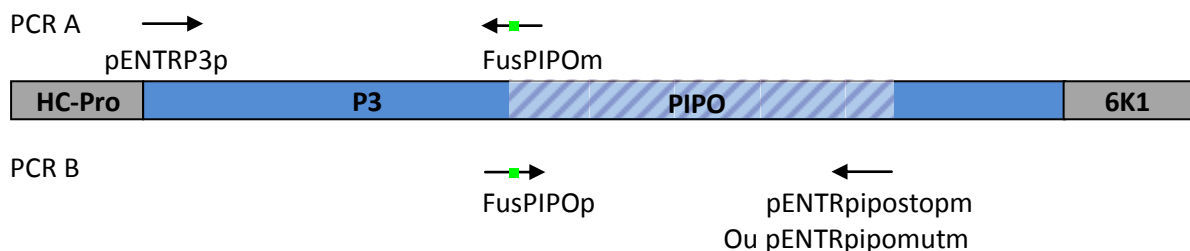
II- Recréer artificiellement le décalage de lecture par mutagenèse dirigée

La mutagenèse dirigée a été réalisée à partir d'une séquence de P3 du LMV-0, il s'agit d'insérer un A (surligné en vert) en position nt 3331 du génome, soit position nt 543 de la séquence P3.

LMV-0 AAU GAA CUC AUA GAA AAA AGU UAU CUC AUG GAU UUG GAG GAU UCG UGG CAC GCA CUA CCA UUG UGU GGA AAA UUA
PIPO AGA AAA AAG UUA UCU CAU GGA UUU GGA GGA UUC GUG GCA CGC ACU ACC AUU GUG UGG AAA AUU AUC

Clonage AAU GAA CUC AUA **A** AGA AAA AAG UUA UCU CAU GGA UUU GGA GGA UUC GUG GCA CGC ACU ACC AUU GUG UGG AAA AUU

III- Stratégie globale



Pour finir : fusion des PCR A et B en un fragment de 773pb qui sera cloné au sein d'un vecteur Gateway pENTR