

Stéphane Blanc Sujet de thèse 2017 ED GAIA

Ecole Doctorale

GAIA - Biodiversité, Agriculture, Alimentation, Environnement, Terre, Eau

Spécialité

BDI – Biologie Des Interactions

Unité de Recherche : BGPI – Biologie et Génétique des Interactions Plante Parasite

Directeur de thèse :

BLANC Stéphane

stephane.blanc@inra.fr

HDR

Co-encadrement : Zeddam Jean-Louis

IRD (UMR IPME)

Jean-Louis.Zeddam@ird.fr

Descriptif de l'encadrement de thèse : La thèse sera co-encadrée par Jean-Louis Zeddam (CR1-IRD, UMR IPME) et Stéphane Blanc (DR1 INRA, UMR BGPI).

Notre proposition s'insère dans le cadre d'un projet ANR-Nano (2015-2019) qui s'intéresse à tous les aspects du cycle de vie des virus multipartites ¹, sur le modèle d'une espèce du genre *Nanovirus* : le *Faba bean necrotic stunt virus* (FBNSV). Actuellement, 2 chercheurs, 1 Post-doc, 2 AI et 1 TR travaillent sur ce programme. Le fonctionnement du génome viral multipartite est étudié, et notamment l'impact des variations du nombre de copies des différents segments génomiques sur l'expression des gènes et des phénotypes viraux. En parallèle, nous tentons de comprendre comment un tel virus assure la transmission d'au moins une copie de chaque segment génomique durant l'invasion de la plante hôte et la transmission par insecte vecteur, en mesurant la « taille efficace » des populations et la MOI (multiplicité d'infection cellulaire) pour chacun des segments. Un aspect du cycle de vie qui n'est que très peu abordé pour l'instant et pour lequel nous proposons ce projet de thèse concerne les mécanismes moléculaires et cellulaires de l'interaction entre le virus et son puceron vecteur. Le thésard sera donc entouré non seulement par les deux chercheurs encadrants, mais aussi par des post-docs et personnels techniques qui abordent des questions complémentaires et maîtrisent ou développent les technologies nécessaires au bon déroulement et à la faisabilité de la thèse.

Collaboration :

L'équipe collabore avec plusieurs autres laboratoires sur le programme :

- Y. Michalakis, CNRS, UMR MIVEGEC Montpellier : biologie évolutive
- B. Gronenborn & T. Timchenko, CNRS, Gif/yonette, Clones infectieux nanovirus et anticorps
- B Krenz, Erlagen, Germany, propriété biochimique & localisation cellulaire protéine NSP
- H. Ziebell & J Vetten, Brunschweig, Germany, anticorps nanovirus

Titre en français :

Mécanismes cellulaires/moléculaires de l'interaction nanovirus-insecte vecteur

Titre en anglais :

Molecular/cellular interactions between a nanovirus and its insect vector

Mots clés en français :

Virus multipartite, nanovirus, transmission par vecteur, puceron, plante, interaction, transmission circulante

Mots clés en anglais :

Multipartite virus, nanovirus, vector transmission, aphid, plant, interaction, circulative transmission

Lien http de l'offre :

-Lien ADUM à préciser ultérieurement

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

Profil candidat

Des connaissances et un intérêt en virologie végétale et sur les interactions plante-virus, virus-vecteur et vecteur-plante seront appréciés. Le (la) candidat(e) devra être familiarisé avec les techniques de base de biologie moléculaire (extraction ADN/ARN, PCR, qPCR, RT-qPCR, clonage...) et la biochimie des protéines (expression de protéine en système hétérologue, purification, gel d'électrophorèse, western-blot).

Une approche multidisciplinaire sera nécessaire pour mener à bien ce projet ; elle inclura : virologie et biologie végétale, entomologie/biologie des insectes, biochimie des interactions, imagerie, biologie moléculaire.

Profil candidat en anglais

The candidate should have particular interest in plant virology and plant-virus, virus-insect vector, and insect vector-plant interactions. The candidate will be well acquainted with basic molecular biology (DNA/RNA extraction, PCR, qPCR, RT-qPCR, cloning, mutagenesis...) and protein biochemistry (heterologous expression, purification, electrophoresis, western-blot).

A multi-disciplinary approach will be necessary to implement the project: this approach will involve virology and plant biology, entomology (biology, anatomy, physiology of aphids), protein biochemistry (protein-protein interaction assays), cell imaging (confocal microscopy) and molecular biology.

Résumé en français

Les nanovirus sont des virus importants sur un plan fondamental et sur un plan plus finalisé. En effet, il s'agit du groupe de virus dont le génome est constitué du nombre de segments le

plus élevé parmi les virus multipartites décrits à ce jour, et la manière dont ces génomes fonctionnent est un mystère. Il s'agit aussi de virus émergents qui affectent les cultures de légumineuses, en particulier en Afrique, et causent des pertes économiques considérables aux cultures de bananes partout dans le monde (à l'exception du Nouveau Monde).

L'équipe d'accueil cherche à décrire et comprendre l'ensemble du cycle de vie de ces virus sur le modèle du *Faba bean necrotic stunt virus* (FBNSV, Famille *Nanoviridae*, Genre *Nanovirus*), et ce projet de thèse est focalisé sur l'étape de la transmission de plante à plante par des pucerons vecteurs. Nous chercherons à comprendre les interactions moléculaires et cellulaires qui régissent le cycle du virus à l'intérieur du vecteur. En particulier, nous souhaitons vérifier si le virus se réplique ou non dans le vecteur, à rechercher le(s) récepteur(s) de ce virus au niveau de l'intestin et/ou des glandes salivaires du puceron, et à déterminer le mode d'action de la protéine virale NSP qui est indispensable au succès de la transmission.

Résumé en Anglais

Nanoviruses are important pathogens both on a fundamental ground and for more practical concerns. Indeed, they represent the group of multipartite viruses with the highest number of genome segments described so far, and the way these genomes are actually functioning remains a mystery. Nanoviruses are also emerging viruses with a dramatic impact on legume crops in Africa and of banana worldwide (with the noticeable exception of New World).

The hosting group investigates the way of life of multipartite viruses, meaning all steps of their life cycle, through the study of the *Faba bean necrotic stunt virus* (FBNSV, family *Nanoviridae*, genus *Nanovirus*), and this PhD project focuses on the step of plant to plant transmission by aphid vectors. We will decipher the molecular and cellular interactions regulating the FBNSV cycle within its aphid vector. In particular, we will confirm or refute the replication of the virus within the aphid body, search for a specific receptor of this virus at the surface of gut and/or salivary gland cells, and determine the mode of action of the viral protein NSP that has been shown to be mandatory for the success of aphid transmission.

Description détaillée en français

Thématique

Transmission des nanovirus par pucerons vecteur

Domaine

Virologie, Pathologie végétale, Interaction virus/insecte vecteur

Contexte

Les virus de la famille *Nanoviridae* sont des virus émergents qui infectent les légumineuses (genre *Nanovirus*) et les *Musaceae* (genre *Babuvirus*). Le genre *Nanovirus*, et en particulier l'espèce *Faba bean necrotic stunt virus* (FBNSV), sont des virus multipartites dont le génome est constitué de huit segments d'ADN circulaire simple brin de taille quasi identique: ≈ 1000 bases. Chaque segment code pour un seul gène et est encapsidé individuellement dans une particule virale indépendante. L'équipe d'accueil a démontré que chacun des huit segments, respectivement dénommés C, M, N, R, S, U1, U2 et U4, s'accumule dans les plantes hôtes avec une fréquence relative très spécifique et reproductible. Ainsi, le nombre de copies relatif des gènes viraux semble précisément contrôlé et se stabilise dans la fève avec les valeurs relatives suivantes pour chaque segment : $3^C 3^M 13^N 2^R 1^S 7^{U1} 10^{U2} 16^{U4}$, définissant la « formule génomique »². Il a été démontré que cette formule génomique dépend de l'espèce

végétale hôte, et qu'elle est significativement différente par exemple dans la fève (*Vicia faba*) et dans la luzerne (*Medicago truncatula*)².

Les informations disponibles concernant la transmission des nanovirus indiquent que les espèces de cette famille virale sont transmises par des pucerons sur le mode circulant non-multipliant³. Ceci signifie que le virus est ingéré par le puceron vecteur, traverse la barrière intestinale, diffuse dans l'hémolymphe jusqu'aux glandes salivaires, puis est enfin relargué avec la salive dans une nouvelle plante hôte. Le terme non-multipliant insiste sur le fait que le virus ne se multiplie pas dans le puceron durant ce cycle. Dès 1999, l'existence d'un facteur d'origine virale contrôlant la transmission par puceron a été suspectée⁴, bien que non-identifié. Des travaux en cours dans le groupe de Bruno Gronenborn (communication personnelle) précise que ce facteur est en fait issu du segment génomique N, en l'absence duquel le virus peut parfaitement infecter la plante mais n'est jamais transmis par le puceron. L'équipe d'accueil a récemment observé que la formule génomique du FBNSV change systématiquement durant le cycle dans le puceron vecteur, avec une diminution drastique de la fréquence relative du segment N et une forte augmentation de celle du segment U2⁵. Il est difficile de concilier cette dernière observation avec une absence de réplication du virus à l'intérieur du puceron et l'équipe propose de revisiter plus généralement les mécanismes qui régissent l'interaction entre les nanovirus et leur insecte vecteur.

Objectif

L'objectif principal de la thèse sera de décortiquer les interactions entre un nanovirus, le FBNSV, et son puceron vecteur (*Acyrtosiphon pisum* et/ou *Aphis craccivora*).

Plus spécifiquement, l'ensemble des travaux proposés vise à répondre à deux questions prioritaires : i) quel mécanisme peut expliquer la variation de la formule génomique du FBNSV durant son passage à l'intérieur du corps de l'insecte vecteur, et ii) quel est le mode d'action du « facteur assistant de la transmission » produit par le segment génomique N.

Méthode

-Principalement pour des raisons pratiques, pour mieux définir les conditions expérimentales de nos tests de transmission, nous mesurerons les temps optimaux d'acquisition et d'inoculation du FBNSV par le puceron vecteur, ainsi que le temps de latence nécessaire entre l'acquisition et l'inoculation. Ces expériences se feront par simple test de transmission avec acquisition du virus par les pucerons sur plantes infectées et transfert de ces pucerons sur plantes saines en faisant varier les durées d'acquisition et d'inoculation ainsi que le laps de temps séparant ces deux phases.

-Nous suivrons/déterminerons le trajet ou le cycle précis du FBNSV dans le corps du puceron vecteur par deux techniques complémentaires, l'hybridation in situ sur segment d'ADN (FISH) et l'immunofluorescence. Ceci nous permettra de suivre chacun des 8 segments indépendamment afin de voir s'ils circulent ensemble au sein du vecteur, et de localiser en parallèle la protéine de capsid (qui protège ces segments dans le vecteur) et la protéine NSP (produit du gène N) qui est indispensable à la transmission mais dont le mode d'action reste totalement inconnu.

-Nous confirmerons ou infirmerons l'absence de réplication du FBNSV dans le puceron en incorporant des déoxyribonucléotides marqués puis en analysant l'ADN viral détecté dans le puceron (présence de marquage ou pas). De même, nous incorporerons des ribonucléotides marqués afin de tester une transcription potentielle des gènes viraux au sein du puceron.

-Si aucune réplication ne peut être détectée, une explication alternative pour le changement de formule génomique pourrait être une dégradation différentielle des différents segments au sein du puceron. Pour valider cette possibilité, nous analyserons la stabilité et plus

généralement les propriétés physico-chimiques des différentes particules virales en fonction de la nature du segment qu'elles contiennent.

-Nous analyserons en détail les propriétés biochimiques de la protéine NSP, codée par le segment N. Cette partie fera appel à la purification de la protéine NSP à partir de plante et à partir de système hétérologues d'expression de protéines (bactéries et système baculovirus cellules d'insecte).

-Enfin, l'équipe d'accueil (Jean-Louis Zeddam) a produit une banque d'ADNc issue d'intestin du puceron vecteur (*Aphis craccivora*), dans le système double hybride (Y2H) compatible avec la détection d'interactions avec des protéines membranaires. Ce système sera utilisé pour rechercher des partenaires des protéines NSP et protéines de capsid du FBNSV ; l'identité de ces partenaires et l'analyse de l'interaction nous aideront à comprendre le mode d'action de la protéine NSP et, peut-être, à identifier un récepteur du FBNSV (soit de NSP soit de CP) chez son insecte vecteur.

Résultats attendus

De manière générale : caractériser l'interaction nanovirus-vecteur dont les mécanismes réels restent quasiment inconnus à l'heure actuelle.

1-Déterminer si les segments génomiques de ce virus multipartite circulent ensemble au sein du puceron vecteur

2-Trancher la question de la réplication ou de l'absence de réplication de ce type de virus chez le vecteur

3-Tester la présence de transcription des gènes viraux dans le puceron, ce qui ouvrirait la porte à un rôle possible des protéines virales ou des siRNA viraux au sein du puceron vecteur

4-Tester un dégradation/décapsidation différentielle des particules virales en fonction du segment génomique qu'elle contiennent qui, avec le résultat « 2 » nous permettra d'apporter une explication à la variation de la formule génomique dans le puceron.

5-Comprendre le mode d'action de la protéine NSP indispensable à la transmission par le vecteur

6-Identifier et caractériser le(s) récepteur(s) de ce virus chez son insecte vecteur

Ref Biblio

- 1 Sicard, A., Michalakis, Y., Gutierrez, S. & Blanc, S. The Strange Lifestyle of Multipartite Viruses. *PLoS pathogens* **12**, e1005819, doi:10.1371/journal.ppat.1005819 (2016).
- 2 Sicard, A. *et al.* Gene copy number is differentially regulated in a multipartite virus. *Nat Commun* **4**, 2248 (2013).
- 3 Blanc, S., Drucker, M. & Uzest, M. Localizing viruses in their insect vectors. *Annual review of phytopathology* **52**, 403-425, doi:10.1146/annurev-phyto-102313-045920 (2014).
- 4 Franz, A. W., van der Wilk, F., Verbeek, M., Dullemans, A. M. & van den Heuvel, J. F. Faba bean necrotic yellows virus (genus Nanovirus) requires a helper factor for its aphid transmission. *Virology* **262**, 210-219 (1999).
- 5 Sicard, A. *et al.* Circulative Nonpropagative Aphid Transmission of Nanoviruses: an Oversimplified View. *J Virol* **89**, 9719-9726, doi:10.1128/JVI.00780-15 (2015).