

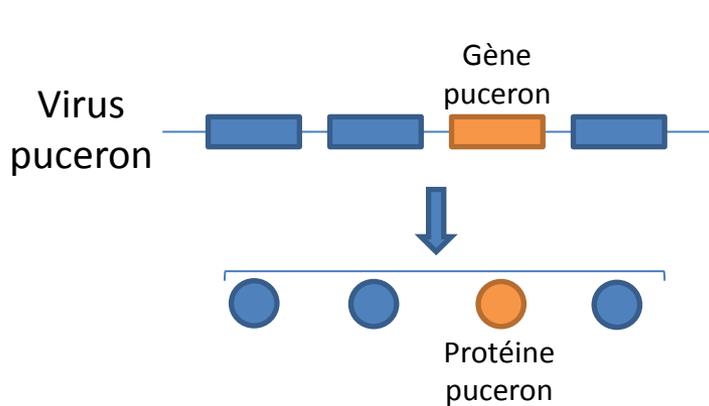
Validation fonctionnelle chez les pucerons par l'utilisation de vecteurs viraux

Véronique Brault

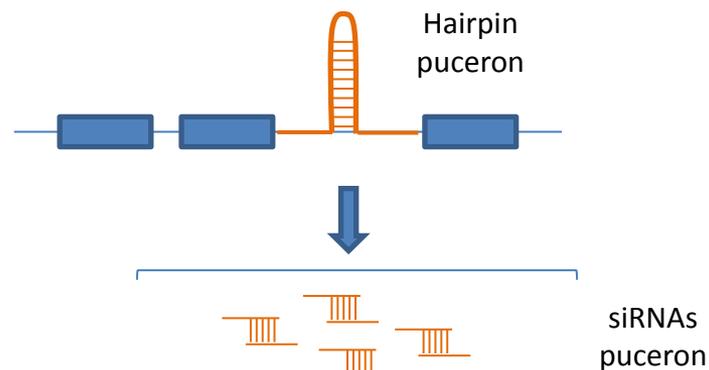


Objectif

Utiliser un virus pour **sur-exprimer** un gène de puceron ou **inhiber** son expression



Sur-expression



Inhibition

Caractéristiques d'un vecteur viral « idéal »:

- pas d'effet ou un faible effet sur son hôte
- un tropisme cellulaire étendu de façon à cibler plusieurs tissus dans l'insecte
- Possibilité d'introduire des séquences extravirales dans le génome
- méthode d'acquisition facile par le vecteur
- large spécificité d'hôtes pour l'utiliser chez plusieurs espèces de pucerons

Les virus de pucerons

Virus à ARN:

ALPV Aphid lethal paralysis virus (van Munster et al., 2002)

RhPV Rhopalosiphum padi virus (Moon et al., 1998)

APV Acyrthosiphon pisum virus (van der Wilk et al., 1997)

RAAV Rosy apple aphid virus

BrBV Brevicorynae brassicae virus (Ryabov, 2007)

SAV Sitobion avenae virus (Allen and Ball, 1990)

Rhabdovirus (ARN-) virus de plante et d'insecte

RAAV Rosy apple aphid virus (Ryabov et al., 2009)

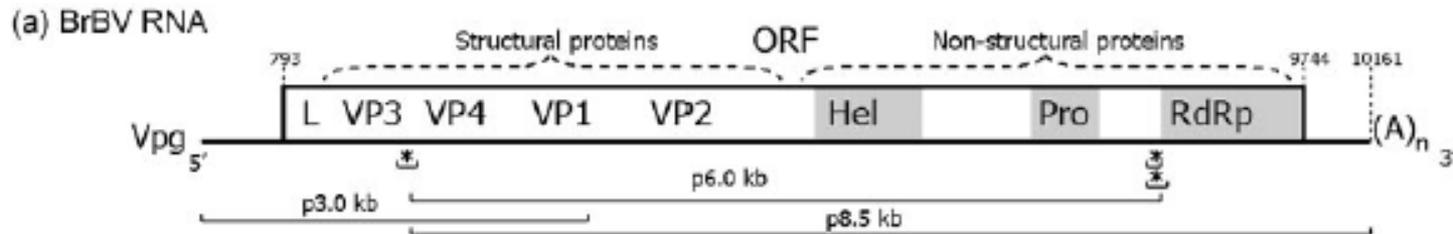
Virus à ADN:

MpDENV Myzus persicae densovirus (van Munster et al., 2003)

DpDENV Dysaphis plantaginea densovirus (Ryabov et al., 2009)

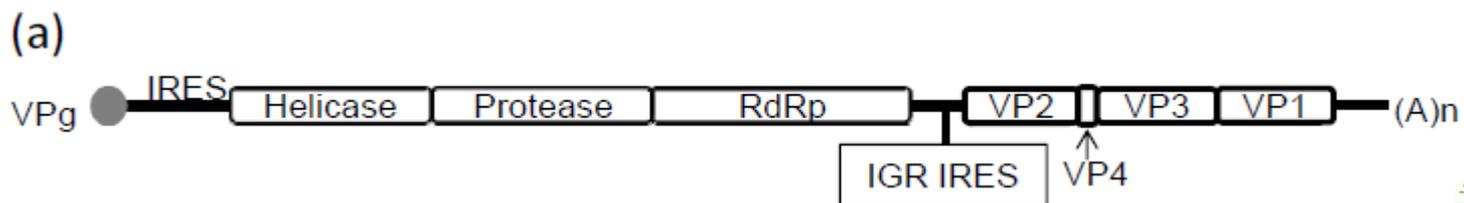
BrBV Brevicorynae brassicae virus (Ryabov, 2007)

RNA+
pas d'effet visible sur les pucerons



ALPV Aphid lethal paralysis virus (van Munster et al., 2002)

RNA+
Peut infecter différentes espèces de pucerons (découvert chez *R. padi* puis chez *A. pisum*)
Chez *R. padi*, provoque une paralysie puis la mort mais pas d'effet apparent chez *A. pisum*
Un isolat APLV découvert chez *Aphis nerii* n'a pas d'effet pathogène chez cette espèce mais est très pathogène pour *M. persicae*
Identifié aussi chez l'abeille, pas d'effet apparent

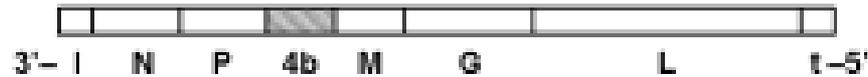


Rhabdovirus virus de plante et d'insecte

ARN-

Identifiés chez *Brevicorynae brassicae*, *Myzus persicae*, + autres

Lettuce necrotic yellows virus



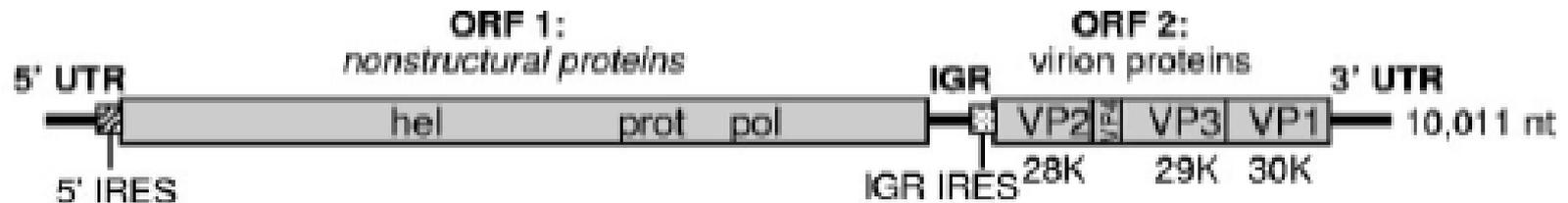
RhPV *Rhopalosiphum padi* virus (Moon et al., 1998)

RNA+ dicistronique

Réduit la longévité du puceron

Réduit la population de la colonie

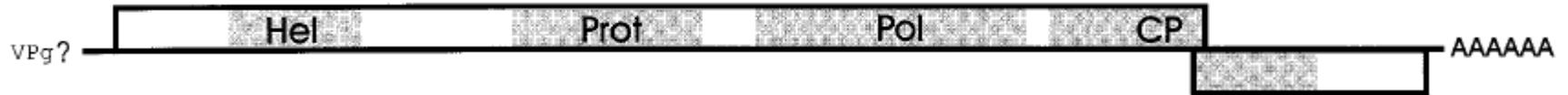
Peut infecter un grand nombre d'espèces de pucerons



APV *Acyrtosiphon pisum* virus (van der Wilk et al., 1997)

ARN+

Réduction de croissance du puceron



SAV *Sitobion avenae* virus (Allen and Ball, 1990)

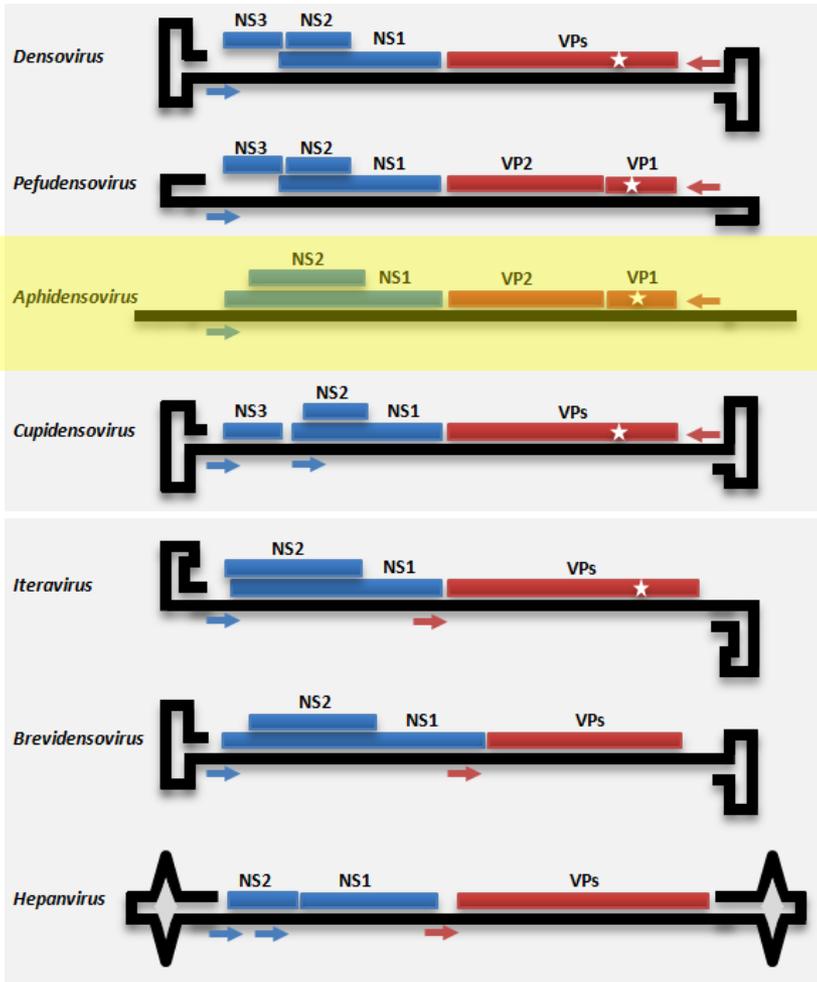
Identifié dans un élevage de laboratoire

Réduction population de pucerons

Virus peu caractérisé

MpDENV Myzus persicae densovirus (van Munster et al., 2003)

ADN simple brin,
ambisens

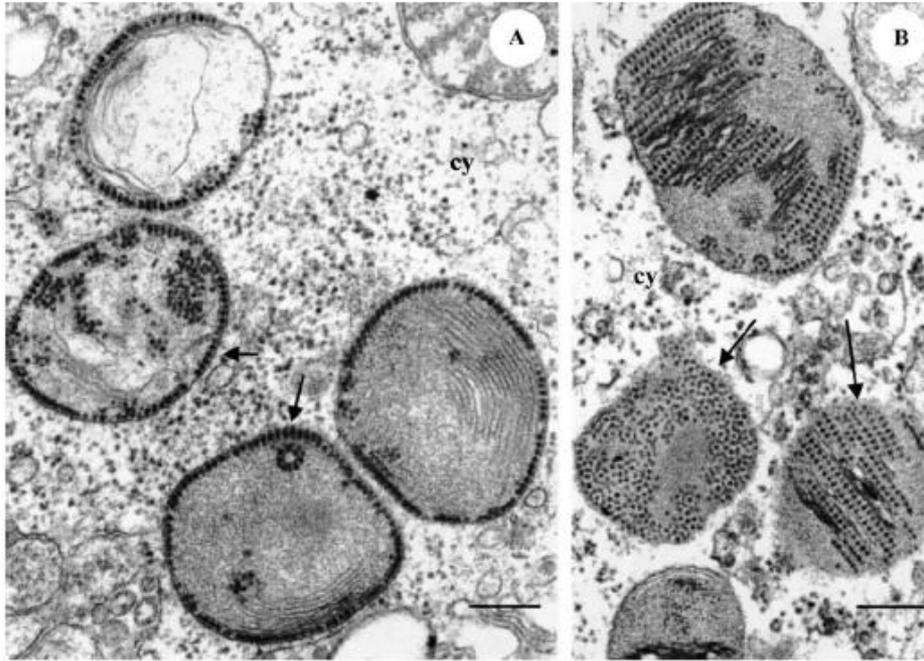


Espèces virales de la famille des *Densovirinae*
Thèse Cécilia Multeau, 2012

- faible effet sur son hôte
- un tropisme cellulaire restreint aux cellules de l'intestin moyen antérieur (estomac), glandes salivaires (principales plutôt qu'accessoire?)
- petit génome 5,7 kb qui peut être modifié (cas de densovirus de lépidoptère et de moustique)
- gènes non essentiels à la réplication virale qui peuvent être remplacés par séquences exogènes
- spécificité d'hôtes restreinte: n'infecte pas *A. pisum*
- Génome de densovirus cloné dans un plasmide peut être infectieux

NS: protéines non structurales
VP: protéines de capsid

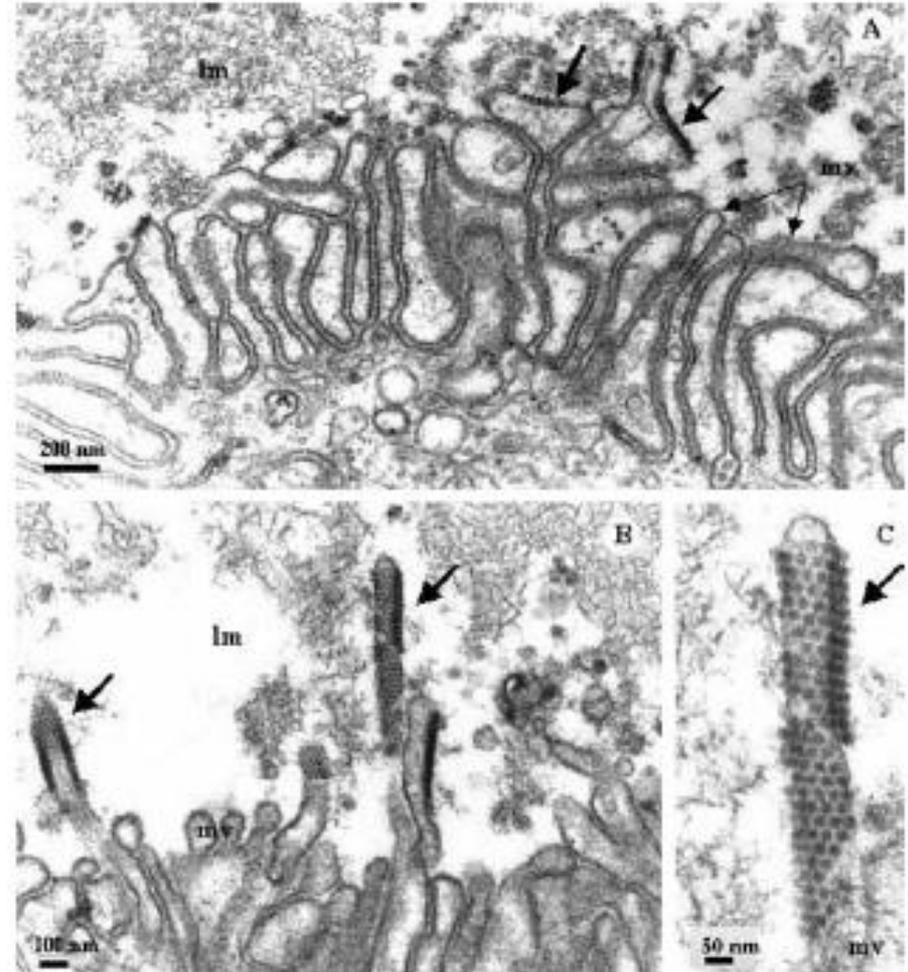
Le MpDNV en microscopie électronique



Particules de MpDNV au niveau de l'intestin moyen antérieur (estomac) de *Myzus persicae*



Particules MpDNV
Diamètre 20 nm



@Catherine Reinbold, INRA Colmar

Exemples d'utilisation de densovirus comme vecteur de gènes chez les insectes

Junonia coenia densovirus – JcDENV – Lépidoptères

Aedes aegypti densovirus – AeDENV – Moustiques

Anopheles gambiae densovirus – AgDENV - Moustiques

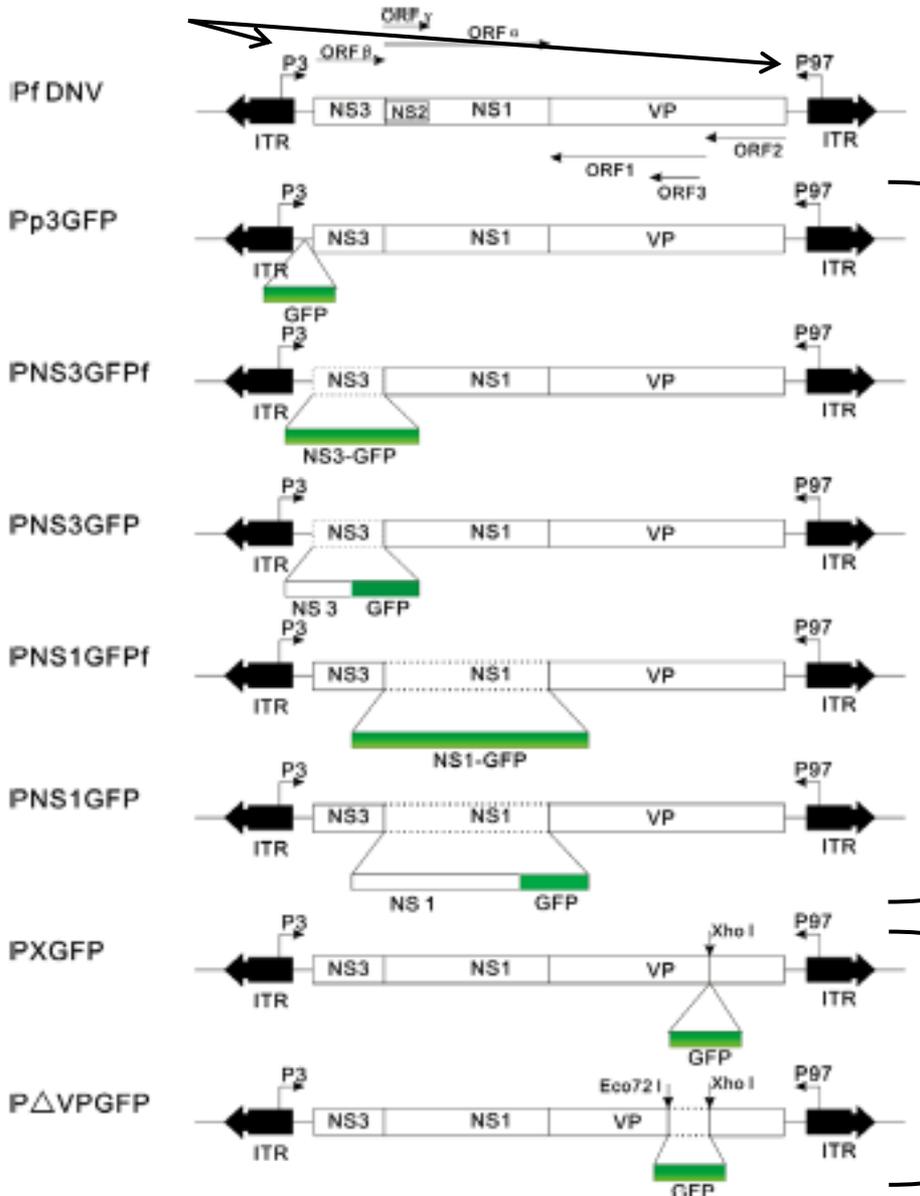
Periplaneta fuliginosa densovirus – PfDENV - Cafards

Promoteurs
viraux

Vecteur de gènes dérivé du PfDENV



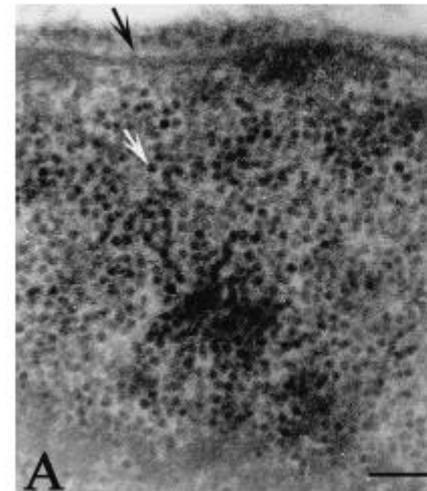
Injection dans corps de l'insecte



Remplacement ou fusion NS

Fusion VP

- GFP sous contrôle promoteur viral, en fusion ou avec son propre codon d'initiation
- Tous les plasmides produisent la fluorescence dans le corps de l'insecte
- Intégration des séquences du PfDENV dans le génome de l'insecte
- La plupart des constructions conduisent à la formation de virions

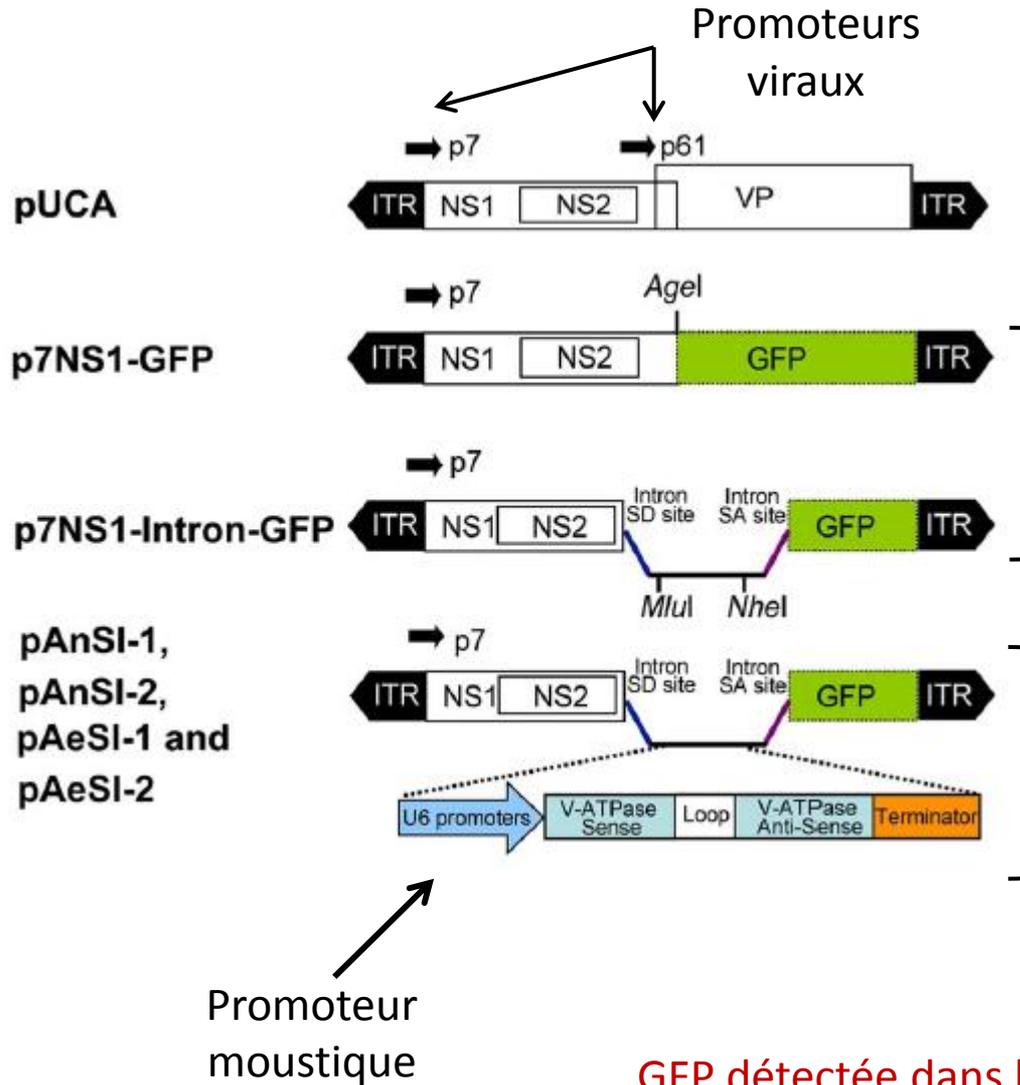


Vecteur de gènes dérivé du AeDNV



Vecteur de la Dengue et fièvre jaune

Transfection de cellules de moustique pour obtention du stock de virus puis acquisition orale par les moustiques



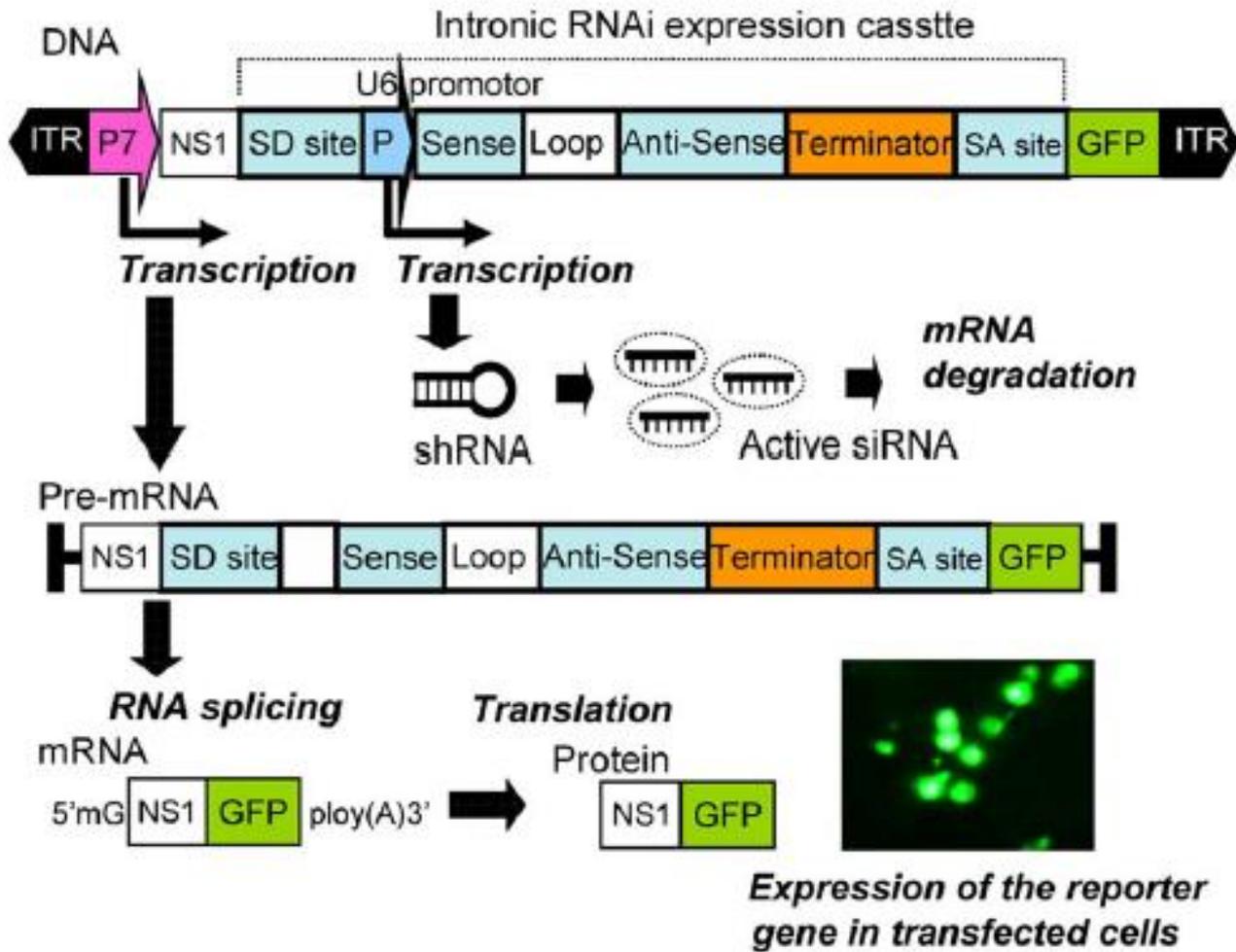
Cassettes d'expression de la GFP (protéine de fusion)

- Casette d'expression des siRNA ciblant la V-ATPase
- Intron artificiel permet de contrôler la synthèse des siRNA

Gu et al., 2011

GFP détectée dans les cellules avec toutes les constructions

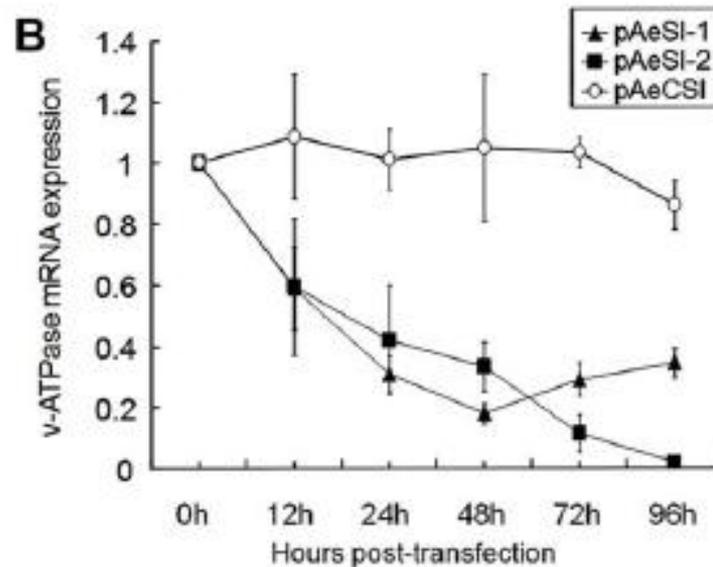
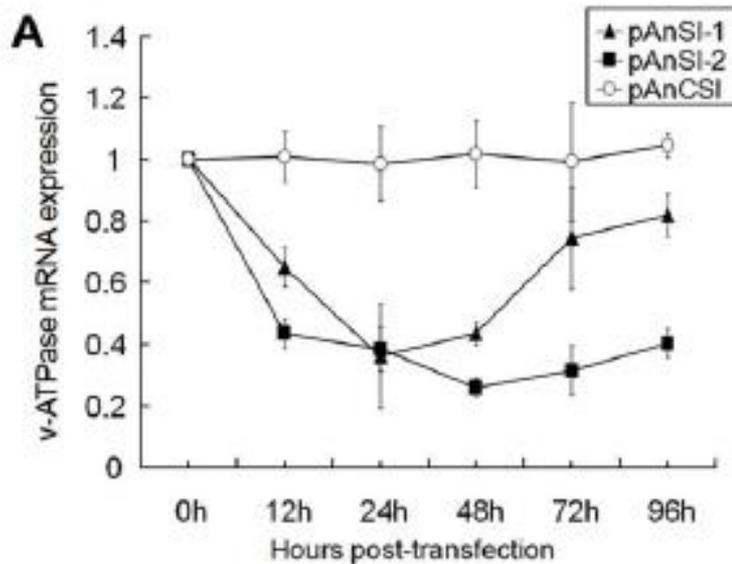
Vecteur de gènes dérivé du AeDNV



Vecteur de gènes dérivé du AeDNV

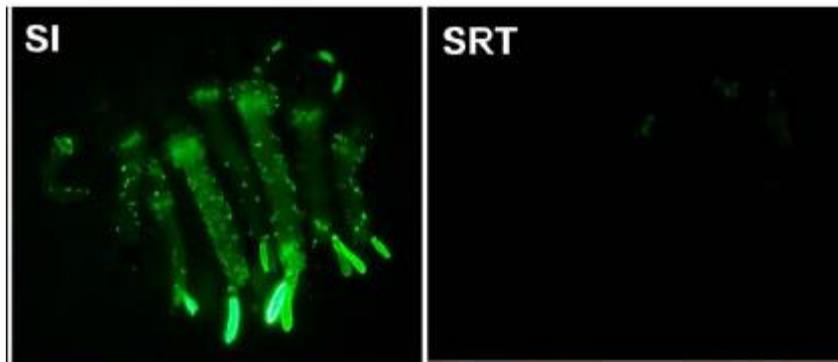


Diminution de l'accumulation de l'ARNm V-ATPase dans cellules d'insecte



Efficacité dépend de l'origine du promoteur utilisé (*A. aegypti* ou *gambiae*)

Dans les larves de moustique, GFP exprimée dans les muscles, l'intestin antérieur, moyen, postérieur. les glandes salivaires. les nerfs. les tubes de Malpighi et papilles annales...



A. Albopictus
vecteur chikungunya
Mortalité augmentée

Vecteur de gènes dérivé du AgDNV

Vecteur malaria

Injection intrathoraxique

- Constructions minimalistes
- Nécessite un virus « helper »
- Expression eGFP avec différents promoteurs et terminateurs

vUTRp7GFP
(1794 bp, 43.3%)



vUTRCopiaGFP
(1941 bp, 46.8%)



vUTRAc2GFP
(2029 bp, 49.0%)



vUTRIExGFP
(3130 bp, 75.6%)



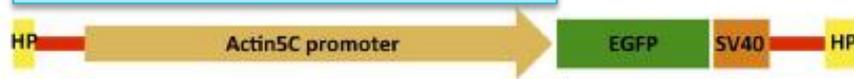
Enhanceur et promoteur baculovirus

vUTRAcShGFP
(2001 bp, 48.3%)



Version tronquée promoteur actine 5c

vUTRAcGFP
(3994 bp, 96.5%)

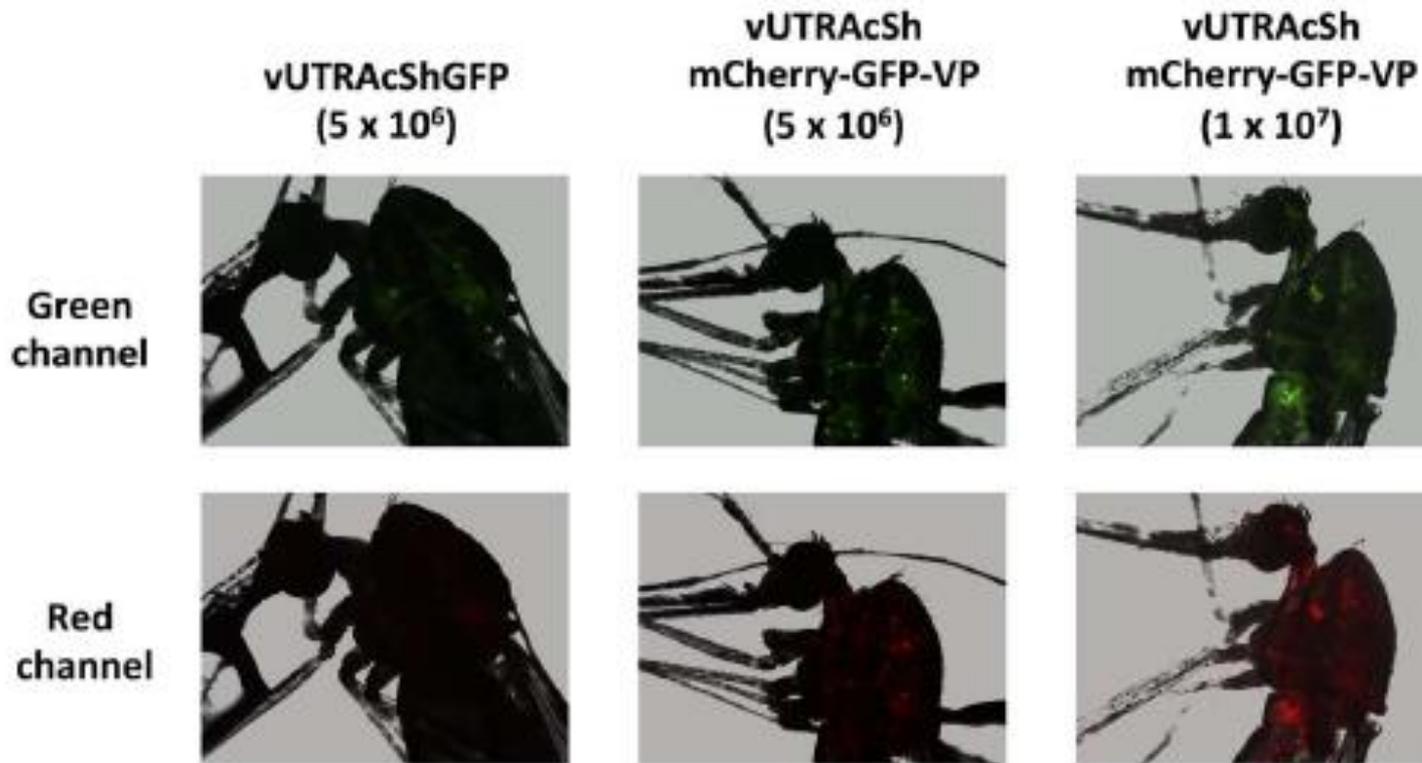
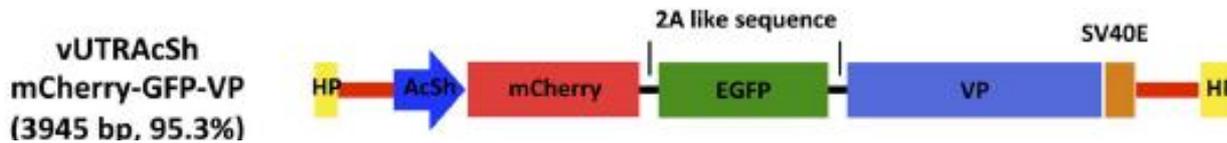


La meilleure efficacité d'expression quand injection plasmides

La meilleure efficacité d'expression quand injection virus

Suzuki et al., 2014

Vecteur de gènes dérivé du AgDNV



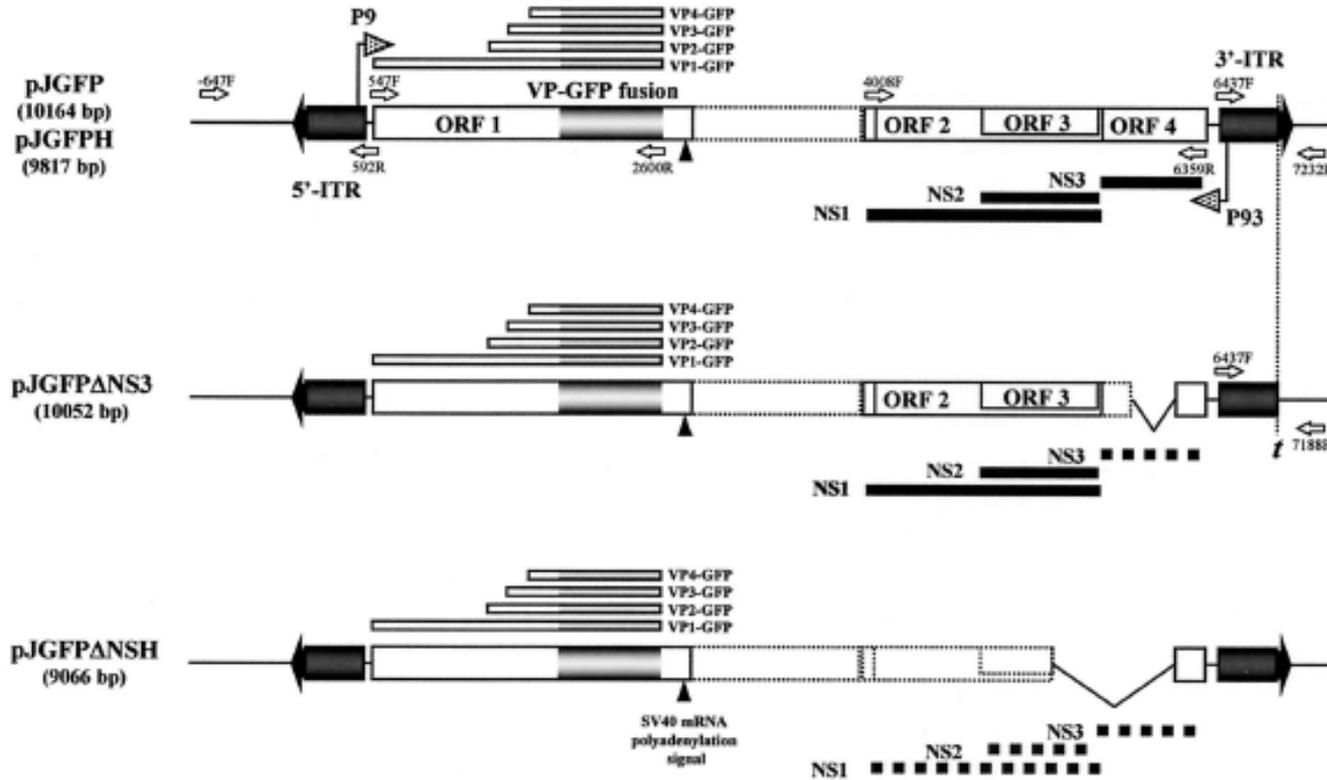
Expression dans les corps gras, les ovaires mais pas dans tubes digestifs et glandes salivaires

Suzuki et al., 2014

Vecteur de gènes dérive du JcDENV



JcDENV inséré dans plasmide: infectieux après injection dans les larves ou cellules



- GFP exprimée en fusion avec les VP et avec les protéines NS fonctionnelles ou pas
- Après transfection, intégration des séquences dans le génome des cellules donc persistance du signal

Bossin et al., 2003