



HAL
open science

La Flavescence Dorée de la vigne: Identification et caractérisation des protéases de surface FtsH du phytoplasme de la FD et Caractérisation de la sensibilité variétale par comparaison de cépages très sensibles et peu sensibles.

Camille Jollard

► **To cite this version:**

Camille Jollard. La Flavescence Dorée de la vigne: Identification et caractérisation des protéases de surface FtsH du phytoplasme de la FD et Caractérisation de la sensibilité variétale par comparaison de cépages très sensibles et peu sensibles.. Sciences agricoles. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT: 2017BORD0899 . tel-01718515

HAL Id: tel-01718515

<https://theses.hal.science/tel-01718515>

Submitted on 27 Feb 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse présentée
pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

Ecole doctorale des Sciences de la Vie
Spécialité Biologie-Santé

Par Camille JOLLARD

LA FLAVESCENCE DORÉE DE LA VIGNE :

**IDENTIFICATION ET CARACTÉRISATION DES PROTÉASES DE SURFACE FTSH DU
PHYTOPLASME DE LA FD**

ET

**CARACTÉRISATION DE LA SENSIBILITÉ VARIÉTALE PAR COMPARAISON DE CÉPAGES
TRÈS SENSIBLES ET PEU SENSIBLES**

Sous la direction de Sandrine EVEILLARD
Chargée de Recherche à l'INRA de Bordeaux

Soutenue le 11 décembre 2017

Membres du Jury

M. HERNOULD. M., Professeur à l'Université de Bordeaux.....	Président
M. BOSCO D., Professeur à l'Université de Turin.....	Rapporteur
M. MANCEAU C., Directeur scientifique à l'ANSES.....	Rapporteur
Mme MARZACHI C., Chercheur à l'Institut de Virologie Végétale de Turin	Examineur
Mme CORIO-COSTET MF., Directeur de Recherche à l'INRA de Bordeaux.	Examineur
Mme EVEILLARD S., Chargée de Recherche à l'INRA.....	Directrice de thèse

Invités

Mme BEVEN Laure, Maître de Conférence à l'Université de Bordeaux
M. MASSON Jean, Directeur de Recherche à l'INRA de Colmar
M. CHARLIER Laurent, Responsable Recherches et Développement au CIVB

«Maladies de la vigne :
Ensemble des calamités naturelles s'acharnant sur le vigneron
pour lui faire perdre sa jovialité naturelle.

C'est l'un des grands paradoxes liés à la viticulture.
Bien que le vin soit censé nous conserver en bonne santé, la vigne peut elle-même être atteinte par
toute sorte de maladies.»

(Jean-Pierre Gauffre, Petit dictionnaire absurde et impertinent de la vigne et du vin)

Remerciements

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de l'Unité Mixte de Recherche 1332 Biologie du Fruit et Pathologie (Institut National de la Recherche Agronomique et Université de Bordeaux), dirigé par M. Thierry Candresse, sous la direction de Mme Sandrine Eveillard.

Je tiens tout d'abord à remercier M. Alain Blanchard pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans son équipe.

Je souhaite remercier M. Domenico Bosco et M. Charles Manceau pour avoir accepté d'examiner et de juger ce manuscrit.

Je remercie également Mme Cristina Marzachi, Mme Marie-France Corio-Costet et M. Michel Hernould d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse.

Je remercie aussi le CIVB pour leur financement sans quoi rien n'aurait été possible. Merci également aux différents viticulteurs et organismes pour nous avoir permis de récolter des bois sur les parcelles.

Trois ans, qu'est ce que cela passe vite, très vite ! Surtout quand on est entouré de personnes sympathiques et bienveillantes. Ce fût donc un plaisir de venir travailler.

Un grand merci à Sandrine, ma directrice de thèse pour m'avoir accompagné, encadré et enseigné pendant ces 3 années. Merci pour ta patience et tes encouragements tout au long du chemin. Qu'est ce qu'on aura stressé à chaque éclosion de *Scapho* ! Comme tu dis, une expérience CIVB où tout se passe comme prévu n'est pas une expérience CIVB !! Mais finalement on aura réussi à faire ce que l'on voulait ! A force de calculs (tes calendriers sur 3 ans sont très utiles !), et je dois le dire d'un peu (beaucoup ?) de Tétris ! On en aura fait voir aussi à ces broyeurs à soupe, paix à leur âme ! Merci pour ta bonne humeur ! Et aussi de m'avoir fourni en M&M's aux cacahuètes mais aussi au chocolat (je ne savais même pas que ça existait) pendant l'écriture !

Je remercie également Laure pour m'avoir accompagné sur les protéines. Peut-être auras-tu réussi à faire rentrer un peu de biochimie dans ma tête. Maintenant, je suis équipée pour les purifications en chambre froide ! Bon courage pour ton HDR ! Merci également à ton stagiaire, Antonin, pour ces essais sur les activités des FtsH.

J'adresse aussi un grand merci à Frédérique pour toutes ces extractions de plantes et d'insectes, ainsi que pour t'être occupé des éclosions. Tu as su dompter ces petites bêtes !! Merci aussi pour ton sourire et bonne continuation dans ta nouvelle vie à Paris !

Je remercie Mireille Perrin et Jean Masson pour les plants *in vitro* et leurs conseils durant cette thèse. J'espère avoir un jour le temps de visiter Colmar, et pas que sa gare !

Je remercie Marie-France Corio-Costet et Marie-Cécile Dufour pour la puce fluidigm, ainsi que José Caïus et Christine Paysant-Leroux pour les données du RNA-Seq.

Je remercie Xavier et Sylvie pour tous leurs conseils et leur aide, mais aussi pour les discussions scientifiques ou non.

Merci aussi à Christophe ! J'ai partagé ton bureau pendant ces 3 ans. Tu n'as jamais râlé quand je commençais mes phrases par « Christophe, est ce que tu sais comment on fait pour ... ? ». Merci pour tes macros (PoPoPiDo entre autres) qui m'ont sauvé la vie et pour toutes tes blagues !

Merci à Marie-Pierre, Pascal S et Delphine pour les dernières extractions en urgence. Merci MPi pour tes disques durs, ton aide et nos discussions ! Merci Delphine de m'avoir permis de récupérer tes plantes et tes insectes quand j'en ai eu besoin. Merci Pascal pour nos discussions sportives !! Oui j'y crois, l'ESTAC restera en Ligue 1 (et cette années pas de défaite 9 à 0 (là aussi, j'y crois !)). Merci aussi à Sybille, Nathalie et Joël pour avoir répondu à mes questions, m'avoir donné du plasmide, du milieu ou simplement pour les discussions que nous avons eu.

Merci Bernard pour ton rire, ton animation, ton rôle de DJ. Non pas dans les soirées mais dans le labo !! Tu es aussi un chef. En cuisine !! Un gâteau par mois, mais jamais le même ! J'espère ne pas t'avoir trop cassé les oreilles à taper avec mon marteau !

Merci à Martine pour tous les autoclavages en urgence et souvent en double. Merci pour ta bonne humeur et ta disponibilité.

Je remercie les serristes, Denis, Kaëlig et Jean pour le soin apporté à nos petites bêtes ! A Thierry M et Coralie pour le soin de nos plantes en serre HC, et pour me permettre de stocker de temps en temps des plantes dans le compartiment d'en face et d'emprunter des mini-serres de la serre HPE !

Je remercie aussi Annie, Isabelle et Laurence pour leur sourire et leur disponibilité.

Merci aussi à Pascal SP, Carole et GG pour leur accompagnement durant mon stage de M2, mais aussi pour nos discussions.

Merci à Yanina (ma coupine du stage M2), à Estelle (profite de l'année qu'il te reste pour faire de belles manip et t'éclater), à Luis (promis je viendrai goûter ta paëlla !!), à Iason (je te souhaite un bon voyage en Amérique du Sud et n'arrête pas de refaire le monde), à Gabrielle (merci pour nos fins de journées en chansons, d'ailleurs pas que les fins de journée, j'ai toujours des chansons plus ou moins pourries dans la tête, la décoration de mon bureau ou de celui de Christophe, prend soin de Boustif !), à David, à Vincent, à Claire, à Juliette... pour nos discussions qui ont portées sur tous les sujets, nos soirées, nos rêves et nos rires.

A Aurélia (bon courage pour la suite), Véronique et Fabrina pour nos discussions du matin dans le bus.

Merci aussi à toute l'équipe du pilâte du vendredi soir et à Marie-Sophie. De bons moments de rigolades et de détente.

Je remercie également toutes les personnes qui sont venues m'aider à un moment ou un autre, que ce soit pour découper des plantes (Brigitte, Thierry L...), pour récolter des bois en Bourgogne, pour me dépanner dans une manip, pour une discussion sur les lipides (Jean-Paul), un problème, une question...je vous remercie d'avoir rendu mes journées ensoleillées !

Je remercie mes amis, d'ici ou de plus loin, et en particulier Maëlle (à toi l'Irlande), Roxane (bon courage pour ces 3 ans de bonheur), Renaud et Mathurin (les meilleurs !). Une pensée aussi pour les GMC !!

Enfin, je tiens à remercier toute ma famille, ma cousine Marion pour nos 4 ans de colloc, et surtout mes parents et mon frère Clément. Merci pour m'avoir permis d'étudier en toute sérénité, pour votre soutien, vos conseils, votre aide... et pour me fournir encore et toujours en pots de gelée de framboises.

A tous ces chanteurs, compositeurs et auteurs que je ne vais pas pouvoir remercier un par un mais qui ont accompagné toutes ces journées de découpe de plantes et parfois de blind test, organisées avec toutes les personnes sympathiques qui ont répondu à mon appel (à l'aide ?) et ont supporté ma maniaquerie (noter moult détails sur un si petit espace qu'est la pochette de broyage...).

A tous ces *Scapho* qui nous ont parfois, (souvent ?) donnés des sueurs froides, créés des espoirs et des désespoirs, et qui sont morts sur l'autel de la science (ou plutôt dans un verre d'alcool).

Merci à tous !

Communications lors de la thèse

- Eveillard S, **Jollard C**, Labroussaa F, Khalil D, Perrin M, Desqué D, Salar P, Razan F, Hévin C, Bordenave L, Foissac X, Masson JE and Malembic-Maher S (2016) Contrasting susceptibilities to flavescence dorée in *Vitis vinifera*, rootstocks and wild *Vitis* species, *Front Plant Sci* 7 : 1762
- **Camille Jollard***. (2014). La Flavescence Dorée, présentation de mon sujet de thèse sur le modèle de ma thèse en 180s, Assemblée générale annuelle d'Inno'vin, 21/05/2015, Bordeaux, France [oral]
- **Camille Jollard***, Sylvie Malembic-Maher, Christophe Garcion, Mireille Perrin, Jean E. Masson, Xavier Foissac, Laure Béven and Sandrine Eveillard. (2015). Flavescence Dorée : Identification and characterization of FD phytoplasma surface proteases and identification of plant genes involved in the resistance to FD phytoplasma, 7^{èmes} journées des doctorants SPE, 01-03/07/2015, Rennes, France [oral]
- **Camille Jollard***. (2015). La Flavescence Dorée, présentation de mon sujet de thèse sur le modèle de ma thèse en 180s, Conférence du millésime 2015, 08/12/2015, Bordeaux, France [oral]
- **Camille Jollard***, Sylvie Malembic-Maher, Christophe Garcion, Mireille Perrin, Jean E. Masson, Xavier Foissac, Laure Béven and Sandrine Eveillard. (2016). Flavescence Dorée : Identification and characterization of FD phytoplasma surface proteases and identification of plant genes involved in the resistance to FD phytoplasma, 12^{èmes} rencontres plantes-bactéries, 11-15/01/2016, Aussois, France [oral]
- **Camille Jollard***. (2016). Flavescence Dorée : mise en évidence de gènes impliqués dans la résistance au phytoplasme chez deux cépages de sensibilité différente, ma thèse en 180s, finale de l'Université de Bordeaux, 01/04/2016, Bordeaux, France [oral]
- **Camille Jollard***, Sylvie Malembic-Maher, Christophe Garcion, Mireille Perrin, Jean E. Masson, Xavier Foissac, Laure Béven and Sandrine Eveillard. (2016). Flavescence Dorée Phytoplasma Interactions : Identification and characterization of surface proteases and Identification of plant genes involved in FD resistance, 16^{ème} Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé, 06/04/2016, Arcachon, France [poster]
- **Camille Jollard***, Sylvie Malembic-Maher, Christophe Garcion, Mireille Perrin, Jean E. Masson, Xavier Foissac, Laure Béven and Sandrine Eveillard. (2016). Flavescence Dorée Phytoplasma Interactions : Identification and characterization of surface proteases and Identification of plant

genes involved in FD resistance, 21^{ème} Congrès de l'Organisation Internationale de Mycoplasmologie (IOM), 03-07/07/2016, Brisbane, Australie [poster]

- **Camille Jollard***, Sylvie Malembic-Maher, Frédérique Razan, Mireille Perrin, Thierry Lusseau, Delphine Desqué, Xavier Foissac, Jean E. Masson et Sandrine Eveillard. (2017). La Flavescence Dorée: Caractérisation des différences de sensibilité des cépages au sein de la famille du Cabernet-Sauvignon et du Merlot, 13^{ème} journée technique du CIVB, 17-02-2017, Bordeaux, France [poster]

- **Camille Jollard***, Sylvie Malembic-Maher, Frédérique Razan, Mireille Perrin, Thierry Lusseau, Delphine Desqué, Xavier Foissac, Jean E. Masson et Sandrine Eveillard. (2017). Flavescence Dorée disease : Differences of susceptibility in Vitis varieties within the Cabernet-Sauvignon and Merlot family, 17^{ème} Journée Scientifique de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé, 12/04/2017, Arcachon, France [poster]

- **Camille Jollard***, Sylvie Malembic-Maher, Frédérique Razan, Mireille Perrin, Thierry Lusseau, Delphine Desqué, Xavier Foissac, Jean E. Masson et Sandrine Eveillard. (2017). Flavescence Dorée disease : Differences of susceptibility in Vitis varieties within the Cabernet-Sauvignon and Merlot family, 9^{èmes} journées des doctorants SPE, 20-22/07/2017, Montpellier, France [poster]

- Sandrine Eveillard*, **Camille Jollard**, Fabien Labroussaa, Dima Khalil, Mireille Perrin, Delphine Desqué, Pascal Salar, Frédérique Razan, Cyril Hévin, Louis Bordenave, Xavier Foissac, Jean E. Masson, Sylvie Malembic-Maher. (2017). Contrasting susceptibilities to Flavescence Dorée in Vitis vinifera rootstocks and wild Vitis species, IOBC-WPRS, Future IPM3.0. 15-20/10/2017. Riva Del Garda, Italy [oral]

* auteur qui a présenté la communication ou le poster

Liste des abréviations

Unités ou symboles :

% : pourcent

°, °C : degré, degré Celsius

σ : sigma

<, > : inférieur à, supérieur à

Conc, μ M, M, nM, N : concentration, micro molaire, molaire, nanomolaire, mol/L

μ g, g, mg FP, ng : micro-gramme, gramme, milligrammes de poids frais, nanogramme

cm, nm, mm : centimètre, nanomètre, millimètre

CPM : lecture par million

Do : densité optique

FDR : False discovery rate

g, rpm : force centrifuge, tour par minute

h, min, s : heure, minute, seconde

ha : hectare

kDa : kilo Dalton

Kpb, Mpb, pb : kilo-paires de bases, millions de paires de bases, paires de bases

L, mL : litre, millilitre

Log, Log2 : logarithme

Miohl : Million d'hectolitres

MNE : Mean Normalized Expression

pH : potentiel Hydrogène

RGE : Relative Gene Expression

RIN : RNA Integrity Number

spt : semaines post-transmission

v/v : volume/volume

w/v : poids/volume

Organismes ou pathogènes :

3309 : 3309 Couderc

5BB : Kober 5BB

41B : 41B Millardet et de Grasset

110R : 100 Richter

'Ca. P.' : '*Candidatus Phytoplasma*'

A. thaliana : *Arabidopsis thaliana*

ArMV : Arabis Mosaic Virus

ARM : *Vitis amurensis*

AY-WB : aster yellows phytoplasma strain witches' broom

B. cinerea : *Botrytis cinerea*

B. subtilis : *Bacillus subtilis*

BER : *Vitis berlandieri*

CF, CF-Ch : Cabernet-Franc, CF avec un greffon Ch

Ch ou CH, Ch-Ch : Chardonnay, Ch avec un greffon Ch

CHAM : *Vitis champinii*

COI : *Vitis coignetiae*

CS, CS-Ch, CS-I, CS-S : Cabernet-Sauvignon, CS avec un greffon Ch, CS infecté, CS sain

D1 à D13 : Descendant 1 à Descendant 13 issus du croisement Mag x CF
DO : *Vitis doaniana*
E. coli : *Escherichia coli*
E. necator : *Erysiphe necator*
E. variegatus : *Euscelidius variegatus*
EY : Elm Yellows
GR : Grenache
GFLV : Grapevine fan leaf virus
L. actis : *Lactococcus lactis*
LAB : *Vitis labrusca*
LON : *Vitis longi*
M, M-Ch, M-I, M-S : Merlot, M avec un greffon Ch, M infecté, M sain
M. rotundifolia : *Muscadinia rotundifolia*
M. quadrilineatus : *Macrosteles quadrilineatus*
Mag ou MAG, Mag-Ch : Magdeleine Noire des Charentes, Mag avec un greffon Ch
NEM : Nematex
OY : Onion Yellow
P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*
P. syringae : *Pseudomonas syringae*
P. viticola : *Plasmopara viticola*
PEN : *Vitis pentagona*
pBN : phytoplasme du BN
pFD : phytoplasme de la Flavescence Dorée
PN : Pinot Noir
RGM : Riparia Gloire de Montpellier
RUB : *Vitis rubra*
RUP : *Vitis rupestris*
S. aureus : *Staphylococcus aureus*
S.titanus : *Scaphoideus titanus*
Sau ou SAU ou Sauvignon B, Sau-Ch : Sauvignon Blanc, Sau avec un greffon Ch
SIM : *Vitis simpsonii*
SO4 : Sélection Oppenheim 4
SY : Syrah Noir
SYL : *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*
TYLCV : Tomato yellow leaf curl virus

Réactifs :

BET : bromure d'éthidium
CTAB : cetyltriméthylammonium bromide
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétracétique
IPTG : IsoPropyl β -D-1-ThioGalactopyranoside
LB : lysogeny broth
MOPS : 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid
PMSF : fluorure de phénylméthylsulfonyle
SDS : Sodium Dodécul Sulfate
SOC : Super Optimal Broth
TAE : Tris-Acétate EDTA
TE : Tris EDTA
TNES : Tris-HCl NaCl EDTA SDS
X-gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside

Autres :

AAA : ATPase Associées à diverses Activités cellulaires
ABA : acide abscissique
ADN (DNA), ADNr, ADNc: Acide DésoxyriboNucléique, ADN ribosomique, ADN complémentaire
AMP : antimicrobial peptides
ARN, ARNr, ARNt : Acide RiboNucléique, ARN ribosomique, ARN de transfert
ATNxxDxDLxALLRPGR : Séquence d'acides aminés avec A : Alanine, D : Aspartate, G : Glycine, L : Leucine, N : Asparagine, P : Proline, R : Arginine, T : Thréonine, x : indifférent
ATP : Adénosine Tri-Phosphate
Avr : protéine d'avrirulence
b-ZIP : basic-domain leucine-zipper
BABA : Acide β -AminoButyrique
BBCH : Biologische Bundesanstalt bundessortenamt and Chemical industry
BIVB : Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne
BN : Bois Noir
BTH : benzo thiadiazole
 Ca^{2+} : ion calcique
 $CaCl_2$: Chlorure de calcium
CDS : Coding DNA Sequence
CIVB : Conseil Interprofessionnel du Vin de Bordeaux
CIVC : Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne
 Cl^- : ion chlorure
CRB-Vigne : Centre de Ressources Biologiques de la Vigne
CRISPR/Cas9 : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associé à Cas9
DAMP : Damaged-Associated Molecular Patterns
DE : différentiellement exprimé
dNTP : Mélange des quatre désoxyribonucléotides : dATP (désoxy adénine tri-phosphate), dCTP (désoxy cytosine tri-phosphate), dGTP (désoxy guanine tri-phosphate), dTTP (désoxy thymine tri-phosphate).
DRAAF-SRAL : Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt-Service Régional de l'Alimentation
Efsa : European Food Safety Authority
ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
ERF : Ethylen Responsive Factor
ET : éthylène
ETI : Effector Triggered Immunity
ETS : Effector Triggered Susceptibility
FD : Flavesence Dorée
FDGDON : Fédérations Départementales de Défense contre les Organismes Nuisibles
FIDEI : Séquence d'acides aminés avec D : Aspartate, E : Glutamate, F : Phénylalanine, I : Isoleusine
Fig : Figure
flg22 : épitope de 22 acides aminés de la flagelline
FREDON : Fédérations Régionales des Groupements de Défense contre les Organismes Nuisibles
FT : facteur de transcription
GA : gibbérelines
GC, GCC, GACC/T : Guanine, Cytosine, Thymine
GDON : Groupements de Défense contre les Organismes Nuisibles
GRP : protéines riches en glycine
 H^+ : ion hydrogène
 H_2O_2 : peroxyde d'hydrogène
HCl : Chlorure d'Hydrogène (acide chlorhydrique)

HExGH : Séquence d'acides aminés avec E : Glutamate, G : Glycine, H : Histidine, x : indifférent
 His : Histidine
 HO⁻ : ion hydroxyde
 HR : Hypersensible Response
 IG-CNS : Institut de Génomique Centre National de Séquençage (Génoscope)
 IFV : Institut Français de la Vigne et du vin
 INRA : Institut National de la Recherche Agronomique
 INSEE : Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques
 IP : inhibiteurs de protéases
 IPS2 : Institute of Plant Sciences Paris Saclay
 IPKGILLxGxPGTGKT : Séquence d'acides aminés avec G : Glycine, I : Isoleucine, K : Lysine, L : Leucine, P : Proline, T : Thréonine, x : indifférent
 JA, JA-Ile : acide jasmonique, JA conjugué avec l'isoleucine
 Kan : Kanamycine
 KCl : Chlorure de potassium
 KH₂PO₄ : Monopotassium phosphate
 L1 à L5 : stade larvaire 1 à 5
 Leu-zip : leucine-zipper
 LPS : lipopolysaccharide
 LRR : Leucine-Rich repeats
 MADS : domaine de fixation à l'ADN sur une séquence CC[A/T]₆GG
 MAMP : Microbial Associated Molecular Pattern
 MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
 MeJA : méthyl-jasmonate
 Mg²⁺ : ion magnésium
 MgCl₂ : chlorure de magnésium
 MgSO₄ : sulfate de magnésium
 MLO : Mycoplasma Like Organism
 MRE : MYB Recognition Element
 NaCl : Chlorure de sodium
 NaOH : Hydroxyde de sodium
 NLR : NOD-like receptors
 NLS : Nuclear Localization Signal
 NO : monoxyde d'azote
 NO₃⁻ : ion nitrate
 NR : non renseigné
 O₂ : dioxygène
 O₂⁻ : ion superoxyde
 OGM : Organisme Génétiquement Modifié
 OIV : Organisation Internationale de la Vigne et du vin
 OSM34 : osmotin-like protein
 PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns
 PCR : Polymerase Chain Reaction
 Peri : Périplasmique
 PLO : Périmètre de Lutte Obligatoire
 PMU : Potential Mobile Units
 Protéines PR : Pathogenesis related protein
 PRP : de protéines riches en proline
 PRR : Pattern-Recognition Receptors
 PTI : PAMP Triggered Immunity
 PS : pore signature
 qPCR : real-time PCR

RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
 RLK : Receptor-Like Kinase
 RLP : Receptor-Like Proteins
 RNA-Seq : Séquençage de l'ARN
 ROS : Reactive Oxygen Species
 RT-PCR : Reverse-Transcription (ou transcription inverse) PCR
 SA : acide salicylique
 SAP : Secreted AY-WB Proteins
 SAR : Systemic Acquired Resistance
 Serre HC : Serre de Haut Confinement
 SRAL : Service Régional de l'Alimentation
 SRH : Second Region of Homology
 SSCP : single-strand conformation polymorphism
 Subsp. : Sous-espèce
 T3SS : Système de Sécrétion de Type III
 TA : température ambiante
 TDR : TDIF Receptor
 TM : TransMembranaire
 Tm : température utilisée pendant l'étape d'hybridation des amorces au cours des PCR
 TMHMM : predicting TransMembrane protein topology with a Hidden Markov Model
 UGA : Uracile Guanine Adénine
 UMR : Unité Mixte de Recherche
 UV : ultra-violet
 WRKYGKQ : Séquence d'acides aminés avec G : Glycine, K : Lysine, Q : Glutamine, R : Arginine,
 W : Tryptophane, Y : Tyrosine
 Y/FxG : Séquence d'acides aminés avec F : Phénylalanine, G : Glycine, Y : Tyrosine, x : indifférent,
 / : ou
 Zn²⁺ : ion zinc

Gènes :

γCA2 : Gamma Carbonic Anhydrase 2
ABA1, ABA2 : ABA deficient 1, ABA deficient 2
ADPG : Arabidopsis Dehiscence Zone Polygalacturonase
AGP20 : ArabinoGalactan Proetin 20
ALD1 : AGD2-Like Defense response protein 1
AMY2 : alpha-amylase-like 2
AOC : Allène Oxyde Cyclase
AOS : Allène Oxyde Synthase
APE2 : Acclimatation of Photosynthesis to Environment 2
APL : ADP-Glucose Pyrophosphorylase
APX : Ascorbate Peroxidase
APX3 : Ascorbate Peroxidase 3
ARR11 : response regulator 11
BAM1 : Barely Any Meristem 1
BAN : Banyuls
BFRUCT : β-fructofuranosidase
BG3/GLU : Beta-1,3-Glucanase 3
BON3 : BONZAI 3
BSMT1 : SA méthyltransférase
BXL3 : Béta-Xylosidase 3

CAD9 : Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase 9
CAM8 : Calmodulin 8
CALS : Callose Synthase
CB5-D : Cytochrome B5 isoform D
CCD1 : Carotenoid Cleavage Dioxigenase 1
CERK1 : Chitin Elicitor Receptor Kinase 1
CES : Cellulose synthase
CHIT3 : chitinase de type III
CHS : Chalcone synthase
CLA1 : Chloroplasts Alterados 1
CML23 : calmodulin-related protein 23
COB : COBRA
COBL4 : COBRA-Like 4
COX-2 : cyclooxygénase
CPK29 : Calcium-dependant Protein Kinase 29
CRK : CDPK-Related Kinase
CRLK1 : Calcium/calmodulin-regulated Receptor-like Kinase 1
CRR23 : chlororespiratory reduction 23
CSD1 : Copper/zinc superoxyde dismutase 1
CSL : Cellulose synthase like
CYP : cyclophilin
CYP51 : Cytochrome P450 51G1
CYP75B1 : Cytochrome P707A1
CYP707A1 : Cytochrome P450
DFR : DihydroFlavonol 4-Reductase
DIN10 : Dark Inductible 11
DMSO : diméthylsulfoxyde
DnaB : DNA replication
CTR1 : Constitutive Triple Response 1
DWF1 : Dwarf1, calmodulin binding
EF1 α , *EF1 γ* : Chaîne α ou γ du Facteur d'Elongation 1
EHD2 : EPS15 HOMOLOGY DOMAIN 2
EIN : Ethylene INsensitive
ETR2 : ethylene response 2
EXL5 : Exordium like 5
EXL : Expansin-Like precursor
EXP : Expansin
F3H : Flavonone-3-hydroxylase
FBL17 : F-Box Like 17
FBW2 : F-BOX With WD-40 2
FLA : Fasciclin-Like Arabinogalactan-protein
FLS1 : Flavonol Synthase 1
FLS2 : Flagellin-Sensitive 2
FRK1 : Flg22-induced Receptor-like Kinase 1
FtsH : Filamentous Temperature Sensitive
GADPH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GAPA : Glyceraldehyde 3-Phosphate dehydrogenase A subunit
GLB1 : globins 1
GoIS2 : galactinol synthase
GSL : Glucan Synthase-Like
GSO1, *GSO2* : GASSHO 1, GASSHO 2
GUX1 : Glucuronic acid substitution of Xylan 1

Hf1B : High frequency of lysogenization
HMGR : 3-hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A reductase class I
HSL1 : HEASA-Like 1
ICS : Iso-Chorismate Synthase
IQD6 : IQ-domain 6 calmodulin binding
IQD31 : IQ-domain 31 calmodulin binding
IMK3 : Meristematic receptor-like Kinase 3
IRK : Inflorescence and Root apices receptor-like Kinase
IRX8, IRX12 : Irregular Xylem 8, 12
JAR1 : Jasmonate Resistant 1
KAM1 : Katamari 1
LAC : laccase
LDOX : Leucoanthocyanidine Di-Oxygénase
LHCB3 : Light-Harvesting Chlorophyll B-binding protein 3
LIK1 : LysM RLK1-Interacting Kinase 1
LOS2 : Low expression of Osmotically response genes 2
LOX : Lipoxygenase
LRX2 : Leucine-Rich Repeat/Extensin 2
MAT3 : Methionine Adenosyltransferase 3
MEE32 : Maternal Effect Embryo Arrest 32
MIK2 : MDIS1-Interacting receptor like Kinase 2
MYB : Myeloblastosis related proteins
NCED3 : Nine-Cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase 3
NPGR1 : No Pollen Germination Related 1
NPR1 : Nonexpressor of Pathogenesis-Related proteins 1
PAL : Phénylalanine-Ammonia Lyase
PEPR1 : PEP1 Receptor 1
PDLP7 : Plasmodermata-Located Protein 7
PIN : Pin-formed
PMEPCRA : Pectinesterase/Méthylestérase PCR A
PME1 : Pectinesterase
PPR1 : Pinoresinol Reductase 1
PRB1 : Basic Pathogenesis-Related protein 1
PXC3 : PXY/TDR Correlated 3
PYD4 : Pyrimidine 4
RCC2 : Rice Chitinase Cht-2
RGP3 : Reversibly Glycosylated Polypeptide 3
RKF1 : Receptor-like Kinase in Flowers 1
RL6 : Rad Like 6
Rpv1 : Resistance to *Plasmopora viticola*
Run1 : Resistance to *Uncinula necator* 1)
SAMT1 : SA Methyl Transferase
SBE2.2 : Starch Branching Enzyme 2.2
SIP1 : Seed Imbibition 1-like
SKIP4 : SKP1 Interacting Partner 4
SMT1 : Sterol Méthyltransférase 1
SQE1 : squalene monooxygenase 1
SRF8 : Strubbelig-Receptor Family 8
SRG1 : Senescence-Related Gene 1
SUS : Sucrose Synthase
THIORYLS8 : Catalytic thioredoxin-like protein 4A
TIP41 : TIP41-like protein

TMK1 : Transmembrane Kinase 1
tolZ : Tolérance aux colicines
TPS : Terpene Synthase
TPS1 : Trehalose-6-phosphate synthase
TRN1 : Tornado 1
TRX2 : Thioredoxin 2
TRX-M4 : Thioredoxin M-type 4
TT10 : Transparent Testa 10
TuA : Tubulin alpha
UBC19 : ubiquitin-conjugating enzyme 19
UGT85A1 : UDP-glycosyltransferase
UGP : UDP-glucose pyrophosphorylase
VH1 : Vascular Highway 1
VvTL1 : *Vitis vinifera* thaumatin-like proteins
WAK : Wall-Associated Kinase
XTR, XTH : xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase
XYL4 : Xylan-1,4-beta-xylosidase

Table des matières

REMERCIEMENTS	5
COMMUNICATIONS LORS DE LA THESE	9
LISTE DES ABREVIATIONS	11
TABLE DES MATIERES	19
LISTE DES FIGURES ET DES TABLES.....	25
INTRODUCTION.....	29
I) LA FLAVESCENCE DOREE	31
A) <i>Généralités</i>	31
1) Symptômes de la Flavescence dorée	32
2) Hypothèse sur l'origine de la FD	33
B) <i>L'hôte végétal : la vigne</i>	34
1) Généralités.....	34
2) Cycle de développement de la vigne	37
3) Les cépages	38
4) Données de génomique	40
5) Les principales maladies de la vigne	40
C) <i>La bactérie responsable : le phytoplasme</i>	42
1) Généralités sur les <i>Mollicutes</i>	42
2) Les phytoplasmes.....	45
3) Phytoplasme de la Flavescence Dorée.....	47
D) <i>L'hôte insecte : Scaphoïdeus titanus</i>	47
1) Généralités.....	47
2) Répartition géographique.....	48
3) Cycle de vie	49
E) <i>Transmission du pFD à la plante via S. titanus</i>	50
F) <i>Lutte contre la Flavescence Dorée</i>	54
II) MECANISMES DE VIRULENCE DES PHYTOPLASMES	55
A) <i>Les effecteurs</i>	55
B) <i>FtsH</i>	56
1) Généralités.....	56
2) Caractérisation structurales.....	57
3) Fonctions.....	58
4) Liens avec la pathogénicité	59
III) LES DEFENSES DES PLANTES	59
A) <i>Généralités</i>	59

B) <i>La perception du pathogène</i>	61
1) La transmission du signal	62
2) Les réponses de défense actives	66
a) Le renforcement des parois	66
b) La réponse hypersensible (HR)	67
c) Les phytoalexines	67
d) Les pathogenesis related protein (PR)	68
C) <i>Stratégies d'amélioration de la résistance des plantes</i>	69
1) Amélioration classique par croisement	69
2) Génie génétique	70
OBJECTIFS DE LA THESE	73
CHAPITRE I : IDENTIFICATION ET CARACTERISATION DE L'EXPRESSION DES FTSH DU pFD	77
I) INTRODUCTION	79
II) RESULTATS-DISCUSSION	81
A) <i>Identification des gènes FtsH dans le génome du pFD</i>	81
B) <i>Expression différentielle des gènes FtsH du pFD selon les hôtes</i>	89
C) <i>Prédiction de la topologie des 8 FtsH du pFD</i>	93
D) <i>Activité de 3 FtsH du pFD</i>	94
III) CONCLUSION	95
CHAPITRE II : CARACTERISATION DE LA DIFFUSION DU PHYTOPLASME DE LA FLAVESCENCE DOREE DANS LES PLANTES DE SENSIBILITE DIFFERENTE CS ET M EN S'AFFRANCHISSANT DES INTERACTIONS PLANTE-INSECTE 99	
I) INTRODUCTION ET OBJECTIFS	101
II) RESULTATS ET DISCUSSION	102
A) <i>Greffage et pourcentage de reprise</i>	102
B) <i>Survie des insectes</i>	103
C) <i>Symptômes</i>	104
D) <i>Titres en phytoplasmes</i>	105
III) CONCLUSION	106
CHAPITRE III : ANALYSE DU CARACTERE HERITABLE DE LA SENSIBILITE/RESISTANCE A LA FLAVESCENCE DOREE	107
I) INTRODUCTION	109
II) RESULTATS ET DISCUSSION	111
A) <i>Caractérisation de la diffusion et de la multiplication du pFD dans les parents du CS et du M via un greffon sensible Ch</i>	111
1) Greffage et pourcentage de reprise	111
2) Survie des insectes et titre en pFD	112
3) Titres en phytoplasmes	113

4)	Conclusions	115
B)	<i>Caractérisation de la diffusion et de la multiplication du pFD dans les parents du CS et du M</i>	117
1)	Survie des insectes	117
2)	Symptômes	118
3)	Titres en phytoplasmes	119
4)	Conclusion.....	120
C)	<i>Caractérisation préliminaire de la sensibilité à la FD de descendants d'un croisement entre un cépage sensible, le CF et un cépage peu sensible, la Mag</i>	122
1)	Croisement et obtention de plants <i>in vitro</i>	122
2)	Phénotypage	123
a)	Survie des insectes.....	123
b)	Nombre de plantes infectées.....	125
c)	Titre en phytoplasmes	126
d)	Conclusion	127
III)	CONCLUSION	128
CHAPITRE IV : COMPARAISON DES TRANSCRIPTOMES DE CS ET DE M SUITE A L'INFECTION PAR LE PHYTOPLASME DE LA FLAVESCENCE DOREE		
		131
I)	INTRODUCTION	133
II)	RESULTATS ET DISCUSSION.....	134
A)	<i>Obtention des plantes à comparer en RNA-Seq</i>	134
B)	<i>Identification des gènes différentiellement exprimés et classification fonctionnelle.....</i>	138
1)	Données brutes du séquençage.....	138
2)	Classement en catégories fonctionnelles des gènes exprimés	139
3)	Recherche des gènes différentiellement exprimés.....	141
a)	Classement en catégorie fonctionnelle des gènes.....	141
b)	Perception du pFD	144
c)	Transduction du signal.....	146
d)	Métabolisme secondaire	154
e)	Paroi cellulaire	155
f)	Protéines PR	157
g)	Protéolyse médiée par l'ubiquitine	159
h)	Métabolisme primaire	160
C)	<i>Validation de l'expression différentielle de certains gènes par RT-qPCR</i>	163
III)	CONCLUSION	165
PERSPECTIVES		169
MATERIELS ET METHODES		177
I)	MATERIEL BIOLOGIQUE	179
A)	<i>Les phytoplasmes.....</i>	179
B)	<i>L'insecte vecteur expérimental : Euscelidius variegatus</i>	179

1)	Origine et conditions d'élevage	179
2)	Infection des <i>E. variegatus</i> et transmission	179
C)	<i>L'insecte vecteur naturel : Scaphoideus titanus</i>	180
1)	Origine et conditions d'élevage	180
2)	Capture et infection	180
D)	<i>Les plants de vigne</i>	181
1)	Les plants de vigne issus de boutures	181
2)	Les croisements Mag x CF	181
3)	Obtention des plants <i>in vitro</i> et acclimatation.....	181
4)	Transmission du phytoplasme FD aux plants de vigne	182
a)	Transmission aux plantes entières utilisée pour le phénotypage des descendants (Chapitre III-C) ou la mesure de l'expression des gènes <i>FtsH</i> (Chapitre I).....	182
b)	Transmission <i>via</i> un greffon Ch utilisée pour infecter les plantes en s'affranchissant des interactions plantes- <i>S. titanus</i> (Chapitres II et III-A).....	183
c)	Transmission sur une seule feuille utilisée pour la caractérisation de la diffusion du pFD (Chapitre III-B) ou pour la comparaison des transcriptomes du CS et du M (Chapitre IV)	183
E)	<i>Escherichia coli : souches et utilisation</i>	184
II)	PLASMIDES.....	184
A)	<i>pET28a (+)</i>	184
B)	<i>pGEM-T-easy</i>	185
III)	METHODES D'ANALYSE DES ADN.....	185
A)	Extraction d'acides nucléiques de plantes.....	185
B)	Extraction d'acides nucléiques d'insectes au TNES	186
C)	Extraction d'acides nucléiques d'insectes au TRIzol.....	186
D)	Détermination du titre en phytoplasmes par qPCR.....	187
E)	Amplification par PCR des gènes codant des <i>FtsH</i>	187
F)	Purification d'ADN plasmidique	190
G)	Purification des fragments d'ADN à partir de gel d'agarose	190
H)	Clonage de fragment d'ADN amplifié par PCR dans un plasmide.....	190
1)	Ligation dans le plasmide pGEM-t-easy	190
2)	Ligation dans le plasmide pET28a	191
I)	Transformation des bactéries <i>Escherichia coli</i> chimiocompétentes.....	191
1)	<i>E. coli</i> souche HST08 (Stellar™ Clontech)	191
2)	<i>E. coli</i> souche BL21 Star™ (DE3)	192
IV)	METHODES D'ANALYSES DES ARN	192
A)	Extraction des ARN d'insectes.....	192
B)	Extraction des ARN de fèves.....	193
C)	Extraction des ARN de vignes.....	194
D)	Vérification du traitement DNase par PCR.....	194
E)	RT-PCR quantitative en temps réel.....	196

1)	Synthèse des ADNc par transcription inverse	196
2)	Amplification des ADNc par PCR en temps réel	196
F)	<i>Analyses transcriptomiques</i>	200
V)	METHODES D'ANALYSES DES PROTEINES	201
A)	<i>Production de protéines FtsH du phytoplasme de la FD souche FD92 recombinantes taguées 6xHis</i> 201	
B)	<i>Purification des protéines</i>	202
C)	<i>Mesure de l'activité ATPasique des FtsH recombinantes</i>	202
D)	<i>Mesure de l'activité protéolytique des FtsH</i>	203
VI)	STATISTIQUES.....	204
	REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	205
	ANNEXES.....	227
I)	ANNEXE 1	229
II)	ANNEXE 2	231

Liste des figures et des tables

Figure 1 : Carte de l'Europe présentant les pays où la Flavescence dorée est présente en 2014.....	31
Figure 2 : Symptômes de Flavescence Dorée sur des plants de vigne.....	32
Figure 3 : Production de vins dans le monde en 2016 en millions d'hectolitres	34
Figure 4 : Présentation de vigne exempte de maladie dans le vignoble bordelais.....	35
Figure 5 : Exemples de différents stades phénologiques de la vigne	36
Figure 6 : Présentation de feuilles de M	36
Figure 7 : Cycle végétatif de la vigne.....	37
Table 1 : Sensibilité des différents cépages étudiés à 5 maladies	38
Figure 8 : Généalogie du CS et du M.....	39
Figure 9 : Présentation des symptômes des principales maladies de la vigne	41
Figure 10 : Arbre phylogénétique des <i>Mollicutes</i>	44
Figure 11 : Arbre phylogénétique des phytoplasmes	46
Figure 12 : Photographie d'un <i>Scaphoideus titanus</i> adulte à la loupe.....	48
Figure 13 : Aire de répartition de l'insecte vecteur de la Flavescence Dorée, <i>S.titanus</i>	49
Figure 14 : Cycle de vie de <i>Scaphoideus titanus</i>	50
Figure 15 : Cycle du pFD dans son insecte vecteur	51
Figure 16 : Protocole d'infection des plantes par <i>S. titanus</i> en serre HC.....	53
Figure 17 : Présentation des différents sites caractéristiques d'une FtsH.....	57
Figure 18 : Schéma général de l'immunité des plantes	61
Table 2 : Présentation quelques facteurs de transcription (FT) de la vigne ayant un lien avec la mise en place des défenses	64
Figure 19 : Introgression des gènes de résistance à l'oïdium <i>Run1</i> et au mildiou <i>Rpv1</i> (Resistance to <i>Plasmopora viticola</i>) à partir de l'espèce sauvage <i>Muscadinia rotundifolia</i>	70
Figure 20 : Présentation des différents sites caractéristiques d'une FtsH.....	79
Figure 21 : Schéma des différentes séquences du génome de pFD ayant une homologie avec les séquences protéiques de FtsH et possédant les différents sites spécifiques	82
Figure 22 : Résultats des amplifications par PCR de gènes codants les FtsH Flado_4539_0023, Flado_0067_0052, Flado_0234_0001, Flado_8115_0004 et Flado_5852_0016	83
Figure 23 : Résultats des amplifications de gènes codants les FtsH Flado_4539_0023 et Flado_0234_0001.....	84
Figure 24 : Schéma des 8 séquences protéiques codées par les gènes <i>FtsH</i> dans le génome du pFD isolat FD92, ainsi que celles d' <i>E. coli</i> et <i>B. subtilis</i> avec les différents sites caractéristiques.....	85

Table 3 : Tableau de correspondance entre les noms des gènes <i>FtsH</i> et les noms abrégés	85
Figure 25 : Présentation des différents domaines des 8 FtsH sur les séquences protéiques	86
Figure 26 : Arbre issu de l'analyse phylogénétique moléculaire des FtsH.....	88
Figure 27 : Expression relative des gènes <i>FtsH</i> du pFD isolat FD92 dans les plantes hôtes (Vigne CS et Fève) et dans les insectes vecteurs (<i>E. variegatus</i> et <i>S. titanus</i>).....	90
Figure 28 : Graphique montrant l'expression relative des gènes <i>FtsH</i> entre les vignes CS et le vecteur naturel <i>S. titanus</i> infectés.....	91
Figure 29 : Graphique montrant l'expression relative des gènes <i>FtsH</i> entre les fèves et le vecteur expérimental <i>E. variegatus</i> infecté.	92
Table 4 : Prédiction de l'orientation extracellulaire de la partie C-terminale des protéases FtsH du pFD par le logiciel Polyphobius.	93
Figure 30 : Graphique représentant la concentration de phosphate libéré suite à l'hydrolyse de l'ATP par les FtsH6, FtsH7 et FtsH8	94
Figure 31 : Photographies de plants de CS ou M avec un greffon Ch en serre de haut confinement	102
Figure 32 : Pourcentage de survie des <i>S. titanus</i> après 7 jours passés sur le greffon Ch greffé sur CS ou M	103
Figure 33 : Photographie des plantes CS-Ch et M-Ch 15 spt.	104
Figure 34 : Quantification des pFD à 15 spt dans les différentes parties des plants M et CS porteurs d'un greffon Ch et inoculés par <i>S. titanus</i> sur la partie Ch.....	105
Figure 35 : Parenté du Cabernet-Sauvignon et du Merlot.....	109
Figure 36 : Graphique montrant le titre en pFD par rapport au CS en fonction de la proportion de plantes infectées par rapport au CS pour chacun des 28 <i>Vitis</i> testés.....	110
Figure 37 : Pourcentage de survie des insectes <i>S.titanus</i> après 7 jours passés sur la partie Chardonnay greffée sur différents porte-greffes.	112
Figure 38 : Quantification des phytoplasmes dans les parties Ch en contact avec les insectes <i>S. titanus</i> infectieux et greffées sur différents porte-greffes (Sau, CS, CF, M, Mag et Ch), 15 spt	113
Figure 39 : Quantification des phytoplasmes dans les parties aériennes des porte-greffes (Sau, CS, CF, M, Mag et Ch) infectés <i>via</i> un greffon Ch, 15 spt.....	114
Figure 40 : Titre en phytoplasmes dans les racines des différents porte-greffes (Sau, CS, CF, M, Mag et Ch) infectés <i>via</i> un greffon 15 spt	115
Figure 41 : Pourcentage de survie des insectes <i>S.titanus</i> mis en contact pendant 7 jours sur une feuille des plantes de cépages Sau, Mag ou CF.....	118
Figure 42 : Schéma des plantes inoculées sur une feuille.....	119
Figure 43 : Titres en phytoplasmes dans les différentes parties des plantes CF, Mag et Sau inoculées sur une seule feuille 10 spt.....	120

Figure 44 : Présentation des différents critères de caractérisation de la sensibilité au pFD chez le CS et le M, ainsi que chez leurs parents (Sau, CF et Mag)	121
Table 5 : Résultats du génotypage des descendants issus du croisement Mag x CF (D1 à D13) au niveau de 20 locus microsatellites nucléaires réalisé par l'IFV	122
Figure 45 : Pourcentage de survie des <i>S.titanus</i> mis en contact avec 9 plantes de chacun des 13 descendant du croisement (D1 à D13), de leurs parents CF et Mag, de leur frère M et de la référence sensible CS pendant 7 jours	124
Figure 46 : Pourcentage de plantes infectées en fonction du nombre de plantes CS infectées 10 spt	125
Figure 47 : Titre en phytoplasmes moyen des plantes infectées des différents descendants (D1-D13), de leurs parents (CF et Mag), de leur frère (M) et de la référence CS en fonction du titre en pFD des plantes CS infectées 10 spt.....	126
Figure 48 : Titre en pFD dans les plantes infectées et pourcentage de plantes infectées des descendants, de leurs parents (CF et Mag) et de leur « frère » (M) par rapport au CS 10 spt.....	127
Figure 49 : Pourcentage de survie des <i>S.titanus</i> infectieux ou sains mis en contact pendant sept jours avec une feuille de CS ou de M	135
Figure 50 : Schéma des plantes inoculées sur une feuille et destinées aux analyses transcriptomiques	136
Figure 51 : Titres en phytoplasmes dans les différentes parties des plantes CS et M infectées dont la feuille inoculée est destinées aux analyses transcriptomique.....	137
Table 6 : Résultats du mapping des lectures de RNA-Seq de haute qualité de CS et M sur le génome du Pinot Noir.	138
Figure 52 : Répartition en catégories biologiques des gènes exprimés dans les différents échantillons (CS-S et CS-I, M-S et M-I) en utilisant les gènes homologues d' <i>A. thaliana</i> et le logiciel Panther.....	140
Figure 53 : Processus ou familles protéiques altérés dans le niveau d'expression des gènes chez le CS et le M infectés comparés au CS et M sains respectivement (Mapman).....	143
Figure 54 : Diagramme de Venn comparant les gènes impliqués dans la perception différentiellement exprimés entre le CS et le M après infection	144
Figure 55 : Diagramme de Venn comparant les gènes impliqués dans la perception différentiellement exprimés entre l'état sain et infecté	145
Figure 56 : Diagramme de Venn comparant les différentes conditions, les chiffres indiquent le nombre de gènes dérégulés.....	145
Table 7 : Expression différentielle de gènes impliqués dans la signalisation du calcium	147
Table 8 : Expression différentielle de gènes impliqués dans les réactions d'oxydo-réduction	148

Table 9 : Expression différentielle de gènes impliqués dans la biosynthèse ou la signalisation hormonale	150
Table 10 : Expression différentielle de gènes codant des facteurs de transcription	152
Table 11 : Expression différentielle de gènes impliqués dans le métabolisme secondaire.....	154
Table 12 : Expression différentielle de certains gènes impliqués dans la biosynthèse, la dégradation et les modifications de la paroi cellulaire.....	156
Table 13 : Expression différentielle de gènes codant des protéines PR	158
Table 14 : Expression différentielle de gènes impliqués dans la dégradation médiée par l'ubiquitine	159
Table 15 : Expression différentielle de gènes impliqués dans la photosynthèse et la chaîne respiratoire.....	160
Table 16 : Expression différentielle de gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés	161
Table 17 : Expression différentielle de gènes impliqués dans le métabolisme des carboxyhydrates et la glycolyse.	162
Table 18 : Expression différentielle des gènes par RT-PCR en temps réel et RNA-Seq	163
Figure 57 : Schéma des réactions différentielles observées chez le M-I comparées au CS-I suite à l'infection par le pFD	166
Figure 58 : Schéma des réactions différentielles observées chez le CS-I comparées au M-I suite à l'infection par le pFD	167
Table 19 : Couples d'amorces et conditions d'amplification utilisés pour amplifier les gènes <i>FTSH6-Flado_0067_0046</i> , <i>FTSH7-Flado_0234_0001</i> et <i>FTSH8-Flado_4539_0023</i>	188
Table 20 : Couples d'amorces et conditions d'amplification utilisés pour amplifier les différents gènes <i>FtsH</i> dont la séquence est incomplète	189
Table 21 : Couples d'amorces et conditions d'amplification utilisés pour vérifier l'efficacité du traitement DNase.....	195
Table 22 : Couples d'amorces et condition utilisés pour quantifier l'expression des différents gènes <i>FtsH</i>	197
Table 23 : Couples d'amorces et conditions utilisés comme témoins positifs de reverse-transcription des différents échantillons.....	198
Table 24 : Efficacité et couples d'amorces utilisées pour la préamplification et l'amplification des gènes vérifiés par RT-PCR en temps réel sur plaque.....	199
Table 25 : Composition du tampon de dilution et de la solution de détection.....	203
Annexe 1 : Expression différentielle de gènes codants des récepteurs kinases.....	230
Annexe 2 : Expression différentielle des gènes impliqués dans la biosynthèse, la dégradation et les modifications de la paroi cellulaire	232

Introduction

I) La Flavescence dorée

A) Généralités

La Flavescence dorée (FD) est une maladie à phytoplasmes affectant la vigne et transmise par une cicadelle vectrice, *Scaphoideus titanus* (Boudon-Padieu, 1996). Elle est apparue dans le Sud-Ouest de la France dans les années 1950, bien que des symptômes similaires aient été observés dans les années 1920, avant de s'étendre de manière épidémique (Caudwell, 1957, 1964). Cependant, la similitude des symptômes avec d'autres jaunisses et l'apparition tardive de méthodes fiables de détection (ELISA ou PCR) ne permettent pas de déterminer précisément l'apparition de la FD en Europe (Boudon-Padieu et al., 1989; Daire et al., 1997). Aujourd'hui, différents pays du pourtour méditerranéen sont touchés par cette maladie. Ces pays sont l'Autriche, la Croatie, l'Espagne, la France, la Hongrie, l'Italie, le Portugal, la Serbie, la Slovénie et la Suisse (Fig. 1) (Krnjajic et al., 2007; Steffek et al., 2007). En France, seules l'Alsace, la Lorraine et la Champagne-Ardenne ne sont pas touchées par la FD (EFSA Panel on Plant Health (PLH), 2014).



Figure 1 : Carte de l'Europe présentant les pays où la Flavescence dorée est présente en 2014 (en rouge).

Bien que pour les maladies à phytoplasmes, une origine virale des jaunisses ait d'abord été proposée, en 1967 une équipe a observé au microscope électronique des organismes ressemblant à des mycoplasmes dans les tubes criblés de plants de ronciars, de pommes de terre et de pétunias atteints de jaunisse, puis en 1971 dans les tissus de vignes présentant des symptômes de Flavescence Dorée (Caudwell, 1957, 1971; Doi et al., 1967). D'abord appelés MLO (Mycoplasma Like Organism), ces bactéries ont ensuite été appelées *Candidatus Phytoplasma*, sur une proposition de Murray et Schleifer en 1994 (Murray and Schleifer, 1994).

1) Symptômes de la Flavescence dorée

Comme toutes les jaunisses à phytoplasmes, des désordres de l'appareil végétatif et reproducteur causés par des défauts d'alimentation ou un déséquilibre hormonal sont observés. Ils se traduisent par une coloration anormale des feuilles, rouge ou jaune selon le cépage avec un enroulement vers le bas, un dessèchement des inflorescences ou un flétrissement des baies ainsi qu'un défaut d'aoûtement des bois conduisant au dépérissement d'une partie ou de la totalité du pied malade (Fig. 2) (Boudon-Padieu, 1996). Ces symptômes sont aussi ceux provoqués par d'autres phytoplasmes tel que le phytoplasme du stolbur, '*Candidatus Phytoplasma solani*'. Les symptômes de la Flavescence Dorée apparaissent généralement l'année suivant l'inoculation par l'insecte vecteur.

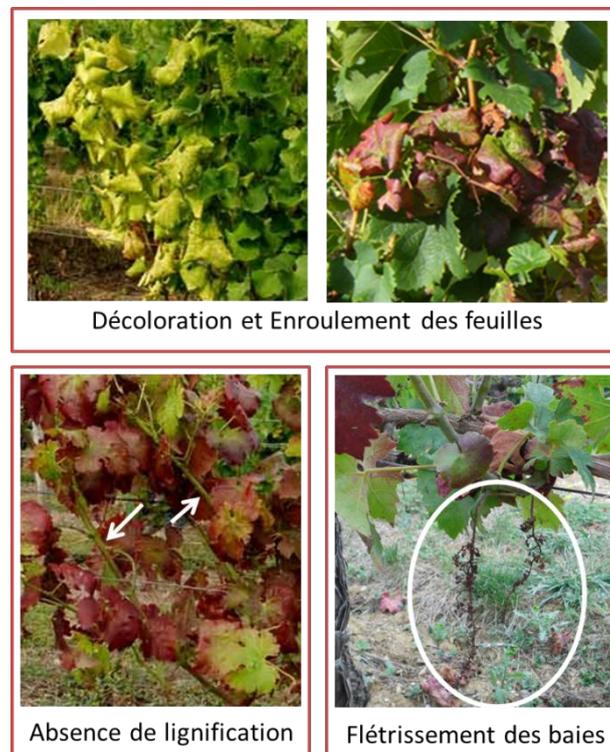


Figure 2 : Symptômes de Flavescence Dorée sur des plants de vigne (Photos : UMR 1332)

L'apparition et la sévérité des symptômes varient en fonction de la sensibilité du cépage. En effet, même si tous les cépages sont sensibles à la Flavescence Dorée, ils manifestent des degrés divers de sensibilité caractérisés par la sévérité des symptômes, le nombre de plantes infectées ou le titre en phytoplasmes (Boudon-Padieu, 1996; Eveillard et al., 2016). Par exemple, le Cabernet-Sauvignon présente un titre en phytoplasmes, un pourcentage de pieds infectés et des symptômes sévères, contrairement au Merlot. De plus chez les porte-greffes, la charge en bactéries peut être très importante comme chez le 3309 Couderc (3309) ou le Sélection Oppenheim 4 (SO4), sans que ceux-ci ne manifestent de symptômes (Eveillard et al., 2016). Ces pieds infectés mais non symptomatiques ne sont pas repérés et sont des sources potentielles de contamination.

2) Hypothèse sur l'origine de la FD

La question de l'origine de la Flavescence Dorée s'est posée : le phytoplasme de la FD (pFD) a-t-il été importé ou était-il déjà présent sur le territoire européen ? Suite à la crise du phylloxéra à la fin du 19^{ème} siècle qui a dévasté la viticulture française, de nombreux plants de *Vitis* américains ont été importés des Etats-Unis. Ces plants auraient pu être porteurs du pFD, cependant aucune épidémie de Flavescence Dorée n'a jamais été observée dans le vignoble nord-américain malgré la découverte d'un phytoplasme du même groupe que le phytoplasme de la FD (pFD) en Floride (Harrison et al., 2001). En revanche certains isolats de phytoplasmes présents dans les aulnes ou les clématites en Europe sont proches voire identiques au pFD (Angelini et al., 2004; Arnaud et al., 2007; Filippin et al., 2009; Maixner et al., 2000). Ainsi deux isolats du pFD, FD1 et FD2, ont été retrouvés dans des aulnes européens en dehors de zones viticoles. Une des hypothèses est que la cicadelle *Oncopsis alni* présente sur ces arbres aurait accidentellement pu les transmettre à la vigne, la dispersion de vigne à vigne étant par la suite assurée par *Scaphoideus titanus*, vecteur du phytoplasme et inféodé à la vigne. De même, un troisième isolat du pFD nommée FD3 a été retrouvé dans des clématites situées à proximité ou non de parcelles de vignes touchées par la FD. Des insectes de la famille des Dictyopharidae ainsi que des *S.titanus* étaient présents sur ces même plantes. Ces constatations sont en faveur d'une origine européenne du phytoplasme responsable de la FD qui aurait été transmis accidentellement à la vigne par des insectes non inféodés à la vigne. C'est l'importation depuis les Etats-Unis de l'insecte vecteur *S.titanus* capable de transmettre le phytoplasme qui aurait provoqué l'épidémie de cette maladie en France et en Europe.

B) L'hôte végétal : la vigne

1) Généralités

La vigne fait partie des cultures fruitières les plus importantes du monde avec plus de 7,5 millions d'hectares, principalement répartis entre l'Europe (54%), l'Asie (24%) et l'Amérique (14%) (<http://www.oiv.int/fr>). Cette culture permet l'obtention de raisin pouvant être consommé en tant que fruit mais aussi être transformé en produits à forte valeur ajoutée tels que le vin, le champagne et le cognac. La France est le 2^{ème} vignoble mondial après l'Espagne, avec une superficie de 786 000 hectares, soit 3% des terres arables de France, le 3^{ème} exportateur de vin en volume après l'Espagne et l'Italie mais le 1^{er} en valeur (<http://www.oiv.int/fr>). En France, la récolte 2016 est de 41,9 millions d'hectolitres de vin dont 7,2 millions d'hectolitres en Nouvelle-Aquitaine soit 960 millions de bouteilles correspondant à 11,6 milliards d'euros en valeur ajoutée (Fig. 3) (<https://www.insee.fr>).

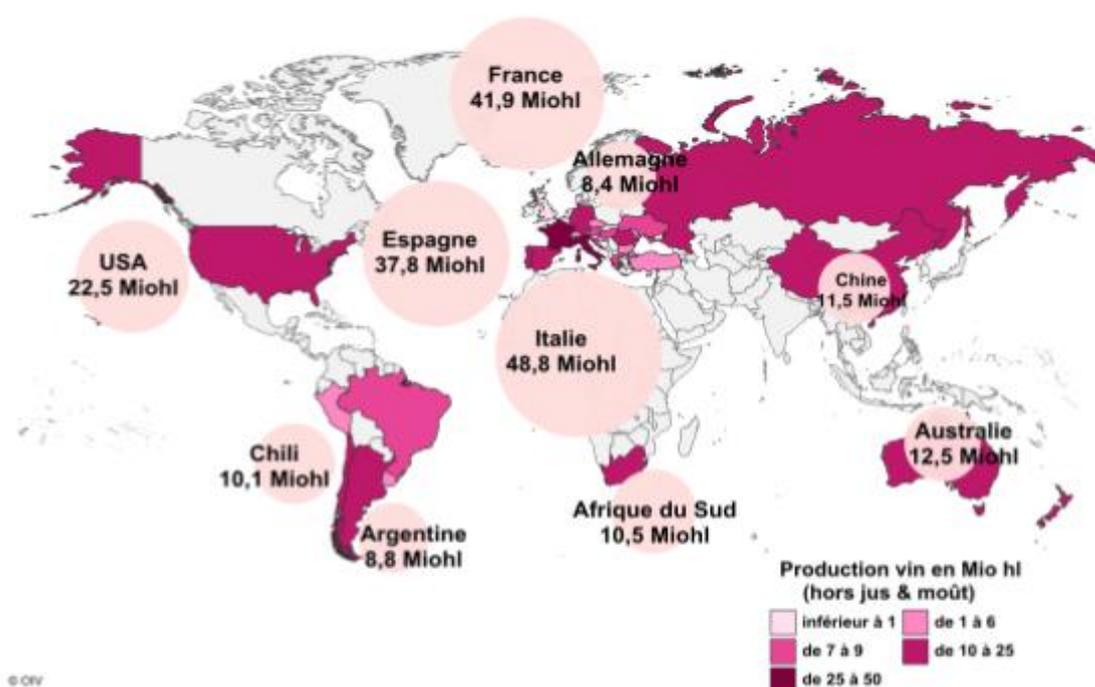


Figure 3 : Production de vins dans le monde en 2016 en millions d'hectolitres (Miohl) (d'après <http://www.oiv.int/fr>)

La vigne est une plante ligneuse et pérenne appartenant à la famille des Vitacées qui comprend 19 genres, dont le genre *Vitis*. La plupart des espèces cultivées appartiennent au sous-genre *Euvitis* et sont classés en trois groupes en fonction de leur origine géographique : américaine,

asiatique et européenne qui comprend l'espèce *vinifera* (Huglin and Scheider, 1998; Reynier, 2016). La vigne développe un système racinaire qui colonise le sol et un système aérien composé de sarments portant des rameaux fructifères ou non (Fig. 4). Ces rameaux fructifères portent le système reproducteur avec les inflorescences dont les stades de développement sont décrits dans l'échelle BBCH (Biologische Bundesanstalt bundessortenamt and CHemical industry) (<http://www.vignevin.com>). Cette dernière emploie un système de code universel décimal subdivisé en stades de croissance principaux et secondaires (Fig. 5). Les feuilles de l'appareil végétatif ont une disposition alternée et opposée à 180° et sont composées du limbe rattaché au rameau par le pétiole (Fig. 6). La forme, la villosité et la dimension du limbe composé de 5 nervures et la longueur du pétiole sont différentes selon les cépages et servent de critères pour leur reconnaissance.

En France, les vignes ont longtemps été plantées franches de pied c'est-à-dire non greffées. Suite à la crise du phylloxéra, les cépages européens sont aujourd'hui portés par des porte-greffes d'espèces américaines. En effet, ces derniers confèrent au cépage une résistance au phylloxéra.



Figure 4 : Présentation de vigne exempte de maladie dans le vignoble bordelais (Photos : UMR 1332)



Figure 5 : Exemples de différents stades phénologiques de la vigne en suivant l'échelle Baggiolini (A à O) et l'échelle BBCH (Biologische Bundesanstalt bundessortenamt and CHEmical industry) (00 à 99) (<http://www.vignevin.com>)

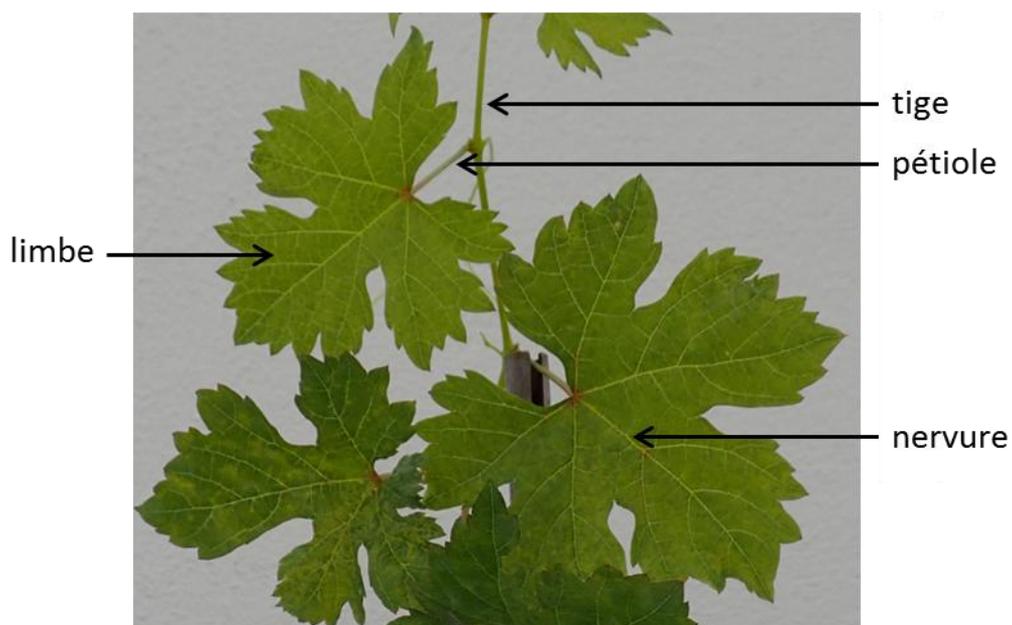


Figure 6 : Présentation de feuilles de M (Merlot). Le limbe composé de 5 nervures et 5 lobes est rattaché à la tige par le pétiole.

2) Cycle de développement de la vigne

Le cycle végétatif de la vigne se déroule sur un an (Baggiolini, 1952) (Fig. 7).

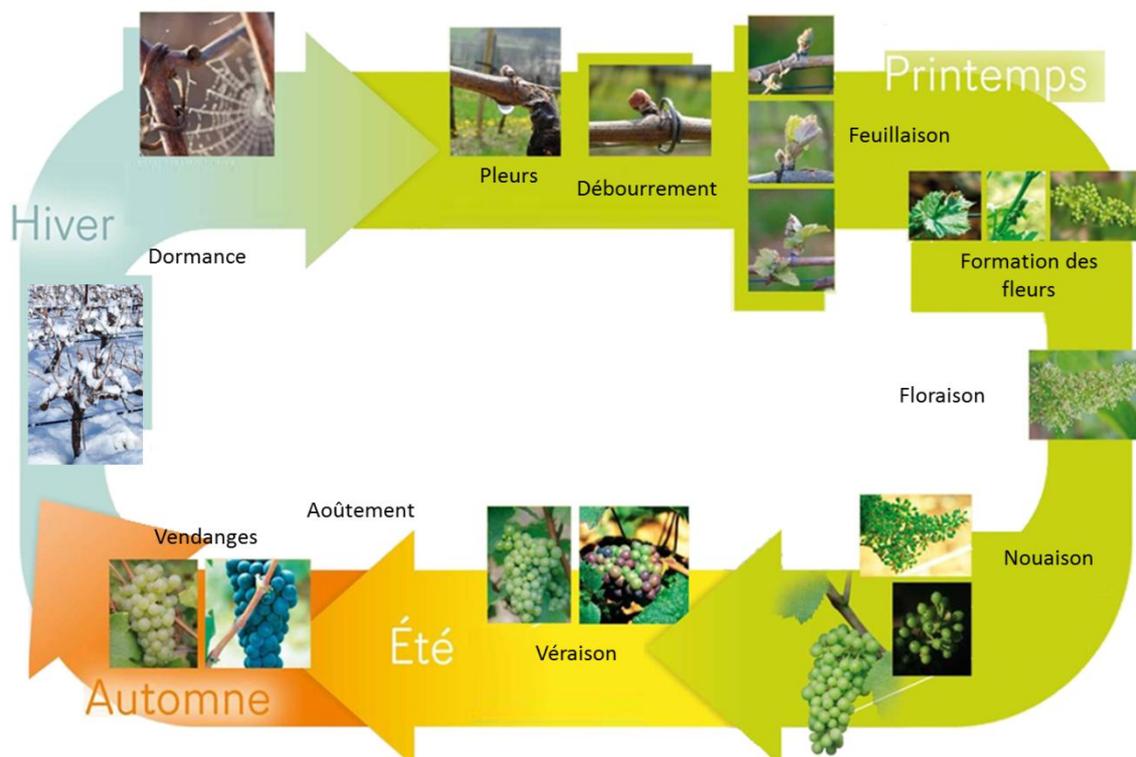


Figure 7 : Cycle végétatif de la vigne (<https://www.vins-bourgogne.fr>)

La vigne est une espèce ligneuse à feuille caduque de zones tempérées subissant une dormance végétative de novembre à mars qui lui permet de survivre aux conditions hivernales. La dormance des bourgeons est contrôlée génétiquement, naturellement induite par la photopériode et la température, et généralement levée après exposition à des températures froides (Horvath et al., 2003). Après cette période, l'apparition de pleurs, écoulement de sève brute à la surface des plaies de taille, indique la reprise de l'activité de la plante. Début avril, le débourement des bourgeons marque le début de la croissance des rameaux. La feuillaison a lieu début mai et la floraison début juin, suivie par la nouaison, transformation des fleurs en fruits. Les baies mûrissent avec accumulation d'eau et de sucres, ainsi qu'une diminution de l'acidité pour enfin être récoltées en septembre. D'août à septembre, les rameaux herbacés se lignifient, ce qui correspond à l'aoûtement. Les réserves de la plante s'accumulent alors dans le bois et permettent la reprise du cycle végétatif l'année suivante, après la dormance.

3) Les cépages

Un cépage est une variété de vigne produisant du raisin considérée pour ses caractéristiques (<http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais>).

Les différents cépages se distinguent par la forme de leurs feuilles, des grappes, la couleur des raisins, les arômes... Ils ont évolué au fil des siècles et diffèrent parfois en fonction des régions afin de s'adapter au sol, au climat et aux méthodes culturales. Dans le Bordelais, l'élaboration des vins est principalement réalisée à partir des cépages Merlot, Cabernet-Sauvignon et Cabernet-Franc pour les rouges, et Sémillon, Sauvignon Blanc et Muscadelle pour les blancs (<https://www.bordeaux.com>).

Le Cabernet-Sauvignon (CS), vieux cépage bordelais est un croisement entre le Cabernet-Franc (CF) et le Sauvignon blanc (Sau) (Fig. 8). Il représente 23% de l'encépagement des cépages noirs correspondant à 30 000 ha en Nouvelle-Aquitaine. Des notes de fruits noirs, cassis, réglisse et menthe sont caractéristiques des vins composés à partir de ce cépage. Il se caractérise par une faible sensibilité à la pourriture grise, mais une grande sensibilité à l'oïdium, aux maladies du bois (eutypiose, esca), au mildiou et à la Flavescence Dorée (Table 1) (<http://ephytia.inra.fr/fr>, <http://plantgrape.plantnet-project.org/fr>) (Boudon-Padieu, 1996; Eveillard et al., 2016). Son origine bordelaise et sa forte sensibilité à la Flavescence Dorée explique pourquoi ce cépage est étudié au laboratoire dans les expériences relatives à cette maladie.

	Pourriture Grise	Oïdium	Eutypiose/ESCA	Mildiou	FD
CS	-	++	++	+	++
M	-	-	-	+	-
Ch	+	+	+	+	++
Mag	NR	NR	NR	NR	-
Sau	+	+	+	+	++
CF	-	+	-	+	+

Table 1 : Sensibilité des différents cépages étudiés à 5 maladies (- : peu sensible, + : moyennement sensible, ++ : très sensible) (NR : non renseigné)

Le Merlot (M) également très répandu dans la région bordelaise (65% de l'encépagement des cépages noirs avec 65 000 ha), est issu du croisement entre le Cabernet-Franc (CF) et la Magdeleine Noire de Charentes (Mag) (Fig. 8) (<https://www.bordeaux.com>) (Boursiquot et al., 2009). Son nom vient de sa ressemblance avec le plumage du merle (couleur bleu-noir). Il a eu plusieurs appellations : merlau, plant médoc, sémillon rouge, béguey, picard, alicante, crabutet noir. Il apporte aux vins des arômes de fruits rouges charnus comme la prune, la figue et souvent des notes grillées après quelques années. Il est sensible au mildiou mais peu sujet à l'oïdium, à la pourriture grise et aux maladies du bois (Table 1) (<http://plantgrape.plantnet-project.org/fr>). Contrairement à son demi-frère le CS, le M est peu sensible à la Flavescente Dorée (Eveillard et al., 2016). L'étude de cette différence de sensibilité à la FD entre ces deux cépages bordelais fait l'objet de ce travail.

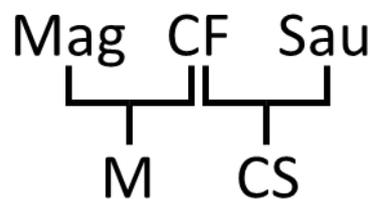


Figure 8 : Généalogie du CS et du M (Mag : Magdeleine Noire des Charentes, M : Merlot, CF : Cabernet-Franc, CS : Cabernet-Sauvignon et Sau : Sauvignon)

Le Chardonnay (Ch), d'origine bourguignonne, provient d'un croisement entre le Pinot noir et le Gouais blanc (<https://www.vins-bourgogne.fr>). Le Chardonnay se caractérise par des notes florales, d'agrumes et parfois minérales (<https://www.champagne.fr>). L'oïdium, la pourriture grise, le mildiou, les maladies du bois ou la Flavescente Dorée peuvent générer des dommages importants chez ce cépage (Table 1) (<http://plantgrape.plantnet-project.org/fr>) (Eveillard et al., 2016). Sa forte sensibilité à la Flavescente Dorée sera utilisée dans nos expériences afin d'infecter par greffage les cépages bordelais (CS et M), ainsi que leurs parents (Cabernet-Franc, Magdeleine Noire des Charentes et Sauvignon).

La Magdeleine Noire des Charentes (Mag) est l'un des parents de différents cépages qui sont le Merlot (M), le Malbec ou Côt, l'Abouriou et le Mourtès noir (Boursiquot et al., 2009). Ce cépage non cultivé aujourd'hui est conservé au Centre de Ressources Biologiques de la Vigne (CRB-Vigne) de Vassal-Montpellier ainsi qu'au Conservatoire du Vignoble Charentais à Cherves Richemont près de Cognac et 4 pieds sont également présents sur le centre INRA de Bordeaux. La Mag est peu sensible à la Flavescente Dorée (Eveillard et al., 2016).

L'origine probable du **Sauvignon blanc (Sau)** est le centre ou le sud-ouest de la France. Il recouvre 5 000 ha, soit 43% de l'encépagement des cépages blancs dans le vignoble bordelais. Ce cépage est sensible à la pourriture grise, à l'oïdium, au mildiou et aux maladies du bois

(<http://plantgrape.plantnet-project.org/fr>). C'est l'un des parents du CS et comme lui, il est très sensible à la Flavescence Dorée (Fig. 8 et Table 1) (Eveillard et al., 2016). C'est le cépage de référence dans le bordelais pour les vins blancs secs dans lesquels il apporte des notes d'agrumes, de buis et de feuilles de figuier.

Le Cabernet-Franc (CF), cépage probablement originaire du Sud-Ouest de la France, est un des parents du CS et du M (Fig. 8) (<https://www.bordeaux.com>). Il est très sensible au mildiou et à l'oïdium et moyennement sensible à la pourriture grise, à l'esca, à l'eutypiose et à la Flavescence Dorée (Table 1) (<http://ephytia.inra.fr/fr>, <http://plantgrape.plantnet-project.org/fr>) (Eveillard et al., 2016). Il apporte des notes de framboises et de violette dans les vins. En Nouvelle-Aquitaine, 14 000 ha de CF sont plantés, soit 10% des cépages noirs.

Tous les cépages décrits ont fait l'objet d'expérimentation lors de ce travail.

4) Données de génomique

Le génome nucléaire de *Vitis vinifera* est diploïde ($2n = 38$ chromosomes) et de petite taille comparé à d'autres plantes cultivées comme la tomate (1 000 Mpb) ou le blé (16 000 Mpb) (Morrell et al., 2012). En effet, sa taille est donnée entre 487 et 489 Mpb à partir des séquençages du Pinot Noir obtenus en 2007 (Jaillon et al., 2007; Velasco et al., 2007). La nouvelle version de la séquence de référence disponible sur le site de genoscope donne une taille de 470 Mpb (www.genoscope.cns.fr/externe/GenomeBrowser/Vitis). Ainsi, le nombre de gènes, d'abord estimé à 30 434 (Jaillon et al., 2007) est revu à la baisse (26 346 gènes) sur la séquence de référence.

5) Les principales maladies de la vigne

En Europe, un grand nombre de maladies est observé chez la vigne. Les principales maladies sont causées par des ravageurs (phylloxera, eudémis), des virus (court-noué), des champignons (mildiou, oïdium) ou des bactéries (Flavescence Dorée, Bois Noir) (Fig. 9). Le manque à gagner est estimé à environ un milliard d'euros/an en France (Quéré and Sermier, 2015).

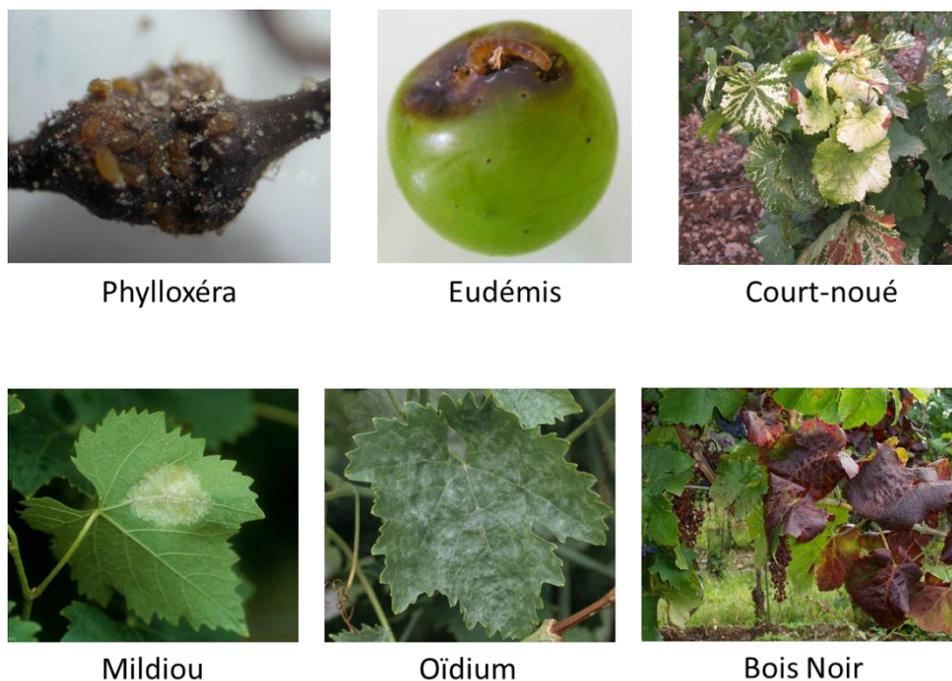


Figure 9 : Présentation des symptômes des principales maladies de la vigne (Photos : <http://ephytia.inra.fr/fr>)

L'insecte *Daktulosphaira vitifoliae* est responsable de l'épidémie de **phylloxéra** du XIX^{ème} siècle qui ravagea les vignobles français. Sur les vignes *Vitis vinifera*, les attaques sur les parties aériennes sont rares mais se produisent fréquemment sur les racines qui présentent des nodosités et des tubérosités, conséquences de la piqûre des femelles. C'est à ce niveau que se produisent des fissures qui favorisent l'entrée de microorganismes causant la mort du cep.

La chenille de l'insecte *Lobesia botrana*, aussi appelé **eudémis** est un ravageur de la vigne. Elle s'attaque principalement aux baies de raisin qu'elle mord et perfore, favorisant le développement d'autres maladies. Les attaques de cet insecte peuvent avoir un impact important sur la récolte, mais également sur la qualité du vin. Des traitements ovicides et larvaires peuvent être appliqués en fonction de la pression du ravageur.

En France, le **court-noué** est causé par deux virus : le Grapevine fan leaf virus (GFLV) et l'Arabis mosaic virus (ArMV) transmis par les nématodes *Xiphinema index* et *Xiphinema diversicaudatum* respectivement ou par greffe de matériel végétal infecté. Les vignobles infectés montrent une gamme de symptômes foliaires comme des panachures ou des mosaïques de couleur jaune d'or le long des nervures puis sur tout le limbe de la feuille ou des asymétries du limbe avec parfois de nombreuses nervures. Les grappes peuvent également être affectées avec la chute des fleurs ou des jeunes fruits (coulures) et un défaut de maturation de la vigne (millerandage) ce qui a des conséquences sur la qualité et le rendement des récoltes. Aucun vignoble français n'est épargné

par le court-noué et aucune méthode curative n'existe. La lutte repose sur une dévitalisation des ceps au glyphosate avant arrachage de toutes les racines afin d'éviter de laisser des fragments propices à la survie des nématodes ainsi qu'une mise au repos du sol pendant 7 à 10 ans ou un traitement anti-nématode (Quéré and Sermier, 2015) (<http://ephytia.inra.fr/fr>).

Le champignon *Plasmopara viticola* est responsable du **mildiou** chez la vigne et se développe sur tous les organes aériens et en particulier les jeunes feuilles. Un duvet blanc se développe sur la face inférieure des feuilles provoquant une nécrose et un dessèchement. *Erysiphe necator*, agent pathogène responsable de l'**oïdium**, s'attaque aux parties vertes de la vigne et en particulier les feuilles. Il provoque l'apparition de tâches poudreuses, blanc-grisâtres sur les feuilles et en l'absence de traitement, il s'attaque aux inflorescences et diminue le rendement des vignes. Afin de lutter préventivement contre ces 2 maladies, un effeuillage des pieds est réalisé pour diminuer l'humidité. Tous les vignobles français sont touchés par ces deux maladies qui sont traités par des fongicides.

Le Bois Noir (BN) et la **Flavescence Dorée (FD)** sont causés par des phytoplasmes, '*Candidatus phytoplasma solani*' et le phytoplasme de la FD (pFD) respectivement. Les symptômes provoqués par ces deux maladies sont identiques, seul un test moléculaire permet de les distinguer. Ils diminuent le rendement en provoquant le dessèchement des grappes. La lutte contre la FD s'organise avec une prospection des parcelles afin de repérer les pieds malades, l'arrachage des vignes infectées et des traitements insecticides pour lutter contre l'insecte vecteur. Contrairement à la FD, il n'existe pas de lutte obligatoire contre le BN sauf si l'arrêté préfectoral organise conjointement la lutte contre la FD et le BN.

C) La bactérie responsable : le phytoplasme

Après la vigne, un autre partenaire du pathosystème étudié ici est le phytoplasme de la FD (pFD). Les phytoplasmes appartiennent à la classe des *Mollicutes* et sont responsables de centaines de maladies dans le monde entier limitant la production de nombreuses cultures d'importance économique (Lee et al., 2000).

1) Généralités sur les *Mollicutes*

Les *Mollicutes* sont des eubactéries présentes chez l'Homme, les animaux, les insectes et les plantes. Un grand nombre d'entre elles sont pathogènes. On compte parmi elles, l'agent de la pneumonie humaine (*Mycoplasma pneumoniae*) et de la péri-pneumonie contagieuse bovine (*Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides*), ainsi que des maladies aviaires. Elles se caractérisent par

une absence de paroi bactérienne d'où provient leur nom (Mollis cutis = peau molle), une petite taille, un génome réduit (de 530 à 2200 kpb) à faible pourcentage en bases GC (entre 24 et 40%) et des voies métaboliques simplifiées (Sirand-Pugnet et al., 2007). Ce sont les plus petites bactéries capables de répllication autonome en milieu acellulaire (Christensen et al., 2005). Ces bactéries dépourvues de paroi bactérienne sont donc résistantes à la pénicilline mais sont sensibles aux antibiotiques dérivés de la tétracycline qui inhibent la synthèse protéique (Tully et al., 1993). Dans les années 1980, les analyses comparatives des séquences d'ADNr 16S ont montré que ces bactéries forment un groupe phylogénétique homogène issu d'un ancêtre commun et sont proches des eubactéries à gram positif avec une faible teneur en bases GC comme *Bacillus*, *Streptococcus* ou *Clostridium* (Weisburg et al., 1989; Woese, 1987). Cette classe de bactéries se scinde en deux : la branche SEM et la AAP. La branche SEM comporte les spiroplasmes, les mésoplasmes, les ureaplasmes et les mycoplasmes et ont pour particularité que le codon stop UGA code pour un tryptophane. La branche AAP regroupe les acholeplasmes, les anaeroplasmes, les asteroleplasmes et les phytoplasmes (Fig. 10) (Sirand-Pugnet et al., 2007). Leur évolution par perte de gènes et diminution de la taille de leurs génomes ne doit pas être étrangère à leur incapacité à synthétiser la paroi bactérienne ainsi qu'à leur adaptation à des niches écologiques particulières comme le phloème (Razin et al., 1998).

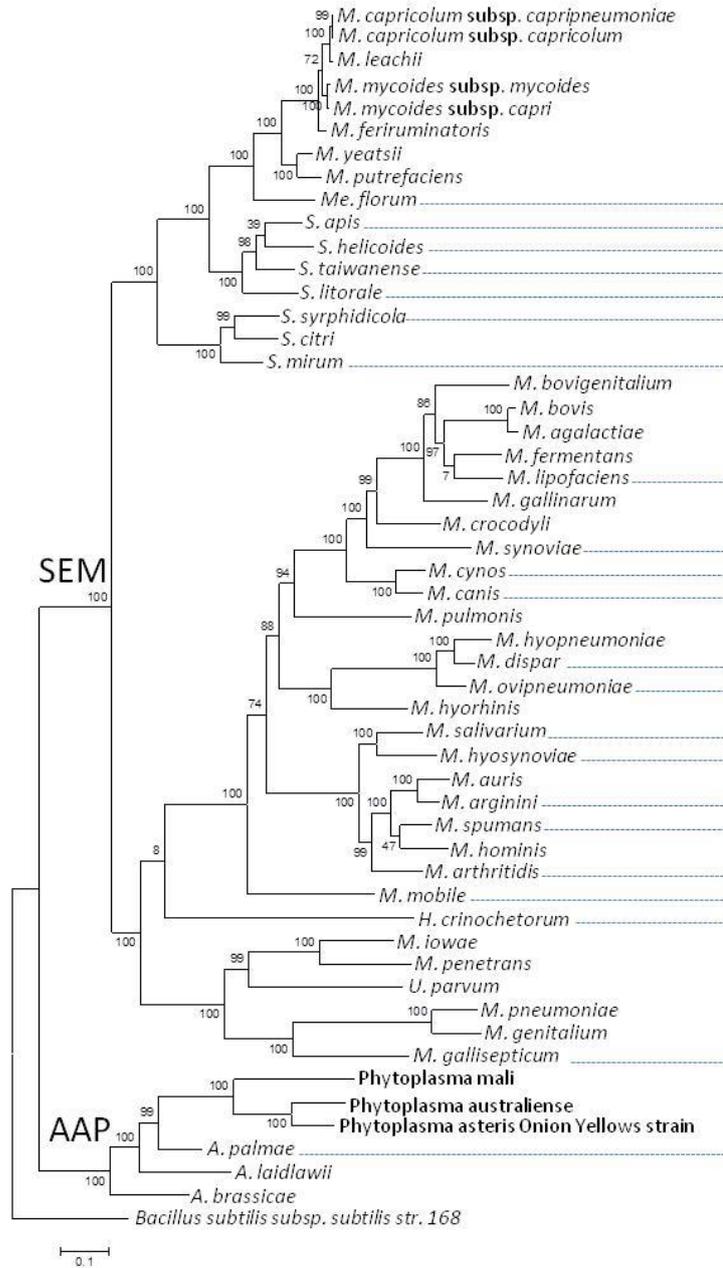


Figure 10 : Arbre phylogénétique des *Mollicutes*. L'arbre phylogénétique a été généré en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance à partir des alignements de séquences multiples de 50 protéines orthologues (UMR 1332, Pascal Sirand-Pugnet)

2) Les phytoplasmes

Les phytoplasmes sont des *Mollicutes* phytopathogènes transmis par des insectes, associés à des centaines de maladies touchant une multitude d'espèces de plantes réparties dans le monde entier y compris les plantes ornementales, les cultures maraîchères, les arbres fruitiers ou non. Les plantes infectées par les phytoplasmes présentent des symptômes qui suggèrent des perturbations importantes dans l'équilibre des hormones végétales ou des régulateurs de croissance (Lee et al., 2000). Les symptômes touchent les parties végétatives avec des aberrations de croissance, des jaunisses et des malformations, mais également les parties reproductives où peuvent être observées une stérilité, une virescence (développement des fleurs vertes et la perte de pigments floraux), une phyllodie (prolifération des pousses axillaires et développement des éléments floraux dans les structures feuillues) ou la prolifération des pousses auxiliaires, ce qui entraîne une apparence de balai de sorcière. Les symptômes induits chez les plantes malades varient avec le phytoplasme. Les pertes économiques causées par les infections phytoplasmiques vont de la réduction partielle du rendement et de la qualité à la perte de récolte presque totale.

Les phytoplasmes se multiplient dans le phloème des plantes et dans les insectes piqueurs-suceurs de phloème qu'ils infectent (Christensen et al., 2005). Leur génome de faible taille et avec un nombre de gènes réduits explique qu'ils ne peuvent assurer toutes les voies métaboliques essentielles à leur survie et qu'ils sont des parasites obligatoires. Malgré de nombreuses tentatives, les phytoplasmes sont aujourd'hui considérés comme non cultivés sur milieu axénique (Contaldo et al., 2012). Ils ne peuvent donc pas vérifier le postulat de Koch puisque l'origine de la maladie ne peut être prouvée, un insecte étant nécessaire à l'inoculation.

Les phytoplasmes ont d'abord été classés en fonction de la maladie dont ils étaient responsables et aujourd'hui une classification basée sur la variabilité de l'ADNr 16S est utilisée. Les phytoplasmes sont classés en 33 groupes en fonction de l'analyse RFLP d'un fragment de gène codant l'ARNr 16S de 1,25 kpb amplifié par PCR (fragment F2nR2) en utilisant un ensemble d'enzymes de restriction (Zhao and Davis, 2016). Pour décrire un nouveau sous-groupe, la séquence du fragment F2nR2 de l'ADNr 16S doit présenter une identité inférieure à 97,5% avec tous les profils des sous-groupes précédemment établis ou respecter trois autres conditions : avoir des hôtes et des vecteurs différents et présenter des différences au niveau moléculaire (IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team--Phytoplasma Taxonomy Group, 2004). Ainsi '*Candidatus* phytoplasma solani' responsable du stolbur appartient au groupe 16SrXII et le phytoplasme de la FD au groupe 16SrV (Fig. 11).

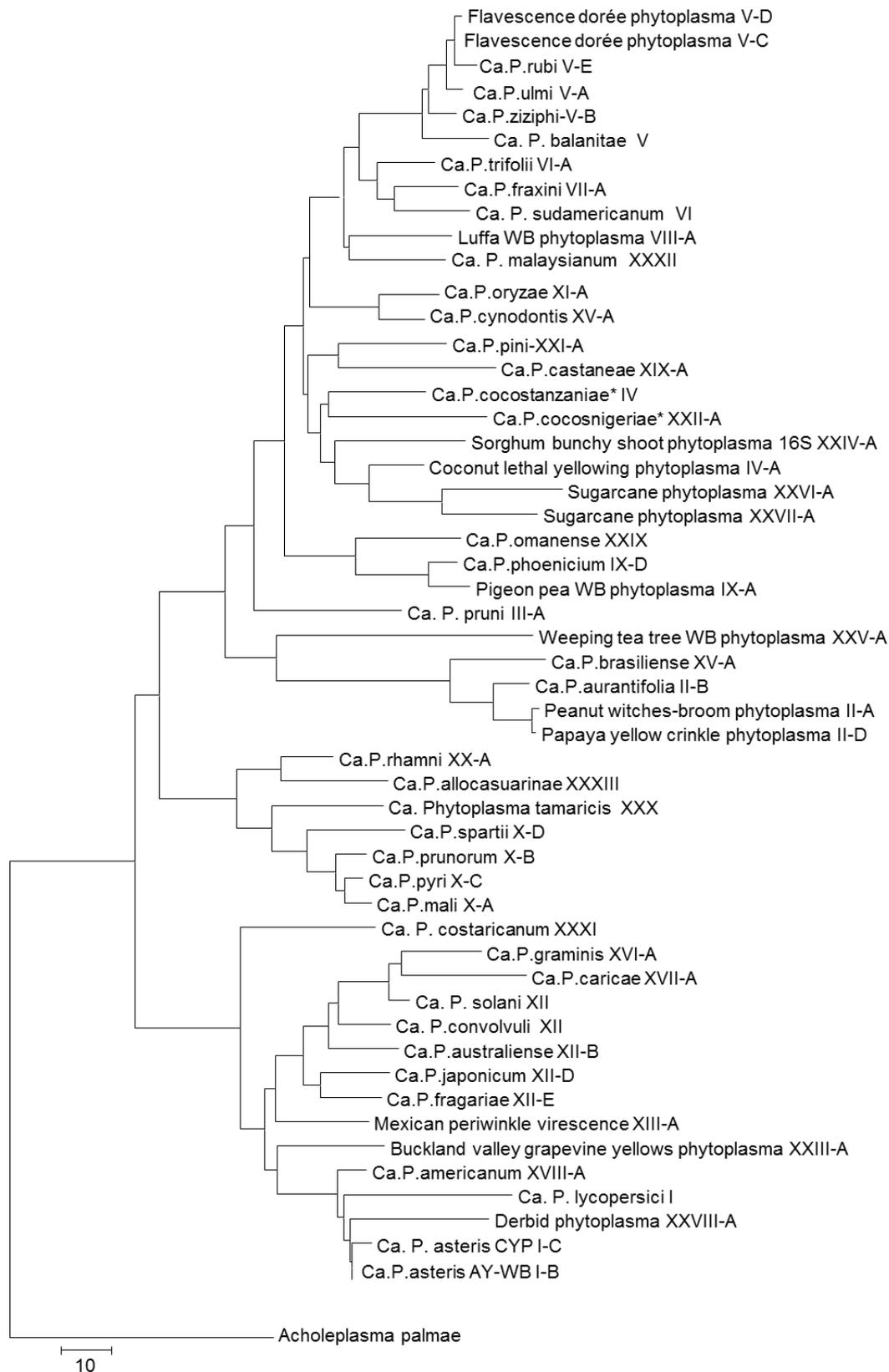


Figure 11 : Arbre phylogénétique des phytoplasmes avec le nom des groupes en chiffres romains à partir de l'alignement des ARNr16S avec la méthode neighbour joining (UMR 1332)

3) Phytoplasme de la Flavescence Dorée

Le phytoplasme de la Flavescence Dorée (pFD) appartient au groupe ribosomique des « Elm Yellows », EY ou 16SrV. Son génome a une taille de 671 ± 14 kpb avec 21,1% de GC, ce qui le classe parmi les plus petits génomes de phytoplasmes (Malembic-Maher et al., 2008). Il a été séquencé par pyroséquençage et séquençage SOLEXA et annoté en partie par annotation semi-automatique sur la plateforme iANT (Xavier Foissac, communication personnelle). Il comprend 2 opérons d'ARNr, 27 ARNt et environ 464 CDS. La plupart des régions codantes (38%) participe au transfert de l'information c'est-à-dire la réplication, la transcription et la traduction. D'autres gènes (19%) sont impliqués dans le métabolisme et 27% dans la dégradation des protéines, dont 15 copies, souvent tronquées, de gènes codant des protéases de surface de type FtsH (Carle et al., 2011).

Le pFD regroupe 3 isolats : FD1 (16SrV-C), FD2 (16SrV-D) et FD3 (16SrV-C) qui sont retrouvées en France et en Italie. Ces isolats sont discriminés les uns des autres par un typage moléculaire sur deux loci génétiques différents : *uvrB-degV* et *secY*. La comparaison de séquences d'échantillons de plantes infectées par le pFD ainsi que des analyses phylogénétiques ont mis en évidence l'existence de ces 3 groupes d'isolat de FD chez la vigne, l'aune, l'orme et le roncier (Arnaud et al., 2007).

La présence du pFD dans des plantes (clématites et aulnes) et des insectes (*Oncopsis alni* et *Dictyophara europea*) du compartiment sauvage ainsi que leur présence sur la vigne suggèrent un transfert de ces bactéries du compartiment sauvage vers la vigne (Angelini et al., 2004; Arnaud et al., 2007; Filippin et al., 2009; Maixner et al., 2000). *Scaphoideus titanus*, insecte vecteur inféodé à la vigne aurait ensuite entretenu le cycle de transmission.

D) L'hôte insecte : *Scaphoideus titanus*

1) Généralités

Le dernier partenaire du pathosystème à décrire est l'insecte vecteur, *Scaphoideus titanus*, un hémiptère de la famille des Cicadellidae (Fig. 12). En Europe, le genre *Scaphoideus* ne présente qu'une seule espèce, *titanus*. Cet insecte d'origine nord-américaine aurait été introduit en Europe par des bois porteurs d'œufs, importés afin de replanter les vignes après la crise du phylloxéra (Chuche and Thiéry, 2014).



Figure 12 : Photographie d'un *Scaphoideus titanus* adulte à la loupe (Photos : UMR 1332)

Afin de se nourrir, ces insectes piquent dans les vaisseaux conducteurs de sève, et préférentiellement de phloème, mais c'est comme vecteur du phytoplasme de la FD qu'il transmet selon le mode persistant-circulant-multipliant que *S.titanus* est nuisible. En effet, une fois infecté, il le reste toute sa vie. Une fois le pathogène ingéré, il traverse la barrière intestinale, gagnent l'hémolymphe et les glandes salivaires, et il se multiplie (Introduction, I, E).

2) Répartition géographique

L'insecte vecteur responsable de l'épidémie de Flavescence Dorée a été découvert dans le vignoble bordelais en 1958. Les populations étaient alors peu abondantes et restaient cantonnés au Sud-Ouest de la France. Dans les années 1960, *S.titanus* s'est répandu jusqu'en Charentes et en Italie du Nord. Aujourd'hui, ce vecteur est présent du Portugal à la Serbie d'Ouest en Est et de la Champagne en France aux Pouilles en Italie du Nord au Sud (Fig. 13) (Chuche and Thiéry, 2014).

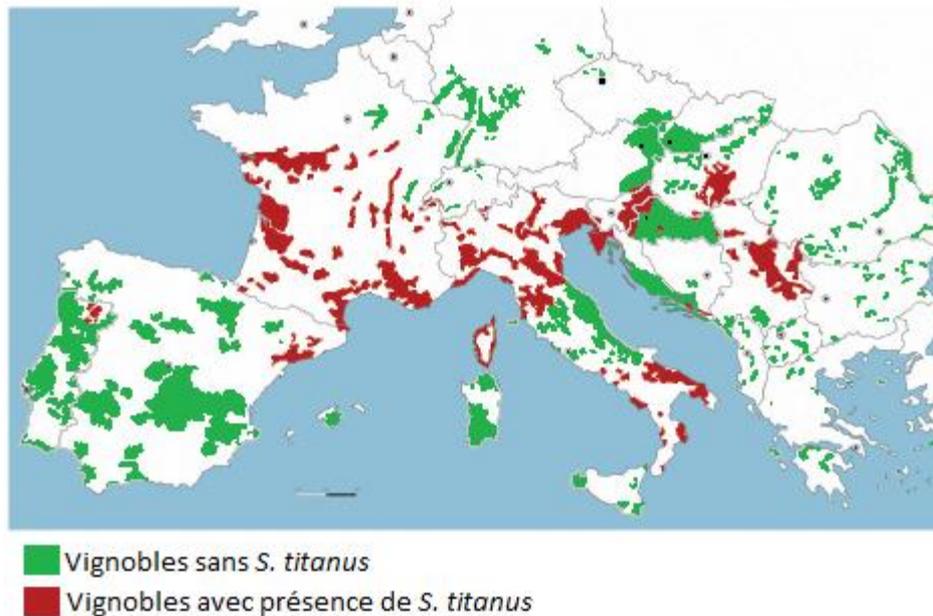


Figure 13 : Aire de répartition de l'insecte vecteur de la Flavescence Dorée, *S.titanus* (d'après (Chuche and Thiéry, 2014))

Ces insectes sont dispersés par les activités humaines comme l'importation et l'échange de bois de plantation mais également par le vent (Chuche and Thiéry, 2014). Ainsi *S.titanus* pourrait s'installer dans des régions encore exemptes comme les vignobles champenois ou allemands.

3) Cycle de vie

S.titanus réalise son cycle de vie uniquement sur vigne, puisqu'il y est inféodé. Il peut acquérir le phytoplasme à tout moment de sa vie et une fois infecté, il l'est à vie.

Les œufs pondus sous l'écorce des bois de plus d'un an à la fin de l'été passent l'hiver en diapause et éclosent l'année suivante à partir du début du mois de mai en même temps que le débourrement de la vigne (Chuche and Thiéry, 2014). Les cinq stades larvaires nécessitent environ 50 jours pour se développer et les adultes vivent 1 mois environ (Fig. 14).



Figure 14 : Cycle de vie de *Scaphoideus titanus*. L1 à L5 : différents stades larvaires d’après (Chuche and Thiéry, 2014).

L’accouplement des adultes met en jeu une communication utilisant des signaux vibratoires. Les mâles peuvent s’accoupler plusieurs fois contrairement aux femelles (Cokl and Virant-Doberlet, 2003). Ces dernières pondent entre 8-10 œufs et au maximum 20 (Linder et al., 2017). C’est une espèce dite univoltine car elle ne présente qu’une génération par an.

E) Transmission du pFD à la plante *via S. titanus*

La transmission de l’agent pathogène se déroule en 3 étapes : l’acquisition de celui-ci par le vecteur à partir de la plante hôte infectée, ici la vigne, sa rétention dans le vecteur ainsi que sa multiplication et enfin l’inoculation à un nouvel hôte végétal.

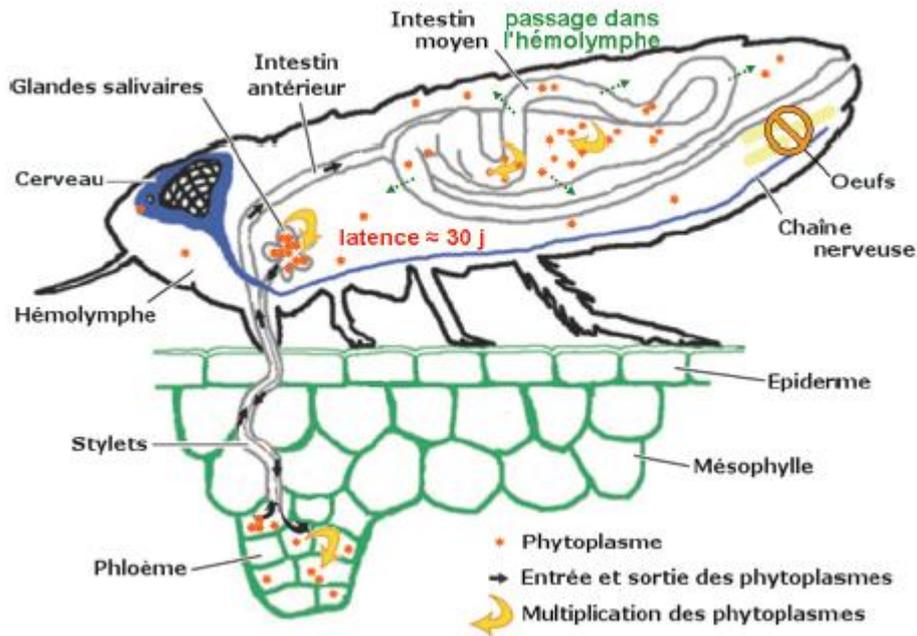


Figure 15 : Cycle du pFD dans son insecte vecteur, d'après (Hogenhout et al., 2008)

Les *S.titanus* acquièrent passivement les phytoplasmes lors de leur prise alimentaire dans le phloème de plantes infectées et cela est possible dès le 1^{er} stade larvaire (Boudon-Padiou et al., 1989; Chucho and Thiéry, 2014). Cependant une période d'alimentation minimale sur une plante infectée est requise. Plus ce temps est long, plus la probabilité d'acquérir la bactérie sera grande (Purcell, 1982). Les insectes infectés le restent à vie mais ne peuvent le transmettre à leur descendance (Christensen et al., 2005). En effet il n'y a pas passage des phytoplasmes du groupe 16SrV dans les œufs, les seuls cas connus de transmission à la descendance ont été observés pour les phytoplasmes du groupe 16SrI (Alma et al., 1997; Bressan et al., 2005a).

Lors de la prise alimentaire, le pFD est aspiré par *S. titanus* via ses stylets (Fig. 15). Puis le phytoplasme passe la barrière intestinale avant de rejoindre l'hémolymphe. Avant de pouvoir transmettre à une autre plante, une période de latence est nécessaire afin que les bactéries puissent se multiplier dans l'insecte, l'envahir et passer la barrière des glandes salivaires (Boudon-Padiou et al., 1989; Lefol et al., 1994). Cette latence est d'environ 1 mois pour le pathosystème *S. titanus*-pFD (Beanland et al., 2006). Puis quand le taux de phytoplasmes dans les glandes salivaires est assez important, les *S. titanus* peuvent les transmettre à la plante lors d'une nouvelle prise alimentaire. Une fois dans le phloème des plantes, le pFD semble suivre le flux du phloème et envahir d'abord les racines, puis il colonise les différentes parties aériennes de la plante où il est alors source d'inoculum pour les *S. titanus* (Kuske, 1992; Lherminier et al., 1994).

L'efficacité de transmission est dépendant de nombreux paramètres comme la capacité vectorielle de *S. titanus* ou les conditions climatiques (Chucho and Thiéry, 2014). La capacité

vectorielle est associée à 6 variables principales que sont la densité du vecteur, la probabilité d'alimentation du vecteur sur un hôte, la probabilité de survie du vecteur, la durée de la période d'incubation, la compétence du vecteur à être infecté et à transmettre et la longévité du vecteur après l'incubation. Ainsi, plus la population de vecteur sera importante, plus le risque d'infection des autres plantes sera grand (Chuche and Thiéry, 2014). Le comportement alimentaire du vecteur a également une influence sur la vexion. En effet, les insectes n'ont pas la même efficacité d'acquisition ou de transmission selon les plantes. *S. titanus* acquiert avec une plus grande efficacité les phytoplasmes quand il se nourrit sur fève que sur vigne, et les cépages sensibles constituent une meilleure source d'inoculum de par une concentration et une répartition en phytoplasmes dans les plantes plus importantes que dans des cépages peu sensibles (Bressan et al., 2005a; Eveillard et al., 2016). *S. titanus* est également plus attiré par les plantes atteintes de la Flavescence Dorée que par les plantes saines (Chuche et al., 2016).

La température joue un rôle important dans ce cycle, en effet, elle influe sur la multiplication des phytoplasmes, mais elle est également importante pour avoir une bonne synchronisation entre les éclosions des insectes et le débourrement des bourgeons afin que les larves puissent se nourrir dès le 1^{er} stade de développement (Chuche et al., 2015; D Amelio et al., 2007; Galetto et al., 2011; Salar et al., 2013).

Bien que les insectes puissent acquérir l'agent pathogène à partir de plantes infectées dès le 1^{er} stade de développement, le nombre de vecteurs infectés augmente avec le stade de développement (Bressan et al., 2006). Cela peut être expliqué par la multiplication des phytoplasmes dans les plantes et donc leur plus grande concentration et disponibilité et par des comportements alimentaires différents entre les stades de développement des *S. titanus*. Enfin, la longévité des insectes infectés varie en fonction des souches de pathogènes et des effets bénéfiques ou délétères qu'elles peuvent avoir. Le pFD réduit la durée de vie des *S. titanus*, ainsi que leur fertilité (Bressan et al., 2005b, 2005a)

Dans nos expériences, ces différentes propriétés sont utilisées (Fig. 16) (Eveillard et al., 2016).

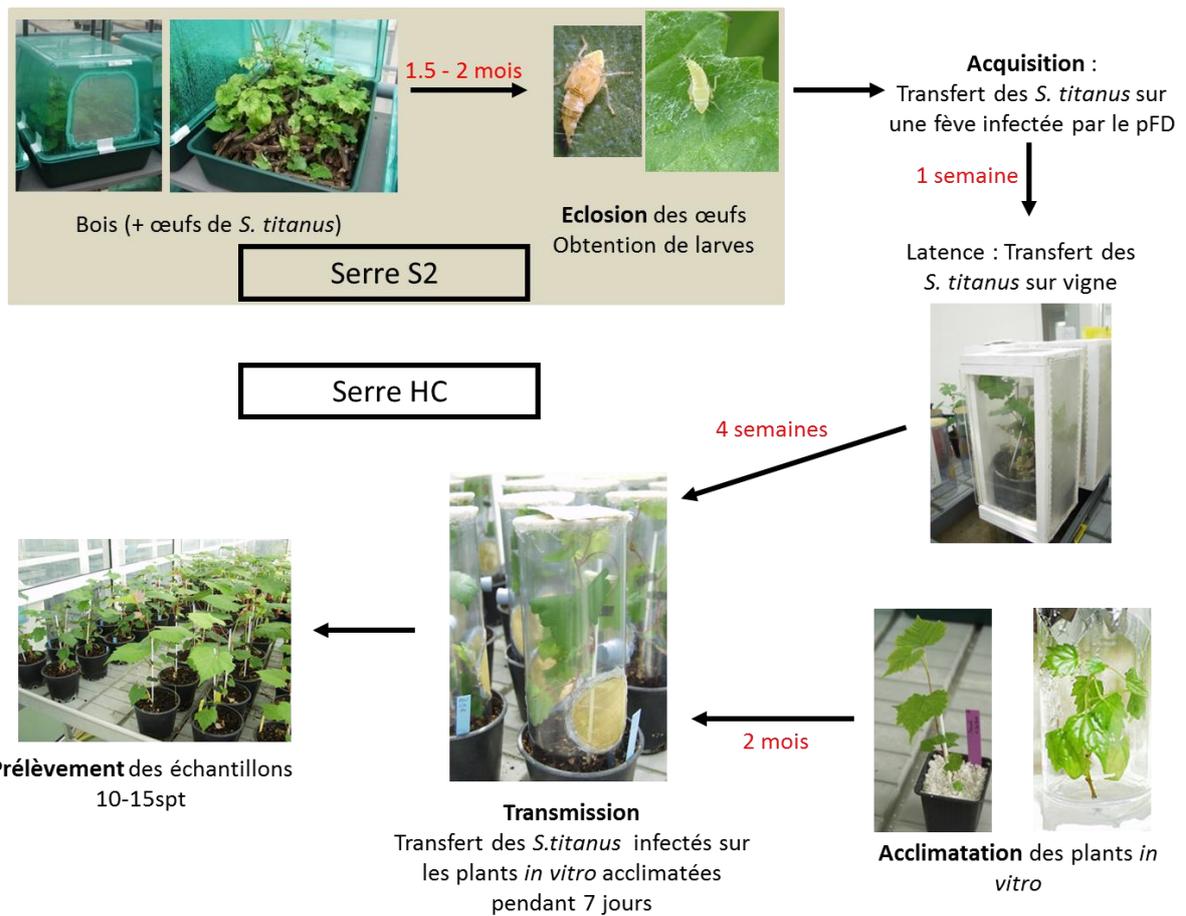


Figure 16 : Protocole d'infection des plantes par *S. titanus* en serre HC (Haut Confinement) (spt : semaines post-transmission)

Les œufs de *S. titanus* contenus dans des bois de vigne récoltés dans des vignobles bourguignons, sont mis à éclore en serre. Arrivés aux stades L3-L5, les insectes sont transférés en serre de haut confinement où ils acquièrent le pFD en s'alimentant sur une fève infectée par le pFD pendant 6 jours. Puis ils subissent une période de latence de 3 à 4 semaines sur vigne. Pendant ce temps, des plants *in vitro* sont acclimatés pendant environ 8 semaines. Une fois les plantes acclimatées et les *S. titanus* infectés, ces derniers sont mis en contact avec les plantes à infecter pendant 7 jours. Plusieurs semaines après la transmission, les plantes sont prélevées pour quantifier le pFD.

F) Lutte contre la Flavescence Dorée

La FD a été classée parmi les maladies de quarantaine au niveau européen en 1993 (directive européenne 2000/29/CE) et à déclaration obligatoire, et le droit français précise les modalités de lutte contre cette maladie (arrêté du 9 juillet 2003). Quand un foyer de FD est détecté, une déclaration auprès de la DRAAF-SRAL (Direction Régionale de l'Alimentation, de l'Agriculture et de la Forêt-Service Régional de l'Alimentation) ou des FREDON (Fédérations Régionales des Groupements de Défense contre les Organismes Nuisibles) doit être faite. Se met ensuite en place une phase de lutte insecticide obligatoire dans le périmètre de lutte obligatoire (PLO) avec les modalités définies par les SRAL après publication d'un arrêté préfectoral qui liste les communes concernées. Dans les PLO, la prospection est effectuée par les FREDON, les FDGDON (Fédérations Départementales de Défense contre les Organismes Nuisibles) ou les GDON (Groupements de Défense contre les Organismes Nuisibles). De même, les pépinières et les vignes-mères de porte-greffes ou de greffons sont soumises à une surveillance effectuée par FranceAgriMer.

Aujourd'hui, près de la moitié du vignoble français (300 000 hectares) est en zone de lutte obligatoire dont le coût est estimé à plus de 50 euros/ha. Seuls les vignobles alsaciens et champenois sont exempts de la présence de *S. titanus* et par conséquent de la FD (Quéré and Sermier, 2015).

La lutte contre la Flavescence Dorée est indirecte du fait de l'impossibilité de s'attaquer directement au phytoplasme. Elle est basée sur l'arrachage de plants malades afin de diminuer les sources de bactéries, les traitements insecticides pour limiter la vexion et la propagation de l'épidémie et la plantation de pieds certifiés sains (Boudon-Padieu, 1996).

La suppression des réservoirs de FD regroupe l'élimination des pieds malades, des vignes abandonnées ou ensauvagées et des repousses de porte-greffes permettant la disparition des sources de phytoplasmes et de refuges pour les insectes vecteurs.

L'élimination du vecteur s'organise annuellement autour de 1, 2 ou 3 traitements insecticides s'attaquant aux larves et aux adultes. En agriculture conventionnelle, le 1^{er} traitement est appliqué 1 mois après l'apparition des 1^{ères} éclosions et a habituellement lieu fin mai-début juin. Il est espacé du 2nd traitement d'environ 14 jours, les dates étant données par les DRAAF-SRAL. Si ces 2 premiers traitements sont des larvicides, le 3^{ème} traitement attaquant les insectes adultes est généralement appliqué fin juillet. En agriculture biologique, les traitements doivent être espacés de 8 à 10 jours et le 1^{er} traitement est effectué 4 semaines après l'observation des 1^{ères} larves. Les bois de taille, potentiellement porteurs d'œufs sont également détruits afin de diminuer la population de *S. titanus*.

La seule méthode curative qui existe pour lutter contre la FD est la thermothérapie. Elle consiste à immerger des bois de vigne dans de l'eau à 50°C pendant 45 minutes afin d'éliminer les

phytoplasmes et les œufs de *S. titanus* sans entraîner la mort de la vigne (Caudwell et al., 1997). La Bourgogne a été la première région viticole à avoir mis en place l'utilisation obligatoire de plants traités à l'eau chaude.

II) Mécanismes de virulence des phytoplasmes

Les phytoplasmes, bactéries obligatoires des insectes et des plantes, ont besoin de ces 2 hôtes pour se disperser dans la nature. Pour une infection réussie des hôtes et l'établissement de la maladie, les agents pathogènes ont besoin de différentes molécules pour faciliter la pénétration, la colonisation de l'hôte et l'absorption des nutriments pour leur croissance et, en même temps, pour se protéger des défenses de l'hôte. Ces molécules peuvent soit être sécrétées dans l'hôte : ce sont les effecteurs, soit être membranaires.

A) Les effecteurs

La sécrétion de molécules, appelées effecteurs interférant avec la physiologie des plantes est l'une des stratégies mises en place par les agents pathogènes pour les infecter. Les fonctions de ces effecteurs peuvent être par exemple de contourner les défenses des plantes ou de permettre d'attirer les insectes vecteurs (Göhre and Robatzek, 2008; Hogenhout et al., 2008).

La plupart des bactéries phytopathogènes utilisent différents mécanismes de sécrétion pour injecter les effecteurs dans les cellules comme le système de sécrétion de type III (T3SS), mais les phytoplasmes ne semblent pas en être dotés et utiliseraient les voies de translocation Sec-dépendantes (Hogenhout et al., 2008). Des protéines impliquées dans ce système d'export telles que SecA, SecY et SecE ont été identifiées chez les phytoplasmes et l'expression de SecA de '*Candidatus Phytoplasma asteris*' souche OY a été détectée dans des plantes *Chrysanthemum coronarium* infectées (Kakizawa et al., 2001, 2004). La sécrétion des protéines par la voie Sec-dépendante requiert un peptide signal en N-terminal qui est ensuite clivé.

L'identification d'effecteurs de phytoplasmes est relativement récente. En utilisant les programmes TMHMM2.0 et SignalP, 56 protéines de '*Ca. P. asteris*' souche AY-WB et 45 de la souche OY avec un peptide signal et sans domaine transmembranaire additionnel ont été identifiés (Hogenhout et al., 2008). Parmi ces effecteurs potentiels, seulement 3 sont aujourd'hui décrits de façon approfondie dans la littérature, et sont nommés SAP11, SAP54 et TENGU.

Chez les plantes *Arabidopsis thaliana* transgéniques exprimant la protéine SAP11, sont observés les mêmes symptômes que ceux causés par '*Ca. P. asteris*' AY-WB, phytoplasme codant

cette protéine (Sugio et al., 2011). Lors d'expérience d'expression transitoire dans *Nicotiana benthamiana*, elle s'accumule dans le noyau car elle comporte une séquence Nuclear Localization Signal (NLS). Des expériences de double-hybrides ont mis en évidence une interaction entre SAP11 et un facteur de transcription TCP (Hogenhout et al., 2008; Sugio et al., 2011). Chez *A. thaliana* exprimant SAP11, la déstabilisation de TCP provoque la répression du gène *LOX2* impliqué dans la biosynthèse d'acide jasmonique (JA) et réduit l'accumulation d'anthocyanines, impliqués dans les défenses des plantes (Lu et al., 2014; Schommer et al., 2008). Le JA joue un rôle important dans les défenses des plantes contre les insectes herbivores, et dans les *A. thaliana* surexprimant SAP11 et où le JA est donc moins produit, une augmentation de la population de *Macrolestes quadrilineatus*, l'insecte vecteur de '*Ca. P. asteris*' souche AYWB, a été observée (Kessler et al., 2004; Sugio et al., 2011).

L'autre effecteur de '*Ca. P. asteris*' nommé SAP54, fixe des facteurs de transcription à domaine MADS et induit leur dégradation, ce qui conduit à une modification du développement floral, produisant des fleurs semblables à celles produites par les plantes infectées par le phytoplasme AY-WB (MacLean et al., 2011, 2014).

Enfin, TENGU, effecteur identifié chez '*Ca. P. asteris*' souche OY induit une variété d'altérations morphologiques, comme le phénotype buissonnant, le nanisme, la phyllodie et la production de fleurs stériles. Lorsque cet effecteur est exprimé dans les *A. thaliana*, une répression des gènes de réponse à l'auxine est observée (Hoshi et al., 2009).

L'identification de TENGU, SAP11 et SAP54 soutient l'idée que les phytoplasmes peuvent induire des symptômes par la sécrétion de protéines effectrices et la modification de l'expression de gènes de plante.

D'autres effecteurs ou protéines de surface des phytoplasmes pourraient également être impliqués dans la virulence de ces bactéries comme les protéases de surface FtsH.

B) FtsH

1) Généralités

Le gène codant la protéine FtsH est universellement conservé chez les eubactéries, dans les mitochondries et les chloroplastes (Langklotz et al., 2012). Il est habituellement présent en un seul exemplaire dans le génome et est indispensable. Il a trois appellations différentes : *FtsH* pour filamentous temperature sensitive, *HflB* pour high frequency of lysogenization et *tolZ* pour colicin tolerance en fonction des caractéristiques observées chez les mutants d'*E. coli* (Narberhaus et al., 2009). La protéine FtsH d'*E. coli* contient 647 acides aminés pour 71 kDa (Ito and Akiyama, 2005).

Aucune structure cristalline d'une protéine FtsH entière n'est disponible à ce jour (Langklotz et al., 2012).

2) Caractérisation structurales

Les protéines FtsH ont des activités ATPase et protéolytique rassemblées sur un seul peptide (Langklotz et al., 2012). Elles possèdent une partie N-terminale ancrée dans la bicouche lipidique et sont composées de deux domaines transmembranaires, de sorte que les deux extrémités soient exposées dans le cytoplasme (Narberhaus et al., 2009). Le domaine ATPase est caractérisé par différents sites conservés permettant (1) la liaison à l'ATP nommés walker A et B, de séquences IPKGILLxGxPGTGKT et FIDEI respectivement et (2) l'hydrolyse de l'ATP (SRH : second region of homology) de séquence ATNxxDxDLDxALLRPGR, ainsi que des résidus de pore conservés Y/FxG (pore-signature) (Ito and Akiyama, 2005). Le domaine métalloprotéasique contient le motif HExGH important pour la fixation au zinc, un glutamate et un aspartate conservés et un motif leucine-zipper (Narberhaus et al., 2009; Schumann, 1999) (Fig. 17).

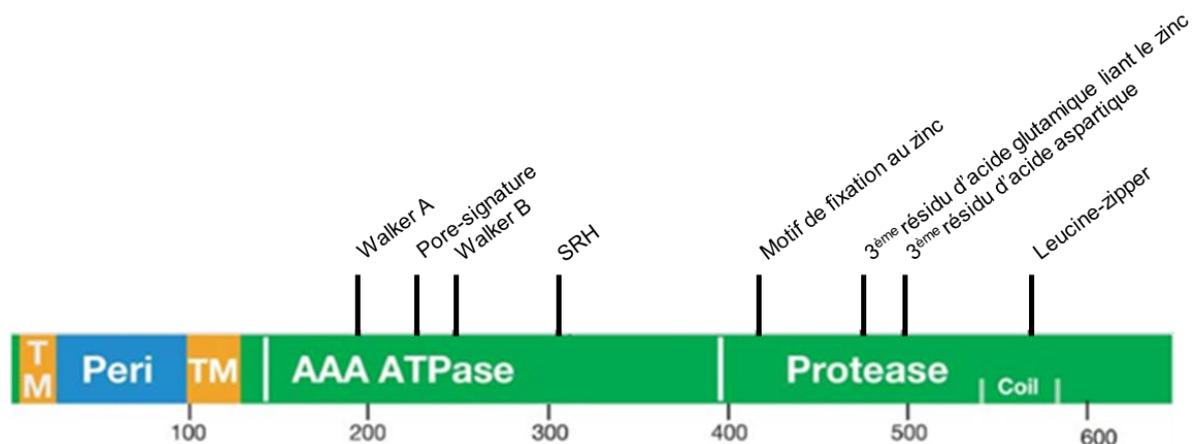


Figure 17 : Présentation des différents sites caractéristiques d'une FtsH. La séquence d'acides aminés de FtsH est représentée avec les régions cytoplasmiques (vert), transmembranaires (TM, orange) et périplasmiques (Peri, bleu). La région cytoplasmique se compose des domaines AAA ATPase et métalloprotéase qui comprennent différents sites : les sites de fixation à l'ATP (walker A et B), de son hydrolyse (SRH), un pore-signature, un motif de fixation au zinc, le troisième résidu d'acide glutamique et d'acide aspartique, ainsi qu'une leucine-zipper, d'après (Ito and Akiyama, 2005)

Les modélisations basées sur les structures cristallines des domaines ATPases d'*E. coli* et de *Thermus thermophilus* et des observations au microscope électronique montrent que les FtsH forment un homo-hexamère semblable à un anneau (Ito and Akiyama, 2005; Krzywda et al., 2002; Niwa et al., 2002).

3) Fonctions

La FtsH est une protéase clé impliquée dans le contrôle qualité des protéines chez les bactéries. Elle est essentielle dans ces organismes et fonctionne pour dégrader les protéines membranaires ou cytosoliques mal repliées, ainsi que des sous-unités de protéines membranaires mal assemblées (Ito and Akiyama, 2005). Par exemple, elle dégrade la sous-unité SecY du canal conducteur de la protéine SecYEG lorsqu'elle est surexprimée en l'absence de SecE (Kihara et al., 1995). La FtsH peut dégrader des protéines modérément instables mais est incapable de dégrader des protéines très stables (Herman et al., 2003). La reconnaissance des protéines à dégrader est indépendante de la séquence et nécessite des extrémités N ou C-terminales exposées d'environ 20 acides aminés (Chiba et al., 2000, 2002). Elle utilise son domaine ATPase pour déplier les protéines et les déplacer dans la chambre protéolytique où elles sont ensuite dégradées en peptides de 5 à 25 acides aminés (Bittner et al., 2017).

Son expression est induite par de hautes températures, ce qui indique qu'il s'agit d'une protéine de choc thermique. Chez *E. coli*, le facteur sigma RpoH (σ 32) est responsable de la transcription des gènes de choc thermique comme les chaperonnes et les protéases. A l'état physiologique, l'expression de RpoH est très faible et sa traduction est régulée par un ARN thermomètre. Les systèmes de chaperonnes DnaK/DnaJ/GrpE ou GroEL/GroES se lient à RpoH, ce qui induit un changement de conformation de RhoH suivi d'une dégradation par FtsH (Rodriguez et al., 2008). Mais quand les températures augmentent, le nombre de protéines dénaturées croît, ainsi les chaperonnes sont tenues éloignées des protéines RpoH. Cette dernière peut alors induire l'expression des gènes de réponse au choc thermique. Lorsque la situation cellulaire des protéines s'améliore, les chaperonnes se lient à nouveau à RpoH (Langklotz et al., 2012).

La FtsH est également un régulateur du rapport entre les phospholipides et les lipopolysaccharides (LPS) dans la membrane en dégradant LpxC, enzyme impliquée dans la biosynthèse des LPS (Ogura et al., 1999; Tomoyasu et al., 1993, 1995). La perte ou la surexpression des LPS est toxique, ce qui rend l'enzyme LpxC ainsi que la protéase FtsH qui régule le niveau de LpxC essentielles chez *E. coli*.

4) Liens avec la pathogénicité

Les protéases et les inhibiteurs de protéases (IP) sécrétées par des agents pathogènes jouent un rôle important dans l'Effector Triggered Susceptibility (ETS) et l'Effector Triggered Immunity (ETI) (van Loon et al., 2006). Les agents pathogènes peuvent en effet surmonter les effets délétères des protéases végétales en sécrétant des protéases qui les modifient (Lange et al., 1996). Par exemple, chez le maïs, les chitinases de classe IV ChitA et ChitB, enzymes impliquées dans la défense des plantes en dégradant la paroi de champignons phytopathogènes, sont clivées par une protéase du pathogène *Fusarium verticillioides* nommée fungalysin Fv-cmp (Naumann et al., 2011; Slavokhotova et al., 2014).

Parmi les protéases, les métalloprotéases dont fait partie la FtsH, sont des enzymes qui utilisent un ion métallique comme le Mg^{2+} ou le Zn^{2+} afin d'hydrolyser la liaison peptidique formée entre deux acides aminés et peuvent donc avoir un rôle dans la pathogénicité des bactéries. Par exemple, chez *S. aureus*, la délétion du gène *FtsH* diminue sa pathogénicité en cas d'infection d'une souris. Chez '*Ca. P. mali*', agent responsable de la prolifération du pommier, 4 gènes *FtsH* ont été identifiés et chez les souches virulentes certaines étaient prédites pour être orientées vers l'extérieur de la bactérie et pourraient donc avoir un rôle dans la pathogénicité (voir Chapitre I, I)

Cependant, les plantes sont équipées d'éléments de défense contre les agents pathogènes.

III) Les défenses des plantes

A) Généralités

Les plantes, constamment en contact avec l'environnement extérieur et de nombreux pathogènes, et ne pouvant se déplacer, doivent réagir sur place à toutes les variations de l'environnement, aux stress biotiques (agents pathogènes, insectes...) et abiotiques (disponibilité en eau, température, lumière...). Pour se protéger, elles ont à leur disposition des défenses dites passives et d'autres dites actives inductibles en réponse à une agression.

La résistance passive est une défense présente même en absence de pathogène, qui limite l'entrée ou la propagation de l'agent pathogène dans la plante. Elle se compose de barrières physiques et de barrières chimiques. Ces défenses préformées permettent de lutter contre la plupart des agents pathogènes rencontrés, limitant ainsi le développement de maladies. Dans ce cas, les interactions plante-pathogènes sont dites incompatibles.

Différents éléments des cellules constituent des obstacles physiques à l'entrée des agents pathogènes. La paroi pectocellulosique est un réseau complexe de polymères polysaccharidiques composé de cellulose, d'hémicellulose, de pectines, de lignines et de protéines (Heredia et al., 1995). Elle permet à la cellule de résister à des pressions internes et externes, et représente une barrière structurelle contre les agents pathogènes. Un dépôt de cires et de cutines du côté externe de la paroi des cellules épidermiques forme la cuticule (Serrano et al., 2014). Cette couche constitue la première défense à laquelle sont confrontés les agents pathogènes puisqu'ils doivent la traverser. Leur entrée n'est possible que lorsque l'intégrité de la cuticule est altérée par une blessure ou par injection directe *via* un insecte vecteur (Kolattukudy, 1985).

Les barrières chimiques sont constituées par un ensemble de divers composés antimicrobiens faisant partie des défenses constitutives. En effet, les phénols, les glycosides phénoliques, les lactones insaturées, les composés soufrés, les saponines, les glycosinolates sont des composés exprimés de manière constitutive dans la plante et qui ont notamment une activité antifongique (Osbourn, 1996). Chez la vigne, le resvératrol, connu pour son rôle dans les défenses contre *Botrytis cinerea* est présent de manière constitutive dans plusieurs organes et permet de limiter la germination de ce champignon (Adrian and Jeandet, 2012; Bavaresco et al., 1999; Langcake and Pryce, 1976).

Quand un agent pathogène n'est pas arrêté par les défenses passives des plantes, l'interaction plante-pathogène est dite compatible. La résistance active se déclenche et se déroule en plusieurs étapes (Fig. 18).

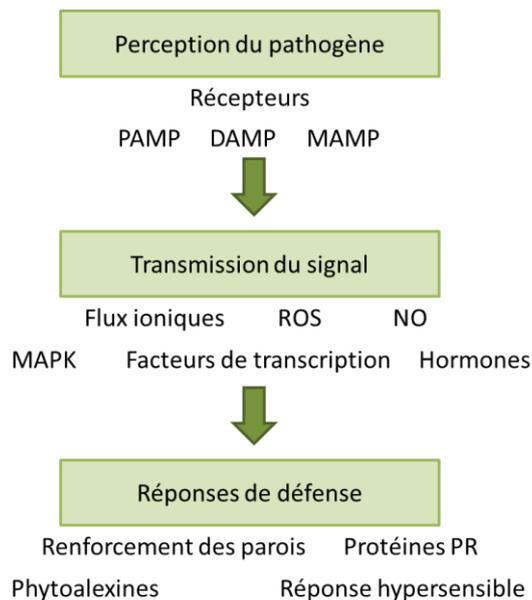


Figure 18 : Schéma général de l'immunité des plantes. Les plantes reconnaissent les motifs généraux conservés (DAMP et MAMP) des microorganismes via des récepteurs membranaires. Cette reconnaissance permet la mise en place des défenses de la plante. (PAMP : Pathogen Associated Molecular Patterns, DAMP : Damaged-Associated Molecular Patterns, MAMP : Microbial Associated Molecular Pattern, ROS : Reactive Oxygen Species, NO : monoxyde d'azote, MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase, Protéines PR : Pathogenesis related protein).

Cette défense nécessite la perception de ce stress et la transmission de l'information *via* des voies de signalisation afin d'aboutir à la mise en place des réponses de défense.

B) La perception du pathogène

Comme les animaux, les plantes sont capables de reconnaître le non-soi et le soi modifié, induisant alors la mise en place des mécanismes de défense (Jones and Dangl, 2006).

Les plantes reconnaissent des motifs moléculaires généraux d'agents pathogènes appelés PAMP (Pathogen-Associated-Molecular-Patterns) *via* des récepteurs membranaires appelés PRR (Pattern-Recognition Receptors) (McGuinness et al., 2003). Des motifs similaires existent également chez des microorganismes non pathogènes, ainsi le terme MAMP (Microbial-Associated-Molecular-Patterns) lui est aujourd'hui préféré (Mackey and McFall, 2006). De plus, les plantes sont capables de reconnaître des motifs endogènes modifiés par les agents pathogènes regroupés sous le terme de DAMP (Damage-Associated Molecular Pattern) (Fig. 19) (Vance et al., 2009).

Le pathogène est détecté par la présence de ces MAMP/PAMP/DAMP regroupés sous le nom d'éliciteurs et pouvant être d'origine polysaccharidique, protéique ou lipidique (Vance et al., 2009).

Par exemple, une augmentation de la production de monoxyde d'azote (NO) est induite dans les cellules de tomate après reconnaissance d'un peptide de 22 acides aminés de la flagelline de la bactérie *Pseudomonas syringae pv tabaci* (Felix et al., 1999). Cette même réaction est produite chez *Arabidopsis thaliana* après la reconnaissance des lipopolysaccharides (LPS) de *Pseudomonas aeruginosa* (Zeidler et al., 2004). Ces éliciteurs peuvent aussi être constitués d'oligogalacturonides ou de cellulose issus de la dégradation de la paroi végétale par le pathogène (Boller and Felix, 2009).

La reconnaissance des éliciteurs par les PRR induit une réponse appelée PTI (PAMP Triggered Immunity) (Jones and Dangl, 2006). Cette PTI confère à la plante une résistance non spécifique contre de nombreux parasites et permet d'activer des cascades de signalisation impliquant des flux ioniques et l'activation des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase). Cependant, certains pathogènes sont capables de contourner la PTI en produisant des effecteurs qui affectent la mise en place des défenses des plantes et la plante se trouve en ETS (Effector-Triggered Susceptibility) (Jones and Dangl, 2006). Pour contourner de tels effecteurs, les plantes ont développé des protéines de résistance, comme les NLR (NOD-like receptors) qui sont des récepteurs membranaires spécifiques. Un effecteur reconnu par ces NLR aboutissant à la résistance de l'hôte, active l'ETI (Effector-Triggered Immunity) et est appelé protéine d'avirulence (Avr). L'ETI engendre une réponse hypersensible de la plante (HR), ce qui permet de limiter la propagation de l'agent pathogène.

1) La transmission du signal

Suite à la perception de l'agent pathogène par la plante, des cascades d'évènements dont l'ordre et les constituants peuvent différer selon l'interaction plante-pathogène sont activées au niveau local et systémique.

Les flux ioniques

Les flux ioniques sont les réponses les plus précoces au niveau des membranes plasmiques. Lors de la reconnaissance des éliciteurs (PAMP, MAMP, DAMP), les canaux membranaires sont activés engendrant des influx de cations (Ca^{2+} , H^+) et des efflux d'anions (Cl^- , NO_3^-) (Yu et al., 2017). Chez la vigne, la perception de l'endopolygalacturonase du champignon *B. cinerea* entraîne une augmentation de la concentration intracellulaire en calcium (Vandelle et al., 2006). Ces signaux ioniques provoquent une dépolarisation membranaire et une acidification cytoplasmique. Les entrées calciques contribuent à l'activation de protéines impliquées dans la mise en place des défenses (Yu et al., 2017).

Les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et le monoxyde d'azote (NO)

L'accumulation de ROS (H_2O_2 , O_2^- et HO^-) mis en place au moment de la perception de l'agent pathogène entraîne une accumulation de calcium, et réciproquement, ce qui participe à la propagation du signal aux autres cellules de l'organisme (Gilroy et al., 2014; Lamb and Dixon, 1997). Ces flux ioniques sont responsables de l'activation des MAPK (Vandelle et al., 2006; Yu et al., 2017). Les ROS agissent négativement sur les agents pathogènes, soit directement avec leur caractère toxique, soit indirectement en induisant la synthèse des pathogenesis related protein (PR), de callose et de lignine ainsi que de composés antimicrobiens tels que les phytoalexines (Aziz et al., 2004; Green and Fluhr, 1995; Thoma et al., 2003).

La voie de transduction des MAPK

Après la perception de l'agent pathogène par les PRR, les MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) assurent la transmission du signal des récepteurs membranaires au noyau (Pitzschke et al., 2009). Cette voie de signalisation se caractérise par une cascade de phosphorylation des MAPK permettant l'activation de facteurs de transcription qui modifient l'expression des gènes de défense impliqués dans la synthèse de protéines PR, de phytoalexines ou impliqués dans la réponse hypersensible (HR) (Pitzschke et al., 2009; Yu et al., 2017). Par exemple, chez la vigne, suite à la perception d'une endopolygalacturonase de *B. cinerea*, deux MAPK de 45 et 49 kDa sont activées (Poinssot et al., 2003).

Les facteurs de transcription

Chez la vigne, environ 2 000 facteurs de transcription putatifs ont été identifiés (Velasco et al., 2007). Ces facteurs de transcription sont classés en grandes familles selon leur domaine de liaison à l'ADN tels que les facteurs de transcription répondant à l'éthylène (Ethylene Responsive Factor ou ERF), les protéines b-ZIP (basic-domain leucine-zipper), les facteurs de transcription de type WRKY et les facteurs MYB (myeloblastosis related proteins) (Table 2) (Rushton and Somssich, 1998; Singh et al., 2002).

Nom du FT	Nb chez <i>Vitis vinifera</i>	Domaine conservé	Lieu de fixation	Induit par	Référence
ERF	124	Domaine ERF (58 acides aminés)	Boite GCC	ET, SA et JA	http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v2.0/
bZIP	45	Leucine-zipper	Séquence as-1	SA, ET, JA ou ABA	http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v2.0/ , (Lebel et al., 1998; Singh et al., 2002; Tak and Mhatre, 2013)
WRKY	59	Séquence protéique WRKYGKQ et un motif en doigt de zinc	Boite W (GACC/T)	Infection ou SA	http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v2.0/ , (Dong et al., 2003; Eulgem et al., 2000; Li et al., 2004; Singh et al., 2002)
MYB	130	Domaine R2R3	Séquence MRE (MYB Recognition Element)	GA ou ABA	http://plntfdb.bio.uni-potsdam.de/v2.0/ , , (Ambawat et al., 2013)

Table 2 : Présentation quelques facteurs de transcription (FT) de la vigne ayant un lien avec la mise en place des défenses (ET : éthylène, SA : acide salicylique, JA : acide jasmonique, GA : gibbérelines, ABA : acide abscissique)

L'expression des gènes codant les ERF sont régulés par l'éthylène (ET), l'acide salicylique (SA) ou l'acide jasmonique (JA) et sont impliqués dans les réactions de défense (Lorenzo et al., 2003; Singh et al., 2002). En effet, l'expression des gènes *Pti4*, *Pti5* ou *Pti6* appartenant à la famille des facteurs ERF chez *A. thaliana* active l'expression des gènes des protéines de défense PR-1, PR-2, PR-3 et PR-4 (Gu et al., 2002). De même, chez *A. thaliana*, le facteur de transcription MYB15 est impliqué dans la régulation de la lignification induite au cours de la défense contre *P. syringae* (Chezem et al., 2017).

Les hormones

De nombreuses hormones impliquées dans le développement mais aussi dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques sont produites par les plantes. L'acide salicylique, l'acide jasmonique et l'éthylène sont les trois hormones ayant un rôle prépondérant dans l'induction des défenses.

L'acide salicylique (SA) est un composé phénolique dérivé du chorismate et produit par deux voies de biosynthèse : celle de la Phénylalanine-Ammonia Lyase (PAL) et celle de l'Iso-Chorismate Synthase (ICS) (Vlot et al., 2009). L'accumulation de SA à la suite de la perception de l'infection est dans un premier temps locale, avant de se propager dans les tissus sains adjacents afin de les protéger d'une éventuelle infection, mettant en place une réponse systémique ou SAR (Systemic Acquired Resistance). Le SA circule sous une forme méthylée inactive dans la plante, permettant une diffusion rapide, et est reconverti en SA pour activer les défenses systémiques (Heil and Ton, 2008; Park et al., 2007, 2009). Le SA affecte la production de ROS et est impliqué dans la réponse hypersensible (HR) (Herrera-Vásquez et al., 2015). Chez la vigne et chez *Arabidopsis thaliana*, une application d'un analogue du SA, le benzo thiadiazole (BTH), conduit à augmenter la résistance au champignon *B. cinerea* (Iriti et al., 2004; Zimmerli et al., 2001).

L'acide jasmonique (JA) est issu de la dégradation des lipides et est un dérivé de l'acide linoléique. La biosynthèse du JA implique différentes enzymes comme la lipoxgénase (LOX), l'allène oxyde synthase (AOS) et l'allène oxyde cyclase (AOC) (Browse, 2009). La forme active du JA est la forme conjuguée avec l'isoleucine (JA-Ile) dont l'association est catalysée par l'enzyme JAR1 (Jasmonate Resistant 1) (Fonseca et al., 2009). Le JA permet de lever la répression du facteur de transcription MYC2 permettant l'expression des gènes de défense médiés par le JA (Chini et al., 2007; Yan et al., 2009). Une application exogène de JA peut induire l'expression de métabolites secondaires mais aussi de protéines de défense comme les protéines PR (Faurie et al., 2009; Repka et al., 2004). Des mutants d'*A. thaliana* incapables d'accumuler le JA sont plus sensibles à *B. cinerea* (Thomma et al., 1998) et une accumulation de MeJA entraîne une meilleure résistance à ce champignon (Seo et al., 2001). Chez la vigne, l'application de MeJA sur les feuilles augmente la résistance à *Erysiphe necator*, agent de l'oïdium (Belhadj et al., 2006).

L'éthylène (ET) est synthétisé à partir de la méthionine (Broekaert et al., 2006). L'ET inhibe la kinase CTR1 par fixation sur des récepteurs qui lui sont associés, ce qui entraîne une déphosphorylation du facteur de transcription EIN2 et l'induction de l'expression de gènes de défense ET-dépendants (Wen et al., 2012). Ainsi chez la vigne, l'application d'éthylène augmente la résistance au champignon *E. necator*, l'induction de gènes de défense comme les protéines PR ainsi que la biosynthèse de phytoalexines, alors qu'un mutant d'*A. thaliana* incapable de percevoir l'ET a une sensibilité accrue à *B. cinerea* (Belhadj et al., 2008; Thomma et al., 1999).

De façon générale, le SA et le JA sont antagonistes, alors que le JA et l'ET agissent en synergie (Pieterse et al., 2009). Ces actions sont dues à des protéines impliqués dans plusieurs voies de signalisation comme NPR1 qui est activé en présence de SA pour induire l'expression de gènes SA-dépendant tels que WRKY70 qui inhibe l'expression des gènes de réponse au JA (Berens et al., 2017). MYC2 et ERF doivent agir en synergie pour induire l'expression des gènes de défense *PR1* et *PR5* (Xu et al., 1994).

Outre le SA, le JA et l'ET, 5 autres hormones végétales sont impliquées dans la signalisation des agents pathogènes, et dans certains cas elles interagissent avec les 3 hormones principales. C'est le cas des gibbérelines (GA) et de l'acide abscissique (ABA) qui agissent de façon antagoniste avec l'ET et le JA (Anderson et al., 2004; Hou et al., 2010). Les cytokinines agissent sur la voie de l'ET en augmentant sa biosynthèse (El-Showk et al., 2013a).

Une fois le pathogène reconnu par les cellules végétales, différentes réponses de défense de la plante se mettent en place.

2) Les réponses de défense actives

a) Le renforcement des parois

La paroi pecto-cellulosique est l'une des premières barrières physiques et elle peut être modifiée afin de devenir plus résistante à la dégradation et à la pénétration des agents pathogènes. En effet, le renforcement de la paroi est un mécanisme de défense régulièrement observé au site d'infection (Hückelhoven, 2007). Ce renforcement peut se faire par l'accumulation de protéines riches en glycine (GRP) ou en proline (PRP) ou de glycoprotéines riches en hydroxyproline comme les extensines, par des dépôts de callose dont la synthèse est assurée par la callose synthase ou par des dépôts de polymères aromatiques comme la lignine.

L'hyperlignification de la paroi peut être observée en réponse aux agents pathogènes et permet une résistance à la pénétration et à la dégradation (Hématy et al., 2007; Heredia et al., 1995). La surexpression des extensines chez *A. thaliana* augmente la résistance à *P. syringae* (Wei and Shirsat, 2006). Chez la vigne, l'accumulation de callose a été observée après un traitement au BABA (Acide β -AminoButyrique), entraînant la résistance à *Plasmopara viticola*, agent du mildiou (Hamiduzzaman et al., 2005). Les feuilles de tomate infectées par le '*Ca. P. solani*' ont présenté des dépôts de callose plus importants que dans les feuilles saines, ainsi qu'une surexpression d'un gène codant une callose synthase (De Marco et al., 2016).

b) La réponse hypersensible (HR)

La réponse hypersensible (HR) est un processus de mort cellulaire programmée déclenchée à la suite d'une attaque par un agent pathogène (Dangl et al., 1996). Au niveau cellulaire, la HR est également caractérisée par un gonflement des mitochondries, une dégradation des chloroplastes, une condensation et une dégradation de la chromatine (Mur et al., 2008). Cette réponse localisée prive le pathogène de ressources nutritives et le confine à son site d'infection initial afin de lutter efficacement contre une propagation de l'agent pathogène aux cellules adjacentes (Lam et al., 2001; Nimchuk et al., 2003). La HR est initiée par des flux calciques, ainsi que par l'accumulation de SA et la production de ROS (Ma and Berkowitz, 2007; Wu et al., 2014). Une augmentation de la HR a été observée chez des mutants du riz qui surexpriment le canal calcique putatif et inversement en cas de répression de l'expression du gène codant ce canal (Kurusu et al., 2005).

c) Les phytoalexines

Suite à l'infection par un agent pathogène, les plantes produisent des métabolites secondaires aux propriétés antimicrobiennes et antifongiques appelées phytoalexines (Ahuja et al., 2012). Chez la vigne, les phytoalexines appartiennent à la famille des composés phénoliques : les stilbènes. Le *trans*-resvératrol, considéré comme le précurseur de tous les stilbènes a été le premier identifié chez la vigne (Langcake and Pryce, 1976). Suite à une infection par le champignon *P. viticola*, la vigne produit des stilbènes qui s'accumulent à de fortes concentrations au niveau des sites d'infection de feuilles de vignes résistantes (*Vitis vinifera* cv. Solaris) en comparaison avec une variété sensible (*Vitis vinifera* cv. Chasselas) (Hammerschmidt, 2004; Pezet et al., 2004). De plus, la nature des stilbènes produits est différente entre ces deux cépages : le Chasselas synthétise une grande quantité de picéides et le Solaris des resvératrols, des ϵ - et des δ -viniférines ayant un effet antifongique important. Ces composés possèdent *in vitro* des propriétés antifongiques, par exemple contre *B. cinerea* (Adrian and Jeandet, 2012; Caruso et al., 2011). De la même façon, *Vitis rupestris*, variété de vigne résistante à *Erwinia amylovora*, agent du feu bactérien, présente une augmentation du resvératrol et de δ -viniférines et développe une HR, non observées chez le Pinot noir, variété sensible, ce qui suggère que les stilbènes jouent un rôle dans la HR. (Chang et al., 2011).

En plus de son activité antimicrobienne, le resvératrol a des avantages pour la santé humaine avec des propriétés anti-âge, anticancéreuses, anti-inflammatoires et antioxydantes qui pourraient être pertinentes dans le traitement des maladies chroniques et dans la longévité (Smoliga et al., 2011). Un phénomène appelé « paradoxe français » décrit que la consommation modérée de vin rouge peut réduire le risque de maladie cardiaque en raison de sa teneur en resvératrol (Renaud and de Lorgeril, 1992).

d) Les pathogenesis related protein (PR)

Les pathogenesis related protein (protéines PR) sont des protéines végétales détectées au cours des interactions plantes-pathogènes (Sels et al., 2008). Ces protéines sont classées en 17 familles en fonction de leurs propriétés biologiques et biochimiques ou des plantes dans lesquelles elles ont été identifiées (van Loon et al., 2006).

Chez la vigne, 14 familles de protéines PR ont été identifiées et elles peuvent s'accumuler dans différents organes (racines, tiges, feuilles, fleurs et baies) suite à la perception d'un agent pathogène tel que *B. cinerea*, d'un stress abiotique comme les rayons UV-C ou d'un traitement avec le MeJA et l'ET (Belhadj et al., 2006, 2008; Bézier et al., 2002; Bonomelli et al., 2004; Ferreira et al., 2004).

Chez le cépage Chardonnay, la surexpression du gène *VvNPR1* impliqué dans la voie du SA entraîne une augmentation de l'expression de PR-1 et par conséquent une augmentation de la résistance à *E. necator* (Henanff et al., 2011).

Certaines protéines PR s'attaquent aux parois des agents pathogènes afin de défendre les cellules végétales. Les endoglucanases PR-2 et les chitinases PR-3, PR-4 et PR-8 permettent la dégradation des parois des champignons et des bactéries. Les thaumatines-like PR-5 ont la capacité de perforer la membrane plasmique des champignons (Anžlovar and Dermastia, 2003). Ainsi, chez la vigne, l'activité antifongique de PR-5 permet d'inhiber la croissance de *B. cinerea*, et la surexpression du gène *VvTL1* (une PR-5 de vigne) d'augmenter sa résistance à *E. necator* (Dhekney et al., 2011; Monteiro et al., 2003).

Les protéines PR peuvent également participer au renforcement des parois cellulaires en jouant un rôle dans la lignification *via* leur activité peroxydase (PR-9), à la mise en place de la HR *via* une activité ribonucléase (PR-10) ou à la formation de ROS *via* une activité superoxyde dismutase (PR-16) (Christensen et al., 2004; van Loon et al., 2006; Park et al., 2004). Chez la vigne, une surexpression de PR-10 augmente la résistance à *P. viticola* (He et al., 2013).

Malgré un arsenal important pour lutter contre les attaques de pathogènes, la vigne est sensible à de nombreuses maladies, parmi lesquelles la FD dont la stratégie de lutte repose sur la prospection des parcelles, l'arrachage des pieds contaminés et les traitements insecticides. Cette méthode de lutte coûte très cher et a également des effets dommageables sur l'environnement et la santé humaine. Ainsi réduire l'apport d'intrants par l'obtention de vignes peu sensibles par la voie de l'amélioration variétale est envisagé pour la FD comme elle l'est pour d'autres maladies telles que le mildiou ou l'oïdium.

C) Stratégies d'amélioration de la résistance des plantes

1) Amélioration classique par croisement

C'est la première technique à avoir été utilisée pour améliorer la résistance des plantes face aux pathogènes. Un parent résistant, possédant rarement les qualités agronomiques recherchées, est croisé avec un parent sensible. Dans la descendance obtenue, seuls les individus présentant le caractère résistant et possédant des qualités agronomiques souhaitées sont retenus, puis recroisés avec un individu possédant les qualités agronomiques recherchées. Cette méthode prend du temps, requiert l'identification d'un parent résistant et comme les pathogènes évoluent, la résistance mise en place peut être contournée.

Par exemple, à partir de 1974, l'INRA a entrepris un programme de sélection variétale basé sur l'introgession de gènes de résistance de *Muscadinia rotundifolia* chez *Vitis vinifera*. Cette espèce américaine est résistante à la plupart des pathogènes inféodés à *Vitis vinifera* comme *E. necator* et *P. viticola* (Bouquet, 1986). Malgré la difficulté des croisements due à la stérilité des hybrides obtenus, une résistance à l'oïdium provenant de *M. rotundifolia* et due au gène *Run1* (Resistance to *Uncinula necator* 1) a été introduit par 6 croisements successifs (Bouquet et al., 2000). Les recherches d'Alain Bouquet et le matériel créé ont permis d'engager le programme ResDur en 2000. Ce programme est un exemple récent d'amélioration classique par croisement chez la vigne qui est basé sur l'introgession de plusieurs gènes de résistance à l'oïdium et au mildiou identifiés chez *M. rotundifolia* et visant à diminuer le risque de contournement des résistances par les agents pathogènes (Fig. 19). Il bénéficie de l'aide des marqueurs moléculaires liés aux gènes de résistance. En effet, il est possible d'identifier les individus porteurs de la résistance souhaitée dès le stade plantule. Cela permet de gagner du temps en effectuant un cycle de croisement par an et de réduire le programme d'amélioration à 15 ans, alors que 25 ans étaient la norme à la fin des années 1990.

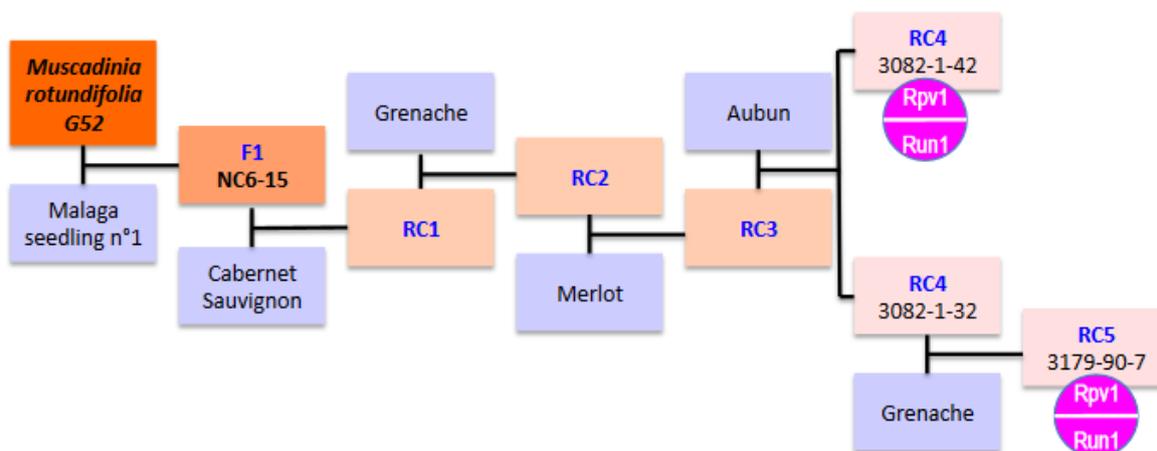


Figure 19 : Introgression des gènes de résistance à l'oïdium *Run1* et au mildiou *Rpv1* (Resistance to *Plasmopora viticola*) à partir de l'espèce sauvage *Muscadinia rotundifolia* (Bouquet et al., 2000). Les descendants résistants sont recroisés avec un *Vitis vinifera* d'intérêt (Grenache, M, CS ou Aubun).

Ce programme est divisé en trois étapes. La sélection par marqueurs permet de trier les descendants lors de la sélection précoce pour vérifier la présence des gènes de résistance choisis. La qualité du vin sera ensuite évaluée en vue d'une sélection finale pour une inscription au catalogue officiel (Schneider et al., 2014). Aujourd'hui, 25 variétés INRA dites « Resdur » de raisin de cuve sont en cours d'étude pour l'inscription au catalogue dont 4 « Resdur 1 » (2 blancs et 2 rouges) pourront être commercialisées à partir de 2022.

2) Génie génétique

Dans ce cas, une plante d'intérêt agronomique peut être transformée avec un gène de résistance identifié chez une autre espèce. Différentes méthodes de modification du génome de plantes existent mais elles nécessitent de connaître préalablement le gène de résistance. Par exemple, le gène de la chitinase du riz (*RCC2*) a été introduit dans les embryons somatiques de vigne (*Vitis vinifera* L. cv. Neo Muscut) en utilisant *Agrobacterium tumefaciens*. Ces plantes modifiées présentent une résistance accrue à l'oïdium (Yamamoto et al., 2000). Aujourd'hui, de nouvelles méthodes de modification de génome basées sur le CRISPR/Cas9 sont développées (Ren et al., 2016).

Mais l'utilisation de plantes OGM et plus précisément de vignes génétiquement modifiées en plein champ semble mal acceptée par la société. En effet, malgré la concertation avec un large public, les essais en parcelle expérimentale de pieds de vigne résistant au court noué sur le site de l'INRA de Colmar ont été détruits en 2009 et 2010.

Aujourd'hui, seule l'amélioration variétale par croisement est envisageable afin de créer des variétés de vigne moins sensibles à la FD.

Objectifs de la thèse

La FD est une maladie épidémique de quarantaine causée par un phytoplasme transmis de plante à plante par un insecte vecteur *S. titanus*. La lutte actuelle repose sur la plantation de ceps sains, l'arrachage des vignes infectées et des traitements insecticides, mais ces méthodes de lutte ont un impact économique et environnemental importants et de nouvelles alternatives sont envisagées. Une meilleure compréhension des interactions entre le pFD et la vigne est essentielle pour les développer.

Les mécanismes de virulence du pFD sont aujourd'hui peu connus. Certains effecteurs (SAP11 et SAP54) de '*Ca. P. asteris*' souche AYWB perturbent la physiologie de la plante hôte en interagissant avec des facteurs de transcription (Lu et al., 2014; MacLean et al., 2011). Des protéases de surface de type FtsH de '*Ca. P. mali*' sont impliquées dans le niveau de virulence des souches (Seemüller et al., 2011, 2013). L'identification et la caractérisation de telles protéases chez le pFD peuvent constituer une avancée dans la compréhension du pouvoir pathogène de ces bactéries et sont présentées dans le Chapitre I.

Du côté de la plante, le phénotypage de différents cépages de *Vitis vinifera*, de porte-greffes et de vignes sauvages n'a pas permis d'identifier de plantes résistantes, mais des différences de sensibilité ont été observées (Eveillard et al., 2016). Ainsi, le CS est très sensible et a un fort titre en pFD, alors que le M est très peu sensible à la FD, que ce soit en serre de haut confinement ou en vignoble. Cependant, en serre, toutes les inoculations ont été effectuées par l'intermédiaire des *S. titanus*. Les différences de réactions observées peuvent donc être dues à une résistance de la plante au pFD mais également à une plus ou moins bonne inoculation de la plante par l'insecte. Aussi afin de mieux caractériser la résistance observée chez le M, il faut s'affranchir de l'influence de l'insecte vecteur pour obtenir uniquement la réaction de la vigne au pFD. Une inoculation de la bactérie aux cépages à tester par l'intermédiaire d'un greffage permet de caractériser la sensibilité des cépages au pFD en s'affranchissant des interactions entre la vigne et *S. titanus*. Ces expériences sont présentées dans le Chapitre II et le Chapitre III, A.

La multiplication et la diffusion du pFD sont limitées dans le M, peu sensible à la FD, ce qui diminue la probabilité d'acquisition du pFD par les insectes et donc la propagation de la maladie (Bressan et al., 2005b). Chez le CS, le pFD se multiplie en moyenne 146 fois plus que chez le M et diffuse dans toute la plante (Eveillard et al., 2016). Mais qu'en est-il chez les parents de ces 2 cépages emblématiques du bordelais ? La caractérisation de la multiplication et de la diffusion du pFD chez les parents du CS et du M permet de compléter la caractérisation de la sensibilité de ces cépages à la FD et est présentée dans le Chapitre III, B.

Les phénotypes des parents du M et du CS suggèrent que la résistance du M provient de sa mère, la Mag (Boursiquot et al., 2009; Eveillard et al., 2016). En effet, il a été montré que le CS et l'un de ses parents, le Sau avaient un phénotype similaire avec une forte multiplication du pFD et une proportion de plantes infectées importante. Le M et sa mère, la Mag avaient également un phénotype similaire avec une faible multiplication du pFD et une faible proportion de plantes infectées 10 semaines post-transmission. Le CF, parent commun au CS et au M avait un phénotype intermédiaire. Afin de continuer la caractérisation du déterminisme génétique de cette résistance, des croisements sont effectués et des descendants issus de Mag x CF sont phénotypés pour la sensibilité à la FD. De plus, l'étude des descendants permet d'observer la ségrégation de la sensibilité et de rechercher des individus moins sensible à la FD que le M mais ayant les mêmes parents. Ces expériences sont présentées dans la Chapitre III.

Enfin, l'un des moyens de mieux comprendre les interactions pFD-vigne au niveau moléculaire est d'étudier l'expression des gènes de la plante suite à l'infection afin d'identifier des voies métaboliques modifiées pendant l'infection. Ces études sont peu nombreuses concernant la vigne infectée par des phytoplasmes, que ce soit de la FD ou du BN mais des différences d'expression de gènes ont été observées entre les vignes saines et les vignes infectées (Albertazzi et al., 2009; Hren et al., 2009a; Prezelj et al., 2016). Par exemple, les gènes de défense et du métabolisme des sucres sont perturbés chez les vignes infectées par le phytoplasme du BN (pBN) comparées aux vignes saines. Cependant, aucune étude n'a comparé les profils transcriptomiques d'une variété sensible et d'une variété peu sensible. La comparaison de l'expression des gènes du CS, sensible à la FD et du M, peu sensible à la FD lors de l'infection a pour but de mettre en évidence des différences de réactions entre ces 2 cépages pouvant expliquer les différences de sensibilité. Les résultats sont présentés dans le Chapitre IV.

Chapitre I : Identification et Caractérisation de l'expression des FtsH du pFD

I) Introduction

La FtsH est une métalloprotéase membranaire fixant le zinc et ATP-dépendante, impliquée dans le contrôle qualité des protéines dans les cellules grâce à sa capacité d'endoprotéase (Ito and Akiyama, 2005; Tomoyasu et al., 1993, 1995). Elle se caractérise par la présence de sites très conservés comprenant deux motifs de liaison à l'ATP (Walker A et B), un site d'hydrolyse à l'ATP (SRH) et d'un site de fixation au zinc (Ito and Akiyama, 2005) (Fig. 20).

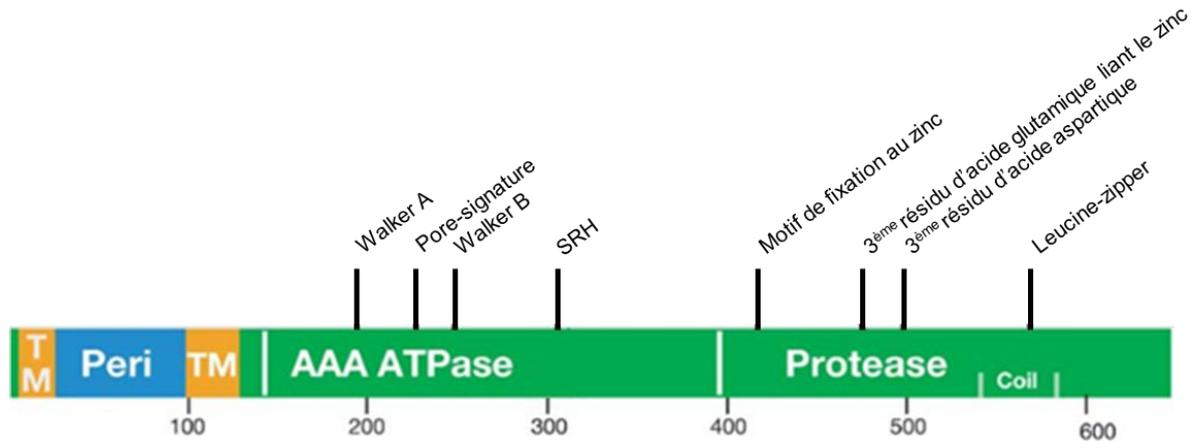


Figure 20 : Présentation des différents sites caractéristiques d'une FtsH. La séquence d'acides aminés de FtsH est représentée avec les régions transmembranaires (TM, orange), périplasmiques (Peri, bleu) et cytoplasmiques (vert) : domaines AAA ATPase, métalloprotéase, sites de fixation à l'ATP (walker A et B), site de l'hydrolyse de l'ATP (SRH), un pore-signature, un motif de fixation au zinc, le troisième résidu d'acide glutamique et d'acide aspartique et une leucine-zipper, d'après (Ito and Akiyama, 2005)

La protéase FtsH peut être essentielle pour la viabilité par exemple chez *E. coli*, *Lactococcus lactis* ou *Helicobacter pylori*, ou non essentielle par exemple chez *B. subtilis* ou *Staphylococcus aureus* (Ge and Taylor, 1996; Lithgow, 2004; Nilsson et al., 1994; Srinivasan et al., 2006). En effet, la délétion du gène *FtsH* n'est pas létale chez *S. aureus*, cependant elle conduit à une diminution de la croissance, une sensibilité à différents stress comme le stress salin ou acide et une diminution de sa pathogénicité en cas d'infection d'un modèle murin (Lithgow, 2004). Toutefois, cette différence de pathogénicité peut être due au défaut de croissance ou de réponse au stress. Ainsi, les différentes fonctions de la protéase FtsH sont potentiellement utiles pour l'adaptation efficace des pathogènes à leur environnement. A l'état physiologique, la FtsH a également un rôle dans la dégradation du facteur de transcription de choc thermique σ_{32} , responsable de la transcription des gènes de choc thermique. Mais quand la cellule subit un stress, ce facteur n'est plus dégradé et il permet la transcription des gènes de choc thermique (Rodriguez et al., 2008). Dans la biogenèse membranaire,

la FtsH régule les niveaux de transcrits du gène LpxC impliqué dans la biosynthèse des lipopolysaccharides dont une sous ou surexpression est toxique pour *E. coli*. FtsH permet par ses dégradations de réguler le niveau d'expression de protéines impliquées dans divers processus biologiques (Ogura et al., 1999; Tomoyasu et al., 1993, 1995).

Ces protéases ont un rôle important chez les bactéries mais elles sont peu étudiées chez les phytoplasmes. Certaines données sont disponibles pour '*Candidatus Phytoplasma mali*' ('*Ca. P. mali*'), l'agent de la prolifération du pommier. Le développement des symptômes de la maladie chez les pommiers dépend de la virulence des souches de phytoplasmes classées en 3 groupes : peu virulentes, modérément virulentes et fortement virulentes (Seemüller and Schneider, 2007). Pour les différencier, un phénotypage basé sur l'analyse du polymorphisme des gènes codants des protéines, ribosomales ou non, a été réalisé. Cependant, les génotypes définis n'étaient pas corrélés avec les niveaux de virulence (Seemüller et al., 2011). Les auteurs ont ensuite analysé les séquences des gènes *FtsH* de '*Ca. P. mali*' qui en possède 6, contrairement à la plupart des bactéries qui en présentent une copie unique (Seemüller et al., 2013). Ce nombre élevé de gènes *FtsH* est répandu chez les phytoplasmes et semblerait indiquer leur importance pour ces agents pathogènes végétaux. L'analyse SSCP (single-strand conformation polymorphism) et le séquençage de fragments du gène *FtsH* de 42 souches différentes de '*Ca. P. mali*' ont montré 20 profils différents (Seemüller et al., 2010). Une corrélation entre les données de pathogénie des souches de '*Ca. P. mali*' et la variabilité de la séquence d'ADN des gènes *FtsH* a été établie. Par exemple, les protéases FtsH codées dans les génomes des souches peu virulentes sont regroupées dans un même cluster (Seemüller et al., 2011). Le logiciel de prédiction de la topologie membranaire Polyphobius, indique que la partie C-terminale des protéases FtsH de '*Ca. P. mali*' des souches sévères est orientée avec l'extérieur de la cellule, contrairement aux souches modérément virulentes (Seemüller et al., 2013). Il est ainsi concevable que les protéases FtsH orientées vers le milieu extracellulaire puissent être impliquées dans la pathogénie en dégradant des molécules de l'hôte.

Aucune donnée concernant les FtsH de pFD n'étant actuellement disponibles, ce chapitre a pour but de les mettre en évidence et de caractériser de leur expression dans les différents hôtes, plantes ou insectes.

II) Résultats-Discussion

A) Identification des gènes *FtsH* dans le génome du pFD

Par alignement du génome du pFD avec des séquences protéiques de FtsH bien caractérisées telles que celles d'*E. coli* et de *B. subtilis*, 15 gènes ayant une homologie globale avec les séquences de référence des protéines FtsH ont été identifiées (Carle et al., 2011).

Les différents sites spécifiques et indispensables pour une protéase de surface de type FtsH que sont les deux domaines transmembranaires, un walker A et un walker B pour la fixation à l'ATP, un SRH (Second Region of Homology) pour l'hydrolyse de l'ATP, un domaine de fixation au zinc et un site D permettant l'activité de la protéase, ont été recherchés pour ces 15 gènes. Trois possèdent tous les sites d'une protéase FtsH (Flado_0314_0026, Flado_7221_0015 et Flado_0067_0046), 6 autres séquences sont incomplètes car situées à l'extrémité d'un contig, et 6 n'ont pas tous les sites spécifiques d'une FtsH et semblent plutôt être des ATPases et ne seront pas retenues (Fig. 21).

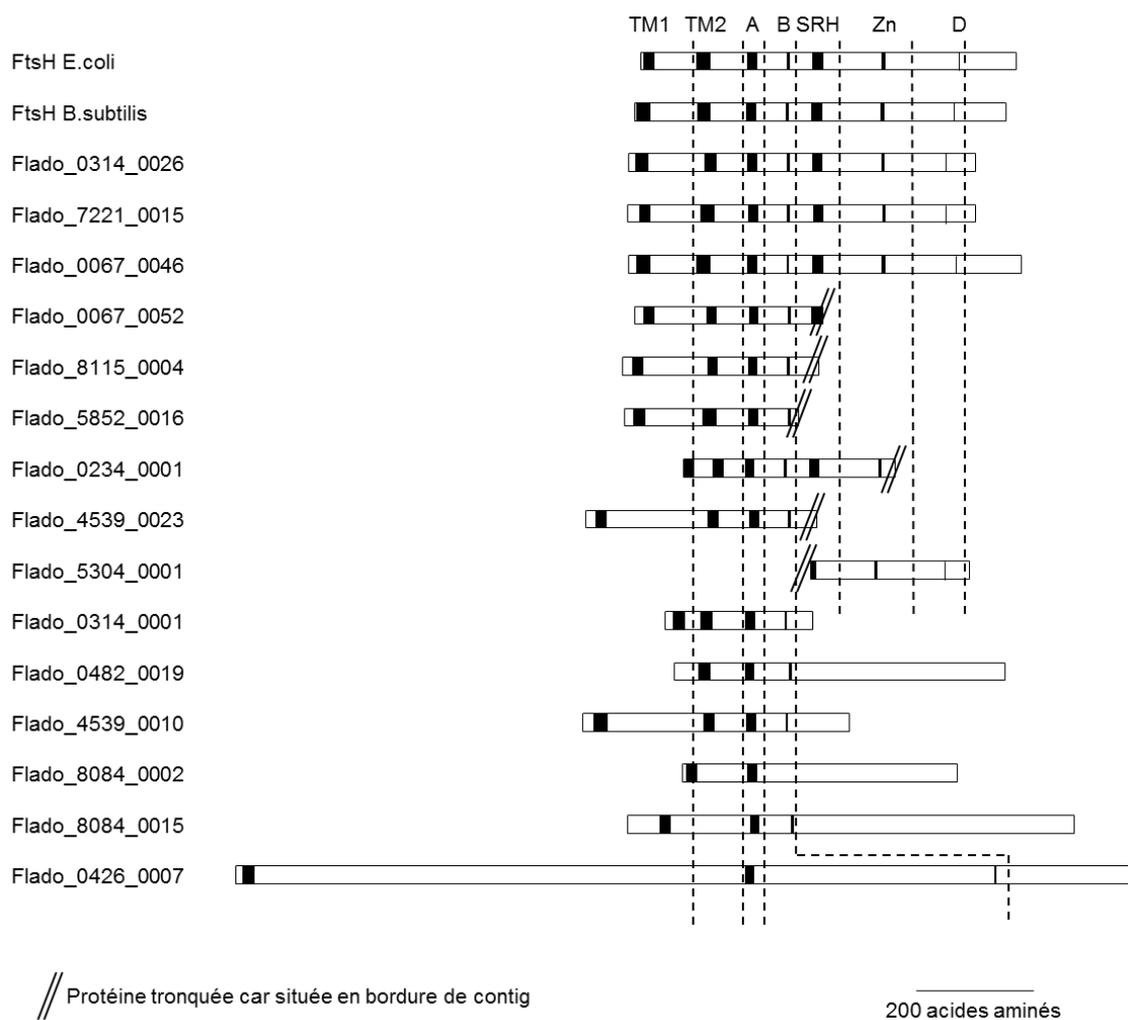


Figure 21 : Schéma des différentes séquences du génome de pFD ayant une homologie avec les séquences protéiques de FtsH et possédant les différents sites spécifiques : les domaines transmembranaires (TM1 et TM2), les sites de fixation à l'ATP (walker A (A) et walker B (B)), le site d'hydrolyse de l'ATP (SRH), le site de fixation au zinc (Zn) et un résidu aspartique (D). Certaines séquences se trouvent en bordure de contig et sont incomplètes (//). Les 6 dernières protéines ne possèdent pas tous les sites spécifiques et n'ont donc pas été retenues.

Sur les 6 séquences partielles, 5 sont tronquées en C-terminal et 1 en N-terminal. Différentes PCR ont été réalisées afin de compléter les séquences. Les amorces ont été dessinées de façon à être spécifiques des séquences à allonger ou commune à toutes les FtsH et notée FtsH-Com-R. Elles ont été utilisées lors de PCR réalisées sur de l'ADN de fève infectée par le pFD isolat FD92, l'ADN de fève saine et l'eau servant de témoins négatifs. Les différentes amplifications ont présenté une seule bande à la taille attendue, à l'exception de l'amplification dont l'objectif était d'allonger la séquence de Flado_5852_0016 qui a présenté deux bandes d'amplification dont une à la taille attendue (Fig. 22).

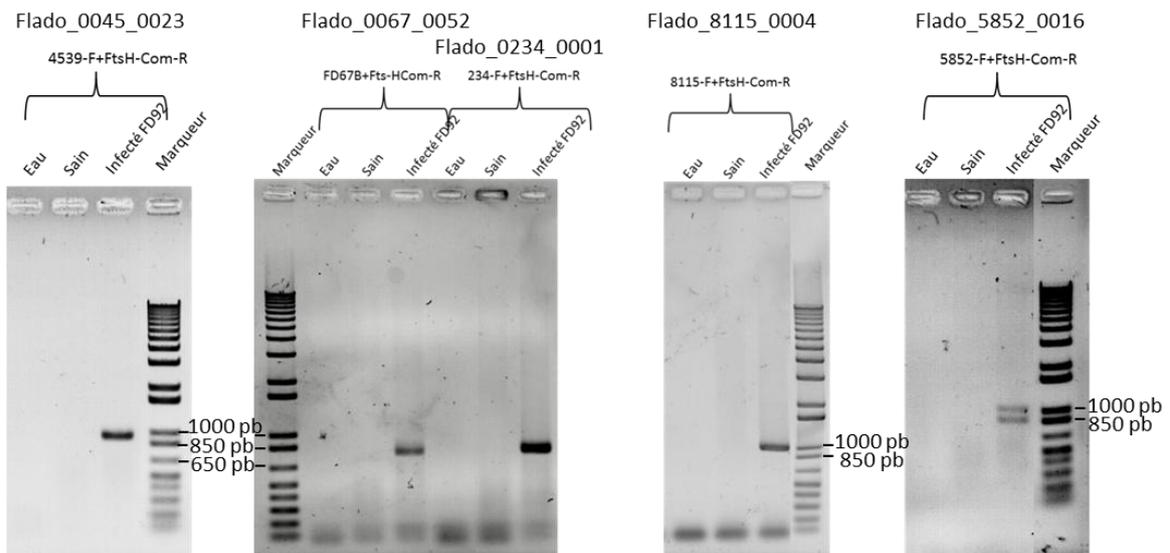


Figure 22 : Résultats des amplifications par PCR de gènes codants les FtsH Flado_4539_0023, Flado_0067_0052, Flado_0234_0001, Flado_8115_0004 et Flado_5852_0016, en utilisant une amorce spécifique de la séquence du gène FtsH à amplifier et une amorce commune aux différents gènes codant des FtsH (FtsH-Com-R). Les tailles attendues sont indiquées dans la Table 20 (Matériels et Méthodes). Les témoins négatifs « eau » et « sain » correspondent à une amplification PCR sans ADN matrice ou avec de l'ADN de fève saine respectivement. Marqueur de taille de 1 kpb (Invitrogen).

Après clonage et séquençage des produits PCR, les séquences allongées des 5 gènes obtenues par amplification PCR ont été ajoutées aux données issues du pyroséquençage. Les gènes Flado_0067_0052, Flado_5852_0016 et Flado_8115_0004 ont alors été complétés. Les résultats d'alignement ont également montrés que Flado_0234_0001 et Flado_5304_0001 constituaient un seul et même gène. Une séquence entière unique en a été déduite et nommée Flado_0234_0001. Les alignements montrent aussi que Flado_4539_0023 peut être prolongé par une extrémité du contig 0426 et ainsi donner une séquence complète. De nouvelles amplifications ont permis de vérifier ces données (Fig. 23).

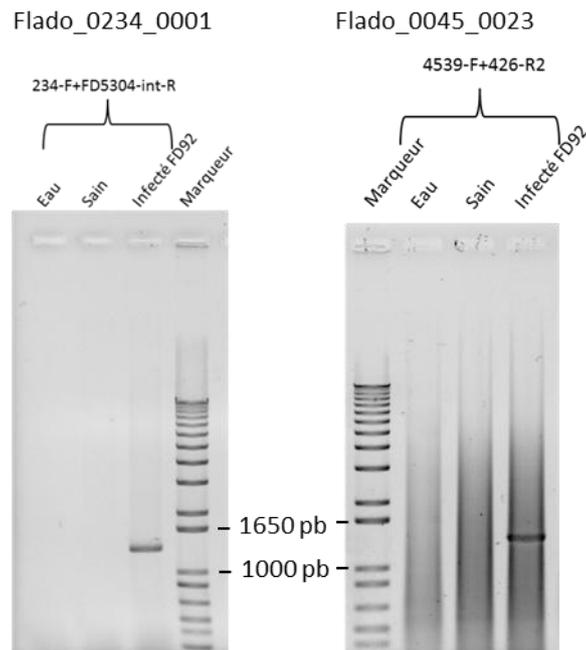


Figure 23 : Résultats des amplifications de gènes codants les FtsH Flado_4539_0023 et Flado_0234_0001, en utilisant une amorce en 5' spécifique placée sur les gènes (234-F et 4539-F) et une amorce spécifique en 3' placée sur les régions inter-géniques (FD5304-int-R et 426-R2). Les tailles attendues sont de 1310 pb et 1318 pb respectivement. Les témoins négatifs « eau » et « sain » correspondent à une amplification PCR sans ADN matrice ou avec de l'ADN de fève saine respectivement. Marqueur de taille de 1 kpb (Invitrogen).

Toutes les séquences protéiques issues de la traduction des séquences nucléiques obtenues après les amplifications PCR et les assemblages de différents séquençages présentent les différents sites caractéristiques des FtsH, à l'exception de Flado_0067_0052 qui ne présente pas de leucine-zipper (Fig. 24 et Fig. 25). Les différentes séquences des FtsH ont été placées sur le génome du pFD et numéroté de 1 à 8 en fonction de leur ordre à partir du gène *DnaB* (Table 3).

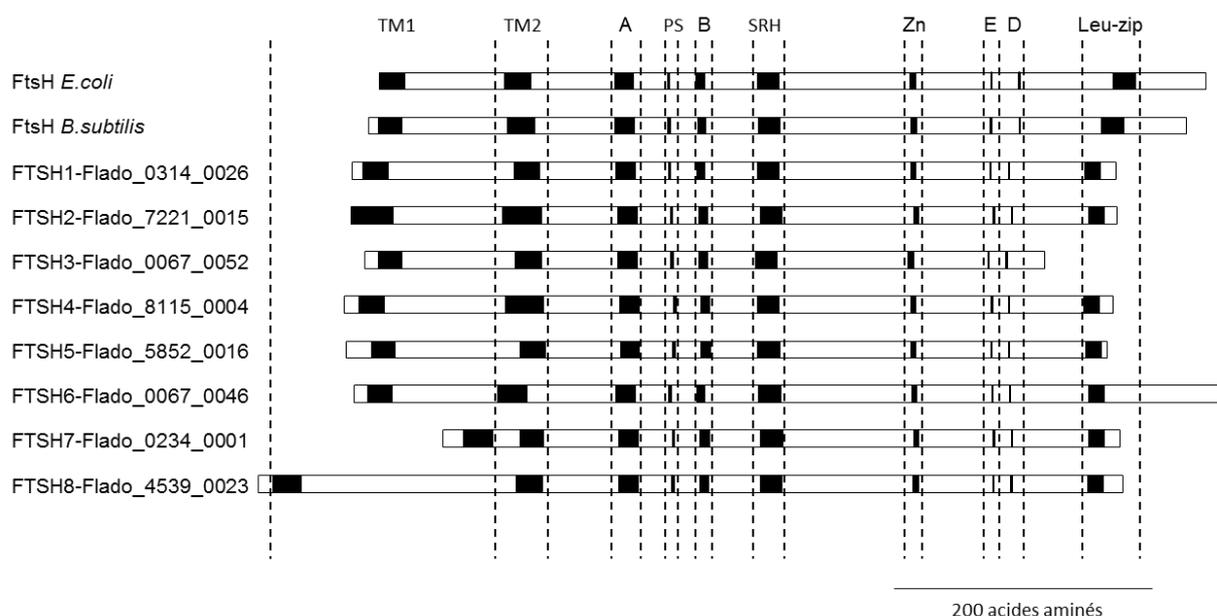


Figure 24 : Schéma des 8 séquences protéiques codées par les gènes *FtsH* dans le génome du pFD isolat FD92, ainsi que celles d'*E. coli* et *B. subtilis* avec les différents sites caractéristiques d'une FtsH en noir : les deux domaines transmembranaires (TM1 et TM2), les sites de fixation de l'ATP (walker A (A) et walker B (B)), une signature signalant un pore (PS), un site d'hydrolyse de l'ATP (SRH), un motif de fixation au zinc (Zn) ainsi que des résidus acides (acide glutamique (E) et acide aspartique (D)) participant à la fixation au zinc et des résidus formant une leucine-zipper (Leu-zip).

Nom du gène	Nom abrégé
<i>FTSH1-Flado_0314_0026</i>	<i>FTSH1</i>
<i>FTSH2-Flado_7221_0015</i>	<i>FTSH2</i>
<i>FTSH3-Flado_0067_0052</i>	<i>FTSH3</i>
<i>FTSH4-Flado_8115_0004</i>	<i>FTSH4</i>
<i>FTSH5-Flado_5852_0016</i>	<i>FTSH5</i>
<i>FTSH6-Flado_0067_0046</i>	<i>FTSH6</i>
<i>FTSH7-Flado_0234_0001</i>	<i>FSTH7</i>
<i>FTSH8-Flado_4539_0023</i>	<i>FSTH8</i>

Table 3 : Tableau de correspondance entre les noms des gènes *FtsH* et les noms abrégés

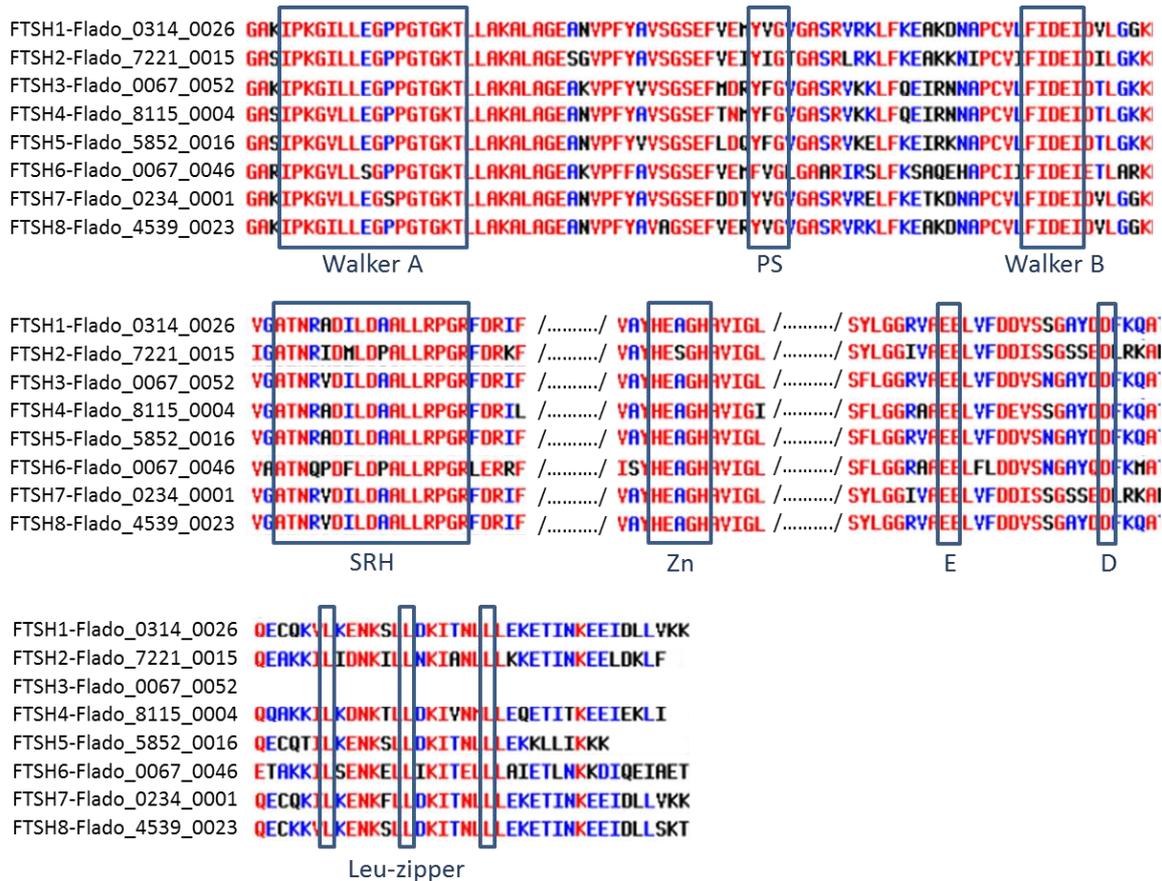


Figure 25 : Présentation des différents domaines des 8 FtsH sur les séquences protéiques : les sites de fixation de l'ATP (walker A et walker B), une signature signalant un pore (PS), un site d'hydrolyse de l'ATP (SRH), un motif de fixation au zinc (Zn) ainsi que des résidus acides (acide glutamique (E) et acide aspartique (D)) participant à la fixation au zinc et des résidus formant une leucine-zipper (Leu-zipper).

Les 8 séquences nucléiques présentent une homologie comprise entre 90 et 53% : FTSH1 et FTSH7 sont les plus proches et FTSH6 et FTSH8 les plus éloignées. Les résultats sont similaires avec les séquences protéiques avec une homologie de 83% entre FTSH1 et FTSH7 et de 42% entre FTSH6 et FTSH8.

Un orthologue du gène *FtsH* est retrouvé dans les génomes de chaque bactérie y compris ceux de phytoplasmes séquencés, c'est-à-dire '*Ca. P. asteris*' isolat OY et AYWB, '*Ca. P. australiense*' et '*Ca. P. mali*', permettant ainsi une analyse phylogénétique moléculaire avec les séquences protéiques des 8 FtsH du pFD. Pour la construction de l'arbre phylogénétique, les séquences paralogues de *FtsH* de '*Ca. P. mali*' (ATP_00457, ATP_00034 et ATP_00464), ainsi que les séquences des ATPases AAA+ et de protéases M41 fixant l'ATP ont été ajoutées.

Sur l'arbre phylogénétique, les séquences des FtsH du pFD se regroupent avec les FtsH des différentes bactéries et sont séparées de la branche des ATPases et des protéines ATP-binding M41 qui n'ont pas tous les sites caractéristiques des FtsH (Fig. 26). Les FtsH du pFD se regroupent sur la même branche à l'exception de la FTSH6. Cette dernière est séparée des autres FtsH du pFD mais clusterise avec les autres FtsH en copie unique des autres phytoplasmes et avec une des copies de '*Ca. P. mali*', suggérant qu'elle puisse être la FtsH originelle. La FTSH2 est également séparée des 6 autres suggérant qu'il y a eu différents événements pour aboutir aux 6 copies de FtsH dans le génome du pFD.

Le fait que les FtsH du pFD se regroupent avec toutes les FtsH des autres bactéries et plus particulièrement avec celles des phytoplasmes est un argument supplémentaire en faveur de leur nomenclature.

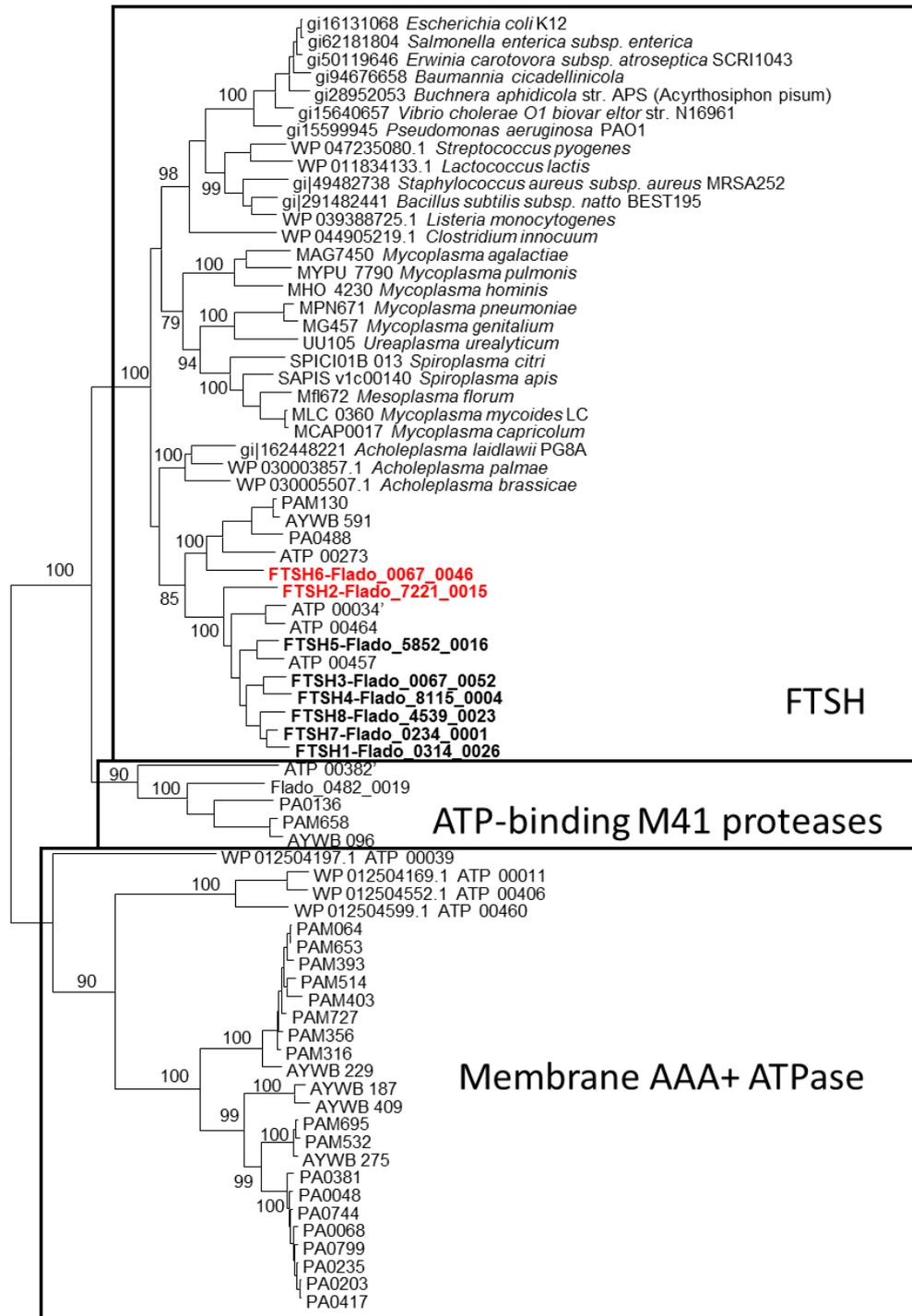


Figure 26 : Arbre issu de l'analyse phylogénétique moléculaire des FtsH par la méthode de vraisemblance maximale basée sur le modèle matriciel JTT et réalisée sur MEGA6. L'arbre présentant la plus forte probabilité logarithmique (-58067.3365) est affiché et il est dessiné à l'échelle, avec des longueurs de branche mesurées en prenant en compte le nombre de substitutions par site. PAM : 'Ca. P. asteris' OY, AYWB : 'Ca. P. asteris' AYWB, PA : 'Ca. P. australiense', ATP : 'Ca. P. mali' et Flado : pFD.

B) Expression différentielle des gènes *FtsH* du pFD selon les hôtes

L'expression des gènes *FtsH* du pFD a été analysée dans 2 pathosystèmes différents : le premier correspond au pathosystème naturel avec la vigne (CS et M) et le vecteur *S. titanus*, et le second correspond au pathosystème expérimental avec la fève (*Vicia faba*) et la cicadelle *E. variegatus*. Après infection, 3 échantillons de chaque groupe d'individus, plantes et insectes, ont été analysés. Les tests qPCR ont montré que les titres en phytoplasmes étaient élevés et correspondaient aux valeurs attendues (Anabestani et al., 2017; Eveillard et al., 2016). En effet, ils variaient entre 1,07E+05 et 2,17E+05 pFD/mgFP chez les vignes CS (avec une moyenne de 1,30E+05), entre 7,14E+04 et 1,73E+05 dans les vignes M (avec une moyenne de 8,93E+04), entre 2,83E+06 et 5,27E+06 pFD/insectes dans les *S. titanus* (avec une moyenne de 4,11E+06), entre 1,13E+06 et 3,74E+06 pFD/mgPF chez les fèves (avec une moyenne de 2,56E+06), et entre 2,65E+04 et 1,4E+05 pFD/insecte dans les *E. variegatus* (avec une moyenne de 5,79E+04). Aucun pFD n'a été détecté dans les échantillons sains, plantes ou insectes.

L'expression de tous les gènes *FtsH* a été testée par RT-PCR pour les deux pathosystèmes. Aucune amplification n'a été obtenue dans les conditions témoins, les hôtes sains, les échantillons exempt de reverse-transcriptase et de façon surprenante dans les échantillons de M. Une comparaison de l'expression des gènes *FtsH* du pFD entre le CS, cépage très sensible à la FD et le M, cépage peu sensible à la FD, n'a donc pas été possible. Les résultats ont montré que tous les gènes *FtsH* étaient exprimés dans les 4 hôtes infectés par le pFD. Cependant, *FTSH8* est exprimé dans les plantes mais très peu chez les insectes, l'expression mesurée étant en limite de détection (Fig. 27). D'ailleurs comparé aux autres gènes *FtsH*, *FTSH8* est statistiquement le plus faiblement exprimé de tous quel que soit l'hôte.

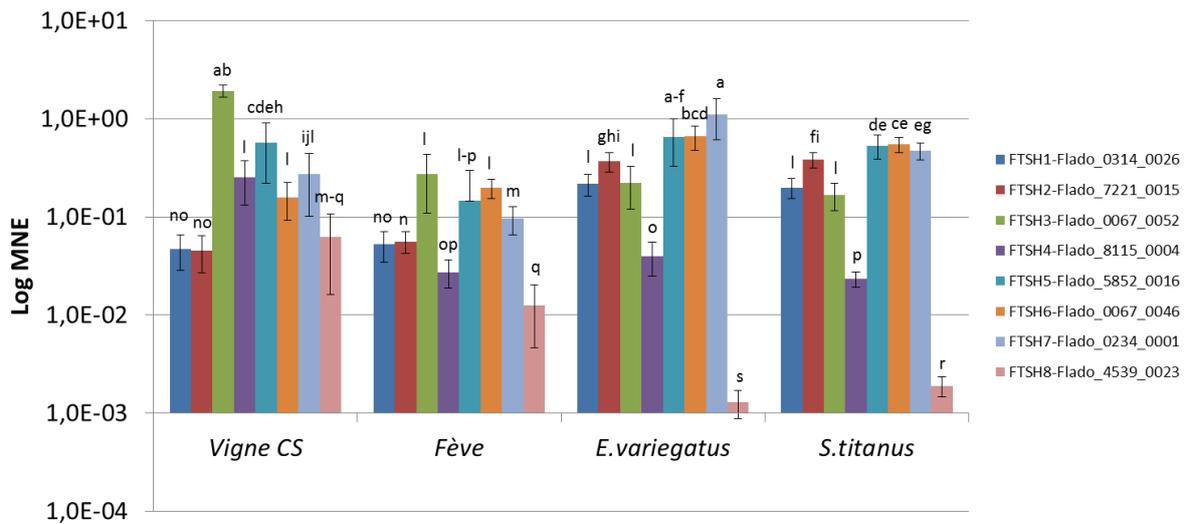


Figure 27 : Expression relative (log Mean Normalized Expression ou MNE) des gènes *FtSH* du pFD isolat FD92 dans les plantes hôtes (Vigne CS et Fève) et dans les insectes vecteurs (*E. variegatus* et *S. titanus*). Les différentes lettres indiquent les différences statistiques (test de Wilcoxon, p-value<0,05)

D'une manière globale, les vignes et les fèves présentent des profils d'expression semblables et la même chose est observée entre *S. titanus* et *E. variegatus*. Ces résultats montrent qu'il n'y a pas de différences majeures de niveaux d'expression entre vigne et fève, et entre *S. titanus* et *E. variegatus*.

Chez la vigne, le gène *FtSH* le plus exprimé est *FTSH3*, puis dans une moindre mesure *FTSH5*. Les gènes les plus faiblement exprimés sont *FTSH1*, *FTSH2* et *FTSH8* chez le CS. Chez le vecteur naturel *S. titanus*, les gènes *FTSH5*, *FTSH6* et *FTSH7*, exprimés à des niveaux non statistiquement différents de *FTSH5* chez le CS, sont les plus exprimés (test de Wilcoxon, p-value<0,05). *FTSH1*, *FTSH2* et *FTSH3* sont un peu moins exprimés chez *S. titanus*. Enfin, *FTSH4* et *FTSH8* sont les plus faiblement exprimés chez *S. titanus* (Fig. 27).

Chez *E. variegatus*, 5 *FtSH* (*FTSH1*, *FTSH2*, *FTSH3*, *FTSH5* et *FTSH6*) ont des niveaux d'expression comparables à ceux de *S. titanus*, les autres gènes (*FTSH4* et *FTSH7*) ont une expression plus importante, excepté *FTSH8*. De façon similaire, *FTSH1*, *FTSH2*, *FTSH6* et *FTSH8* ont des niveaux d'expression comparable chez la fève et la vigne, les 4 autres *FtSH* étant moins exprimées chez la fève que chez la vigne (Fig. 27)

Après avoir évalué le niveau d'expression des différents gènes dans les 4 hôtes, l'expression relative des gènes *FtsH* du pFD entre la vigne CS et le vecteur naturel *S. titanus* a été calculée. Les résultats indiquent que 3 *FtsH* sont plus exprimés dans le CS : *FTSH3*, *FTSH4* et *FSTH8*, ce dernier s'exprimant très faiblement quel que soit l'hôte. *FTSH3* et *FTSH4* par exemple, s'expriment 10 fois plus lorsque le pFD infecte la vigne plutôt que *S. titanus*. Inversement, *FTSH1*, *FTSH2*, *FTSH6* et *FTSH7* sont plus exprimés dans l'insecte vecteur que chez la plante. *FTSH5* semble s'exprimer de façon similaire chez ces deux hôtes (test de Wilcoxon, p-value<0,05) (Fig. 28).

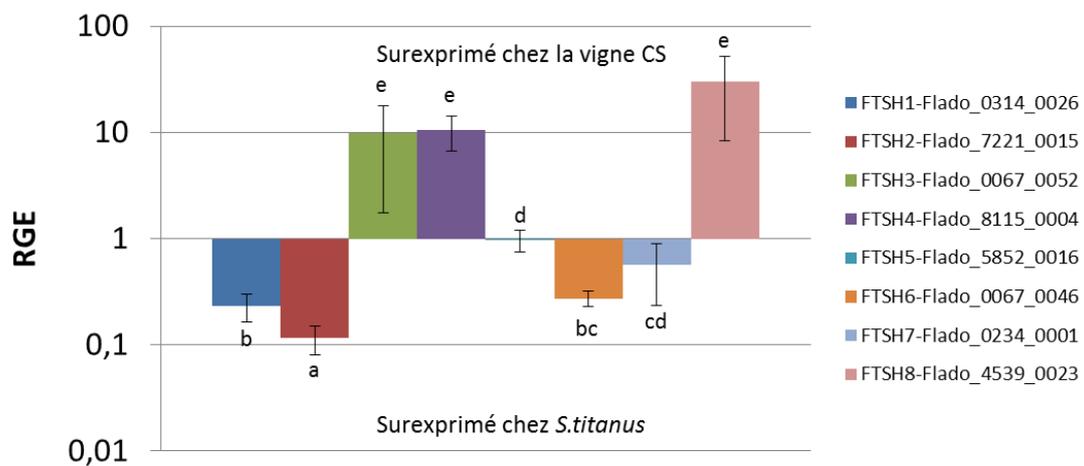


Figure 28 : Graphique montrant l'expression relative des gènes *FtsH* (Relative Gene Expression ou RGE) entre les vignes CS et le vecteur naturel *S. titanus* infectés. Les différentes lettres indiquent les différences statistiques (test de Wilcoxon, p-value<0,05).

Dans le pathosystème expérimental *E. variegatus*-fève, *FTSH1*, *FTSH2*, *FTSH6* et *FSTH7* ont un niveau d'expression plus important dans les *E. variegatus* infectés que dans les fèves infectées, contrairement à *FTSH8* qui est très peu exprimé dans les insectes (Fig. 29). L'expression des *FTSH3*, *FTSH4* et *FTSH5* n'est significativement pas différente entre fèves et *E. variegatus*.

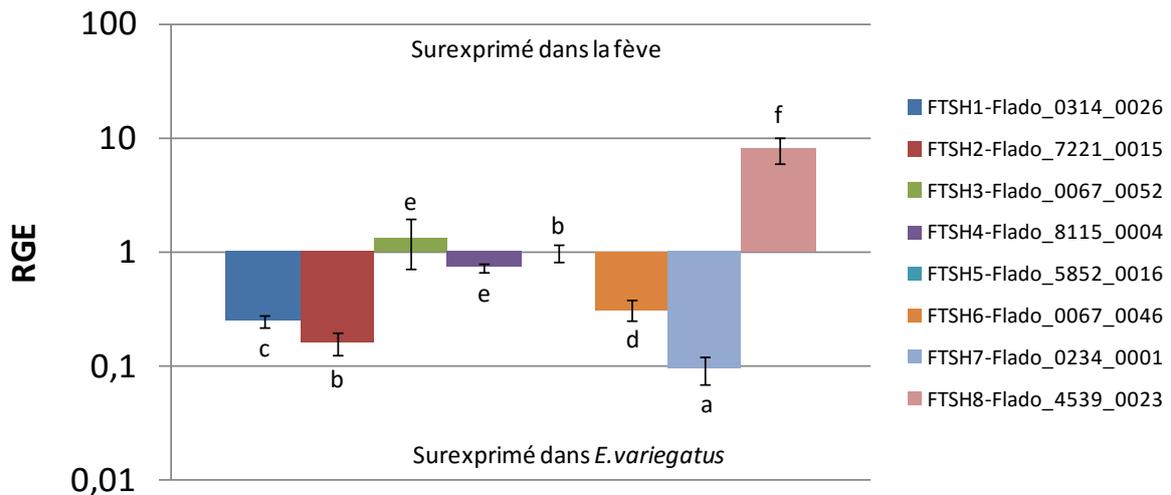


Figure 29 : Graphique montrant l'expression relative des gènes *FtsH* (RGE) entre les fèves et le vecteur expérimental *E. variegatus* infecté. Les différentes lettres indiquent les différences statistiques (test de Wilcoxon, p-value<0,05).

Les différents gènes *FtsH* du pFD s'expriment en cas d'infection de la vigne, de la fève, d'*E. variegatus* et de *S. titanus*, mais les niveaux d'expression varient, ce qui laisse à penser que les *FtsH* pourraient avoir un rôle dans l'adaptation des phytoplasmes à leurs hôtes en permettant par exemple la dégradation de différentes protéines de l'hôte. L'expression des *FTSH1*, *FTSH2*, *FTSH6* et *FTSH7* est plus importante dans les insectes (*S. titanus* et *E. variegatus*) que dans les plantes (vigne et fève), à la différence de *FTSH8*. Ces gènes pourraient avoir un rôle dans l'adaptation des phytoplasmes à leurs hôtes insectes et plantes respectivement.

Mais l'expression de certains gènes *FtsH* entre les plantes et les insectes vecteurs est différente entre le pathosystème naturel et le pathosystème expérimental. En effet, les niveaux d'expression de *FTSH3* et *FTSH4* sont très différents entre les deux pathosystèmes. Alors que les expressions de ces gènes sont similaires chez la plante et l'insecte du pathosystème expérimental, elles sont plus importantes chez la vigne que chez le vecteur naturel. Ainsi, ces gènes pourraient permettre une adaptation à l'hôte vigne.

Chez '*Ca. P. asteris*' AY-WB, des différences d'expression de gènes entre insecte vecteur et plante hôte ont été observées (MacLean et al., 2011; Makarova et al., 2015). Certains effecteurs comme SAP54 et SAP11, sont surexprimés chez *A. thaliana* comparé à *M. quadrilineatus*. Ils sont impliqués dans le développement de symptômes et la dérégulation de la biosynthèse du JA pour augmenter l'attraction des plantes pour les insectes vecteurs afin de disséminer le phytoplasme. D'autres gènes impliqués dans la réponse des bactéries au stress sont surexprimés

dans l'insecte hôte infecté tel que le gène *mutT* (AYWB_302) nécessaire pour la protection contre les ROS chez *E. coli*. Ainsi, les FtsH pourraient elles aussi avoir un rôle dans l'adaptation du pFD à ses hôtes.

Des FtsH dont la partie protéase serait exposée vers le milieu extracellulaire, pourraient donc être impliquées dans les interactions hôte-pathogène, ainsi que dans la virulence. Nous avons donc recherché quelle topologie avaient les 8 FtsH du pFD.

C) Prédiction de la topologie des 8 FtsH du pFD

Différents logiciels de prédiction de la topologie des protéines membranaires existent. Polyphobius a été choisi étant donné qu'il semble être plus performant pour prédire celle des protéines de phytoplasmes (Käll et al., 2004; Seemüller et al., 2013). Les 8 protéases FtsH identifiées dans le génome de pFD ont par définition 2 domaines transmembranaires qui ont également été identifiés par Polyphobius (Table 4). Ce logiciel prédit également que les parties C-terminales des FtsH sont intracellulaires, à l'exception de FTSH6 et FTSH7. Les différents sites de ces 2 protéases seraient exposés vers le milieu extracellulaire c'est-à-dire directement au contact de l'hôte. Elles pourraient donc avoir un rôle dans la pathogénie du pFD.

Nom de la protease FtsH	Nombre d'acides aminés	Nombre de domaines transmembranaires prédits par Polyphobius	Prédiction de l'orientation extracellulaire de la partie C-terminale par Polyphobius (%)
FTSH1	595	2	9
FTSH2	596	2	8
FTSH3	530	2	10
FTSH4	599	2	1
FTSH5	611	2	3
FTSH6	674	2	74
FTSH7	528	2	86
FTSH8	673	2	25

Table 4 : Prédiction de l'orientation extracellulaire de la partie C-terminale des protéases FtsH du pFD par le logiciel Polyphobius.

Il serait intéressant de démontrer expérimentalement l'orientation de ces FtsH. Des observations en microscopie électronique avec des anticorps spécifiques de chacune des FtsH du pFD pourraient permettre de valider ou non les prédictions d'orientation de ces protéases.

Les protéases FTSH6, FTSH7 et FTSH8 ont été exprimées chez *E. coli* dans le but de mesurer leur activité ATPasique et protéasique. FTSH6 et FTSH7 ont été sélectionné sur le critère de la

prédiction de la topologie protéique et FTSH8 puisqu'elle a la caractéristique d'avoir un espace inter-membranaire plus long que toutes les autres protéases.

D) Activité de 3 FtsH du pFD

Lors des tests de mesure de l'activité ATPasique, une augmentation de 1 348%, 220% et 199% de la concentration de phosphate due à l'hydrolyse de l'ATP a été observée au contact de FTSH6, FTSH7 et FTSH8 respectivement après 15 min d'incubation (Fig. 30).

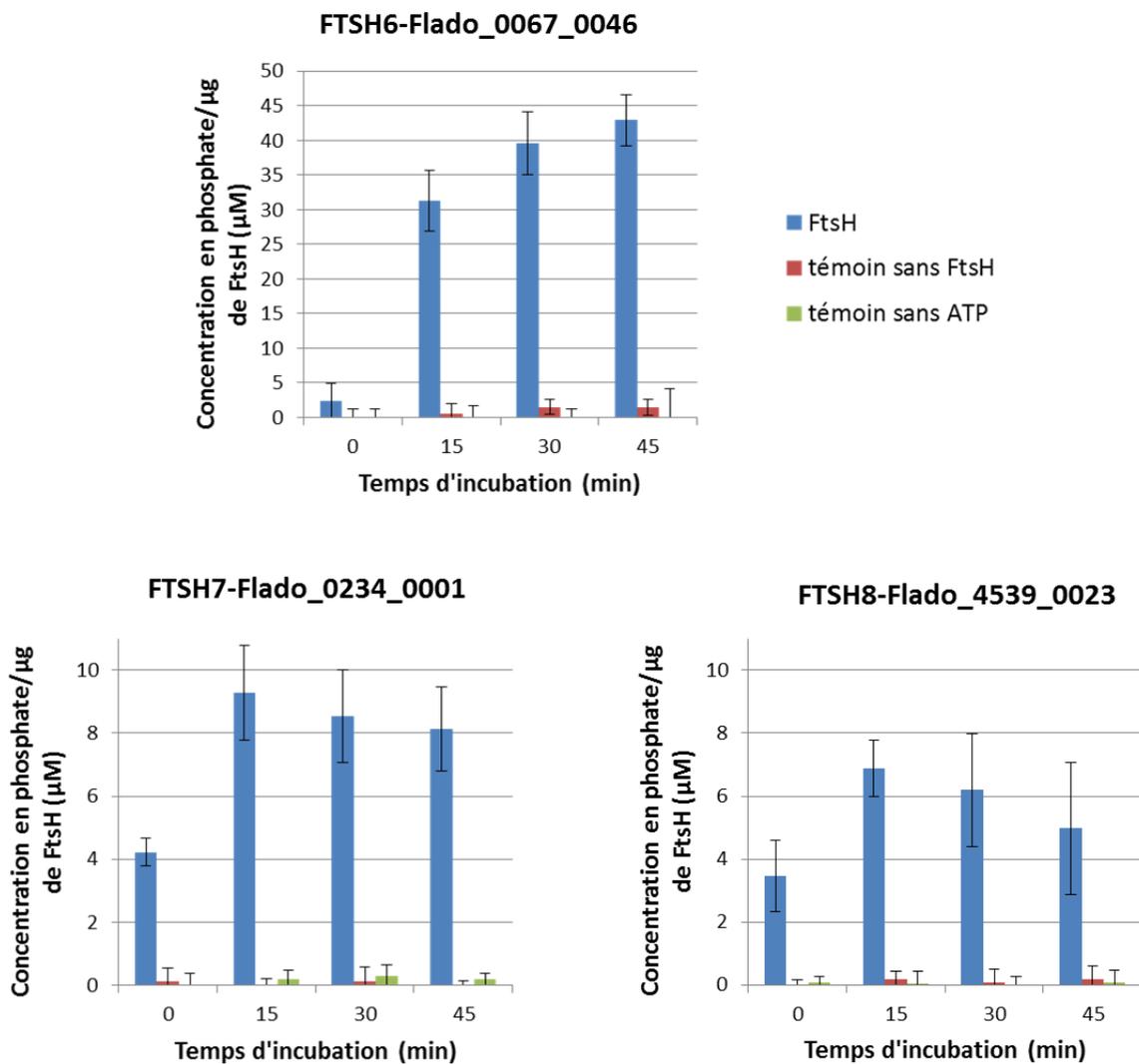


Figure 30 : Graphique représentant la concentration de phosphate libéré suite à l'hydrolyse de l'ATP par les FtsH6, FtsH7 et FtsH8 après 0, 15, 30 et 45 minutes. Les témoins sans ATP et sans FtsH ont été ajoutés.

Par comparaison, les témoins sans ATP et sans FtsH ont révélé de très faibles concentrations en phosphate (de 0,02 à 1,51 μM de phosphate/ μg de FtsH). La FTSH6 hydrolyse l'ATP de manière plus importante que les FTSH7 et FTSH8 puisqu'à 45 min, environ 43 μM de phosphates/ μg de FtsH sont détectés avec la FTSH6, alors que seulement 8 et 5 μM de phosphates/ μg le sont avec la FTSH7 et la FTSH8 respectivement (Fig. 30).

Les FTSH6, FTSH7 et FTSH8 ont donc une activité ATPasique *in vitro*, cependant aucune activité protéolytique n'a été détectée avec le test d'hydrolyse de l'asocaséine. Une autre série d'essai pour évaluer leur activité protéolytique est à effectuer.

III) Conclusion

Comme dans le génome de '*Ca. P. mali*' qui possède 4 gènes *FtsH*, 8 copies de ce gène ont été identifiées dans le génome du pFD. Contrairement aux copies supplémentaires de *FtsH* chez '*Ca. P. asteris*' isolat AYWB, les gènes *FtsH* du pFD ne semblent pas être dans des Potential Mobile Units (PMU) (Bai et al., 2006; Carle et al., 2011). Chez '*Ca. P. asteris*' AYWB, la majorité des gènes de virulence sont situés dans des régions PMU, suggérant que les gènes codant les FtsH sont impliqués dans la virulence et dans l'adaptation du phytoplasme à leurs hôtes (Makarova et al., 2015).

Les 6 gènes *FtsH* de '*Ca. P. asteris*' isolat AYWB sont plus exprimés lorsqu'il est dans l'insecte *Macrostes quadrilineatus* L. (Hemiptera, *Cicadellidae*) que dans la plante *A. thaliana*, à l'exception de la copie AYWB591, non située dans une PMU. En effet, le nombre de copies de PMU circulaire chez ce phytoplasme est plus élevé d'environ 5 fois chez les insectes par rapport aux plantes, ce qui peut expliquer les niveaux d'expression des *FtsH* plus importants. Les différents gènes *FtsH* du pFD s'expriment dans les différents hôtes naturels (vigne et *S. titanus*) et expérimentaux (fève et *E. variegatus*) mais à des niveaux différents. Par comparaison avec '*Ca. P. asteris*' isolat AYWB, il était attendu que le niveau d'expression des *FtsH* du pFD soit supérieur chez les insectes en comparaison avec les plantes, cependant certaines *FtsH* du pFD se comportent différemment. En effet, *FTSH8* est plus exprimé dans les plantes que dans les insectes même si son niveau d'expression est globalement très faible, et *FTSH3* et *FTSH4* sont plus exprimés dans la vigne comparée à *S. titanus*. L'expression de toutes les *FtsH* dans les différents hôtes semble indiquer une fonction importante de ces protéases, et les différences d'expression inter-hôtes suggèrent un rôle dans l'adaptation. En effet, les gènes *FTSH1*, *FTSH2* et *FTSH6* sont surexprimés chez l'insecte, suggérant que ces protéases sont importantes pour la multiplication du phytoplasme dans l'insecte. Ces différentes FtsH pourraient-elles dégrader des substrats différents selon l'hôte ? Ou sont-elles dans

le même opéron que des gènes indispensable à la survie et eux-aussi surexprimés dans l'insecte ou dans la plante, ce qui pourrait expliquer leur nombre élevé chez ces organismes ? Toutes ces copies sont-elles indispensables à la survie des phytoplasmes ? L'expression des FtsH au niveau du nombre de transcrits a été évalué dans les différents hôtes, mais il serait intéressant de vérifier le niveau d'expression des protéines FtsH dans ces derniers.

Sur l'arbre phylogénétique, les *FtsH* des phytoplasmes se situent sur la même branche que les *FtsH* des bactéries, distincte de la branche des protéines ATPases. Ces informations sont des arguments en faveur de leur dénomination en tant que FtsH. Sur les 8 *FtsH* du pFD, la *FTSH6* clusterise avec les FtsH en copie unique de différents phytoplasmes dont AYWB591, la copie hors PMU de '*Ca. P. asteris*' isolat AYWB, et a des homologies moins importante avec les autres FtsH, suggérant qu'elle pourrait être la protéase originelle.

Les FTSH6 et FTSH7 sont prédites pour être orientées vers le milieu extracellulaire, c'est-à-dire directement en contact avec l'hôte. Cependant, les logiciels de prédiction sont le plus souvent entraînés sur des jeux de données de bactéries avec des séquences aux propriétés différentes de celles des phytoplasmes rendant difficile les prédictions d'orientation des protéines membranaires. Les domaines transmembranaires du pFD ont été prédits par TMHMM et le signal peptide du pFD ou de '*Ca. P. asteris*' souche AYWB par SignalP ((Abbà et al., 2014; Sugio et al., 2011)). TMHMM prédit pour les FtsH du pFD, 2 domaines transmembranaires. Des observations en microscopie électronique avec des anticorps spécifiques de chacune des FtsH du pFD pourraient permettre de valider ou non les prédictions d'orientation de ces protéases.

Chez '*Ca. P. mali*', des différences dans la topologie membranaires de FtsH corrèlent avec le niveau de virulence (Seemüller et al., 2013). En effet, des FtsH de souches virulentes sont prédites pour être orientées vers le milieu extracellulaire, contrairement aux FtsH des souches peu virulentes (Seemüller et al., 2013). Or chez le pFD, 2 FtsH sont prédites pour être extracellulaires et pourraient donc être impliquées dans la pathogénie. Bien que seule l'activité ATPasique ait pu être démontrée *in vitro*, les FtsH du pFD pourraient dégrader les protéines de l'hôte afin de créer un environnement favorable au développement et à la multiplication des phytoplasmes, par exemple en dégradant des protéines impliquées dans la signalisation des voies de défense ou la dégradation de composés bactériens. Cette dégradation des protéines pourrait aussi permettre une libération des acides aminés qui peuvent être utilisés par le pFD. Ce phénomène a été observé chez *Pseudomonas entomophila* qui grâce à des métalloprotéases dégrade des peptides immunitaires antimicrobiens AMP de drosophile. De la même façon, la métalloprotéase auréolysine de *S. aureus* dégrade le peptide antimicrobien humain LL-37 (Liehl et al., 2006; Sieprawska-Lupa et al., 2004). On peut donc émettre l'hypothèse que les *FtsH* du pFD qui s'expriment plus dans la vigne pourraient dégrader des protéines de défense de cet hôte, et celles qui s'expriment plus chez l'insecte

pourraient dégrader les protéines de celui-ci, permettant au pFD de s'adapter à chacun de ses hôtes. La vérification de l'activité protéasique des FtsH est donc importante et pourrait permettre de valider ou non cette hypothèse. L'activité des FtsH présente en copie unique dans des bactéries comme *Mycobacterium tuberculosis* ou *Lactococcus lactis* a été vérifiée par complémentation de la souche d'*E. coli* AR423 ($\Delta ftsH :: kan/pAR171$) thermosensible à 42°C (Nilsson et al., 1994; Srinivasan et al., 2006). Il pourrait en être fait de même avec les FtsH du pFD.

En raison de leurs capacités métaboliques limitées, les phytoplasmes dépendent de leurs hôtes. Ils sont donc équipés de systèmes de transport pour l'absorption des nutriments requis et nécessitent également des systèmes efficaces de sécrétion pour introduire des protéines effectrices telles que des toxines, des adhésines et des enzymes hydrolytiques pour attaquer ou manipuler leurs hôtes (Hogenhout et al., 2008). Des gènes codants des transporteurs ABC putatifs sont situés à proximité des gènes *FTSH8* et *FTSH5* et ils pourraient permettre d'importer les éléments dégradés par les FtsH tels que les acides aminés.

Chapitre II : Caractérisation de la diffusion du
phytoplasme de la Flavescence Dorée dans les
plantes de sensibilité différente CS et M en
s'affranchissant des interactions plante-
insecte

I) Introduction et objectifs

Le pFD, restreint au phloème, est transmis naturellement d'une plante à l'autre par l'insecte vecteur *S. titanus* (Schvester et al., 1963; Weintraub and Beanland, 2006). La propagation de la maladie dépend de la taille de la population des vecteurs, de l'efficacité de la transmission et de l'abondance de l'inoculum, car il existe une corrélation entre les titres de pFD dans la plante et l'efficacité d'acquisition par *S. titanus* (Bressan et al., 2005b; Galetto et al., 2014; Morone et al., 2007). Des différences de sensibilité entre les cépages ont été observées, soit dans les vignobles en fonction de l'incidence de la maladie et de la gravité des symptômes, soit en serre en fonction du pourcentage de plantes infectées et du titre en pFD dans ces plantes (Boudon-Padieu, 1996; Eveillard et al., 2016). Au vignoble, le pourcentage de plantes infectées et le pourcentage de branches symptomatiques sur chaque cep sont plus faibles chez le Merlot (M) que chez le Cabernet-Sauvignon (CS). En conditions contrôlées, le M et le CS présentent un comportement différent vis-à-vis de la FD, ainsi le CS présente de sévères symptômes, des titres élevés en pFD (moyenne de $7,6E+04$ pFD/mg PF pour les CS contre $3,3E+02$ pFD/mg PF pour les M), un nombre de plants infectés (96,9% pour les CS contre 34,4% pour le M) et une diffusion plus importants que dans le M (Eveillard et al., 2016). D'autre part, après une transmission localisée sur une feuille de CS et de M, le pFD se multiplie et colonise l'ensemble de la plante de CS alors que dans le M, le pFD reste confiné au site d'infection, à un titre plus faible que dans le CS (Eveillard et al., 2016).

Cependant, au cours de ces expériences, le taux de survie des *S. titanus* après la période de transmission sur M (28%) était inférieur à celui sur CS (58%). Cet écart pourrait conduire à une efficacité de transmission du pFD plus faible au M. Afin de savoir si la différence de sensibilité observée en conditions contrôlées entre le CS et le M est due à une interaction vigne-*S. titanus* ou vigne-pFD, une expérience d'inoculation du pFD a été menée en s'affranchissant de l'insecte. Pour cela, un rameau de Chardonnay (Ch) sensible au pFD, a été greffé sur CS et M et le pFD a été transmis à ce greffon Ch. Ainsi, après sa multiplication dans ce greffon, le pFD pourra diffuser *via* le point de greffe dans le porte-greffe (CS ou M) La réaction observée chez le CS et le M sera donc uniquement due aux interactions pFD-vigne.

II) Résultats et discussion

A) Greffage et pourcentage de reprise

Lors de cette étude, des plants de CS et de M sont inoculés *via* un greffon Ch, sensible à la FD. Le pFD est transmis à ce greffon Ch *via* l'insecte vecteur *S. titanus* en serre de haut confinement. Seuls des plants *in vitro* peuvent rentrer dans cette dernière, les greffages de Ch sur les plants de CS et de M ont donc été réalisés *in vitro* à l'INRA de Colmar par Jean Masson et Mireille Perrin (Fig. 31).

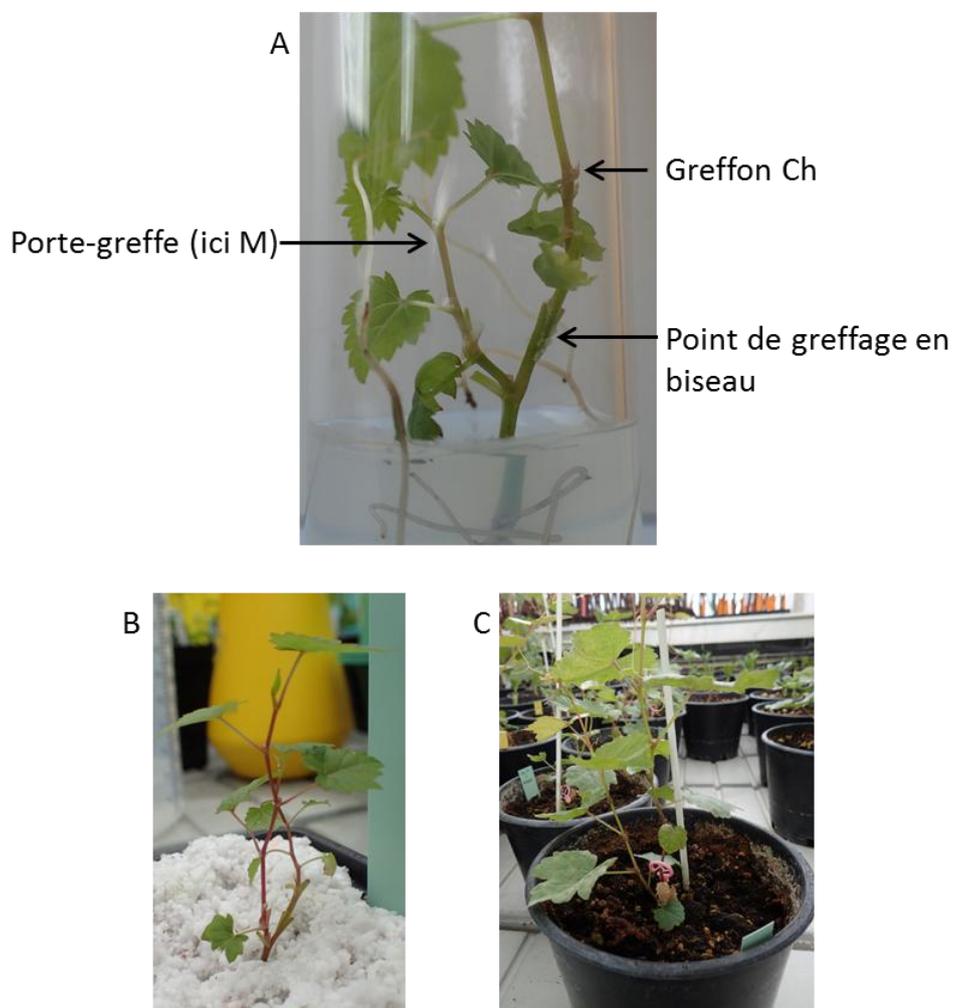


Figure 31 : Photographies de plants de CS ou M avec un greffon Ch en serre de haut confinement. A : le greffage est effectué *in vitro*, le greffon est inséré en biseau. B : les plants repiqués en perlite. C : plants repiqués en terreau additionné de perlite.

Ce type de greffage est très minutieux et la réussite de la greffe varie selon le cépage. En effet, 40% de Ch greffés sur CS et 60% de Ch sur M ont donné des résultats satisfaisants c'est-à-dire un greffon et un porte-greffe (CS ou M) qui se développent permettant ainsi une inoculation sur la partie Ch et un développement de la partie porte-greffe à tester (CS ou M).

Pour une question de lisibilité, les plantes CS avec un greffon Ch sont nommées CS-Ch et les plantes M avec un greffon Ch, M-Ch dans la suite du manuscrit.

B) Survie des insectes

Les greffons Ch de 7 CS-Ch et de 6 M-Ch ont été mis au contact de 7 *S. titanus* infectieux pendant 7 jours. A la fin de cette période de transmission, les insectes sont récupérés sur chaque plante (Fig. 32).

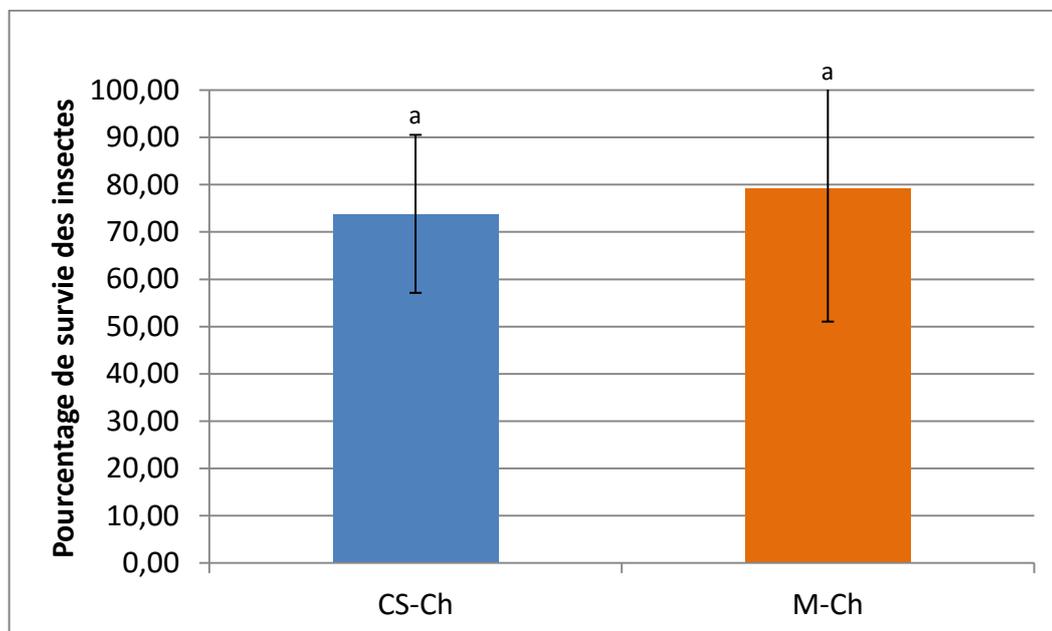


Figure 32 : Pourcentage de survie des *S. titanus* après 7 jours passés sur le greffon Ch greffé sur CS ou M (7 insectes sur 7 CS et 6 M). a : résultats du test de Wilcoxon avec $p > 0,05$

Quel que soit le porte-greffe (CS ou M) sur lequel est greffé le Chardonnay, les insectes ont survécu de façon similaire avec un pourcentage de survie de 73,81% pour les 7 Ch greffés sur CS et de 79,17% pour les 6 Ch greffés sur M. Ce pourcentage de survie n'est pas statistiquement différent (test Wilcoxon avec $p > 0,05$) aussi nous pouvons supposer que les *S. titanus* ont la même probabilité de transmettre le pFD à ces deux groupes de plantes. Ces chiffres sont également en accord avec la survie observée sur Ch (Eveillard et al., 2016).

Ces *S.titanus* ont présenté un titre en pFD moyen de 1,22E+07 pFD/insecte, titre en accord avec les données d'expériences précédentes et compatible avec une transmission efficace du pFD (Eveillard et al., 2016).

C) Symptômes

Dès la 5^{ème} semaine post-transmission (spt), la partie Ch de 5 des 7 Ch greffés sur CS et de 5 des 6 Ch greffés sur M ont montré des symptômes de FD indifféremment du porte-greffe CS ou M. Les feuilles étaient recroquevillées vers le bas, jaunes et desséchées. Les symptômes ont persisté jusqu'au prélèvement à la 15^{ème} spt.

Aucun symptôme de FD n'a été observé sur les parties aériennes de CS et de M, même 15 spt, date à laquelle l'expérience a été arrêtée et les plantes prélevées. La présence de pFD dans les parties greffons Ch et les porte-greffes CS et M a par la suite été vérifiée par qPCR (Fig. 33).

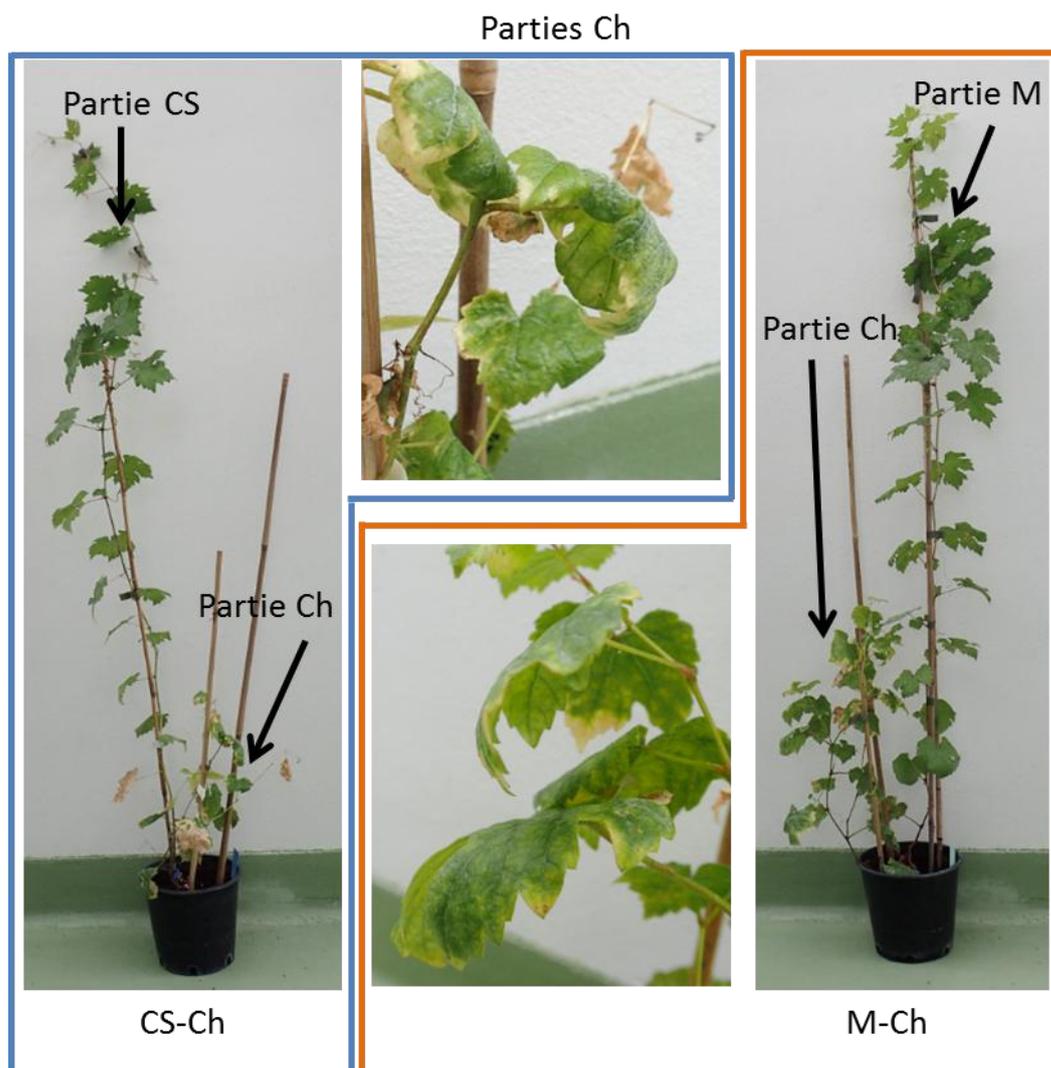


Figure 33 : Photographie des plantes CS-Ch et M-Ch 15 semaines post-transmission.

D) Titres en phytoplasmes

Concernant les greffons Ch, 5 des 7 Ch greffés sur CS et 5 des 6 Ch greffés sur M sont positifs pour la présence de pFD avec un titre moyen de $1,29E+05$ pFD/mg PF (poids frais) et $1,58E+05$ pFD/mg PF respectivement, non statistiquement différents (test de Wilcoxon, $p>0,05$) 15 spt (Fig. 34). Des prélèvements intermédiaires de feuilles effectués à 5 spt avaient déjà mis en évidence la présence de pFD avec des titres similaires dans les parties Ch greffées sur CS et M.

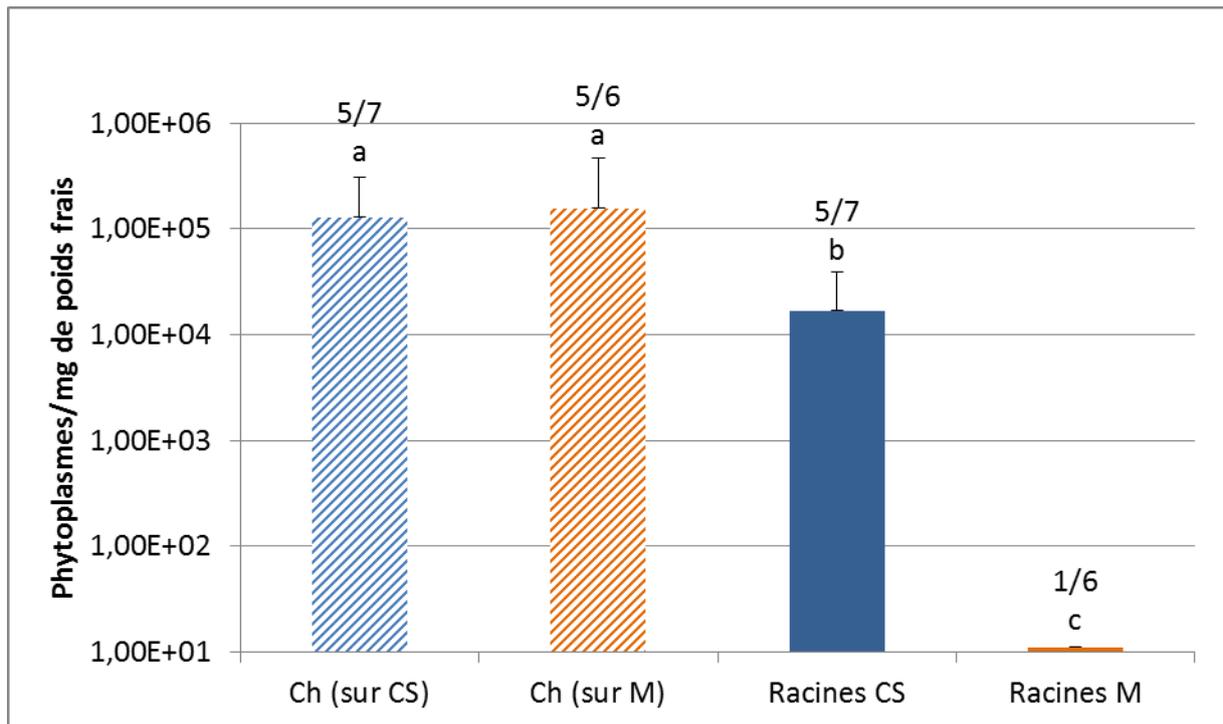


Figure 34 : Quantification des pFD à 15 spt dans les différentes parties des plants M et CS porteurs d'un greffon Ch et inoculés par *S. titanus* sur la partie Ch. Le nombre de plants positifs par rapport au nombre total testé est indiqué sur le graphique. Les lettres indiquent les différences statistiques (test de Wilcoxon, $p\text{-value}<0,05$).

Aucun phytoplasme n'a été détecté dans les parties aériennes de CS ou de M qui d'ailleurs n'expriment pas de symptômes, même à 15 spt.

Les phytoplasmes ont également été quantifiés par qPCR dans les racines de ces plantes 15 spt. Les 5 CS qui avaient un greffon Ch infecté possédaient tous un titre élevé en phytoplasmes dans les racines avec une moyenne de $1,70E+04$ pFD/mg PF. Par contre, 1 seul des 5 M possédant un greffon Ch infecté a présenté dans les racines un titre en phytoplasmes, faible qui plus est ($2,40E+01$ pFD/mg PF, ce qui est en limite de détection). La différence de titre en pFD dans les racines de CS et de M est statistiquement significative (test de Wilcoxon, $p\text{-value}<0,05$).

III) Conclusion

Lors du phénotypage du CS et du M par inoculation directe de *S. titanus*, la plus faible infection du M pouvait provenir d'une plus faible survie des insectes vecteurs qui se nourrissaient moins et donc inoculaient moins de pFD. Les expériences de transmission du pFD à CS et M *via* un greffon Ch permettent de s'affranchir d'une potentielle mauvaise inoculation de l'insecte vecteur sur l'un ou l'autre des cépages. Les résultats obtenus après inoculation du pFD *via* un greffon Ch présentant le même titre en pFD quel que soit le porte-greffe sont en accord avec les expériences précédentes d'infection du cépage directement par *S. titanus* montrant une différence de sensibilité au pFD, avec le CS plus sensible que le M (Eveillard et al., 2016; Malembic-Maher et al., 2015). En effet, suite à l'infection *via* le greffon Ch, le passage du phytoplasme dans les racines du M est moins fréquent que dans celles du CS, et la multiplication y est beaucoup plus faible.

A 15 spt, le pFD n'a pas diffusé des racines vers les parties aériennes du porte-greffe. Dans les conditions naturelles du vignoble, les symptômes de FD apparaissent l'année suivant l'inoculation. Ainsi, il n'est pas impossible que pour cette expérience, une période d'hivernage puisse permettre aux phytoplasmes d'envahir la plante entière, permettant sa détection dans les parties aériennes, confirmant ou non les résultats obtenus dans les racines. Ces expériences de transmission par greffage étant longues et devant être réalisées en serre de haut confinement, elles n'ont pas pu être suivies d'un hivernage. Ainsi, les résultats observés sont, au moins en partie, dus aux interactions pFD-vigne et pas seulement aux interactions vigne-*S. titanus*. C'est la 1^{ère} fois qu'il est montré expérimentalement que la moindre sensibilité de la plante est due aux interactions pFD-vigne, et non à une moins bonne inoculation de l'insecte. Il est donc intéressant d'avoir une meilleure compréhension des interactions vigne-pFD puisque l'on sait maintenant qu'elles interviennent dans la résistance.

Les plantes CS et M réagissent donc différemment à la présence du pFD, même en s'affranchissant de l'inoculation directe du cépage par *S. titanus*. Dans un premier temps, nous allons chercher à savoir si cette différence de sensibilité au pFD sans l'intervention du vecteur est reproductible chez d'autres cépages, par exemple les parents du CS et du M et si cette moindre sensibilité à la FD est héréditaire.

Chapitre III : Analyse du caractère héritable de la sensibilité/résistance à la Flavescence

Dorée

I) Introduction

Le CS et le M présentent une sensibilité différente vis-à-vis de la FD que ce soit en vignoble ou en serre de haut confinement. En effet, le CS présente un pourcentage de plantes infectées important, un titre en pFD élevé, des symptômes sévères et une diffusion du pFD dans toute la plante, contrairement au M pour lequel l'incidence de la maladie est faible. Par des inoculations *via* un greffon Ch, il a été montré que cette différence de sensibilité est due à une interaction vigne-pFD et non pas seulement à une interaction vigne-*S. titanus* (Chapitre II).

En conditions contrôlées, 28 accessions *Vitis* dont les parents du CS, le Sauvignon (Sau) et le Cabernet-Franc (CF), ainsi que ceux du M, le CF et la Magdeleine Noire des Charentes (Mag) ont été testés pour leur sensibilité à la FD (Fig. 35 et Fig. 36) (Eveillard et al., 2016).

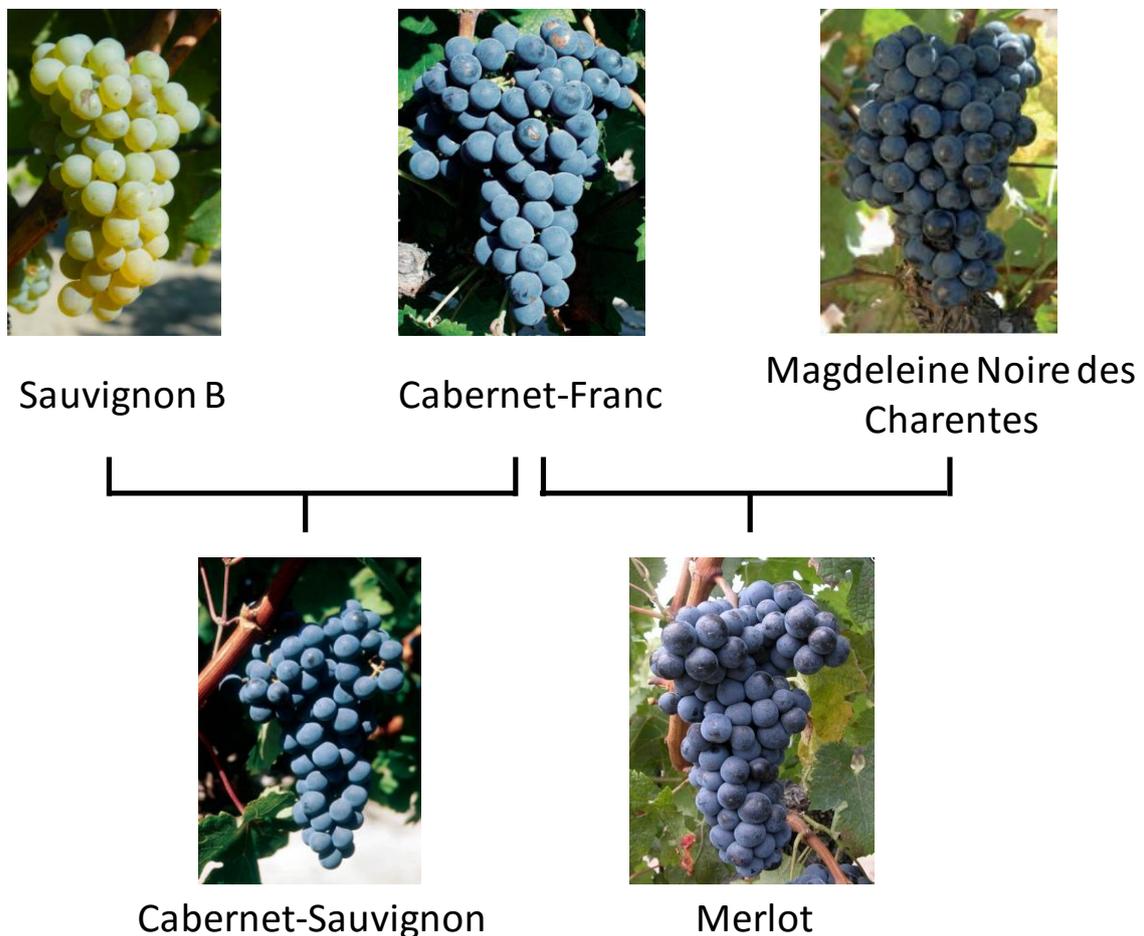


Figure 35 : Parenté du Cabernet-Sauvignon et du Merlot qui partagent le Cabernet-Franc comme parent commun et ont comme autre parent le Sauvignon blanc et la Magdeleine Noire des Charentes respectivement (Photos : <http://plantgrape.plantnet-project.org/fr>).

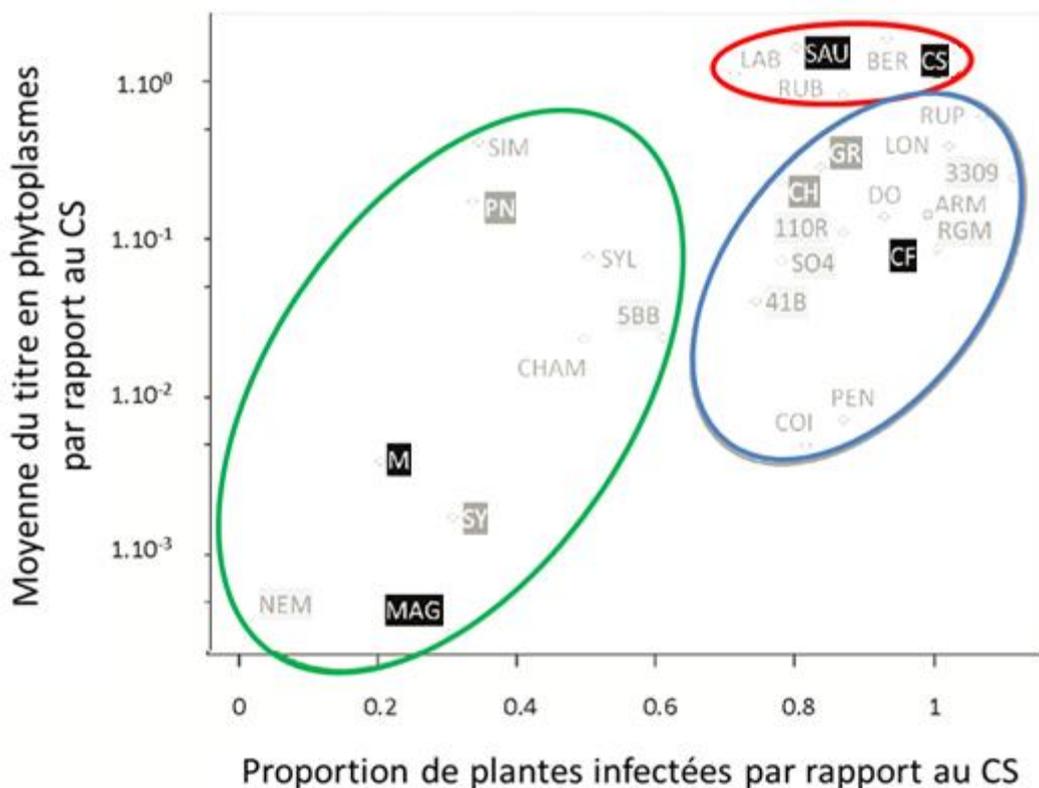


Figure 36 : Graphique montrant le titre en pFD par rapport au CS en fonction de la proportion de plantes infectées par rapport au CS pour chacun des 28 *Vitis* testés (CF : Cabernet-Franc, CS : Cabernet-Sauvignon, CH : Chardonnay, GR : Grenache, MAG : Magdeleine Noire des Charentes, M : Merlot, PN : Pinot Noir, SAU : Sauvignon Blanc, SY : Syrah Noir, 110R : 100 Richter, 3309 : 3309 Couderc, 41B : 41B Millardet et de Grasset, 5BB : Kober 5BB, NEM : Nemadex, RGM : Riparia Gloire de Montpellier, SO4 : Sélection Oppenheim 4, ARM : *Vitis amurensis*, BER : *Vitis berlandieri*, CHAM : *Vitis champinii*, COI : *Vitis coignetiae*, DO : *Vitis doaniana*, LAB : *Vitis labrusca*, LON : *Vitis longii*, PEN : *Vitis pentagona*, RUB : *Vitis rubra*, RUP : *Vitis rupestris*, SIM : *Vitis simpsonii*, SYL : *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris*). Entouré en vert : faible sensibilité, en rouge : très forte sensibilité et en noir : sensibilité intermédiaire à la FD, (d’après Eveillard et al., 2016).

Les 28 accessions *Vitis* phénotypés ont ségrégués en 3 groupes : les peu sensibles c’est-à-dire une faible proportion de plantes infectées et un faible titre en pFD comprenant le M et la Mag, les très sensibles c’est-à-dire une forte proportion de plantes infectées et un fort titre en pFD comprenant le CS et le Sau, et les sensibles présentant un phénotype intermédiaire comme le CF (Fig. 36) (Eveillard et al., 2016). Il est alors proposé que la faible sensibilité du M soit héritée de sa mère, la Mag, qui est très peu sensible à la FD.

Cependant, ces phénotypes ont été réalisés sur plante entière par *S. titanus* sans différencier la résistance de la plante à l'insecte de celle au pFD. Afin de savoir si les différents phénotypes de sensibilité à la FD observés sont les mêmes avec une inoculation en s'affranchissant de l'effet insecte, une expérience de greffage de Chardonnay (Ch) sur les cépages à tester (Sau, CF et Mag) a été réalisée.

Enfin, afin de vérifier les hypothèses d'héritabilité de la sensibilité/résistance au pFD, un croisement entre le cépage Mag, très peu sensible et le cépage CF, sensible a été effectué et quelques descendants phénotypés pour observer la répartition du caractère résistant dans cette descendance.

II) Résultats et discussion

A) Caractérisation de la diffusion et de la multiplication du pFD dans les parents du CS et du M via un greffon sensible Ch

1) Greffage et pourcentage de reprise

Le Sau, le CF et la Mag inoculés *via* un greffon Ch sont nommés Sau-Ch, CF-Ch et Mag-Ch respectivement. Des plantes témoins, greffon Ch sur porte-greffe Ch, nommées Ch-Ch ont également été testées lors de cette expérience ainsi que des CS-Ch et des M-Ch.

La réussite de la greffe varie selon les cépages, 40% des Ch greffés sur Ch, 50% de Ch sur CS, Mag ou CF, 60% de Ch sur Sau et 70% de Ch sur M ont montré un développement de la partie Ch afin de permettre l'inoculation et de la partie porte-greffe.

Dans la première expérience (Chapitre II), aucun phytoplasme n'avait été détecté dans les parties aériennes du CS ou du M. Afin de créer un appel de sève dans la partie aérienne du porte-greffe (Sau, CS, CF, M, Mag et Ch), ce dernier a été taillé, contrairement à l'expérience présentée dans le chapitre II.

Ainsi au moment du prélèvement, soit 15 spt, les parties porte-greffes ont une taille plus petite que les plantes de l'expérience précédente. En effet, les porte-greffes de cette expérience ont une taille moyenne de 33 cm et les greffons Ch de 73 cm, alors que dans l'expérience présentée dans le chapitre II, les plantes avaient une taille moyenne de 47 cm pour porte-greffes et 31 cm pour les parties Ch.

2) Survie des insectes et titre en pFD

Les insectes porteurs du phytoplasme FD sont restés 7 jours en contact avec les parties Ch greffées. A l'issue de cette période d'infection, le pourcentage de survie des *S. titanus* est compris entre 32,59 et 60,71% avec une moyenne de 48,1% (Fig. 37).

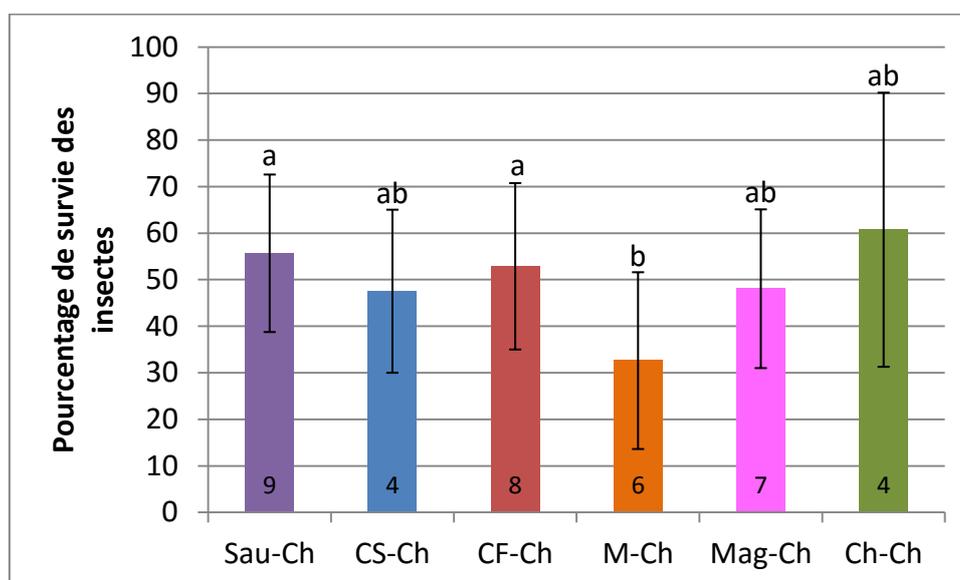


Figure 37 : Pourcentage de survie des insectes *S. titanus* après 7 jours passés sur la partie Chardonnay greffée sur différents porte-greffes (9 Sau-Ch, 4 CS-Ch, 8 CF-Ch, 6 M-Ch, 7 Mag-Ch et 4 Ch-Ch). Les lettres indiquent les différences statistiques (test de Wilcoxon, p -value < 0,05).

Le pourcentage de survie est similaire quel que soit le porte-greffe, sauf entre les porte-greffes M et Sau, ainsi qu'entre M et CF (test de Wilcoxon, p -value < 0,05). Lors de cette expérience, la survie sur la partie Ch greffée sur le porte-greffe M était plus faible que lors de l'expérience précédente présentée dans le chapitre II, A. Nous pouvons supposer que les insectes qui se sont nourris sur la partie Ch ont la même probabilité de transmettre le phytoplasme, hormis aux plantes M-Ch.

Les titres en phytoplasmes dans les *S. titanus* sont compris entre $1,66E+06$ et $1,07E+09$ pFD/insecte avec une moyenne de $8,68E+07$, proches de ceux ayant précédemment permis une bonne transmission du pFD à la vigne (Eveillard et al., 2016).

3) Titres en phytoplasmes

Les greffons Ch ont montré des symptômes sévères de FD dès la 5^{ème} semaine post-transmission (spt), et ce même pour les parties Ch greffées sur les porte-greffes M bien que la survie des insectes sur ces plantes ait été moins élevée que sur les autres. Aucun symptôme n'a été observé sur les parties aériennes des différents porte-greffes qui n'ont pas été en contact avec les insectes.

Les greffons Ch infectés présentant des symptômes ont un titre en phytoplasmes relativement élevé avec une moyenne de 1,16E+04 pFD/mg PF 15 spt, non statistiquement différent quel que soit le porte-greffe sur lequel il est greffé (Fig. 38) (test de Wilcoxon, p-value>0,05). Un fort titre en pFD avait également été observé dès la 5^{ème} spt (non montré).

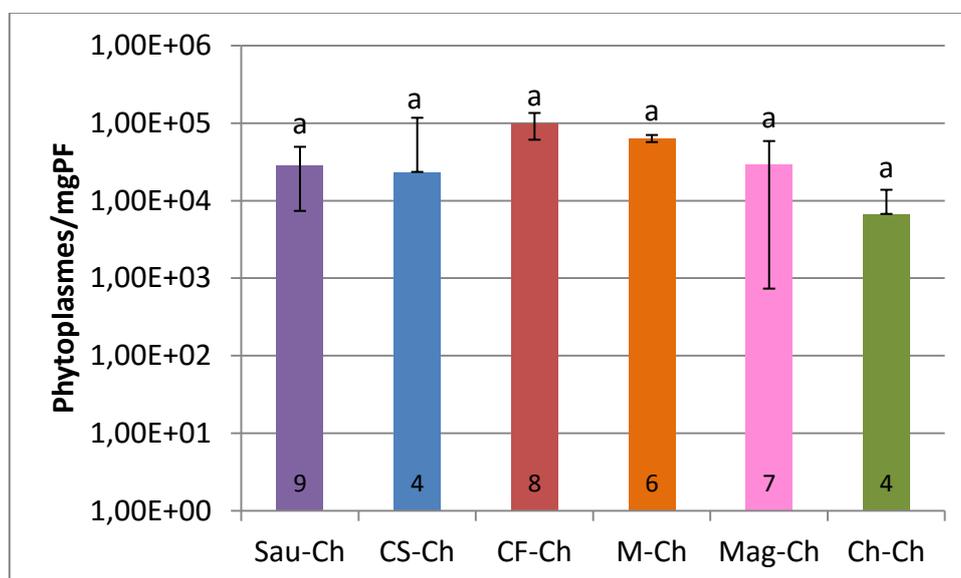


Figure 38 : Quantification des phytoplasmes dans les parties Ch en contact avec les insectes *S. tiganus* infectieux et greffées sur différents porte-greffes (Sau, CS, CF, M, Mag et Ch), 15 spt. Les lettres indiquent les différences statistiquement significatives (test de Wilcoxon, p-value<0,05)

Une taille des porte-greffes a été effectuée à la fin de la mise en contact, soit 7 jours post-transmission afin de créer un appel de sève et favoriser l'infection des parties aériennes du porte-greffe. Quel que soit le cépage, le titre en pFD dans les parties aériennes est nul à 10 spt, en limite de détection à 15 spt et aucune différence statistique n'est observée (test de Wilcoxon, p-value>0,05) entre les différents porte-greffes (Fig. 39).

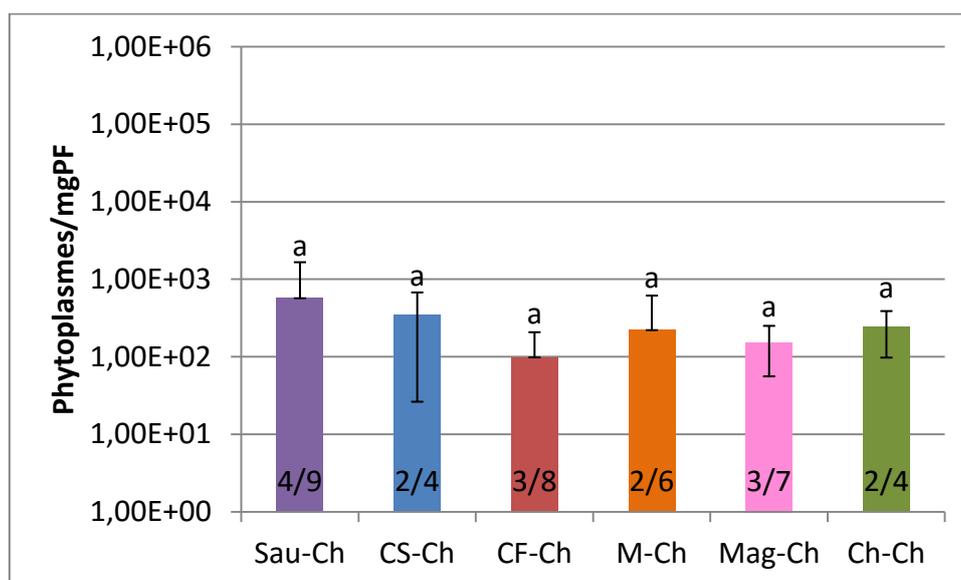


Figure 39 : Quantification des phytoplasmes dans les parties aériennes des porte-greffes (Sau, CS, CF, M, Mag et Ch) infectés *via* un greffon Ch, 15 spt. Les lettres indiquent les différences statistiques (test de Wilcoxon, p-value<0,05).

Un prélèvement plus tardif aurait peut-être permis d'observer des différences de titres en phytoplasmes entre cépages. En effet, il est possible que l'infection des parties aériennes du porte-greffe soit récente. Effectuer un prélèvement plus tardif aurait permis au phytoplasme de poursuivre sa multiplication, ou non, selon le phénotype de sensibilité des cépages.

Les phytoplasmes ont également été quantifiés par qPCR dans les racines de ces plantes 15 spt (Fig. 40).

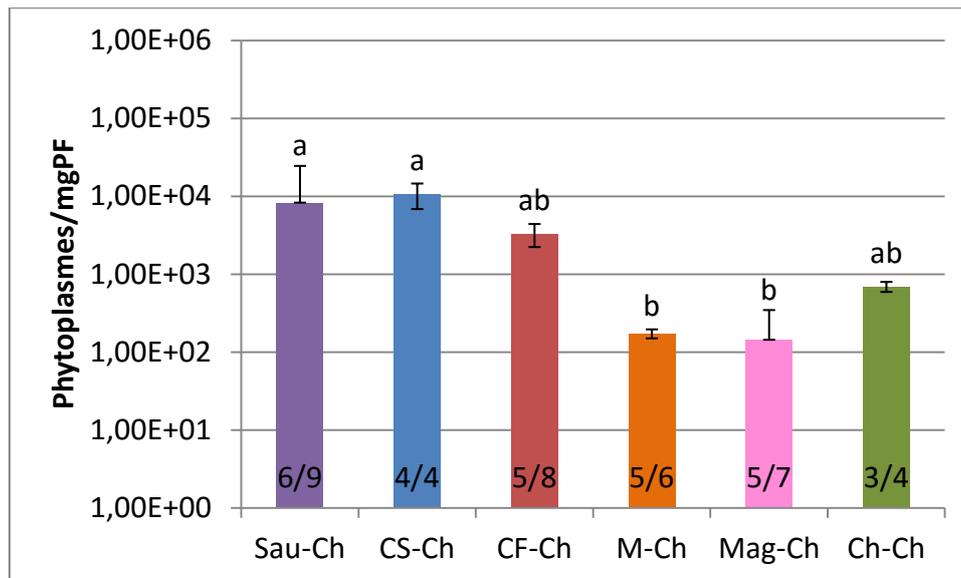


Figure 40 : Titre en phytoplasmes dans les racines des différents porte-greffes (Sau, CS, CF, M, Mag et Ch) infectés *via* un greffon 15 spt. Les lettres indiquent les différences statistiques (test de Wilcoxon, p-value<0,05).

Sau, CS et CF présentent dans les racines des titres moyens similaires de 5,52E+03, 1,07E+04 et 3,31E+03 pFD/mg PF respectivement. Par contre, M et Mag présentent des titres moyens relativement faibles de 1,72E+02 et 1,43E+02 pFD/mg PF, significativement différent de celui quantifié chez le CS et Sau (test de Wilcoxon, p-value<0,05). Les racines du témoin Ch-Ch présentent un titre en pFD moyen de 4,63E+02 pFD/mg PF, non statistiquement différent des autres cépages.

4) Conclusions

La survie des *S. titanus* mis au contact des greffons Ch ne semble pas être impactée par le porte-greffe, excepté dans le cas de la greffe sur M en comparaison avec CF et Sau, mais cette observation est peut-être une coïncidence. Cette différence de survie ne semble par ailleurs pas impacter l'infection du greffon Ch. En effet, cette dernière est similaire en termes de titre en phytoplasmes et de symptômes quel que soit le porte-greffe. Ainsi, tous les cépages ont pu être infectés *via* ce greffon et nous avons donc pu nous affranchir d'une possible mauvaise transmission de l'insecte à l'un de ces cépages et des interactions plante-vecteur.

La multiplication des phytoplasmes dans les racines du M est moins importante que dans celles du CS malgré l'étêtage du porte-greffe réalisée 7 jours post-transmission. Cette différence de titre en pFD dans les racines a également été observée en absence de taille du porte-greffe (présentée dans le chapitre II) et au niveau des parties aériennes lors de l'inoculation directement

par *S. titanus* sur le cépage à tester (Eveillard et al., 2016; Malembic-Maher et al., 2015). Les plantes CS et M réagissent différemment à la présence du pFD et leurs comportements en terme de titre en pFD sont semblables, qu'ils aient été inoculés directement par *S. titanus* ou *via* un greffon Ch. Les titres en pFD dans les racines sont statistiquement différentes (test de Wilcoxon, p -value $<0,05$) entre le CS et la Mag, entre le Sau et la Mag et entre le Sau et le M. Ces différences sont en adéquation avec celles observées entre ces cépages lors d'une infection directe par l'insecte vecteur (Eveillard et al., 2016).

Ces expériences ont permis de montrer que la Mag se comporte comme le M avec un faible titre en pFD des plantes infectées *via* un greffon ou directement par *S. titanus*. De même les plantes Sau présentent un titre en pFD et un pourcentage de plantes infectées élevée et elles ont un phénotype similaire à celui du CS. Enfin, le CF présente un phénotype intermédiaire avec un titre en phytoplasme modéré. Ces résultats concernant les titres en pFD suivent les différences de sensibilité mises en évidence par infection directe par *S. titanus* (Eveillard et al., 2016). Cependant, la proportion de plantes infectées de Mag et de M par rapport au CS est plus importante après infection par greffage que lors d'une inoculation directe du pFD par *S. titanus*. Cette différence entre ces 2 inoculations pourrait mettre en évidence une possible influence du vecteur lors de l'infection. Deux composantes différentes entreraient alors en jeu dans la différence de sensibilité des plantes, au moins dans la proportion de plante infectée : une réaction à la piqûre de *S. titanus* et une réaction au pFD.

Cependant, en comparant les pourcentages de plantes infectées avec ceux présentés dans le Chapitre II et les résultats d'une inoculation directement par l'insecte vecteur, les résultats sont discordants. En effet dans cette expérience, le pourcentage de M infectés est plus important. L'appel de sève créé par la taille du porte-greffe a peut-être entraîné un inoculum plus fort vers le M.

Le pFD semble être remonté des racines vers les parties aériennes des différents porte-greffes 15 spt sans différences statistiquement significatives en terme de titre en pFD. Cette infection est récente puisqu'aucun phytoplasme n'avait été détecté après 10 spt (non montré). Les précédentes expérimentations de transmission directement par l'insecte vecteur ou par un greffon Ch infecté (Chapitre II) avaient permis d'obtenir des titres en phytoplasmes élevés à 10 et 15 spt respectivement (Eveillard et al., 2016). Cependant, dans cette expérience, les plantes semblent nécessiter plus de temps pour montrer des différences de multiplication entre cépages. Cette hypothèse n'a pas pu être testée pendant ma thèse, du fait du temps important d'expérimentation, de sa réalisation en serre de haut confinement et de la minutie des greffages du Ch sur les différents cépages à tester.

Ces expériences démontrent que la différence de sensibilité entre les cépages est due à une réaction différente des plantes au pFD et non pas seulement à un choix de l'insecte d'inoculer ou non la plante. Il semble que cette réaction au pFD soit une composante importante de la différence de sensibilité des plantes vis-à-vis de la FD. Chez le M, le pFD se multiplie moins et diffuse moins que dans le CS, mais qu'en est-il chez leurs parents ?

B) Caractérisation de la diffusion et de la multiplication du pFD dans les parents du CS et du M

Précédemment au laboratoire, une étude de la diffusion du phytoplasme dans la plante après infection par *S.titanus* sur une feuille a été réalisée chez le CS et le M (Eveillard et al., 2016), mettant en évidence une différence de plus entre ces 2 cépages. En effet, le phytoplasme se multiplie et diffuse davantage dans le CS que dans le M, dans lequel il semble confiné au lieu d'injection. La même expérience a été réalisée chez les parents du CS et du M afin de connaître leur réaction vis-à-vis de la diffusion du phytoplasme.

1) Survie des insectes

Après 7 jours placés sur une seule feuille des plantes, les pourcentages de survie des *S. titanus* sur CF, Mag et Sau sont respectivement de 48,33%, 7,69% et 40,74%. Les insectes ont statistiquement moins bien survécu sur Mag que sur Sau et CF (test de Wilcoxon, p-value<0,05 et <0,01 respectivement) (Fig. 41) mais sont similaires à ceux obtenus précédemment (Eveillard et al., 2016).

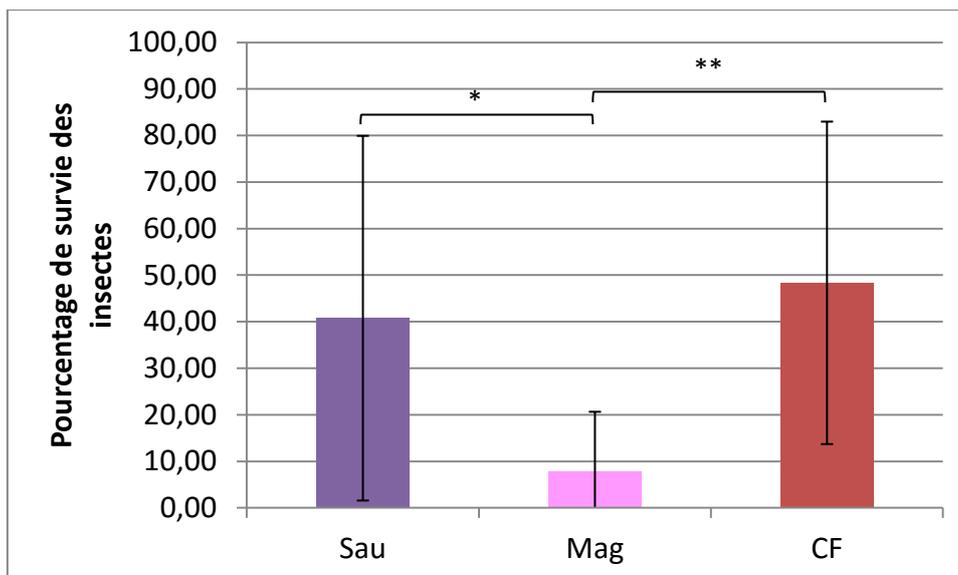


Figure 41 : Pourcentage de survie des insectes *S. titanus* mis en contact pendant 7 jours sur une feuille des plantes de cépages Sau, Mag ou CF. 7 insectes infectés sur 9 Sau, 13 Mag et 10 CF (Test de Wilcoxon, * p-value<0,05 et ** p-value<0,01)

Les insectes ont un titre en pFD compris entre 9,74E+06 et 9,61E+08 pFD/insecte avec une moyenne de 1,72E+08, similaires à des titres permettant une bonne inoculation du pFD aux vignes (Eveillard et al., 2016).

2) Symptômes

Globalement, peu de symptômes ont été observés au niveau des feuilles en contact avec les *S. titanus*. Les Mag ont présenté des petites tâches rouges, absentes sur les feuilles des plantes saines et sur l'une d'elles un dessèchement partiel. Un rougissement de certaines feuilles de CF a été observé, ainsi qu'un recroquevillement et un début de jaunissement des feuilles de Sau. Il est à noter qu'à 6 spt les symptômes FD sont visibles sur CS et peuvent apparaître plus tardivement sur d'autres cépages.

3) Titres en phytoplasmes

Six spt, les feuilles mises en contact avec les insectes ont été prélevées puis 10 spt, les plantes entières ont été prélevées et découpées en tronçons (Fig. 42). Les ADN ont été extraits afin de mesurer le titre en pFD dans ces différentes parties.

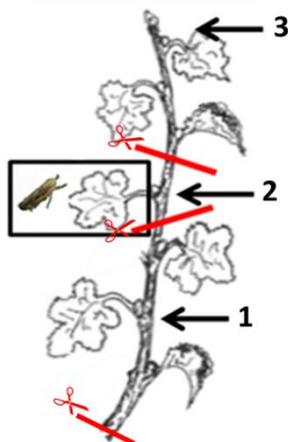


Figure 42 : Schéma des plantes inoculées sur une feuille (F). Les plantes sont découpées en plusieurs tronçons : 1 : portion de plante située en dessous de la feuille inoculée par insectes. 2 : portion de plante portant la feuille inoculée par insectes, et 3 : portion de plante située juste au-dessus de la feuille inoculée.

Le tronçon 2, partie de la tige à laquelle est rattachée la feuille mise en contact avec les insectes, a présenté des titres moyens en phytoplasmes de $6,82E+02$ pFD/mg PF pour les CF, $3,45E+02$ pour les Mag et $1,86E+04$ pour les Sau, non statistiquement différents entre eux (test de Wilcoxon, $p\text{-value}<0,05$). Cependant le pourcentage de feuilles infectées varie puisqu'il est de 60%, 55% et 46% pour les CF, Sau et Mag respectivement (Fig. 43).

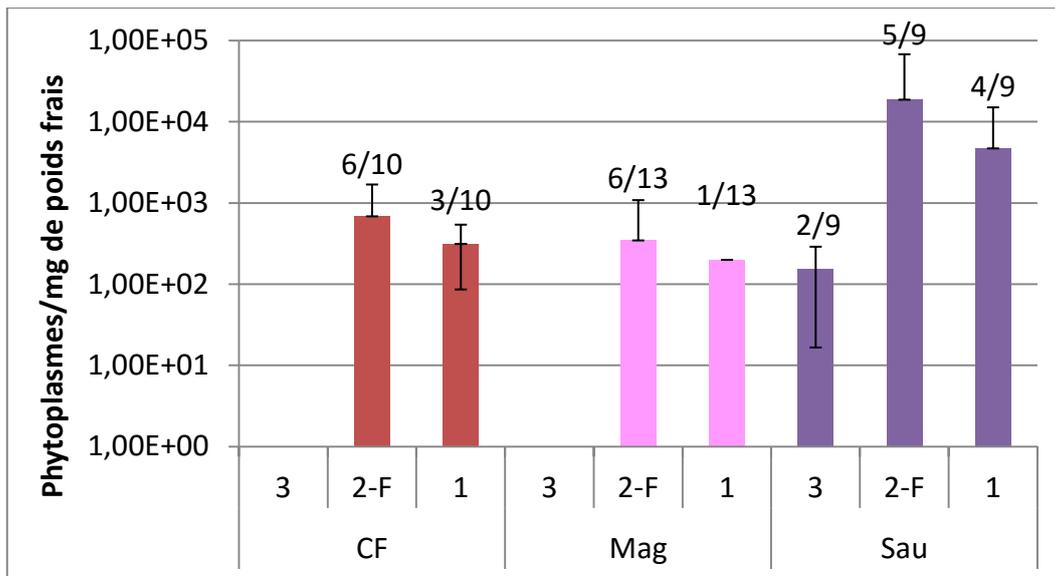


Figure 43 : Titres en phytoplasmes dans les différentes parties des plantes CF, Mag et Sau inoculées sur une seule feuille 10 spt. Les fractions représentent le nombre de plantes positives sur le nombre total de plantes inoculées.

Les phytoplasmes semblent diffuser dans le tronçon situé en dessous de la feuille inoculée quel que soit le cépage à un titre moyen de $1,73E+02$ pFD/mg PF, non statistiquement différent entre CF, Mag et Sau même si le titre moyen est plus élevé chez le Sau. Par contre, le nombre de tronçons 1 infectés diffère de façon importante entre les cépages, 44% pour les Sau, 30% pour les CF et 7,69% pour les Mag. De plus, dans certaines plantes Sau, les phytoplasmes ont également colonisé le tronçon au-dessus de la feuille inoculée (22%).

4) Conclusion

La diffusion des phytoplasmes dans les plantes est plus importante dans les Sau que dans les Mag et les CF. De même, la diffusion dans un autre tronçon que celui de la feuille inoculée chez les Mag est peu fréquente. Ainsi, les diffusions dans les plantes Sau et CS sont similaires, de même que celles dans les Mag et les M. Ces cépages, précédemment phénotypés en fonction du nombre de plantes infectées et du titre en phytoplasmes, avaient été classés dans 3 catégories : Sau et CS dans les cépages très sensibles, Mag et M dans les peu sensibles et CF dans les intermédiaires (Eveillard et al., 2016). Les résultats de la caractérisation de la diffusion des phytoplasmes dans les plantes corrélient donc avec la caractérisation de sensibilité.

Sachant que les cépages de vigne jouent un rôle important pour influencer la population de *S. titanus* infectés par le pFD dans les vignobles, ils peuvent donc influencer le taux de propagation

de la maladie (Bressan et al., 2005b). En effet l'efficacité d'acquisition du pFD par les insectes vecteurs dépend du cépage : ils s'infectent plus facilement en s'alimentant sur du Pinot Blanc, très sensible à la FD que sur du M, peu sensible. La faible capacité de *S. titanus* à acquérir le pFD à partir de M est probablement associé au faible titre dans cette plante, ainsi qu'à la répartition non uniforme du pFD dans la plante. La faible diffusion des pFD dans certains cépages et leur disponibilité restreinte à une partie de la plante diminuent certainement la probabilité d'acquisition du pFD par les insectes et participent à la réduction de la propagation de la maladie.

CS et M présentent une sensibilité différente à la FD qui se traduit par une différence de multiplication du pFD, de la proportion de plantes infectées et de la diffusion du pFD dans la plante, et ce même en s'affranchissant des interactions plante-insecte. La moindre sensibilité du M semble provenir de la Mag qui présente un phénotype similaire alors que son second parent, le CF présente une proportion de plantes infectées et un titre en pFD plus important (Fig. 44).

	Sauvignon B	Cabernet-Franc	Magdeleine Noire des Charentes
Proportion de plantes infectées <i>via S. titanus</i>	++	+	+/-
Proportion de plantes infectées <i>via</i> un greffon	++	+	+
Titre en pFD	++	+	+/-
Diffusion dans la plante	++	+/-	+/-



	Cabernet-Sauvignon	Merlot
Proportion de plantes infectées <i>via S. titanus</i>	++	+/-
Proportion de plantes infectées <i>via</i> un greffon	++	+
Titre en pFD	++	+/-
Diffusion dans la plante	++	+/-

Figure 44 : Présentation des différents critères de caractérisation de la sensibilité au pFD chez le CS et le M, ainsi que chez leurs parents (Sau, CF et Mag) (++ : important, + : intermédiaire, +/- : faible).

Il semble que des caractères de faible sensibilité de la Mag aient été transmis au M. Il serait donc intéressant de phénotyper des individus issus d'une même descendance afin d'observer la ségrégation de différents caractères de sensibilité à la FD : la proportion de plantes infectées et le titre en pFD.

C) Caractérisation préliminaire de la sensibilité à la FD de descendants d'un croisement entre un cépage sensible, le CF et un cépage peu sensible, la Mag

1) Croisement et obtention de plants *in vitro*

Les descendants obtenus par croisement de la Mag et du CF ont été génotypés au niveau de locus microsatellites nucléaires par l'IFV (Institut Français de la Vigne et du Vin) afin de vérifier le croisement (Table 5).

Locus microsatellites	VMC1b11	VWb01	VWp31	VWq52	VWv37	VWMD21	VWMD24	VWMD25	VWMD27	VWMD28	VWMD32	VWMD5	VWMD7	VWS2	VrZAG62	VrZAG79
CF	184	290	188	77	149	246	206	238	178	227	239	223	239	137	194	248
	188	290	188	77	159	255	206	254	186	235	257	238	262	145	204	260
Mag	171	288	178	79	159	241	206	248	178	233	239	225	239	145	188	260
	171	294	182	83	169	247	210	248	188	235	271	234	247	149	194	260
D1	171	288	182	77	159	241	206	248	178	227	239	234	239	145	188	248
	188	290	188	79	159	246	206	254	186	235	271	238	239	149	194	260
D2	171	288	182	77	159	247	206	238	178	227	239	225	247	137	194	260
	188	290	188	79	169	255	206	248	188	233	239	238	262	149	204	260
D3	171	290	182	77	159	241	206	248	178	227	239	223	239	145	194	260
	188	294	188	83	159	255	206	254	188	235	257	234	247	149	194	260
D4	171	290	182	77	149	241	206	238	178	227	257	234	239	137	188	260
	188	294	188	79	159	255	206	248	178	233	271	238	239	149	194	260
D5	171	290	182	77	149	247	206	248	178	235	239	225	239	145	194	260
	184	294	188	79	159	255	206	254	188	235	239	238	247	149	194	260
D6	171	288	178	77	149	247	206	238	178	227	239	234	247	137	194	260
	184	290	188	79	169	255	210	248	188	235	257	238	262	149	204	260
D7	171	290	178	77	149	241	206	238	178	233	239	225	239	137	188	260
	188	294	188	83	159	255	206	248	178	235	239	223	262	149	204	260
D8	171	288	178	77	149	247	206	248		227	239	223	239	145	188	260
	188	290	188	79	169	255	206	254		235	239	234	239	149	194	260
D9	171	290	178	77	149	241	206	238	178	227	239	225	239	137	188	260
	188	294	188	79	159	255	206	248	186	235	257	223	262	149	204	260
D10	171	288	182	77	159	241	206	238		227	239	223	239	137	188	260
	184	290	188	79	169	246	206	248		235	257	234	262	149	204	260
D11	171	288	182	77	149	246	206	238		227	239	225	239	137	194	248
	188	290	188	79	159	247	206	248		235	257	238	247	149	194	260
D12	171	288	178	77	149	247	206	238	178	235	257	225	247	137	188	260
	184	290	188	79	169	255	210	248	186	235	271	238	262	149	204	260
D13	171	290	178	77	149	241	206	248	186	235	239	234	239	145	188	248
	184	294	188	83	159	255	210	254	188	235	271	238	262	149	204	260

Table 5 : Résultats du génotypage des descendants issus du croisement Mag x CF (D1 à D13) au niveau de 20 locus microsatellites nucléaires réalisé par l'IFV. Les chiffres indiquent la taille de l'amplifiat. Les cases en bleu, en rouge et en vert indiquent que le locus est hérité du CF (père), de la Mag (mère) ou de l'un des deux parents respectivement.

La taille des locus est indiquée pour les deux copies du génome. L'analyse de ces résultats nous permet de vérifier que les descendants sont bien issus des croisements attendus et de remarquer qu'aucun des descendants n'a le même génotype. Ces descendants ont ensuite été phénotypés pour étudier la variabilité de la sensibilité génétique d'un pool de descendants.

2) Phénotypage

a) Survie des insectes

Sept insectes ont été mis sur 9 plantes de chaque descendant (D1 à D13), de leurs parents (Mag et CF), de leur « frère » (M) et de la référence sensible (CS). Les différents descendants ont été phénotypés au cours de différentes expériences, le CS servant de référence.

Des *S. tiganus* sains ou infectés ont été mis en contact pendant 7 jours avec ces plantes, à l'issue de cette période, ils sont comptés et le titre en phytoplasmes est mesuré. Aucun phytoplasme n'a été détecté dans les insectes sains et les titres variaient de $1,62E+06$ à $6,97E+08$ pFD/insecte avec un titre moyen de $2,35E+08$ pFD/insecte dans les insectes infectés. Ils sont similaires à ceux habituellement mesurés, nécessaire pour une bonne transmission (Eveillard et al., 2016).

Des différences de survie des insectes vecteurs se nourrissant pendant une semaine sur des accessions différentes ont été observées (Fig. 45).

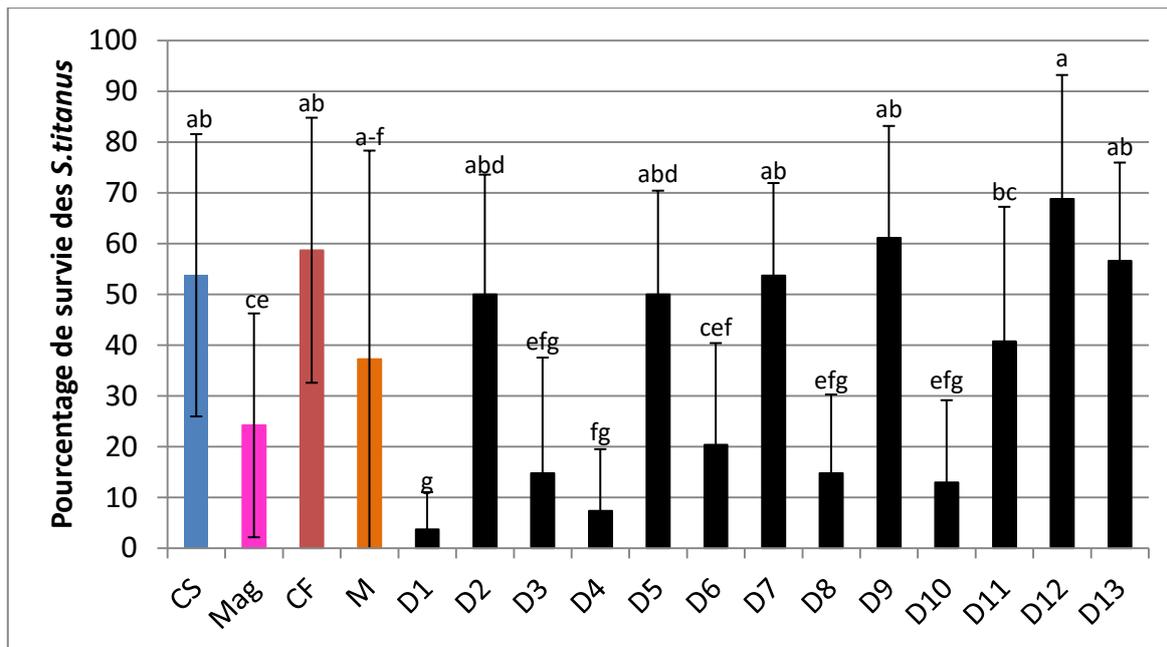


Figure 45 : Pourcentage de survie des *S.titanus* mis en contact avec 9 plantes de chacun des 13 descendant du croisement (D1 à D13), de leurs parents CF et Mag, de leur frère M et de la référence sensible CS pendant 7 jours. Les lettres indiquent les différences statistiques (test de Wilcoxon, p-value<0,05).

Ainsi, les *S. titanus* présentent un meilleur pourcentage de survie quand ils s'alimentent sur CS, CF, D2, D5, D7, D9, D11, D12, et D13 avec un pourcentage compris entre 40,74% et 61,11%. A noter que la survie sur M, de 37% n'est statistiquement différente que de celle sur D1 de 3,70% qui est très faible (test de Wilcoxon, p-value<0,05). Le taux de survie sur Mag, D3, D6, D8 et D10 est faible, compris entre 12,96% et 30,38% et celui sur D1 et D4 est très faible puisqu'inférieur à 10% (3,7% et 7,41% respectivement). Une forte mortalité des insectes sur Mag a déjà été observée au laboratoire, cependant celle sur les descendants n'a été observée qu'une fois, ainsi une nouvelle expérimentation avec ces plantes permettaient de confirmer ces observations (Eveillard et al., 2016). Une trop faible survie des insectes peut être préjudiciable pour la transmission, en effet nous ne savons pas si les *S. titanus* sont morts après 2, 3 ou 7 jours de contact avec les plantes et donc s'ils ont eu le temps d'inoculer le pFD.

b) Nombre de plantes infectées

Le phénotypage des descendants s'est déroulé au cours de 3 expérimentations différentes, ainsi les résultats sont exprimés en fonction du CS qui sert de référence aussi bien pour le nombre de plantes infectées que du titre en phytoplasmes. De plus, le M et les parents (Mag et CF) ont également été phénotypés deux fois (Fig. 46).

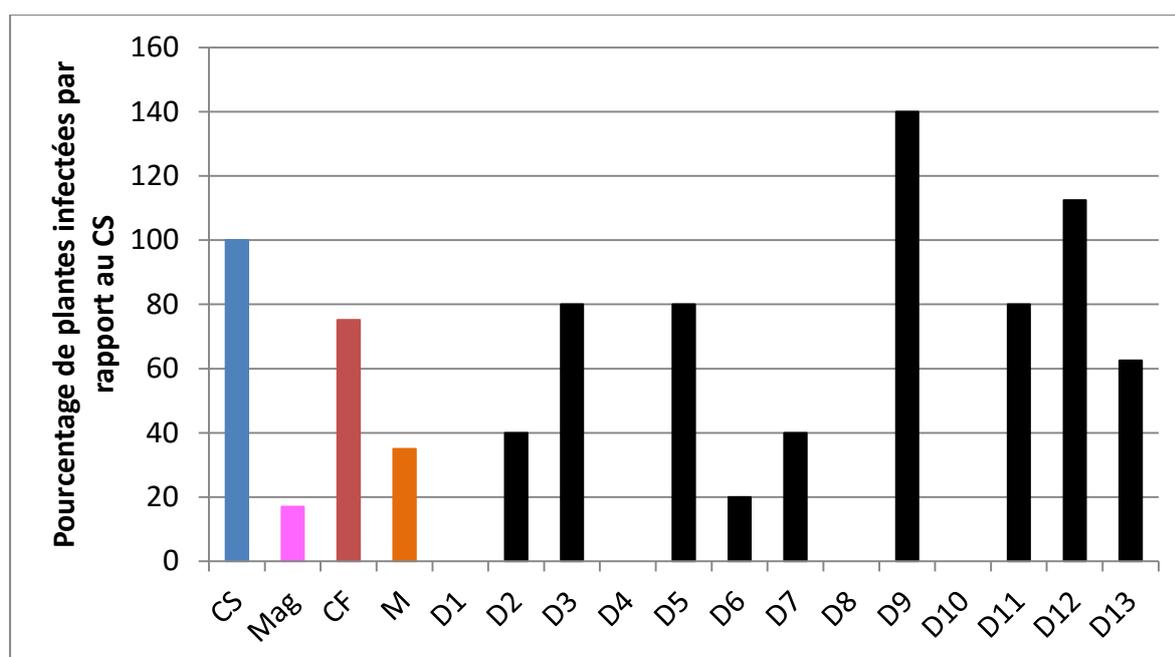


Figure 46 : Pourcentage de plantes infectées en fonction du nombre de plantes CS infectées 10 spt. Pour chaque descendant (D1 à D13), les parents (Mag et CF), le M et le CS, 9 plantes ont été infectées.

Comme attendu, les nombres de plantes infectées de CF et de CS sont proches, et ceux de Mag et de M sont plus faibles que celui de CS. Certains descendants (D3, D5 et D11) ont un pourcentage de plantes infectées similaire à celui de leur père (CF), le D6 à celui de sa mère (Mag), d'autres (D2, D7 et D13) sont intermédiaires et similaires à celui de leur « frère », le M. Des phytoplasmes ont été détectés dans davantage de plantes de D9 et de D12 que dans les autres accessions, au contraire de D1, D4, D8 et D10 pour lesquelles aucune plante n'a été infectée.

Bien que les pourcentages de survie des descendants D8 et D10 ne soient statistiquement pas différents de celui de la Mag, aucune plante D8 et D10 n'a été infectée. Inversement le descendant D3 avec une survie des *S. titanus* de 14,81% comparable à celle sur D8, descendant non infecté, présente le même nombre de plantes infectées que le CF. De même les descendants D7 et

D2 ont peu de plantes infectées comme le M alors que le pourcentage de survie des *S. titanus* est similaire à celui observé chez le CS.

Globalement, les descendants avec aucune plante infectée (D1, D4, D8 et D10) sont ceux sur lesquelles les *S. titanus* survivent mal puisque la survie des vecteurs sur ces plantes variait de 3,70 % à 14,81%. A l'inverse, une bonne survie des insectes (53,70% pour D7) ne permet pas toujours une bonne inoculation aux plantes (40% de plantes infectées), alors qu'avec la même survie des *S. titanus* (50%), 80% des plantes D5 ont été infectées, soit le double.

c) Titre en phytoplasmes

Aucun phytoplasme n'a été détecté dans les plantes des descendants D1, D4, D8 et D10, pour lesquelles la survie de vecteurs était mauvaise (Fig. 47).

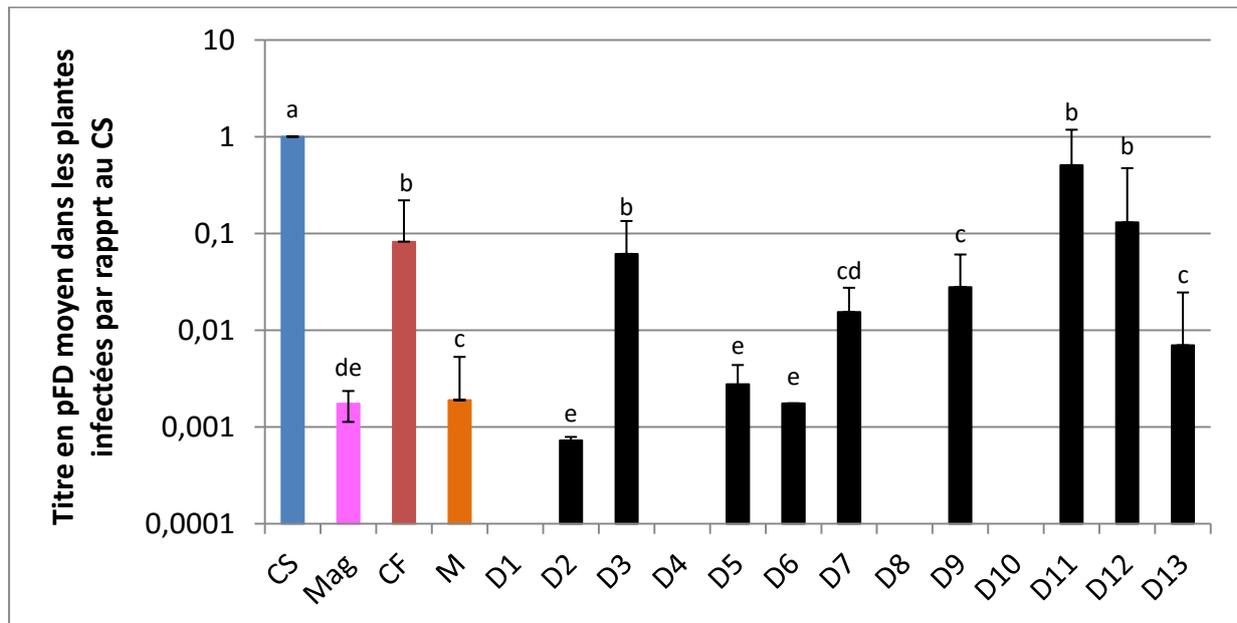


Figure 47 : Titre en phytoplasmes moyen des plantes infectées des différents descendants (D1-D13), de leurs parents (CF et Mag), de leur frère (M) et de la référence CS en fonction du titre en pFD des plantes CS infectées 10 spt. Les lettres indiquent les différences statistiques (test de Wilcoxon, p-value<0,05).

Certaines plantes (D3, D11, D12) présentent un titre moyen en pFD similaire à celui de leur père (CF), d'autres (D2, D5 et D6) à leur mère (Mag) et les descendants D3, D7, D9 et D13 à leur « frère » (M) selon les analyses statistiques (test de Wilcoxon, p-value<0,05)

Globalement, les descendants avec un titre moyen en pFD élevé présentent aussi un nombre de plantes infectées important, comme par exemple le D12 qui a un titre en pFD moyen de $4,08E+04$ pFD/mg PF et 100% de plantes infectées. Et inversement, les descendants avec un faible titre ont peu de plantes infectées comme le D6 avec $6,03E+04$ pFD/mg PF et 11% de plantes infectées.

d) Conclusion

Les descendants du croisement entre la Mag et le CF présentent des phénotypes variés vis-à-vis de la FD. En effet, certains se rapprochent de celui de leur mère avec un titre en pFD et un pourcentage de plantes infectées faible, contrairement à d'autres qui se rapprochent de celui de leur père (Fig. 48).

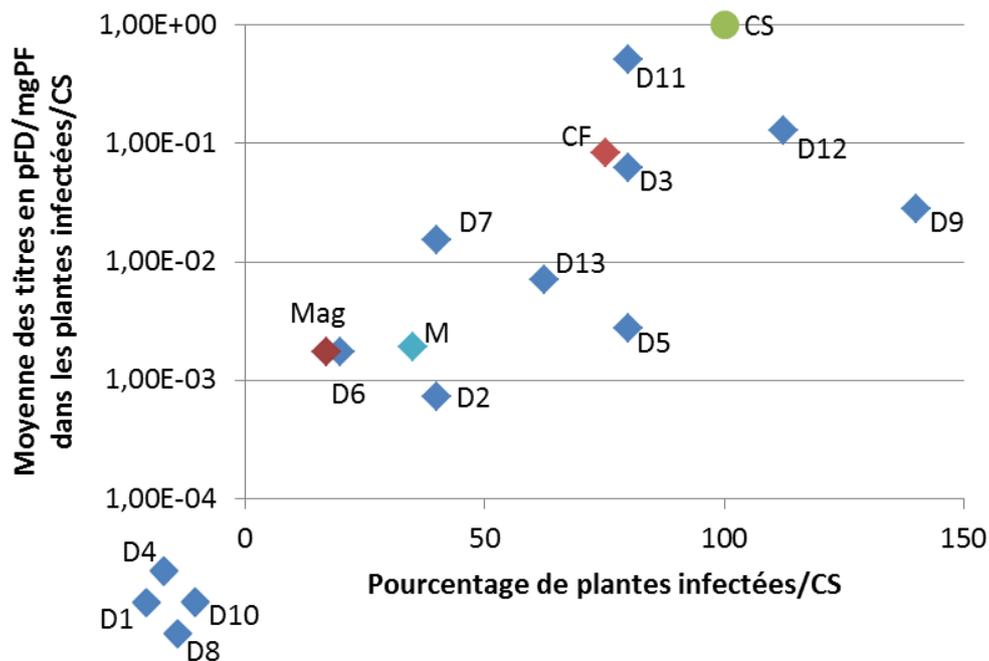


Figure 48 : Titre en pFD dans les plantes infectées et pourcentage de plantes infectées des descendants, de leurs parents (CF et Mag) et de leur « frère » (M) par rapport au CS, 10 spt

D'autre part, D2, D5, D7 et D13 présentent des phénotypes intermédiaires à leur 2 parents, comme c'est le cas de leur « frère », le M, ou des phénotypes extrêmes en étant plus sensibles (D11 et D12), ou moins sensibles (D1, D4, D8 et D10). Cependant l'absence d'infection de ces individus est à mettre en relation avec la faible survie des *S. titanus* sur ces plantes. Pourtant, la survie des insectes mis sur les descendants D3 qui présentent un phénotype proche du CF (sensible) est faible mais 44% des plantes sont infectées à un titre similaire au CF. Sur la moitié de ces plantes D3 infectées, la survie des insectes est de 0%. Ce qui montre dans le cas d'une faible survie qu'il est

difficile de savoir si les *S. titanus* ont eu le temps d'inoculer le pFD avant de mourir ou non. Ces descendants qui n'ont pas été infectés devront être à nouveau phénotypés afin de confirmer ces observations.

De même que cela été effectué chez les CS, les M et leurs parents, une inoculation du pFD *via* un greffon Ch pourrait compléter la caractérisation de la sensibilité des descendants au pFD en s'affranchissant d'une potentielle mauvaise inoculation du pFD par l'insecte vecteur.

III) Conclusion

Le phénotypage des 5 cépages en s'affranchissant d'une possible mauvaise inoculation par les *S. titanus* a présenté 3 groupes de plantes : CS et Sau sont très sensibles avec un nombre important de plantes infectées et un titre en pFD élevé, à l'inverse Mag et M sont peu sensibles et CF présente un phénotype intermédiaire. Ces observations sont en accord avec le phénotypage réalisé par inoculation directe *via* l'insecte vecteur (Eveillard et al., 2016). Les cépages présentent donc une différence de sensibilité au pFD indépendamment d'une différence d'inoculation possible du *S. titanus*.

La diffusion du pFD dans ces cépages a également été caractérisée comme cela a été effectué pour le CS et le M (Eveillard et al., 2016). Chez le Sau, la diffusion du pFD est importante puisqu'il a été détecté dans toutes les parties de la plante, comme c'est le cas pour le CS. A l'inverse, la diffusion est faible dans le CF et la Mag où il n'a diffusé que dans une autre partie de la plante, et que cette diffusion est exceptionnelle pour la Mag qui se comporte comme le M. Les cépages très sensibles (CS et Sau), en plus de présenter un nombre important de plantes infectées et un titre en pFD élevé, permettent une diffusion du pFD dans toute la plante. Les cépages peu sensibles (Mag et M) restreignent le pFD au niveau du site d'infection. Cette restriction du pFD sur une partie de la plante diminue la probabilité d'acquisition du pFD par les vecteurs et pourraient ainsi réduire l'épidémie de FD (Bressan et al., 2005b).

Ainsi ces expériences permettent de compléter la caractérisation de la sensibilité des cépages à la FD classés en 3 groupes :

- Les cépages très sensibles avec un nombre important de plantes infectées, un titre en pFD élevé après inoculation directe par *S. titanus* ou par greffage et une diffusion dans toute la plante (CS et Sau)
- Les cépages peu sensibles avec un nombre de plantes infectées, un titre en pFD et une diffusion du pFD dans la plante faible (M et Mag)
- Les cépages intermédiaires (CF)

Comme la faible sensibilité du M pourrait provenir de sa mère, la Mag, il a été intéressant de phénotyper des descendants issus du croisement Mag x CF afin d'étudier la ségrégation des caractères de multiplication du pFD et de pourcentage de plantes infectées dans cette descendance. Les résultats préliminaires ont montré des phénotypes variés. Ainsi, certains descendants sont très sensibles et d'autres peu sensibles. D1, D4, D8 et D10 n'ont pas été infectés et un nouveau phénotypage est nécessaire afin de confirmer cette observation. De même, le phénotypage d'un plus grand nombre de descendants est nécessaires afin d'exploiter le déterminisme génétique de la sensibilité/résistance à la FD et d'envisager à long terme l'utilisation de ces données dans le cadre d'un programme d'amélioration variétale. En effet, la caractérisation d'un ou de plusieurs descendants avec un faible pourcentage de plantes infectées et un très faible titre en pFD pourrait faire partie des solutions afin de diminuer les intrants et de limiter la maladie. Certaines espèces de *Vitis* portent des résistances naturelles aux maladies cryptogamiques, comme les gènes *Rpv1* et *Run1*. Une introgression de ces gènes a été réalisée et a conduit à la sélection de variétés moins sensibles au mildiou et à l'oïdium, et de bonne qualité œnologique (variétés ResDur), contribuant à une viticulture durable.

Ces recherches doivent également être complétées par des études sur les interactions entre le pFD et les plantes hôtes. A l'heure actuelle, celles-ci sont peu nombreuses et l'un des moyens de les caractériser est d'observer les dérégulations de l'expression des gènes de la plante suite à l'infection afin d'identifier les voies métaboliques perturbées. Cette étude fait l'objet du chapitre suivant.

Chapitre IV : Comparaison des transcriptomes de CS et de M suite à l'infection par le phytoplasme de la Flavescence Dorée

I) Introduction

Aujourd'hui, la caractérisation de la différence de comportements vis-à-vis de la FD chez le CS et le M est basée sur la sévérité des symptômes, la proportion de plantes infectées, la quantification et la diffusion des pFD dans les plantes (Boudon-Padieu, 1996; Eveillard et al., 2016). Un moyen de caractériser les interactions entre les agents pathogènes et leur plante hôte est d'étudier l'expression des gènes de la plante au cours de l'infection afin d'identifier des voies métaboliques perturbées pouvant être responsable des différents symptômes, et/ou d'une résistance.

Chez les plants de tomates infectés par le Tomato yellow leaf curl virus (TYLCV), une surexpression des gènes impliqués dans les réponses hormonales, la régulation de la transcription et le protéasome a été observée, ainsi qu'une répression des gènes du métabolisme primaire et secondaire (Miozzi et al., 2014).

Chez la pervenche, le cocotier, le maïs ou la fève, les phytoplasmes affectent le métabolisme glucidique, probablement en inhibant le transport du phloème (Gai et al., 2014; Hren et al., 2009a, 2009b; Junqueira et al., 2004; Lepka et al., 1999; Rojas et al., 2014; Santi et al., 2013). En effet, des dépôts de callose obstruant les vaisseaux du phloème ont été observés dans les éléments de tubes criblés d'*A. thaliana* infectés par '*Ca. P. asteris*' (Pagliari et al., 2016). Ce dépôt de callose est en accord avec une induction de la callose synthase observée dans les vignes infectées par le pBN (Hren et al., 2009a). D'autre part, il a été constaté une réduction de la photosynthèse, une accumulation des peroxydes d'hydrogène, une altération du métabolisme secondaire et une perturbation de l'équilibre hormonal chez la pervenche, le tabac, le cocotier ou la vigne infectés par les phytoplasmes. Ces dérégulations pourraient expliquer les symptômes observés chez ces plantes (Choi et al., 2004; Gambino et al., 2013; Lepka et al., 1999; Maust et al., 2003; Musetti et al., 2007).

Concernant la vigne, une comparaison de l'expression des gènes a montré que les gènes de défense et du métabolisme des sucres sont perturbés chez les plantes infectées par '*Ca. P. solani*', agent du BN (Albertazzi et al., 2009; Hren et al., 2009b). Des études métabolomiques et protéomiques sur des vignes infectées par le pFD de cépage Modra frankinja et Nebbiolo respectivement, mettent en évidence une dérégulation des gènes ou des protéines impliqués dans la photosynthèse et dans la défense (protéines PR) (Margaria and Palmano, 2011; Margaria et al., 2014; Prezelj et al., 2016). Cependant, aucune étude n'a comparé les profils transcriptomiques d'une variété de vigne sensible et d'une variété peu sensible, or l'identification de gènes différentiellement exprimés chez des cépages peu sensibles lors de l'infection pourrait potentiellement mener à des marqueurs pour la sélection de cépages moins sensibles.

Une comparaison de l'expression génique du CS sain et infecté (CS-S et CS-I) et du M sain et infecté (M-S et M-I) permet de caractériser les dérégulations géniques mises en jeu lors de l'infection par le pFD. Afin de mettre en évidence les différences de réactions au pFD entre le CS et le M, les transcriptomes de ces 2 cépages en conditions infectées (CS-I/M-I) sont comparés. Ces différences pouvant déjà exister avant l'infection, l'expression des gènes de ces cépages en condition saine a aussi été analysée afin de mettre en évidence des différences physiologiques (CS-S/M-S).

Suite aux résultats d'infection de CS et de M *via* un greffon Ch qui n'aboutissaient pas à la présence de pFD dans les parties aériennes (Chapitre II), il a été décidé d'inoculer les CS et M destinés aux analyses de transcriptomique par des *S. titanus* infectieux encagés sur une seule feuille. Ce type d'expérience avait déjà été mené et avait notamment permis d'étudier la diffusion du phytoplasme dans la plante entière de CS et M (Eveillard et al., 2016).

II) Résultats et discussion

Dans un souci lisibilité, la discussion est incluse dans chaque partie des résultats.

A) Obtention des plantes à comparer en RNA-Seq

L'infection des plants de CS et M destinés à l'étude de l'expression des gènes a été effectuée par les insectes *S. titanus* infectieux sur une seule feuille. Parallèlement, les plantes témoins saines ont été mises en contact avec des *S. titanus* sains afin que les plantes soient dans les mêmes conditions. En effet, la plante en contact avec des insectes infectieux réagit à la présence du phytoplasme mais également à la piqure de l'insecte, or dans cette expérience, seule la réponse de la plante au phytoplasme FD veut être observée. En mettant aussi les plantes saines en contact avec des insectes, la réponse à l'insecte ne sera pas prise en compte lors des analyses de comparaison entre plantes saines et plantes infectées.

Sept jours après la mise en contact des *S. titanus* sains ou infectieux avec les feuilles, les insectes sont récupérés. Les pourcentages de survie sont plus élevés sur les feuilles de CS puisqu'ils sont de 92,86% pour les insectes sains et 65,83% pour les insectes infectés, alors que sur les M, ils ne sont que de 32,14% et 45,24% chez les insectes sains et infectés respectivement (Fig. 49).

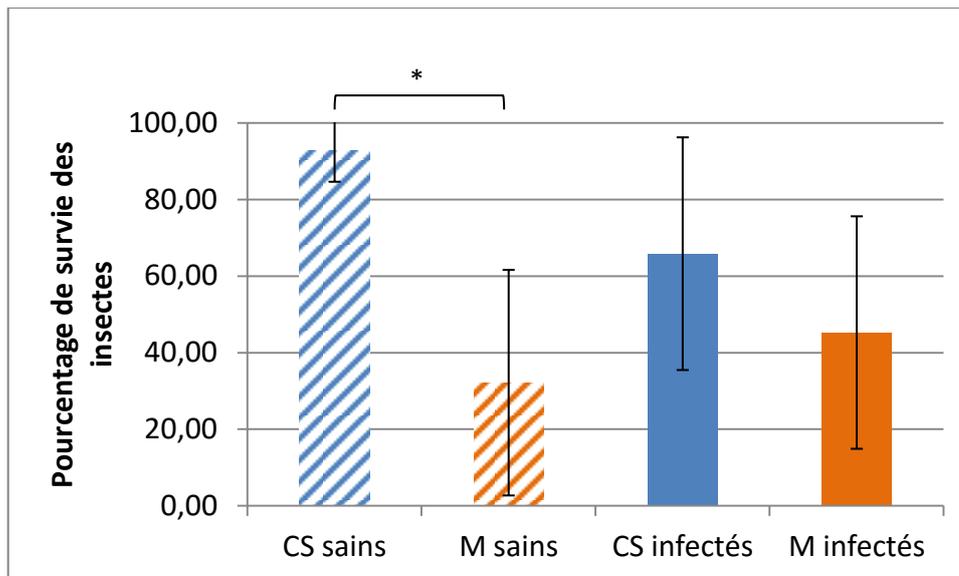


Figure 49 : Pourcentage de survie des *S.titanus* infectieux ou sains mis en contact pendant sept jours avec une feuille de CS ou de M (test de Wilcoxon, p-value<0.05). (7 insectes sains sur 4 CS et 4 M et 7 insectes infectés sur 8 CS et 12 M).

Ces pourcentages ne sont pas statistiquement différents sauf entre les insectes sains placés sur les CS (92,86%) et les M (32,14%) (Test de Wilcoxon, p-value<0.05). Aucun phytoplasme n'a été détecté dans les insectes sains placés sur les plantes saines. Les insectes infectieux en contact avec les plantes à infecter présentaient un titre moyen de 3,71E+07 phytoplasmes/insecte, ce qui est en accord avec des études précédentes et permet une bonne transmission du pFD à la plante (Eveillard et al., 2016).

Six semaines après la mise en contact avec les *S. titanus*, les feuilles ont été prélevées. Elles ne présentaient pas de symptômes de FD, bien que leur apparition puisse se manifester 6 à 7 semaines post-transmission (spt). Le reste de la plante a également été prélevé et découpé en tronçons afin de connaître la diffusion des phytoplasmes dans la plante (Fig. 50).

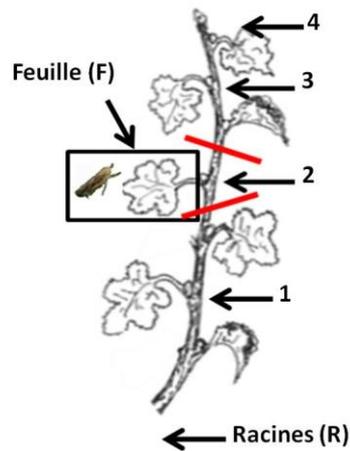


Figure 50 : Schéma des plantes inoculées sur une feuille et destinées aux analyses transcriptomiques. Les plantes sont découpées en plusieurs tronçons : Racines (R), portion de plante située en dessous de la feuille inoculée par insectes (1), portion de plante portant la feuille inoculée par insectes (2), feuille inoculée par insectes (feuille (F)), portion de plante située juste au-dessus de la feuille inoculée (3) et apex de la plante (4).

Aucun phytoplasme n'a été détecté dans les feuilles des plantes mises en contact des insectes sains. Les feuilles mises en présence pendant sept jours avec des *S. titanus* infectieux ont présenté des titres moyens de $1,08E+04$ phytoplasmes/mg PF (pFD/mg PF) pour les CS et de $5,13E+03$ pFD/mg PF pour les M.

Pour les analyses de RNA-Seq, nous avons choisi d'étudier et de comparer les transcriptomes de trois plantes de chaque condition. Ainsi, 3 CS sains et 3 M sains ont été choisis parmi les 4 disponibles. Trois CS infectés ont également été sélectionnés sur les 8 disponibles (CS-I-8, CS-I-18 et CS-I-27) avec des titres en phytoplasmes de $2,61E+03$, $1,46E+04$ et $2,49E+04$ pFD/mg PF. Afin de nous rapprocher des conditions des CS, 3 M (M-I-5, M-I-10 et M-I-26) dont les titres en phytoplasmes étaient les plus forts ($8,88E+03$, $4,90E+03$ et $9,06E+03$ pFD/mg PF) ont été sélectionnés parmi les 12 disponibles.

Chez les CS infectés, toutes les parties de la plante se sont révélées positives pour la présence de pFD, que ce soit les tiges, les pétioles et même les racines, montrant ainsi la large diffusion du phytoplasme dans les plants de CS (Fig. 51A). Chez les 3 M infectés choisis, les tronçons de tige n°2 portant la feuille inoculée F sont soit négatifs, soit en limite de détection, soit faiblement positifs avec un titre de $8,52E+01$ pFD/mg PF. Toutes les autres parties des M infectés sont négatives pour la présence du phytoplasme (Fig. 51B). Celui-ci n'a donc pas diffusé dans le M contrairement à ce qui a été observé chez le CS, et ce qui est en accord avec des résultats précédents (Eveillard et al., 2016).

Les ARN de ces 12 plantes ont été extraits et envoyés au laboratoire IPS2 (Institute of Plant Sciences Paris Saclay) pour l'analyse transcriptomique.

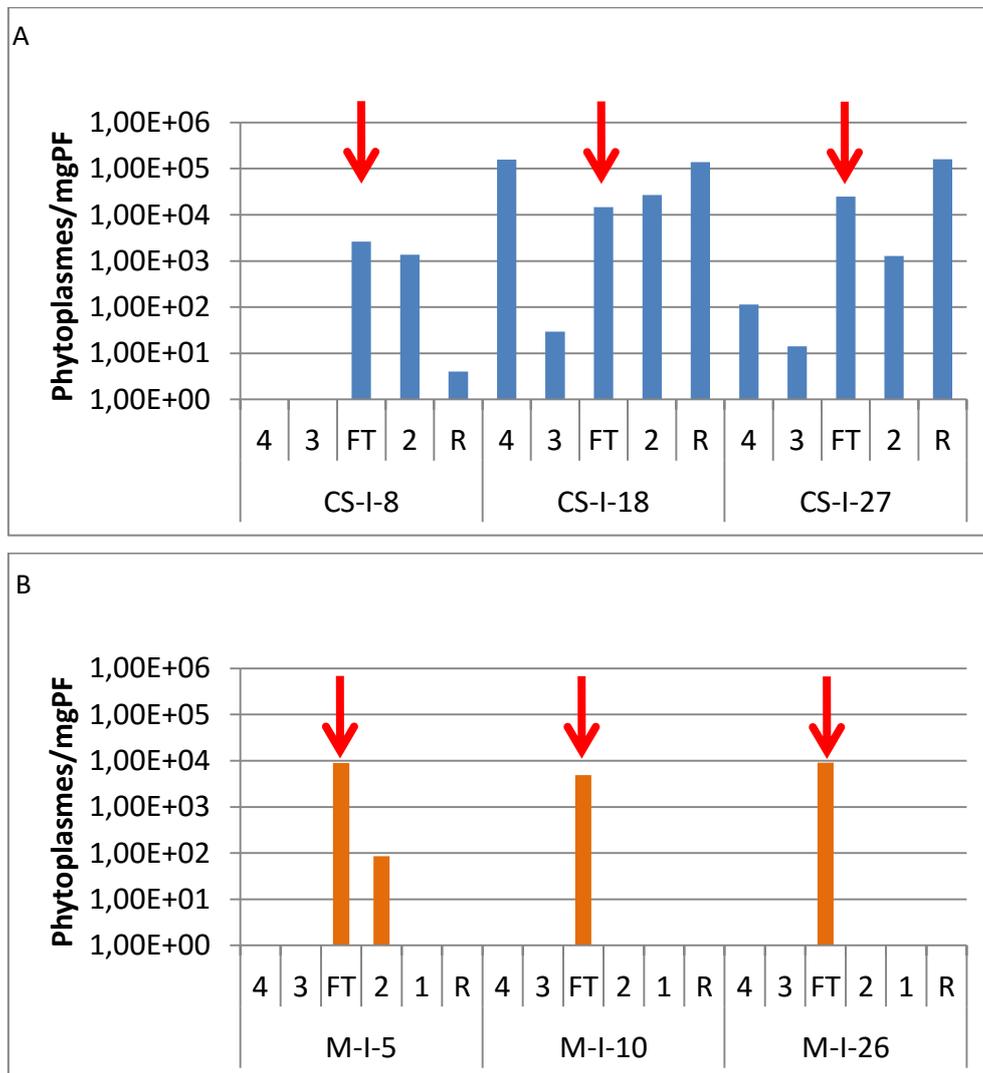


Figure 51 : Titres en phytoplasmes dans les différentes parties des plantes CS et M infectées dont la feuille inoculée est destinée aux analyses transcriptomiques. A : CS, B : M. La flèche rouge indique le titre en phytoplasmes obtenu dans la feuille où a eu lieu la transmission (FT), les chiffres indiquent les tronçons de la plante.

Pour plus de lisibilité, les CS sains, les M sains, les CS infectés et les M infectés sont nommés dans la suite du manuscrit CS-S, M-S, CS-I et M-I respectivement.

B) Identification des gènes différentiellement exprimés et classification fonctionnelle

1) Données brutes du séquençage

Les lectures brutes générées par HiSeq 2000 ont été filtrées à l'aide de différents outils afin de supprimer les séquences ribosomiques et de ne conserver que les lectures de haute qualité. Elles ont été alignées contre le transcriptome de *Vitis vinifera* cépage Pinot Noir et seules les lectures paired-end pour lesquelles les deux lectures s'alignent sans ambiguïté sur la carte du transcriptome, en éliminant les lectures multiples ont été conservées. Seules les lectures dont la paire s'aligne de manière concordante sur la référence, c'est-à-dire que les 2 lectures paired-end sont distantes l'une de l'autre dans la gamme de taille d'insert attendu, sont dans la bonne orientation et s'alignent sur le même gène, sont comptées et utilisées pour l'analyse (Table 6).

Echantillon	Nombre de lectures de haute qualité	Lectures associées à un gène (%)	Lectures mappées à différents endroits du génome(%)	Lectures comptées (%)
CS-S-4	30 401 095	24 396 879 (80,25)	589 781 (1,94)	23 427 084 (77,06)
CS-S-25	31 770 882	25 035 455 (78,80)	616 355 (1,94)	23 863 109 (75,11)
CS-S-29	35 775 914	28 770 990 (80,42)	686 898 (1,92)	27 286 290 (76,27)
M-S-4	33 567 458	25 158 810 (74,95)	694 846 (2,07)	23 896 673 (71,19)
M-S-13	35 327 426	27 597 785 (78,12)	650 025 (1,84)	26 460 242 (74,9)
M-S-17	33 849 792	24 402 315 (72,09)	687 151 (2,03)	23 281 887 (68,78)
CS-I-8	29 000 632	22 005 680 (75,88)	495 911 (1,71)	21 112 460 (72,8)
CS-I-18	34 594 458	27 308 865 (78,94)	643 456 (1,86)	25 945 844 (75)
CS-I-27	27 250 939	20 686 188 (75,91)	602 246 (2,21)	19 680 628 (72,22)
M-I-5	34 414 034	26 619 255 (77,35)	746 785 (2,17)	25 259 901 (73,4)
M-I-10	32 566 109	24 616 722 (75,59)	683 888 (2,1)	23 558 323 (72,34)
M-I-26	32 714 475	26 315 524 (80,44)	631 389 (1,93)	25 065 831 (76,62)
Moyenne	32 602 768	25 234 542 (77,40)	645 535 (1,98)	24 064 103 (73,81)

Table 6 : Résultats du mapping des lectures de RNA-Seq de haute qualité de CS et M sur le génome du Pinot Noir.

Selon ces règles, plus de 27 millions de lectures de haute qualité ont été obtenues pour chaque échantillon. Environ 78% (72,09 à 80,44%) de ces lectures ont été associées à un gène dans le génome de référence de la vigne (Pinot Noir) dont environ 74% (68,78 à 77,06%) ont été mappés à des endroits isolés et environ 2% (1,71 à 2,21%) à différents endroits du génome. Ces chiffres sont en accord avec ceux obtenus lors d'une étude transcriptomique réalisée sur la vigne (*Vitis amurensis* 'Shuanghong') infectée par le mildiou où une moyenne de 31 536 404 lectures de hautes qualités a été obtenue et dont 76,05% des lectures sont associées à un gène (Li et al., 2015). Les lectures comptées correspondent à l'expression de 24 311 et 24 256 gènes de vignes soit 92,28 et 92,08% de couverture de la totalité des gènes chez les M et les CS respectivement. Les analyses des transcriptomes ont ensuite été menées, tout d'abord en classant les gènes en catégories fonctionnelles, puis en recherchant les gènes différentiellement exprimés entre les différentes conditions dans ces différentes catégories.

2) Classement en catégories fonctionnelles des gènes exprimés

Les gènes de vigne exprimés dans les différentes conditions sont classés en catégories fonctionnelles. Pour cela, l'homologie avec les gènes d'*A. thaliana* a été nécessaire notamment afin d'utiliser le logiciel Mapman, ainsi 20 685, 20 925, 20 714 et 20 968 gènes homologues à un gène d'*A. thaliana* et exprimés chez les CS-S, les CS-I, les M-S et les M-I respectivement ont été classés en catégories biologiques avec Panther (Fig. 52) (Rotter et al., 2009; Thimm et al., 2004; Thoma et al., 2003).

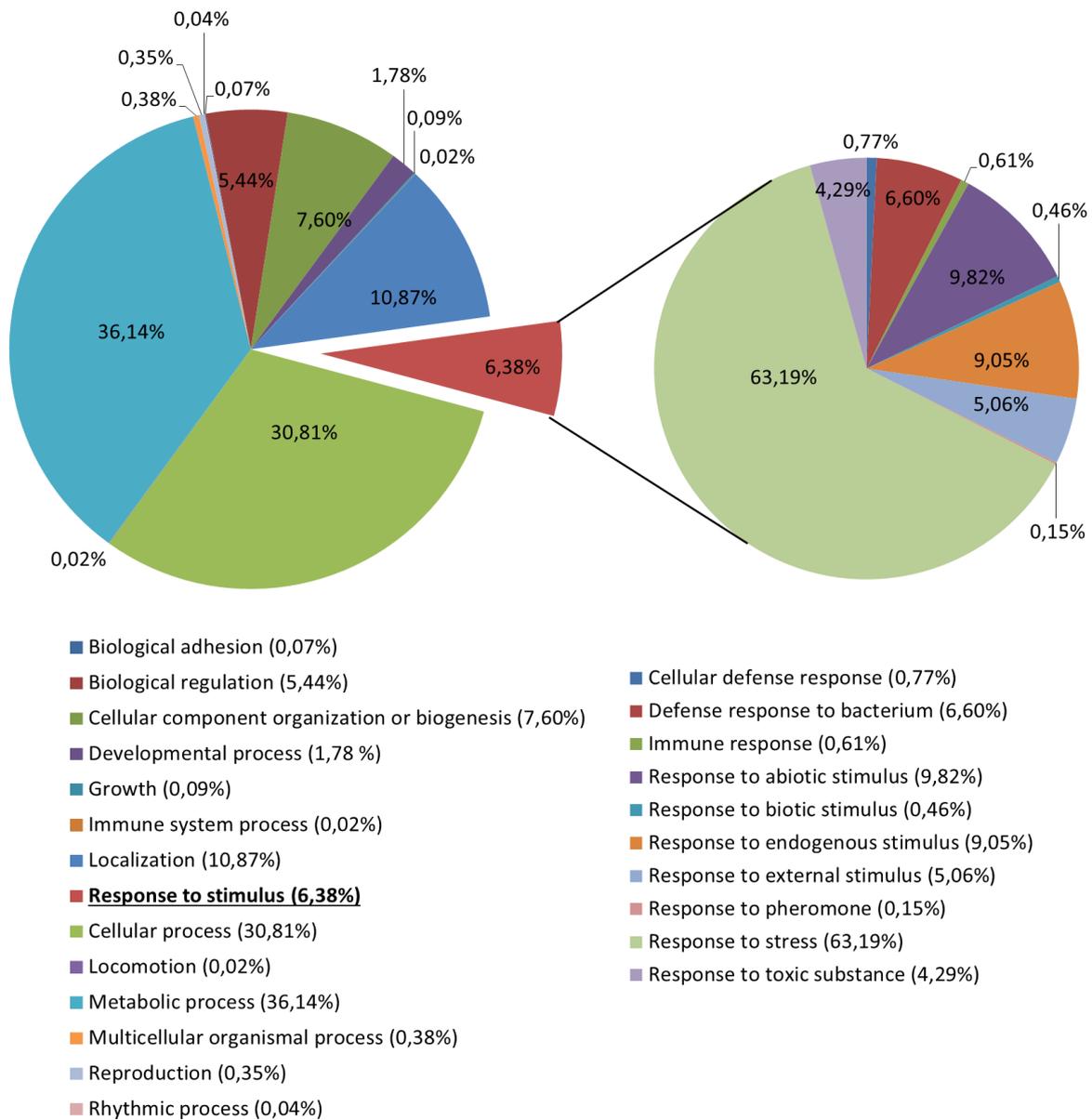


Figure 52 : Répartition en catégories biologiques des gènes exprimés dans les différents échantillons (CS-S et CS-I, M-S et M-I) en utilisant les gènes homologues d'*A. thaliana* et le logiciel Panther (Thoma et al., 2003). Les pourcentages obtenus sont issus d'une moyenne des différents échantillons.

Les gènes les plus nombreux à s'exprimer appartiennent à la catégorie processus métaboliques (36,14%) et processus cellulaire (30,81%). Viennent ensuite les catégories localisation (10,87%), organisation et biogenèse cellulaire (7,60%) et réponse aux stimuli (6,38%). Cette catégorie réponse aux stimuli est représentée à 63,19% par des gènes de réponses au stress et à 6,6% par des gènes de réponse aux bactéries.

Aucune différence globale majeure entre les échantillons n'a été observée. Ainsi, entre CS et M, et entre plantes saines et infectées, la proportion des catégories de gènes exprimés semble similaire. Une différence de l'intensité de l'expression des gènes de ces différentes classes est maintenant recherchée entre les plantes saines et les plantes infectées, mais aussi entre les 2 cépages de sensibilité différente à la FD.

3) Recherche des gènes différentiellement exprimés

a) Classement en catégorie fonctionnelle des gènes

Pour l'analyse de l'expression des gènes différentiellement exprimés entre les différentes conditions, une p-value inférieure à 0,05 et un log₂ fold change supérieur à 2 ou inférieur à -2 ont été choisis comme seuils.

Sur les 22 333 gènes de vigne homologues à un gène d'*A. thaliana*, 539 et 876 sont différentiellement exprimés (DE) chez le CS-I par rapport au CS-S et chez le M-I par rapport au M-S respectivement, dont 92% sont surexprimés chez les CS-I contre 83% chez les M-I. Le M semble réagir à l'infection en faisant varier la transcription de plus de gènes que le CS.

Les gènes de certaines catégories fonctionnelles sont peu influencés par l'infection, comme les gènes intervenant dans la glycolyse, le métabolisme azoté ou la synthèse d'ATP (Fig. 53). En effet, seul 1 gène de la glycolyse est surexprimé et un seul gène du métabolisme azoté est réprimé aussi bien chez le CS-I que chez le M-I par rapport au CS-S et au M-S respectivement. En revanche, d'autres catégories sont très impactées par la présence du pFD. Ainsi, 18 gènes impliqués dans le métabolisme secondaire sont surexprimés chez le M-I et le CS-I par rapport au M-S et au CS-S respectivement. Le métabolisme hormonal, les réponses de défense au stress, la biosynthèse de la paroi cellulaire et la signalisation sont aussi stimulés en présence du pFD puisque 20 à 50 gènes de ces catégories sont davantage exprimés, ce qui semble cohérent avec les réactions de défense des plantes à un pathogène. Ces différences d'expression de gènes entre les cépages sains et infectés permettent une caractérisation des réactions communes de la vigne à l'infection par le pFD.

Dans certaines catégories, le M-I surexprime un nombre plus important de gènes que le CS-I : il s'agit du métabolisme hormonal (27 gènes surexprimés chez le M-I contre 20 chez le CS-I) ou de la signalisation (47 gènes surexprimés chez le M-I contre 37 chez le CS-I). Ces différences d'expression entre CS-I et M-I sont recherchées afin de caractériser des différences de réactions entre ces deux cépages de sensibilité différente et donc potentiellement impliquées dans la faible sensibilité du M à la FD. Certaines de ces différences sont déjà présentes entre le CS-S et le M-S décrivant des différences physiologiques entre ces deux cépages et pouvant aussi être intéressantes pour expliquer la différence de sensibilité.

Dans la suite du manuscrit, certaines catégories ont été choisies et sont décrites plus spécifiquement : la perception du pFD, la transduction du signal et le métabolisme hormonal, le métabolisme secondaire, les protéines PR, la protéolyse médiée par l'ubiquitine et le métabolisme primaire.

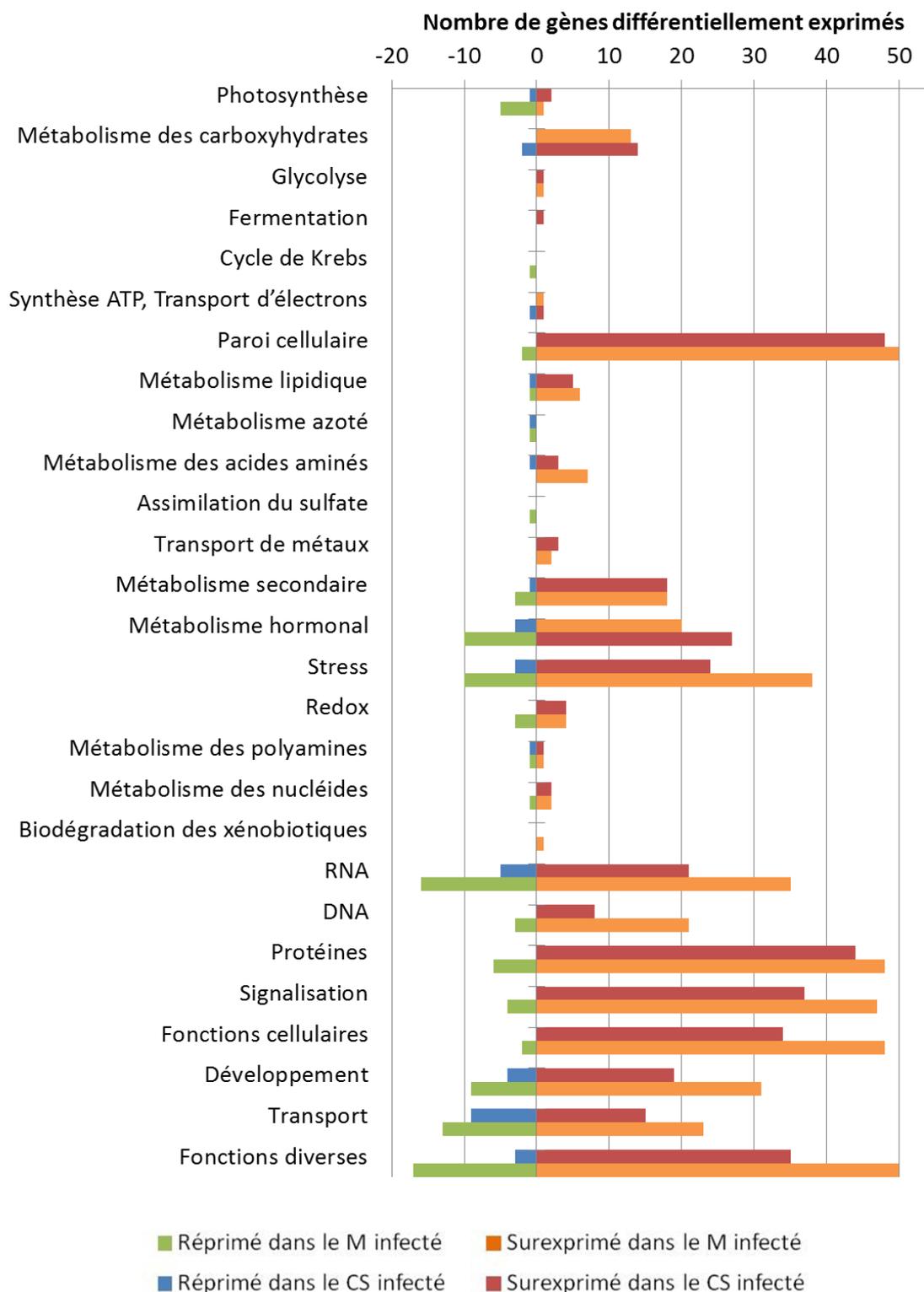


Figure 53 : Processus ou familles protéiques altérés dans le niveau d'expression des gènes chez le CS et le M infectés comparés au CS et M sains respectivement (Mapman). Les gènes non assignés à une fonction ne sont pas présentés.

b) Perception du pFD

L'expression de gènes codant des récepteurs déjà caractérisés pour la reconnaissance de pathogènes bactériens est attendue dans notre système. En effet, cette reconnaissance pourrait permettre la mise en place de réponses de défense par la plante. Les réactions de défense des plantes contre les agents pathogènes sont déclenchées par des PAMP reconnus par des récepteurs spécifiques. Ils peuvent être de type RLK (Receptor-Like Kinase) avec une partie extracellulaire de type LRR (Leucine-Rich repeats) ou de type RLP (Receptor-Like Proteins) (Tör et al., 2009).

Chez les CS-I et M-I, 15 récepteurs de ce type sont davantage exprimés que chez le CS-S et le M-S respectivement (Annexe 1 et Fig. 54). Par exemple, le récepteur PXC3 (PXY/TDR Correlated 3, *GSVIVT01033288001*) impliqué dans les réponses de défense aux bactéries possède un niveau d'expression 5 fois supérieur en condition infectée à la fois chez le CS et le M.

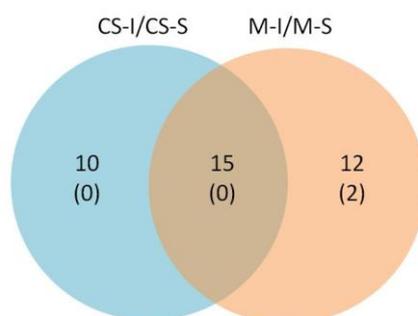


Figure 54 : Diagramme de Venn comparant les gènes impliqués dans la perception différentiellement exprimés entre le CS et le M après infection, les chiffres indiquent le nombre de gènes surexprimés et ceux entre parenthèses, les gènes réprimés.

En présence du pFD, l'expression d'autres récepteurs est augmentée chez le CS-I mais pas chez le M-I (10 gènes) ou inversement (12 gènes) (Annexe 1 et Fig. 55). Par exemple, le récepteur à la flagelline FLS2 (Flagellin-Sensitive 2, *GSVIVT01029149001*) est 4,6 fois plus exprimé chez le M-I que chez le M-S, alors qu'il ne varie pas entre le CS-S et le CS-I. Ce récepteur FLS2 reconnaît un épitope de 22 acides aminés de la flagelline nommé flg22 (Zipfel and Felix, 2005). La plupart des plantes répondent à la présence de flagelline, très conservée chez les bactéries, démontrant ainsi que ce système de perception est largement conservé dans le règne végétal (Felix et al., 1999). Dans certains cas, les événements induits par la flagelline peuvent également entraîner la HR, la formation de callose, l'accumulation de la protéine de défense PR1 et une forte inhibition de la croissance (Gómez-Gómez et al., 1999; Hann and Rathjen, 2007). Cependant, l'épitope flg22 n'est pas présent chez le pFD : FLS2 pourrait-il reconnaître un autre motif du pFD ?

La surexpression de ces 10 gènes de récepteurs uniquement chez le CS-I par rapport au CS-S ou des 14 uniquement chez le M-I par rapport au M-S semble spécifique de la réponse à l'infection de chaque cépage. Par contre, aucune différence d'expression statistiquement significative n'a été observée ni entre les CS et M sains, ni entre les CS et M infectés pour ces gènes.

Parmi les gènes différemment exprimés entre le CS infecté et le M infecté, 16 gènes sont surexprimés chez le CS-I et 2 chez le M-I (Annexe 1 et Fig. 55).

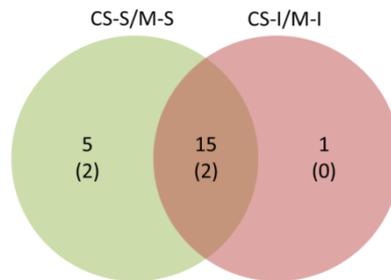


Figure 55 : Diagramme de Venn comparant les gènes impliqués dans la perception différemment exprimés entre l'état sain et infecté, les chiffres indiquent le nombre de gènes surexprimés chez le CS et entre parenthèse, ceux surexprimés chez le M.

Pour 15 des 18 gènes différemment exprimés entre le CS infecté et le M infecté, aucune différence d'expression n'est observée ni entre CS-S et CS-I, ni entre M-S et M-I (Fig. 56).

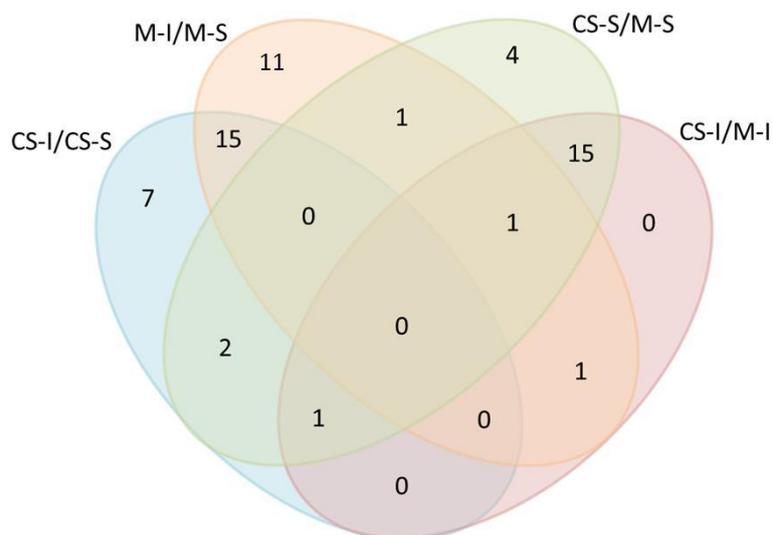


Figure 56 : Diagramme de Venn comparant les différentes conditions, les chiffres indiquent le nombre de gènes dérégulés.

Ces gènes ne sont donc ni surexprimés, ni réprimés chez le CS ou le M suite à l'infection. Par contre, les différences d'expression sont déjà présentes entre CS-S et M-S, sauf pour *LIK1*. Ces différences sont donc inhérentes aux cépages et peuvent potentiellement être impliquées dans la différence de sensibilité au pFD. Le gène *LIK1* (LysM RLK1-Interacting Kinase 1, *GSVIVT01021285001*) dont le niveau d'expression est équivalent entre CS-S et M-S, est 7,89 fois moins exprimé dans le M-I que dans le CS-I. Il code pour une protéine LRR-RLK localisée dans la membrane plasmique et impliquée dans la régulation de l'immunité innée des plantes aux agents pathogènes. *LIK1* est phosphorylé par *CERK1*, une kinase impliquée dans la perception de la chitine, constituant des membranes des agents pathogènes, ce qui active les voies de signalisation du JA et de l'ET, hormones impliqués dans les réactions de défense chez *A. thaliana* (Le et al., 2014). Chez le mutant *Lik1* d'*A. thaliana*, des gènes impliqués dans les voies de signalisation du JA et de l'ET sont réprimés, or ces voies sont impliquées dans la réponse aux agents nécrotrophes ainsi qu'aux insectes et herbivores et ont une action antagoniste avec le SA (Le et al., 2014; Lortzing and Steppuhn, 2016; Wasternack and Hause, 2013). La plus faible expression du récepteur *LIK1* dans le M pourrait donc entraîner une répression des voies du JA et de l'ET et ainsi favoriser la voie du SA, majoritairement impliqué dans la réponse spécifique contre les agents pathogènes biotrophes (Loake and Grant, 2007). De plus, toujours chez le mutant *Lik1* d'*A. thaliana*, les traitements à la chitine ou à la flagelline (*flg22*) ont provoqué une production de ROS supérieure à celle des plantes sauvages.

Une expression différentielle des gènes ayant un rôle dans les voies de signalisation du JA et de l'ET est donc attendue entre le CS et le M. Cette partie est présentée ci-dessous dans la partie Transduction du signal (Chapitre IV, B, 3, c).

Des différences de niveau d'expression des gènes intervenant dans la perception du pFD ont été mises en évidence entre ces 2 cépages en condition infectée, pouvant potentiellement être impliquées dans la différence de sensibilité au pFD entre M et CS.

c) Transduction du signal

Suite à la perception de l'agent pathogène, un réseau de signalisation médiée par des flux ioniques, des espèces réactives à l'oxygène (ROS) ou des phytohormones telles que l'acide salicylique (SA), l'acide jasmonique (JA) ou l'éthylène (ET), permet de mettre en place les réponses de défense de la plante.

Transduction du signal : Signalisation du calcium

Globalement, une augmentation du nombre de transcrits des gènes impliqués dans la signalisation du calcium a été observée chez le CS-I (4 gènes) et le M-I (8 gènes) en comparaison avec le CS-S et le M-S respectivement, sans toutefois présenter de différences entre le M-I et le CS-I (Table 7). Cela peut s'expliquer par les seuils fixés, ainsi certains gènes pourraient être considérés comme surexprimés si les seuils étaient abaissés. Deux gènes sont réprimés chez le M-I par rapport au M-S.

Nom du gène	Description	Log2 (CS-I/CS-S)	Log2 (M-I/M-S)	Log2 (CS-S/M-S)	Log2 (CS-I/M-I)
<i>GSVIVT01007243001</i>	EHD2	5,18	3,95	0	0
<i>GSVIVT01018063001</i>		0	2,6	0	0
<i>GSVIVT01035382001</i>	IQD6	0	5,06	0	0
<i>GSVIVT01002377001</i>		0	3,33	0	0
<i>GSVIVT01008749001</i>	CPK29	0	2,09	0	0
<i>GSVIVT01003132001</i>	CAM8	0	-2,07	0	0
<i>GSVIVT01008043001</i>	IQD31	2,69	2,64	0	0
<i>GSVIVT01009343001</i>	NPGR1	2,44	2,31	0	0
<i>GSVIVT01018058001</i>		3,83	2,7	-2,12	0
<i>GSVIVT01008934001</i>	CML23	0	-2,77	0	0
<i>GSVIVT01022002001</i>	BON3	0	0	2,41	2,36

Table 7 : Expression différentielle de gènes impliqués dans la signalisation du calcium entre CS-I et CS-S, M-I et M-S, entre CS-S et M-S et entre CS-I et M-I exprimés en log2. Dans les colonnes Log2(CS-I/CS-S) et Log2(M-I/M-S), les valeurs positives représentent une surexpression dans les plantes infectées et dans les colonnes Log2(CS-S/M-S) et Log2(CS-I/M-I), les valeurs positives représentent une surexpression chez les CS. Les valeurs 0 indiquent qu'il n'y a pas de différences d'expression statistiquement significative (FDR<0,05 et Log2 fold change >2 ou <-2). L'explication des valeurs dans les tableaux suivants est la même et est simplifiée dans la suite du manuscrit.

Dans les tableaux, les valeurs en log2 ont été données par les analyses RNA-Seq, mais dans le texte, les valeurs « brutes » ont été transformées en nombre de fois surexprimé ou réprimé.

Seul le gène *BON3* (Bonzai 3/*GSVIVT01022002001*) est 5 fois plus exprimé chez le CS-I que chez le M-I. Cette différence est déjà observée entre ces deux cépages à l'état sain. *BON3* permet une répression de la mort cellulaire programmée et une promotion de la croissance chez *A. thaliana* (Yang et al., 2006). A la suite d'une attaque par un agent pathogène, un processus de mort cellulaire programmée appelé réponse hypersensible (HR) est déclenchée. Cette réaction localisée permet de

restreindre l'accès des pathogènes aux nutriments et donc d'éviter la propagation de l'infection aux cellules adjacentes. L'expression plus faible de ce gène dans le M-I et donc potentiellement une HR efficace pourrait expliquer l'absence de diffusion du pFD dans le M, contrairement au CS qui ne pourrait pas bloquer autant le pFD.

Transduction du signal : Oxydo-réduction

Globalement à l'état infecté, il y a une surexpression des gènes impliqués dans les réactions d'oxydo-réduction chez le CS et le M, même si certains gènes sont réprimés chez le M (Table 8).

Nom du gène	Description	Log2 (CS-I/CS-S)	Log2 (M-I/M-S)	Log2 (CS-S/M-S)	Log2 (CS-I/M-I)
<i>GSVIVT01020089001</i>	TRX2	2,2	0	0	0
<i>GSVIVT01014360001</i>	TRX-M4	0	-2,53	0	0
<i>GSVIVT01009376001</i>	CB5-D	4,83	3,16	0	0
<i>GSVIVT01031840001</i>		0	-2,1	-3,36	-2,56
<i>GSVIVT01027750001</i>		0	-2,12	6,4	3,97
<i>GSVIVT01011605001</i>		0	2,26	0	0
<i>GSVIVT01018740001</i>	APX3	2,39	2,06	0	0
<i>GSVIVT01031901001</i>	GLB1	2,8	0	0	0
<i>GSVIVT01033855001</i>		0	3,07	0	0
<i>GSVIVT01021922001</i>	CSD1	0	0	0	4,27

Table 8 : Expression différentielle de gènes impliqués dans les réactions d'oxydo-réduction entre CS-I et CS-S, M-I et M-S, entre CS-S et M-S et entre CS-I et M-I exprimés en log2.

Ainsi, nous constatons que le gène *APX3* (Ascorbate peroxidase/*GSVIVT01018740001*) est surexprimé dans les conditions infectées quel que soit le cépage. Ce gène code une enzyme qui élimine le peroxyde d'hydrogène dans les cellules végétales afin de les protéger du stress oxydatif (Narendra et al., 2006). Cette protection a été montrée chez *A. thaliana* qui acquiert une tolérance accrue aux températures élevée lorsqu'elle surexprime le gène codant une APX d'orge (Shi et al., 2001). Le niveau accru d'APX semble donc augmenter la tolérance au stress dans les plantes.

Le gène *CSD1* (Copper/zinc superoxyde dismutase 1/*GSVIVT01021922001*) est 19 fois plus exprimé chez les CS-I que chez les M-I. La protéine CSD1 joue, elle aussi, un rôle majeur dans la défense antioxydante en catalysant la dismutation des radicaux O_2^- en O_2 et H_2O_2 qui est éliminé par des catalases, des glutathione-peroxydases et des APX. Ainsi une activité superoxyde dismutase est réduite chez les cultivars de tomates résistantes au nématode *Meloidogyne incognita* et augmentée dans les cultivars sensibles (Zacheo et al., 1993). Chez le pois, l'activité de cette enzyme est

augmentée dans les plantes sensibles JG62 infectées par le champignon *Fusarium oxysporum* F. sp. *ciceris*, contrairement aux plantes résistantes (García-Limones et al., 2002). Ainsi chez les CS-I, les ROS pourraient être convertis plus rapidement que chez les M-I du fait de la surexpression de *CDS1*. Cette diminution de ROS réprimerait le déclenchement de la HR et pourrait être impliquée dans la diffusion plus importante du pFD dans le CS-I comparé au M-I.

Ce n'est pas étonnant d'observer une modification de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif au cours de l'infection. En effet, les espèces réactives d'oxygène (ROS) produites par la plante, servent de molécules de signalisation dans la transduction du signal en réponse à un stress (Foyer and Noctor, 2005) mais, elles peuvent aussi nuire au métabolisme cellulaire en cas de surproduction générant un stress oxydatif (Apel and Hirt, 2004; Mittler, 2002). Les plantes ont donc développé des systèmes antioxydants efficaces qui peuvent protéger les plantes contre ce stress avec par exemple des molécules antioxydantes telles que l'acide ascorbique et le glutathion ou des enzymes comme l'ascorbate peroxydase (APX), la catalase, la glutathion réductase et la superoxyde dismutase (Apel and Hirt, 2004; Asada, 1992; Mittler, 2002; Noctor and Foyer, 1998).

Transduction du signal : Signalisation hormonale

De nombreuses hormones sont impliquées dans le développement et les réponses de défense chez les plantes. La transcription des gènes impliqués dans la signalisation hormonale chez le CS et le M est elle aussi affecté par la présence du pFD, en effet de nombreux gènes sont surexprimés au cours de l'infection quel que soit le cépage (Table 9).

Nom du gène	Voie hormonale	Description	Log2 (CS-I/CS-S)	Log2 (M-I/M-S)	Log2 (CS-S/M-S)	Log2 (CS-I/M-I)
<i>GSVIVT01038080001</i>	ABA	NCED3	0	3,02	0	0
<i>GSVIVT01033919001</i>		ABA2	0	3,47	0	0
<i>GSVIVT01036885001</i>		CYP707A1	2,39	0	0	0
<i>GSVIVT01037769001</i>	Auxine	TRN1	2,39	2,53	0	0
<i>GSVIVT01010025001</i>		PIN6	3,6	4,69	0	0
<i>GSVIVT01025748001</i>		PIN4	3,39	3,1	0	0
<i>GSVIVT01033285001</i>	BR	SMT1	2,48	0	-2,54	0
<i>GSVIVT01001101001</i>		CYP51	2,52	0	0	0
<i>GSVIVT01010184001</i>		DWF1	3,18	3,15	0	0
<i>GSVIVT01009287001</i>		SQE1	2,31	0	0	0
<i>GSVIVT01011586001</i>		VH1	0	2,01	0	0
<i>GSVIVT01023873001</i>		EXL5	3,35	2,42	0	0
<i>GSVIVT01016402001</i>	cytokinines	UGT85A1	0	0	2,12	2,64
<i>GSVIVT01020354001</i>	ET		0	0	2,69	2,27
<i>GSVIVT01027761001</i>			0	0	0	2,81
<i>GSVIVT01017572001</i>			3,89	2,8	0	0
<i>GSVIVT01013934001</i>			0	0	0	3
<i>GSVIVT01027723001</i>		ETR2	0	2,39	0	0
<i>GSVIVT01024904001</i>		EIN4	0	2,55	0	0
<i>GSVIVT01032029001</i>		JA	LOX2	4,28	4,53	4,96
<i>GSVIVT01018910001</i>	SA		0	2,42	0	0
<i>GSVIVT01018917001</i>			0	0	3,57	2,19
<i>GSVIVT01018904001</i>		BSMT1	0	4,49	0	0
<i>GSVIVT01011641001</i>			0	0	-3,04	-3,59

Table 9 : Expression différentielle de gènes impliqués dans la biosynthèse ou la signalisation hormonale entre CS-I et CS-S, M-I et M-S, entre CS-S et M-S et entre CS-I et M-I exprimés en log2. ABA : acide abscissique, BR : Brassinostéroïdes, ET : Ethylène, JA : acide jamonique et SA : acide salicylique

Globalement, les voies de signalisation hormonale sont surexprimées chez les plantes infectées. En effet, les gènes impliqués dans les voies de l’auxine et des brassinostéroïdes (BR) sont surexprimés de plus de 5 fois chez les CS-I et les M-I sans que ne soient observées de différences statistiquement significatives entre ces deux cépages en condition infectée.

En présence du pFD, les plantes ne modifient pas l’expression d’un gène impliqué dans la voie de signalisation des cytokinines, mais une différence d’expression entre CS-I et M-I, ainsi qu’entre CS-S et M-S a été observée. En effet, le gène *UGT85A1* (UDP-glycosyltransferase/*GSVIVT01016402001*) est 6,2 fois plus exprimé chez le CS comparé au M qu’ils soient sains ou infectés. Ainsi la voie des cytokinines semble avoir un niveau basal d’expression plus élevé chez le CS que chez le M. Les cytokinines sont impliquées dans la biosynthèse d’éthylène ainsi

une surexpression des gènes impliqués dans cette voie est attendue chez le CS-I par rapport au M-I (El-Showk et al., 2013b).

Chez les plantes infectées, l'expression de 2 gènes (*NCED3* (Nine-Cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase 3) et *ABA2* (ABA deficient 2)) impliqués dans la biosynthèse de l'ABA est augmentée chez le M, alors que c'est l'expression du gène *CYP707A1* (Cytochrome P450, Family 707, Subfamily A, Polypeptide 1) impliqué dans la dégradation de l'ABA qui est surexprimé chez le CS. Aucune différence significative n'est observée entre les deux cépages, mais quand les seuils sont un peu abaissés ($p\text{-value} < 0,05$ et $\log_2 \text{fold change} < -1,4$ ou $> 1,4$), le gène *NCED3* est 2,7 fois plus exprimé dans le M-I que le CS-I, et le gène *CYP707A1*, 2,7 fois moins. En présence du pFD, la biosynthèse d'ABA semble donc stimulée chez les M et réprimée chez les CS. L'ABA agit de façon antagoniste avec l'ET et le JA. En effet, une application exogène d'ABA sur *A. thaliana* conduit à une répression de l'expression de gènes de défense ET et JA-dépendants, et inversement chez des mutants carencés en ABA dus à des mutations dans les gènes *ABA1* et *ABA2*, les gènes dépendants des voies ET et JA sont surexprimés (Anderson et al., 2004). Ainsi, il est attendu une plus faible expression des gènes impliqués dans les voies hormonale de l'ET et du JA chez le M-I comparé au CS-I.

Le gène *GSVIVT01032029001/LOX2* (lipoxygénase) impliqué dans la biosynthèse du JA est 41 fois plus exprimé dans le CS-I que le M-I. Une surexpression de *LOX2* de 23 et 19 fois est également observée chez le M-I comparé au M-S et chez le CS-I comparé au CS-S respectivement. Une observation similaire a été décrite chez le cépage Chardonnay infecté par le pBN, '*Ca. P. solani*' où *LOX* était 11 fois plus exprimé dans les plantes infectées au cours de la première année d'expérimentation (Hren et al., 2009a). Il avait été proposé que ce gène soit impliqué dans la résistance aux ravageurs ou à des réponses de défense suite à une blessure. Ces hypothèses ne peuvent être validés dans notre étude car les témoins sains ont été mis en contact avec des insectes sains et ont été cultivés dans les mêmes conditions que les plantes infectées. La surexpression de la voie du JA chez le CS-I par rapport au M-I est en accord avec les résultats d'expression des gènes de la voie de l'ABA cités précédemment. Chez le chou chinois, l'infection par *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* active la résistance systémique acquise (SAR) chez les lignées résistantes et la voie de l'éthylène chez les lignées sensibles (Miyaji et al., 2017).

Deux gènes impliqués dans la voie de l'ET sont surexprimés chez le CS-I comparé au M-I. Ces voies de signalisation JA et ET sont connues pour avoir une action synergique et sont toutes deux davantage exprimées chez le CS-I que chez le M-I. L'augmentation de l'expression des voies du JA et de l'ET sont en accord avec les résultats d'expression des voies des cytokinines et de l'ABA.

Certaines méthyltransférases impliquées dans la voie du SA ont une expression modifiée en présence du pFD. Par exemple, le gène *GSVIVT01018904001/BSMT1* (SA méthyltransférase) impliqué dans la SAR en permettant la conversion du SA en MeSA est surexprimé chez le M-I comparé au M-S. Aucune modification de l'expression de ce gène n'est observée ni entre CS-S et CS-I, ni entre le CS et le M qu'ils soient infectés ou sains. L'expression des gènes intervenant dans la voie hormonale du SA ne semble pas présenter de différences majeures entre ces 2 cépages. Par contre, il est observé une nette surexpression de 2 gènes chez le M-I par rapport au M-S.

Ainsi, les différentes voies hormonales sont affectées par la présence du pFD. Les gènes impliqués dans les voies de biosynthèse du JA et de l'ET sont plus exprimés chez le CS et ceux de la voie de l'ABA chez le M, montrant une différence dans les réponses de défense médiée par les hormones entre ces deux cépages de sensibilité différente.

Transduction du signal : les facteurs de transcription

L'infection par le pFD a également des effets sur l'expression des gènes codant les facteurs de transcription (Table 10).

Nom du gène	Catégorie	Description	Log2 (CS-I/CS-S)	Log2 (M-I/M-S)	Log2 (CS-S/M-S)	Log2 (CS-I/M-I)
<i>GSVIVT01027182001</i>	MYB	MYB111	5,12	3,55	0	0
<i>GSVIVT01034943001</i>		MYB108	0	3,71	0	0
<i>GSVIVT01029941001</i>		MYB105	2,02	0	-2,01	0
<i>GSVIVT01024385001</i>		MYB93	0	0	-8,27	-6,85
<i>GSVIVT01037667001</i>		MYB101	0	0	-2,53	-2,43
<i>GSVIVT01034166001</i>		MYB91	0	2,1	0	0
<i>GSVIVT01031982001</i>		RL6	-4,15	-4,33	0	0
<i>GSVIVT01008553001</i>	WRKY	WRKY75	0	3,66	0	0
<i>GSVIVT01032661001</i>		WRKY70	0	2,36	2,28	0
<i>GSVIVT01037686001</i>		WRKY42	0	-2,07	0	2,19
<i>GSVIVT01029688001</i>		WRKY9	0	0	0	-4,53
<i>GSVIVT01007549001</i>	ARR	ARR11	0	0	4,27	3,42

Table 10 : Expression différentielle de gènes codant des facteurs de transcription entre CS-I et CS-S, M-I et M-S, entre CS-S et M-S et entre CS-I et M-I exprimés en log2.

En présence du pFD, les gènes codant les facteurs de transcription sont globalement surexprimés sauf *RL6* (Rad Like 6/*GSVIVT01031982001*) et *WRKY42* (*GSVIVT01037686001*).

Quatre gènes MYB sont surexprimés soit chez le M-I comparé au M-S (*GSVIVT01034943001/MYB108* et *GSVIVT01034166001/MYB91*), soit chez le CS-I comparé au CS-S (*GSVIVT01029941001/MYB105*) soit chez le CS-I et le M-I comparé au CS-S et au M-S respectivement (*GSVIVT01027182001/MYB111*) sans présenter de différences statistiquement significatives entre le CS-I et le M-I. Deux gènes *GSVIVT01024385001/MYB93* et *GSVIVT01037667001/MYB101* sont moins exprimés dans le CS-I que dans le M-I de 115 et 5 fois respectivement. Ces différences étaient déjà observées en l'absence de maladie (de 308 et 5,8 fois respectivement). Une répression de gènes *MYB* a déjà été observée lors de l'infection du Chardonnay par le pBN et il a été proposé que cette répression soit associée à un blocage de la biosynthèse de lignine (Hren et al., 2009a). La lignification est un processus utilisé par les cellules afin de permettre un renforcement de la paroi, un des mécanismes de défense. Il semble que la lignification chez le M soit plus importante que chez le CS. La lignine peut constituer une barrière physique à la pénétration des agents pathogènes et pourraient limiter la diffusion des phytoplasmes dans la plante.

Le gène *GSVIVT01007549001/ARR11* (response regulator 11) est 10 fois plus exprimé chez le CS que le M, que ce soit en condition saine ou infectée et est impliqué dans la transduction du signal cytokine-dépendante (Mason et al., 2005). Cette surexpression est en accord avec l'expression plus importante des cytokinines chez le CS infecté comparé au M infecté (Partie Signalisation hormonale de ce chapitre).

Deux gènes codant des facteurs de transcription de type WRKY (*GSVIVT01008553001/WRKY75* et *GSVIVT01032661001/WRKY70*) sont surexprimés chez le M-I comparé au M-S. Il a été montré que l'expression de *WRKY70* est induite par le SA afin de permettre la transcription de gènes de défense médiée par le SA, ce qui est accord avec les résultats montrant une augmentation du SA chez le M-I comparé au M-S (Eulgem and Somssich, 2007). Cependant aucune différence n'est observée entre le CS et le M en condition saine ou infectée. *GSVIVT01037686001/WRKY42* est réprimé pendant l'infection du M, ce qui peut expliquer son expression plus importante chez le CS-I comparé au M-I (Table 10), puisqu'aucune différence de niveaux d'expression n'est observée par ailleurs.

Certains facteurs de transcription WRKY comme *WRKY70* sont impliqués dans la transcription de gènes SA-dépendants. Cependant, il est connu que d'autres facteurs WRKY les répriment. Il est alors difficile de généraliser et de conclure sur le rôle de ces différences d'expression observées entre ces deux cépages.

d) Métabolisme secondaire

Les gènes impliqués dans le métabolisme secondaire sont dans leur grande majorité surexprimés chez le CS et le M en condition infectée avec parfois des différences significatives entre ces 2 cépages. Ainsi les voies des phénols simples, des phénylpropanoïdes, des chalcones, des flavonols, des isoflavonols et des dihydroflavonols sont stimulées lors de l'infection (Table 11).

Nom du gène	Catégorie	Description	Log2 (CS-I/CS-S)	Log2 (M-I/M-S)	Log2 (CS-S/M-S)	Log2 (CS-I/M-I)
<i>GSVIVT01003955001</i>	Isoprénoïde	CLA1	0	0	-2,29	-2,24
<i>GSVIVT01035633001</i>		CCD1	0	0	-4,22	-4,4
<i>GSVIVT01006642001</i>		TPS03	0	3,94	-5,08	-4,31
<i>GSVIVT01036360001</i>		TPS21	0	-3,84	-4,9	-5,37
<i>GSVIVT01005217001</i>		TPS14	0	0	-2,28	-2,53
<i>GSVIVT01012346001</i>	Phénol simple	LAC14	0	6,08	0	-4,73
<i>GSVIVT01025046001</i>		LAC17	2,85	6,63	0	0
<i>GSVIVT01012752001</i>		TT10	0	0	-2,14	-4,23
<i>GSVIVT01032744001</i>		LAC12	2,97	3,5	0	0
<i>GSVIVT01018939001</i>		LAC11	0	5,06	0	0
<i>GSVIVT01034003001</i>		IRX12	2,61	6,04	0	0
<i>GSVIVT01013135001</i>	Phénylpropanoïde		3,42	2,13	0	0
<i>GSVIVT01032968001</i>	Chalcone	CHS	4,38	3,07	0	0
<i>GSVIVT01009743001</i>	Dihydroflavonol	DFR	2,74	0	0	0
<i>GSVIVT01006396001</i>		BAN	3,11	0	0	0
<i>GSVIVT01009907001</i>		F3H	3,31	0	0	0
<i>GSVIVT01033633001</i>		CYP75B1	2,85	3,42	-3,66	0
<i>GSVIVT01008907001</i>	Flavonol	FLS1	3,69	2,44	0	0
<i>GSVIVT01018335001</i>		SRG1	3,4	0	0	6,03
<i>GSVIVT01011958001</i>	Isoflavonol		6,08	3,5	0	0
<i>GSVIVT01022411001</i>			2,23	3,1	0	0

Table 11 : Expression différentielle de gènes impliqués dans le métabolisme secondaire entre CS-I et CS-S, M-I et M-S, entre CS-S et M-S et entre CS-I et M-I exprimés en log2.

Une augmentation significative du nombre de transcrits des gènes *LAC14* (laccase 14/*GSVIVT01012346001*) et *TT10* (Transparent Testa 10/*GSVIVT01012752001*) impliqués dans la synthèse de phénols simples est observée chez le M-I comparé au CS-I.

De même, les gènes impliqués dans la synthèse des isoprénoïdes sont statistiquement plus exprimés chez le M-I que chez le CS-I. Ainsi les gènes *GSVIVT01003955001/CLA1* (Cloropastos Alterados 1), *GSVIVT01005217001/TPS14* (Terpene Synthase 04), *GSVIVT01006642001/TPS03*

(Terpene Synthase 3), *GSVIVT01035633001/CCD1* (Carotenoid Cleavage Dioxygenase 1) et *GSVIVT01036360001/TPS21* (Terpene Synthase 21) sont 4.7, 5.8, 19.8, 21 et 41 fois plus exprimés chez le M-I que chez le CS-I et cette différence est retrouvée entre ces deux cépages en condition saine.

Le gène *SRG1* (Senescence-Related Gene 1/*GSVIVT01018335001*) impliqué dans le métabolisme des flavonols est surexprimé chez les CS-I comparées aux CS-S et chez le CS-I comparé au M-I. L'expression de gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des flavonoïdes (*CHS*, *F3H* et *DFR*) est augmentée chez les CS-I par le pFD comparé aux CS-S, phénomène également observé chez le Chardonnay infecté par le pBN, cépage connu pour être sensible à la FD (Hren et al., 2009a). Les flavonoïdes peuvent piéger les ROS sous l'action de laccases et de catéchol oxydases. Ainsi, une surexpression des flavonoïdes chez le CS-I comparé au M-I peut être impliquée dans une réduction des ROS chez les CS-I (Pourcel et al., 2007).

e) Paroi cellulaire

Un nombre importants (69) de gènes impliqués dans la synthèse ou la dégradation de la paroi cellulaire présentent des différences d'expression pendant l'infection du CS ou du M (Annexe 2). Parmi ces 69 gènes, 42 sont surexprimés chez le CS et le M au cours de l'infection, 11 et 14 uniquement chez le CS ou le M respectivement et 2 sont réprimés chez le M-I. Globalement, au cours de l'infection, l'expression des gènes impliqués dans la synthèse, la dégradation et la modification de la paroi cellulaire augmente chez le CS et le M.

Les gènes présentant une différence d'expression entre le CS-I et le M-I sont présentés dans la Table 12, ainsi que des gènes codant les PAL et ceux impliqués dans le métabolisme de la callose.

Nom du gène	Catégorie	Description	Log2 (CS-I/CS-S)	Log2 (M-I/M-S)	Log2 (CS-S/M-S)	Log2 (CS-I/M-I)
<i>GSVIVT01006760001</i>	Synthèse cellulose	CSLE1	0	0	-2,95	-2,51
<i>GSVIVT01029162001</i>	Dégradation	XTH24	3,66	0	0	2,33
<i>GSVIVT01033359001</i>		ADPG1	0	0	0	-3,2
<i>GSVIVT01029174001</i>	Modification	XTR6	4,52	3,71	0	2,81
<i>GSVIVT01017296001</i>		EXLB3	0	-2,7	0	2,13
<i>GSVIVT01024299001</i>	Biosynthèse lignine	PAL2	2,95	3,88	0	0
<i>GSVIVT01015123001</i>		PAL4	2,93	3,8	0	0
<i>GSVIVT01025214001</i>		PAL1	4,62	3,27	0	0
<i>GSVIVT01022642001</i>		PPR1	0	0	0	-2,28
<i>GSVIVT01008765001</i>		CAD9	0	0	-3,22	-2,59
<i>GSVIVT01025362001</i>	Métabolisme callose	GSL12	2,14	2,76	0	0
<i>GSVIVT01000622001</i>		GSL04	3,18	3,39	0	0
<i>GSVIVT01020854001</i>		GSL07	0	2,48	0	0

Table 12 : Expression différentielle de certains gènes impliqués dans la biosynthèse, la dégradation et les modifications de la paroi cellulaire entre CS-I et CS-S, M-I et M-S, entre CS-S et M-S et entre CS-I et M-I exprimés en log2.

Seuls 7 gènes présentent une différence d'expression statistiquement significative entre le CS et le M infecté. Les gènes *CSLE1* (Cellulose synthase like E1/*GSVIVT01006760001*) et *ADPG1* (Arabidopsis Dehiscence Zone Polygalacturonase 1/*GSVIVT01033359001*) sont 5,7 et 9,2 fois plus exprimé chez le M-I que le CS-I respectivement. Ces gènes sont impliqués dans la synthèse de cellulose et la dégradation de pectines respectivement.

Inversement, les gènes *XTR24* (xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase 24/*GSVIVT01029162001*), *XTR6* (Xyloglucan endotransglycosylase 6/*GSVIVT01029174001*) et *EXLB3* (Expansin-Like B3 precursor/*GSVIVT01017296001*) sont surexprimés chez le CS-I comparé au M-I. Le gène *XTR24* est impliqué dans la dégradation de différents composés de la paroi cellulaire et les 2 autres gènes dans la modification de la paroi cellulaire.

Le gène *CAD9* (Cinnamyl Alcohol Dehydrogenase 9/*GSVIVT01008765001*) impliqué dans la synthèse de lignine est 6 fois plus exprimé chez le M que le CS en condition infectée et 9 fois plus en condition saine sans que son expression ne soit modifiée pendant l'infection des cépages. Enfin, le gène *PPR1* (Pinoresinol Reductase/*GSVIVT01022642001*) également impliqué dans la biosynthèse de la lignine est 4,8 fois plus exprimé chez le M-I que chez le CS-I. Cette différence d'expression de *PPR1* et *CAD9* est en accord avec une expression plus importante des gènes *MYB* chez le M-I que chez le

CS-I. En effet, une répression des gènes *MYB* observés chez le Chardonnay infecté par le pBN semble être associée à une diminution de la lignification.

Ainsi, la présence du pFD dans les plantes provoque des modifications dans l'expression des gènes du métabolisme secondaire comme la biosynthèse des phénylpropanoïdes ou des flavonoïdes rapportés comme étant impliqués dans la défense des plantes avec la synthèse de phytoalexines et le renforcement des parois végétales. Quelques gènes (*LAC14*, *TT10*, *PRR1*, *CAD9* et *CSLE1*) impliqués dans la synthèse de lignine et de cellulose, composants de la paroi cellulaire, sont plus exprimés chez le M-I que le CS-I suggérant une réaction de renforcement de la paroi cellulaire plus importante chez le M.

f) Protéines PR

Les pathogenesis related protein ou protéines PR, sont des protéines exprimées lors d'une réaction de défense contre un pathogène. Il n'est donc pas étonnant que durant l'infection par le pFD, la transcription de 19 gènes codant des protéines PR soit augmentée : 9 sont communs au CS et au M, 2 sont spécifiques au CS et 8 au M (Table 13).

Nom du gène	Description	Log2 (CS-I/CS-S)	Log2 (M-I/M-S)	Log2 (CS-S/M-S)	Log2 (CS-I/M-I)
GSVIVT01001785001		0	0	5,93	5,52
GSVIVT01004064001		0	2,33	-2,59	-2,35
GSVIVT01004101001		0	0	2,95	0
GSVIVT01007191001	PR3	3,96	2,28	2,3	1,27
GSVIVT01010805001		0	2,12	0	0
GSVIVT01010827001		0	2,14	0	0
GSVIVT01012761001		0	0	-4,63	-4,25
GSVIVT01019897001	PR7	2,48	2,47	0	0
GSVIVT01015707001		0	2,27	0	-6,89
GSVIVT01017267001		0	0	-4,69	-6,28
GSVIVT01019193001		0	0	0	2,64
GSVIVT01019450001		0	0	4,76	3,09
GSVIVT01019849001	PR5	3,71	2,78	0	0
GSVIVT01019848001	OSM34	0	4,25	0	0
GSVIVT01021916001		0	0	2,05	0
GSVIVT01021958001		2,24	0	2,08	0
GSVIVT01022979001		0	0	-7,81	-7,09
GSVIVT01025397001		0	2,36	0	0
GSVIVT01025485001	RLP46	0	0	0	2,01
GSVIVT01028752001	PR8	3,17	3,88	0	0
GSVIVT01028928001		0	0	3,26	0
GSVIVT01033538001	PR2	2,47	3,34	2,41	0
GSVIVT01034362001		2,23	2,45	0	0
GSVIVT01036279001	PR4	2,47	2,48	0	0
GSVIVT01037005001	PR1	0	3,92	4,84	2,38
GSVIVT01037015001	PRB1	0	0	4,015	3,89
GSVIVT01037180001		2,82	0	-4,56	-5,43
GSVIVT01037221001		2,31	2,15	0	0
GSVIVT01037222001		0	2,76	3,09	0
GSVIVT01037226001		0	2,78	3,29	3,64
GSVIVT01035013001	BG3/GLU	3,08	4,98	0	0

Table 13 : Expression différentielle de gènes codant des protéines PR entre CS-I et CS-S, M-I et M-S, entre CS-S et M-S et entre CS-I et M-I exprimés en log2.

Parmi les gènes surexprimés pendant l'infection du CS et du M se trouvent des *PR-2*, *PR-3*, *PR-4*, *PR-5*, *PR-7* et *PR-8*, et parmi ceux qui le sont uniquement chez le M, il y a un *PR-1*. La surexpression des gènes codant les PR-5 et les chitinases (*PR-3*, *PR-4* et *PR-8*) a aussi été observée lors de l'infection du Chardonnay par le pBN (Hren et al., 2009a). Ces PR permettent la dégradation des parois des champignons et des bactéries et de lutter contre les agents pathogènes.

Le nombre de transcrits de 6 et 8 gènes est augmenté chez le M-I par rapport au CS-I et le CS-I par rapport au M-I respectivement. Ainsi, les gènes *PR-3*, *RLP46*, *PR-1* et *PRB1* sont exprimés de façon plus importante dans le CS-I que dans le M-I. La surexpression du gène codant PR-1 est en

accord avec la surexpression de gènes impliqués dans la voie des cytokinines. En effet, le facteur de transcription ARR2, activé par les cytokinines peut se lier au facteur de transcription TGA3 pour activer l'expression du gène *PR1* (Choi et al., 2010).

g) Protéolyse médiée par l'ubiquitine

En dégradant les protéines du pathogène, l'ubiquitination est proposé pour avoir un rôle important dans les réponses de défense des plantes. Généralement, une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la dégradation des protéines médiées par ubiquitination est observée chez les plantes infectées. C'est effectivement ce qui est observé, surtout chez le M-I puisque 9 gènes sur 13 sont surexprimés par rapport au M-S (Table 14).

Nom du gène	Description	Log2 (CS-I/CS-S)	Log2 (M-I/M-S)	Log2 (CS-S/M-S)	Log2 (CS-I/M-I)
<i>GSVIVT01026904001</i>	SKIP4	0	0	5,9	Inf
<i>GSVIVT01000724001</i>	FBL17	0	2,86	0	0
<i>GSVIVT01022447001</i>		2,13	0	0	0
<i>GSVIVT01006146001</i>	FBW2	0	0	-4,33	-4,77
<i>GSVIVT01022967001</i>		0	2,93	0	0
<i>GSVIVT01025740001</i>		0	2,6	0	0
<i>GSVIVT01014576001</i>		0	3,66	0	0
<i>GSVIVT01007793001</i>		2,96	2,1	0	0
<i>GSVIVT01030205001</i>		0	2,34	0	0
<i>GSVIVT01011767001</i>		2	0	0	0
<i>GSVIVT01030125001</i>	XERICO	3	2,92	0	0
<i>GSVIVT01027769001</i>		0	2,97	0	0
<i>GSVIVT01031547001</i>	UBC19	3,24	3,83	0	0

Table 14 : Expression différentielle de gènes impliqués dans la dégradation médiée par l'ubiquitine entre CS-I et CS-S, M-I et M-S, entre CS-S et M-S et entre CS-I et M-I exprimés en log2. (Inf : non exprimé dans le M-I)

En comparant les deux cépages en condition infectée (CS-I par rapport au M-I) ou saine (CS-S comparé au M-S), seuls deux gènes, *GSVIVT01026904001/SKIP4* (SKP1 Interacting Partner 4) et *GSVIVT0100614600/FBW2* (F-BOX With WD-40 2) présentent une surexpression statistiquement significative chez le CS et le M respectivement. Par exemple, le gène *SKIP4* est surexprimé chez le CS-I par rapport au M-I, dans lequel il n'est pas exprimé. Ces 2 gènes codent pour des ubiquitines ligases E3 impliquées dans la reconnaissance du substrat à dégrader.

h) Métabolisme primaire

Métabolisme primaire : photosynthèse et chaîne respiratoire

Globalement, les gènes impliqués dans la photosynthèse sont réprimés chez le CS et le M au cours de l'infection (Table 15).

Nom du gène	Catégorie	Description	Log2 (CS-I/CS-S)	Log2 (M-I/M-S)	Log2 (CS-S/M-S)	Log2 (CS-I/M-I)
<i>GSVIVT01006210001</i>	Photosynthèse		0	0	0	2,43
<i>GSVIVT01014439001</i>		LHCB3	0	-2,16	-3,57	0
<i>GSVIVT01014837001</i>			-2,04	-2	0	0
<i>GSVIVT01022114001</i>			2,45	0	0	0
<i>GSVIVT01001128001</i>		GAPA	0	-2,25	0	0
<i>GSVIVT01019893001</i>			0	0	0	2
<i>GSVIVT01011707001</i>		CRR23	0	-2,09	0	0
<i>GSVIVT01020484001</i>		PSBR	0	-2,19	0	0
<i>GSVIVT01018929001</i>		Chaîne respiratoire	γ CA2	0	0	5,99
<i>GSVIVT01037963001</i>	ATP synthase		0	-2,25	0	0

Table 15 : Expression différentielle de gènes impliqués dans la photosynthèse et la chaîne respiratoire entre CS-I et CS-S, M-I et M-S, entre CS-S et M-S et entre CS-I et M-I exprimés en log2.

Seuls les gènes impliqués dans la photosynthèse *GSVIVT01006210001* et *GSVIVT01019893001* codant une protéine de la sous-unité β de l'ATP synthase et une hydroxypyruvate reductase respectivement, sont surexprimés chez le CS-I comparé au M-I. La diminution de la photosynthèse semble plus importante chez le M-I que chez le CS-I. Ainsi, comme lors de l'infection par le pBN, le pFD provoque globalement une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la photosynthèse chez le Barbera et le Nebbiolo (Hren et al., 2009a; Margaria and Palmano, 2011; Margaria et al., 2014). Cette diminution de la photosynthèse qui est plus importante chez les M-I comparé aux CS-I provoque une sénescence rapide des feuilles et les symptômes de jaunissement ou de rougissement des feuilles. La diminution de la photosynthèse est également plus forte et plus rapide chez les *A. thaliana* infectées par une souche avirulente de *P. syringae* comparée à une souche virulente (Bonfig et al., 2006). L'importante répression de la photosynthèse chez le M-I pourrait permettre une initiation de la HR (Scharte et al., 2005).

Le gène γ CA2 (*GSVIVT01018929001*/Gamma Carbonic Anhydrase 2) impliqué dans le complexe I de la chaîne respiratoire, est surexprimé chez le CS-I par rapport au M-I. Chez les *A. thaliana* surexprimant γ CA2, la production de ROS est réduite et cela pourrait intervenir dans l'inhibition de la polymérisation de la lignine dépendante de H₂O₂ (Villarreal et al., 2009). Ainsi chez les M-I, l'accumulation de ROS semble être augmentée par rapport au CS-I.

La plus forte répression de la photosynthèse et du gène γ CA2 chez le M-I comparé au CS-I pourraient permettre une accumulation des ROS et une augmentation de la HR pouvant être impliqué dans la différence de diffusion du pFD entre ces 2 cépages.

Métabolisme primaire : métabolisme des acides aminés

Les gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés sont globalement surexprimés au moment de l'infection par le pFD, surtout chez le M (Table 16). Cette observation a également été faite lors de l'infection du Chardonnay et du Manzoni par le pBN (Albertazzi et al., 2009).

Nom du gène	Catégorie	Description	Log2 (CS-I/CS-S)	Log2 (M-I/M-S)	Log2 (CS-S/M-S)	Log2 (CS-I/M-I)
<i>GSVIVT01015502001</i>	Synthèse		3,69	2,62	0	0
<i>GSVIVT01033651001</i>		MAT3	2,46	3,87	0	0
<i>GSVIVT01009070001</i>			0	2,29	0	0
<i>GSVIVT01021978001</i>		MEE32	0	4,07	0	0
<i>GSVIVT01029761001</i>		ALD1	0	5,48	2,76	-2,11
<i>GSVIVT01032043001</i>			0	2,44	0	0
<i>GSVIVT01026470001</i>	Dégradation		2,23	0	0	0
<i>GSVIVT01030227001</i>		PYD4	0	2,46	0	-2,43
<i>GSVIVT01003346001</i>			0	0	-2,57	-3,61

Table 16 : Expression différentielle de gènes impliqués dans le métabolisme des acides aminés entre CS-I et CS-S, M-I et M-S, entre CS-S et M-S et entre CS-I et M-I exprimés en log2.

Trois gènes sont surexprimés chez le M-I comparé au CS-I, deux impliqués dans la dégradation des acides aminés et un impliqué dans leur biosynthèse. Le niveau d'expression d'*ALD1* (AGD2-Like Defense response protein 1/*GSVIVT01029761001*) est augmenté de 4 fois chez le M-I par rapport au CS-I. De plus, ce gène est 44 fois plus exprimé chez le M-I par rapport au M-S. Il est à noter que des plantes d'*A. thaliana* pour lesquelles le gène *ALD1* a été muté sont plus sensibles à l'infection par *P. syringae* et ont une accumulation réduite de SA (Song et al., 2004). D'ailleurs, parallèlement à la surexpression d'*ALD1*, les M-I présentent également une répression des gènes de la voie du JA, qui est connu pour être antagoniste de celle du SA.

Métabolisme primaire : métabolisme des carboxyhydrates et glycolyse

Globalement, les gènes impliqués dans le métabolisme des carboxyhydrates sont surexprimés lors de l'infection (Table 17). Bien que la glycolyse soit peu impactée en nombre de gènes dérégulés, un gène impliqué dans cette voie, *LOS2*, est surexprimé chez le CS-I et le M-I par rapport au CS-S et M-S respectivement.

Nom du gène	Rôle	Description	Log2 (CS-I/CS-S)	Log2 (M-I/M-S)	Log2 (CS-S/M-S)	Log2 (CS-I/M-I)
<i>GSVIVT01026525001</i>	Synthèse amidon	GUX1	0	2,42	0	0
<i>GSVIVT01023805001</i>		APL3	5,27	4,12	0	0
<i>GSVIVT01028270001</i>		APL2	0	2,23	0	0
<i>GSVIVT01008673001</i>		SBE2.2	2,04	0	0	0
<i>GSVIVT01024105001</i>	Dégradation saccharose		2,11	0	0	0
<i>GSVIVT01035389001</i>		BFRUCT1	0	0	0	4,32
<i>GSVIVT01001272001</i>		BFRUCT4	3,74	3,43	0	0
<i>GSVIVT01018625001</i>			0	4,07	0	0
<i>GSVIVT01029388001</i>		SUS6	2,31	2,34	0	0
<i>GSVIVT01015018001</i>		SUS4	2,76	2,76	0	0
<i>GSVIVT01008714001</i>	Dégradation amidon	AMY2	2,04	0	0	0
<i>GSVIVT01011504001</i>			2,47	0	0	0
<i>GSVIVT01012209001</i>		APE2	0	-2,05	-2,08	0
<i>GSVIVT01017634001</i>	Synthèse galactinol	GoIS2	2,38	4,37	0	-5,81
<i>GSVIVT01007681001</i>	Synthèse raffinose	SIP1	2,8	2,78	0	0
<i>GSVIVT01015589001</i>		DIN10	0	2,64	0	0
<i>GSVIVT01021313001</i>	Métabolisme tréhalose	TPS1	2,68	2,16	0	0
<i>GSVIVT01018517001</i>	Glycolyse	LOS2	2,34	2,57	0	0
<i>GSVIVT01026561001</i>		UGP	0	0	0	2,41

Table 17 : Expression différentielle de gènes impliqués dans le métabolisme des carboxyhydrates et la glycolyse entre CS-I et CS-S, M-I et M-S, entre CS-S et M-S et entre CS-I et M-I exprimés en log2.

Le gène *GoIS2* (galactinol synthase/*GSVIVT01017634001*) impliqué dans la synthèse du raffinose est surexprimé chez le M-I comparé au CS-I. Inversement, le gène *BFRUCT1* (β -fructofuranosidase/*GSVIVT01035389001*) impliqué dans la dégradation du saccharose est surexprimé chez le CS-I comparé au M-I. Une plus grande synthèse et accumulation de sucre chez le M-I entraînerait une inhibition de la photosynthèse plus importante chez le M-I que chez le CS-I, ce qui est en accord avec une répression plus importante des gènes impliqués la photosynthèse chez le M-I comparé au CS-I.

La surexpression de ces gènes a également été observée lors de l'infection du Chardonnay par le pBN ou de pervenches de Madagascar par différents phytoplasmes tels que '*Ca. P. mali*' ou '*Ca. P. fraxini*' (Hren et al., 2009a; Lepka et al., 1999; Tan and Whitlow, 2001). L'inhibition de la

photosynthèse observée lors de l'infection par le pFD entrainerait une chlorose, symptômes effectivement présents chez les vignes atteinte de FD (Christensen et al., 2005).

C) Validation de l'expression différentielle de certains gènes par RT-qPCR

Afin de valider les données RNA-Seq, 21 gènes impliqués dans la synthèse des protéines PR, de métabolites secondaires, dans le renforcement des parois, dans la signalisation hormonale ou codant des facteurs de transcription ont été analysés en RT-PCR en temps réel (Dufour et al., 2016). Les profils d'expression de ces gènes confirment ceux détectés par l'analyse RNA-Seq (Table 18).

		Log2 (CS-I/CS-S)		Log2 (M-I/M-S)		Log2 (CS-S/M-S)		Log2 (CS-I/M-I)	
		RT-PCR	RNA-Seq	RT-PCR	RNA-Seq	RT-PCR	RNA-Seq	RT-PCR	RNA-Seq
Protéines PR	PR1	4,48	1,45	4,38	3,92	1,21	4,84	1,31	2,38
	GLU	5,85	3,08	7,70	4,98	0,00	0,00	0,00	0,00
	PR2	3,88	2,47	5,59	3,34	2,73	2,41	1,09	1,55
	PR4	4,90	2,47	4,50	2,48	0,00	0,00	0,00	0,00
	PR5	1,17	1,03	3,90	4,25	1,54	1,55	-1,20	-1,68
	PR7	2,92	2,48	2,47	2,47	0,00	0,00	0,00	0,00
	CHIT3	6,24	3,18	6,88	3,95	0,43	1,09	0,00	0,00
	PR8	3,22	3,17	2,14	3,88	0,00	0,00	0,00	0,00
Métabolisme secondaire	CHS	7,07	3,07	5,51	4,38	0,00	0,00	0,00	0,00
	DFR	3,46	2,74	2,93	1,95	0,00	0,00	0,00	0,00
	LDOX	10,86	5,10	7,49	3,26	0,00	0,00	0,00	0,00
	HMGR	5,73	1,86	3,91	1,77	0,00	0,00	0,00	0,00
	F3H	4,96	3,31	5,63	1,89	0,00	0,00	0,00	0,00
Signalisation hormonale	LOX2	3,91	4,28	3,09	4,53	1,07	4,96	1,82	5,37
	SAMT1	4,48	1,40	7,24	2,21	0,00	0,00	-5,21	-1,45
Paroi cellulaire	PAL2	3,45	2,95	3,26	3,88	0,00	0,00	0,00	0,00
	CALS	3,64	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	-2,66	0,00
	CALS2	3,02	2,14	1,61	2,76	0,00	0,00	0,00	0,00
	CALS3	2,31	0,00	2,85	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Facteur de transcription	WRKY1	5,33	1,95	5,00	3,66	0,00	0,00	-1,14	-1,54
	WRKY2	2,78	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,99	0,00

Table 18 : Expression différentielle des gènes par RT-PCR en temps réel et RNA-Seq entre CS-I et CS-S, entre M-I et M-S, entre CS-S et M-S et entre CS-I et M-I exprimé en Log2. En rouge et rose : gènes surexprimés, en bleu clair ou foncé : gènes réprimés et en blanc : pas de différences statistiquement significatives

Globalement, tous les gènes différentiellement exprimés en RNA-Seq montrent un profil d'expression similaire, sauf pour 7%. En effet, seuls 6 comparaisons sur 84 ont montré une différence entre ces 2 techniques.

Les gènes codant des protéines PR ou des facteurs de transcription WRKY, ou impliqués dans le métabolisme secondaire sont surexprimés chez le CS-I et le M-I comparés à CS-S et M-S. Les PR-1 et PR-2 sont davantage exprimés chez le CS-I par rapport au M-I. En effet, le gène codant PR-5 est 2,3 fois plus exprimé par RT-PCR et 3,2 fois plus en RNA-Seq chez le M-I que chez le CS-I. De même, le gène *WRKY1* est surexprimé chez le M-I comparé au CS-I de 2,2 fois en RT-PCR et 2,9 fois en RNA-Seq.

Les gènes codant les protéines impliquées dans la synthèse de callose sont surexprimés pendant l'infection et l'un d'eux (*CALS*) est plus exprimé chez le M-I que chez le CS-I de 6,3 fois (soit 3,64 en log2), alors que cette différence n'est pas observée en RNA-Seq. L'observation microscopique d'un dépôt de callose en microscopie permettrait de confirmer ou non cette différence entre ces 2 cépages.

Les voies de biosynthèse de l'ET et du SA sont stimulées lors de l'infection, à la fois chez le M et chez le CS. Cependant des différences d'expression entre le CS-I et le M-I sont observées. En effet, le gène *SAMT1* impliqué dans la voie de signalisation de SA est réprimé chez le CS-I par rapport au M-I de 37 fois en RT-PCR et de 2,7 fois en RNA-Seq. Inversement, le gène *LOX2* est surexprimé chez le CS-I par rapport au M-I de 3,5 fois en RT-PCR et de 41 fois en RNA-Seq.

Malgré des différences dans le niveau d'expression, les gènes validés en RT-PCR confirment les tendances observées en RNA-Seq.

III) Conclusion

Les analyses préliminaires des résultats de transcriptomique ont permis, entre autre, d'observer chez le M-I comparé au CS-I (Fig. 57):

- L'augmentation du métabolisme des acides aminés qui stimule la voie du SA (Song et al., 2004).
- La voie du SA est connue pour augmenter la production de certaines protéines PR et des ROS (Henanff et al., 2011).
- La répression du gène *LIK1* codant un récepteur, qui régule positivement les voies de signalisation du JA et de l'ET et qui réprime la production de ROS (Le et al., 2014).
- La surexpression du gène *NCED3* impliqué dans la biosynthèse de l'ABA et la répression du gène *CYP707A1* jouant un rôle dans la dégradation de l'ABA, engendrant une augmentation de la voie de l'ABA connue pour agir de façon antagoniste avec l'ET et le JA (Anderson et al., 2004; Hou et al., 2010).
- La répression du gène *UGT85A1* impliqué dans la voie des cytokinines, diminuant la biosynthèse d'ET (El-Showk et al., 2013b).
- La répression des voies du JA et de l'ET avec par exemple la répression du gène *LOX2*.
- La répression du gène *CSD1* impliqué dans l'élimination des radicaux libres qui favorisent la mise en place de la HR.
- La répression du gène γ CA2 augmentant les ROS et potentiellement la polymérisation et de la lignine H₂O₂-dépendante (Villarreal et al., 2009).
- La répression de gène impliqué dans le métabolisme des flavonoïdes, ainsi les ROS augmentent (Pourcel et al., 2007).
- La répression du gène *BON3* impliqué dans la répression de la HR (Yang et al., 2006).
- La surexpression de gènes codant les facteurs de transcription Myb101 et Myb93 potentiellement impliqués dans des réponses de défense *via* la biosynthèse de lignine (Borevitz et al., 2000; Sugimoto et al., 2000; Tamagnone et al., 1998).
- La surexpression des gènes *CAD9* et *PRR1* impliqués dans la synthèse de lignine (Boerjan et al., 2003).
- La surexpression du gène *CSLE1* impliqué dans la synthèse de cellulose.

Ainsi, chez le M-I, une accumulation des ROS plus importante que chez le CS-I permet une augmentation de la HR et permettrait une diminution de la diffusion du pFD. Les variétés résistantes du chou chinois à *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* active la résistance systémique acquise (SAR) (Miyaji et al., 2017).

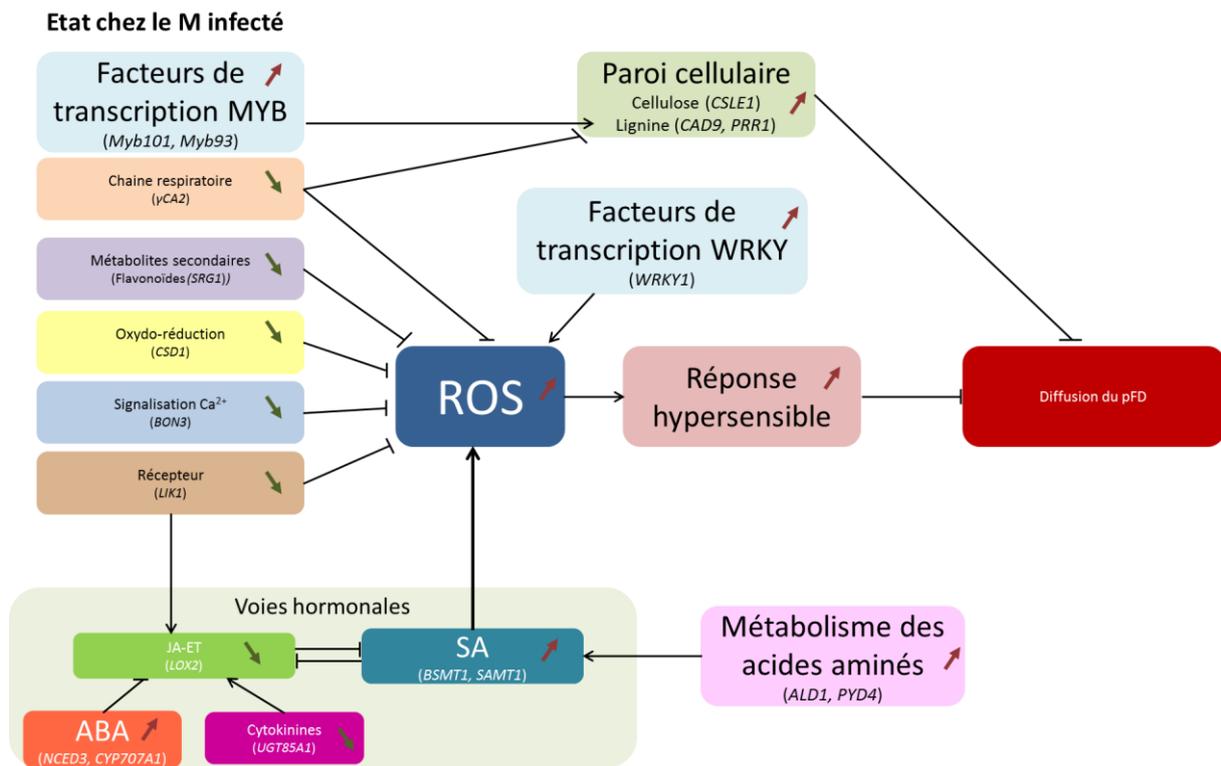


Figure 57 : Schéma des réactions différentielles observées chez le M-I comparées au CS-I suite à l'infection par le pFD. Les flèches vertes indiquent une diminution des voies et les flèches rouges une augmentation.

Chez le CS-I, il semblerait que ce soit l'inverse avec une plus faible accumulation des ROS que chez le M-I, entraînant une diminution de la HR ayant pour effet une augmentation de la diffusion du pFD (Fig. 58). Plusieurs études montrent que des variétés sensibles, par exemple celles du chou chinois à l'infection par *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans* augmente l'expression des gènes impliqués dans la voie de l'éthylène, ou du cépage très sensible au pFD, Barbera, qui accumule davantage de flavonoïdes (Margaria et al., 2014; Miyaji et al., 2017). Nos résultats de transcriptomique sont en accord avec ces études.

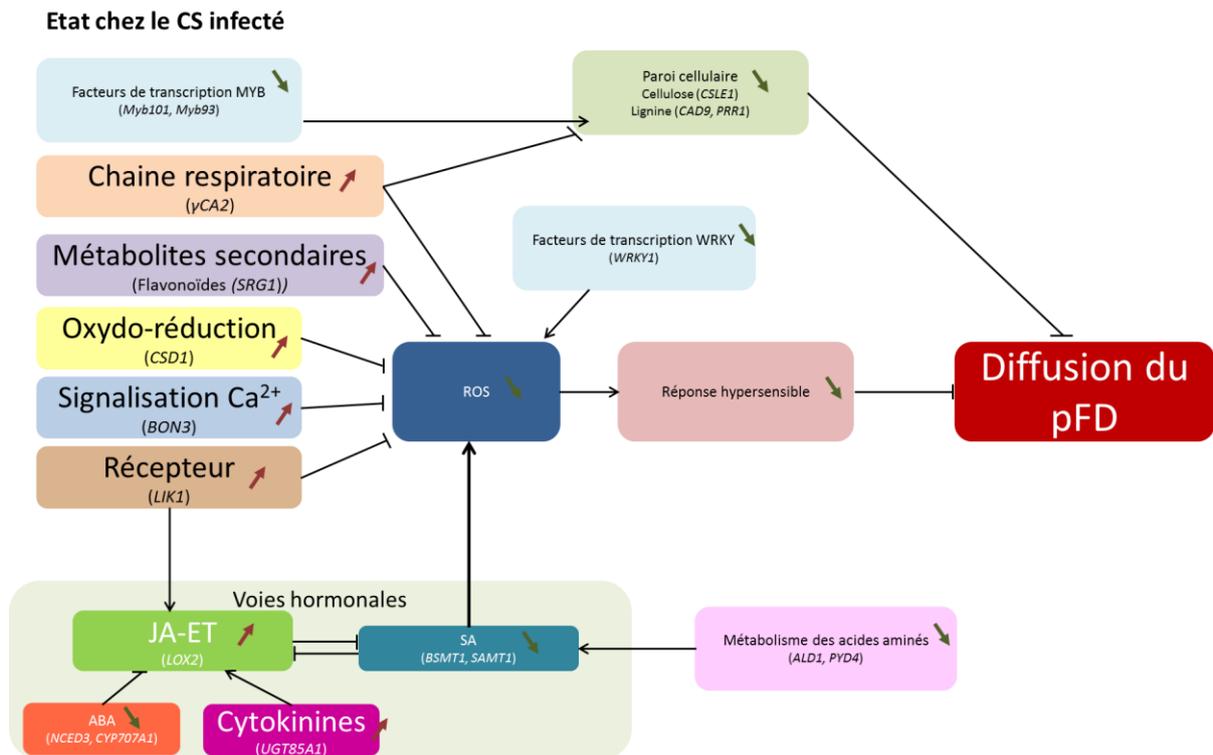


Figure 58 : Schéma des réactions différentielles observées chez le CS-I comparées au M-I suite à l'infection par le pFD. Les flèches vertes indiquent une diminution des voies et les flèches rouges une augmentation.

Ces résultats sont préliminaires et doivent être approfondis par une autre méthode comme la RT-qPCR. Cependant ils peuvent constituer une piste de recherches pour la sélection de cépages plus résistants à la FD.

Perspectives

La FD est une maladie de quarantaine infectant les vignes européennes. L'agent responsable est un phytoplasme du groupe V qui est transmis de vigne à vigne par l'insecte vecteur *S. titanus* et aucun cépage actuellement cultivé n'est totalement résistant. En France, les méthodes de lutte réglementaires se concentrent sur la plantation de pieds certifiés sains, l'éradication des plantes contaminées et des insectes vecteurs dans les zones touchées par la FD. En plus du coût économique de ces moyens de lutte, l'usage des produits phytosanitaires impacte l'environnement et la santé humaine. Cette lutte a aussi un impact social, les viticulteurs en agriculture biologique ou raisonnée sont freinés dans leur démarche, la lutte étant obligatoire.

Une meilleure compréhension des relations entre les différents acteurs du pathosystème vigne-pFD-*S. titanus* est donc essentielle pour pouvoir appliquer d'autres stratégies dans le but de lutter contre la FD.

Dans ce contexte, les principaux objectifs de ma thèse étaient (1) d'identifier et de caractériser au niveau fonctionnel des gènes codant des protéases de surface, les FtsH, potentiellement impliquées dans la virulence des phytoplasmes, (2) de caractériser la multiplication et la diffusion du pFD dans la vigne en s'affranchissant des interactions vigne-*S. titanus*, (3) d'initier la caractérisation phénotypique d'un pool de descendants issus d'un croisement entre le cépage sensible CF et le cépage peu sensible Mag et (4) d'identifier des différences de réaction entre le cépage très sensible CS et le cépage peu sensible M par comparaison des transcriptomes.

Identification et caractérisation de l'expression des FtsH du pFD

Ce travail a permis pour la 1^{ère} fois, d'identifier 8 gènes *FtsH* présents sur le génome du pFD. Deux de ces protéines sont prédites pour être dirigées vers le milieu extracellulaire. Une activité ATPasique *in vitro* a été détectée, mais aucune activité protéasique. Les 8 gènes *FtsH* s'expriment dans les différents hôtes du pathosystème naturel et expérimental. Des différences d'expression entre les plantes et les insectes ont été observées, suggérant un rôle dans l'adaptation aux hôtes, voire dans la virulence.

Différentes stratégies d'étude sont envisagées pour continuer cette caractérisation. Pour vérifier leur expression au niveau protéique, la détection des protéines FtsH pourra être effectuée en utilisant des anticorps spécifiques des FtsH du pFD dans des plantes ou des insectes infectés. D'ailleurs 2 anticorps ont été obtenus et pourront être utilisés dans des expériences de western-blot ou dans des observations au confocal. La protéine VmpA du pFD a pu être observée dans les glandes salivaires d'*E. variegatus* et de *S. titanus*, confirmant ainsi son expression dans cet hôte (Nathalie Arricau-Bouvery, communication personnelle).

Pour confirmer leur fonction, une activité ATPasique et protéasique pourra être recherchée sur les autres FtsH et par d'autres méthodes. Pour cela, une expérience de complémentation est

possible. En effet, les *FtsH* de bactéries comme *L. lactis* ont été exprimés dans une souche d'*E. coli* thermosensible à 42°C. La complémentation permet de rétablir le phénotype sauvage et ainsi confirmer l'activité de la protéine. Les *FtsH* du pFD présentent des homologies entre 35,1 et 41,7% avec celle d'*E. coli*, et les différents sites actifs sont conservés. La complémentation avait été concluante avec *L. lactis* dont l'homologie avec la séquence *FtsH* d'*E. coli* est de 44%, ce qui indique la faisabilité de cette expérimentation pour les *FtsH* du pFD (Nilsson et al., 1994). De même, un remplacement du gène *FtsH* de *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* par une des copies du pFD en utilisant les technologies CRISPR-Cas9 et de biologie de synthèse appliquées aux mycoplasmes pourrait être envisagée afin de valider leur fonction dans un organisme phylogénétiquement plus proche (Lartigue et al., 2007, 2009; Tsarmpopoulos et al., 2016).

Pour valider les prédictions de topologie, des observations microscopiques en immunofluorescence ou en microscopie électronique sur des extraits des plantes ou de glandes salivaires d'insectes infectés pourraient être envisagées. Une autre technique peut consister à exprimer les protéines *FtsH* dans un système hétérologue. Par exemple, la protéine *VmpA* du pFD a été exprimée dans *Spiroplasma citri* et des observations en microscopie électronique ont permis de montrer sa localisation membranaire : une démarche similaire pourrait être appliquée pour les *FtsH* (Renaudin et al., 2015).

Caractérisation de la réaction des plantes au pFD

Les différences de sensibilité observées notamment chez le CS et le M lors des inoculations par l'intermédiaire de *S. titanus* pouvaient être expliquées par une réaction différente des plantes au pFD et/ou à une différence d'efficacité de transmission par l'insecte vecteur. Les inoculations réalisées en s'affranchissant des interactions plante-*S. titanus* sont en accord avec les résultats précédents et permettent de valider que les différences de sensibilité à la FD sont dues, au moins en partie, au pFD (Eveillard et al., 2016). Ces expériences n'avaient jamais été réalisées auparavant et confirment que les plantes peuvent être plus ou moins résistantes au pFD. Cela oriente les recherches sur les stratégies de lutte en recherchant des sources de résistance.

Pour étudier le caractère héréditaire de la faible sensibilité au pFD, des croisements entre la Mag et le CF ont été réalisés et 13 descendants ont été testés vis-à-vis de leur sensibilité à la FD. Un éventail de phénotypes a été observé avec des comportements proches de ceux de leurs parents, ou intermédiaires, et de façon intéressante, pour certains descendants aucune plante n'a été infectée. Ainsi, les caractères multiplication du pFD et nombre de plantes infectées ségrégent dans la descendance.

Les interactions pFD-vigne étant impliquées dans les différences de sensibilité, leur caractérisation est importante et a été initiée par des analyses transcriptomiques pour tenter de les

expliquer. Les résultats préliminaires indiquent que le M active des voies métaboliques différentes que le CS pour réagir à l'infection par le pFD. Cette première comparaison des réactions transcriptionnelles entre un cépage sensible et un cépage résistant infectés par le pFD pourra être utilisée pour améliorer la compréhension des différences de sensibilité mais aussi dans la lutte, par exemple en stimulant certaines voies de défense.

Ces différents résultats convergent vers deux hypothèses majeures : (1) le M agirait de façon à confiner le pFD au site d'injection et (2) la Mag transmettrait son caractère « faible sensibilité à la FD » à ses descendants.

Pour confirmer ces propositions et les exploiter dans le but d'améliorer la lutte contre la FD, différentes expérimentations peuvent être menées.

Par exemple, après analyse des données transcriptomiques, les dérégulations géniques doivent dans un premier temps être validées par RT-PCR. Par la suite, afin de confirmer l'implication différentielle de ces voies, l'expression des différents gènes pourrait être mesurée sur des plantes cultivées au vignoble. Enfin, il serait intéressant de confirmer l'expression des gènes en effectuant une mesure de leurs produits : protéines et métabolites. Une étude a comparé l'expression transcriptionnelle et l'accumulation des métabolites impliqués dans la voie des flavonoïdes entre le cépage très sensible Barbera et le cépage peu sensible Nebbiolo. L'accumulation d'anthocyanines est plus importante chez le Barbera que chez Nebbiolo infecté par le pFD (Margaria et al., 2014). Nos résultats indiquent une surexpression de la voie des flavonoïdes chez le CS-I comparé au M-I et sont donc en accord avec les résultats sur les cépages italiens. Des expériences similaires pour nos 2 cépages pourraient être envisagées.

Les prélèvements ayant eu lieu plusieurs semaines après la transmission, cette expérience ne permet pas d'observer les réponses précoces des plantes. Afin de visualiser l'enchaînement et la cinétique de la mise en place des défenses, des prélèvements à différents temps pourraient être proposés. En effet, l'hypothèse selon laquelle une réaction plus rapide permet de lutter plus efficacement contre les pathogènes, est souvent émise et pourrait également expliquer des différences de sensibilité (Dai, 1995; Miyaji et al., 2017).

De même, les réactions observées sont celles étant survenues au site d'infection, mais qu'en est-il des autres parties de la plante ? L'expression des gènes pourrait être mesurée dans celles-ci pour vérifier l'état transcriptionnel. En effet, certains composés comme le SA peuvent s'accumuler au site d'infection avant de se propager à distance de manière systémique pour contribuer à la mise en place de défenses plus rapides et plus intenses si un nouveau stress se manifeste.

Pour poursuivre cette idée, une stratégie de stimulation de défense des plantes en amont de l'infection pourrait être envisagée. Il a déjà été observé qu'une pulvérisation d'un dérivé de la chitine sur la vigne est accompagnée par une accumulation de phytoalexines et une augmentation de la résistance à *B. cinerea* (Aziz et al., 2006, 2007). De même, l'application de BTH ou de MeJA tend à augmenter la résistance à *B. cinerea* ou à *E. necator* respectivement (Belhadj et al., 2006; Zimmerli et al., 2001). En ce qui concerne la FD, les premiers essais du cépage très sensible Barbera traités par du BTH ont montré une plus faible proportion de plantes infectées par le pFD que chez les plantes non traitées, indiquant un effet possible de ce produit dans la prévention de la transmission du pFD par l'insecte vecteur, alors qu'aucun effet significatif n'a été constaté sur les plantes déjà infectées (Miliordos et al., 2017). Le BTH est considéré comme un analogue fonctionnel au SA, et les gènes impliqués dans cette voie sont surexprimés chez le M-I comparé au CS-I. La voie du SA pourrait peut-être être impliquée dans la plus faible sensibilité du M. Il a été choisi d'étudier la réaction des plantes au pFD, mais une caractérisation des réactions des plantes aux insectes permettraient d'obtenir des informations sur les interactions *S. titanus*-vigne pouvant aussi jouer un rôle dans la différence de sensibilité à la FD observée entre le CS et le M.

Pour confirmer l'impact de l'expression de certains gènes sur le phénotype différentiel observé entre le CS et le M, leurs expressions pourraient être mesurée chez d'autres cépages présentant des phénotypes de sensibilité identiques (Mag et M, ainsi que Sau et CS) ou intermédiaire (CF) ou chez les descendants du croisement Mag x CF. Ces dérégulations géniques pourraient être envisagées comme un outil de diagnostic de la sensibilité des cépages et une aide à la sélection.

Pour renforcer l'hypothèse du caractère héréditaire « faible sensibilité » de la Mag, un plus grand nombre de descendants, ainsi que d'autres descendants de la Mag (Malbec, Côt, Abouriou et Mourtès noir) seront testés pour leur sensibilité à la FD (Projet CoACT). D'autre part, les descendants pour lesquels aucune plante n'a été infectée doivent être phénotypés à nouveau afin de confirmer les résultats. En effet, des cépages n'étant pas infectés ou avec un titre en pFD peu élevé permettent de diminuer la probabilité d'infection des insectes vecteurs et donc de freiner l'épidémie (Bressan et al., 2005b).

En collaboration avec un groupe de travail composé de viticulteurs, de chercheurs et des organismes de défense contre les organismes nuisibles (GDON, FREDON, DRAL, structures de gestion de l'environnement des vignobles), ces expérimentations pourront permettre de sélectionner des « frères » du M encore moins sensibles que le M à la FD. Ce travail fait partie intégrante du projet CoACT financé dans le cadre du Plan National de Dépérissement de la Vigne qui a démarré en juillet 2017. A plus long terme et en accord avec le groupe de travail, les descendants les moins sensibles pourront être plantés au vignoble afin d'observer leur vigueur, la qualité des baies ou l'architecture

des plantes par exemple. Dans une réflexion sur le changement climatique, leur résistance à la sécheresse et leur précocité seront aussi observées.

A terme, ces recherches ont pour vocation, par exemple, de proposer des cépages ou des géniteurs moins sensibles à la FD.

Matériels et méthodes

I) Matériel biologique

A) Les phytoplasmes

Les isolats FD-PEY05 et FD92 du pFD ont été transmis à la fève (*Vicia faba*) par des cicadelles *S.titanus*, collectées respectivement en 2005 et en 1992 dans des vignobles du sud-ouest de la France infectés par la flavescence dorée. FD-PEY05 a été collectée à Peyrière (Lot et Garonne) et FD92 à Ognos (Landes) (Papura et al., 2009). Les génotypes de FD-PEY05 et FD92 appartiennent au groupe génétique map-FD2 (sous-groupe 16SrV-D) qui est largement distribué dans les principaux foyers d'Europe de l'Ouest (Arnaud et al., 2007; Papura et al., 2009). Les souches ont été maintenues depuis lors par transmission en série sur la fève, en utilisant *Euscelidius variegatus* comme insecte vecteur expérimental (Caudwell et al., 1972). FD92 est utilisée pour l'identification et la caractérisation des FtsH et FD-PEY05 pour la caractérisation de la sensibilité variétale.

B) L'insecte vecteur expérimental: *Euscelidius variegatus*

1) Origine et conditions d'élevage

Des *Euscelidius variegatus* ont été prélevés dans la région de Bordeaux et mis en élevage au laboratoire par Jean-Luc Danet et Xavier Foissac. Les cicadelles saines sont élevées dans des cages grillagées contenant des fèves et des avoines renouvelées régulièrement. La photopériode est de 16 h de lumière à 22°C et de 8 h d'obscurité à 18°C. Les cages d'élevage sont regroupées dans une pièce climatisée isolée des autres compartiments de la serre et de l'extérieur par un sas de sécurité. Des pièges jaunes englués sur lesquels se fixent les insectes échappés lors de la manipulation ou de l'entretien sont disposés entre les cages.

2) Infection des *E. variegatus* et transmission

Les *E. variegatus* au stade L4 sont ensuite mises en contact avec une fève infectée par le phytoplasme de la flavescence dorée. Les *E.variegatus* doivent rester au minimum une semaine sur cette fève infectée pour ingérer le phytoplasme. Des fèves saines sont ensuite introduites dans la cage, afin que les insectes puissent se nourrir une fois la fève infectée morte. Cinq semaines après la mise en contact des insectes sains avec les fèves infectées, ces cicadelles sont infectieuses et peuvent être utilisées pour infecter des fèves saines en se nourrissant dessus pendant une semaine. Les

symptômes sur fèves apparaissent 3 à 4 semaines après la mise en contact avec les cicadelles infectieuses.

C) L'insecte vecteur naturel : *Scaphoideus titanus*

1) Origine et conditions d'élevage

L'élevage de *Scaphoideus titanus* est indisponible dû à la biologie de cet insecte qui nécessite une diapause. Ainsi les expériences sont conditionnées par l'éclosion des œufs contenus dans des bois de vigne. De plus, les œufs ne peuvent être comptés puisque les *S. titanus* pondent profondément sous l'écorce et qu'une dissection de celle-ci risquerait de les abimer.

Les bois de *Vitis vinifera* de 2 ans sont récoltés en janvier, dans des vignobles exempts de FD et de traitements insecticides dans la région de Beaune (France). Les bois sont ensuite stockés à 4°C dans une chambre froide. Les éclosions sont effectuées comme décrit dans (Chuche et al., 2015) par incubation des bois à 22°C avec des pulvérisations quotidiennes d'eau. Les premiers œufs éclosent 3 semaines plus tard et les larves sont transférées dans une cage contenant des vignes afin qu'elles se développent. Les éclosions peuvent être étalées dans le temps rendant difficile l'obtention d'une grande quantité de *S.titanus* au même stade de développement nécessaire pour les expérimentations.

2) Capture et infection

Les *S. titanus* au stade L3-L4 sont transférés en serre de haut confinement par groupe de 100 sur des fèves infectées par les souches FD-PEY05 ou FD92 pour l'acquisition du phytoplasme. Six jours plus tard, les insectes sont transférés sur des vignes issues de boutures de Cabernet-Sauvignon (CS) clone 15 ou de Riparia Gloire de Montpellier (RGM) clone 142 pour une période de latence de 3 à 4 semaines afin que les phytoplasmes puissent se multiplier et que les insectes deviennent infectieux et soient en mesure de les inoculer à d'autres plantes.

Dans la serre de haut confinement, la photopériode est de 15 h à 25 °C et l'humidité est de 50%.

D) Les plants de vigne

1) Les plants de vigne issus de boutures

Les boutures de vigne utilisées pour la période de latence des *S. titanus* sont issus de bois de vigne de type RGM clone 142 ou CS clone 15 de la collection INRA de La Grande Ferrade. Les boutures sont issues de rameaux de vigne prélevées sur les ceps, traitées dans une solution d'eau de Javel à 1% pendant 20 min. Après 3 rinçages avec de l'eau osmosée pendant 15 min sous agitation, les bois sont conservés à 4°C. Afin de faire débourrer les bois, ils sont taillés en biseau et plantés dans du sable préalablement humidifié en serre de haut confinement et placé dans un bac de rétention d'eau. Les bois et le sable sont ensuite traités avec un fongicide (Prévicur 1 mL/L) et avec du Naturen EV (20 mL/L) après séchage. Les bois sont régulièrement humidifiés avec de l'eau. Quand les boutures ont raciné, elles sont repiquées dans du terreau (Substrat 5, Klasmann).

2) Les croisements Mag x CF

Les plants de vigne qui servent pour faire les croisements sont plantés sur pieds depuis des années sur les sites de La Grande Ferrade (Bordeaux), du Domaine de Vassal (Montpellier) et du Conservatoire du Vignoble Charentais (Cherves Richemont, Cognac). Après la castration, les grappes de Magdeleine Noire des Charentes (Mag) sont protégées de l'extérieur et des pollens environnant par un sachet en papier. Elles sont ensuite pollinisées pendant 4 à 6 jours avec du pollen de Cabernet-Franc (CF) à l'aide d'un pinceau. Le croisement inverse a également été effectué, ainsi qu'une autofécondation Mag x Mag. Les grappes se développent et au moment de la maturité physiologique, elles sont récoltées et envoyées à l'INRA de Colmar. Une étape de sauvetage d'embryons est effectuée afin d'obtenir des plantules à partir des pépins. Jusqu'à présent, 13 descendants Mag x CF et 2 descendants de l'autofécondation ont été phénotypés.

3) Obtention des plants *in vitro* et acclimatation

Les plants *in vitro* de vigne, ainsi que les greffages sur plant *in vitro* ont été produits à l'INRA de Colmar par Mireille Perrin et Jean Masson (Perrin et al., 2004). Environ 6 semaines après repiquage *in vitro*, ils ont été repiqués dans de la perlite (Medan SA) et acclimatés en serre de haut confinement. Tous les jours, ils sont arrosés et de l'eau est pulvérisée sur eux et sur les parois de la mini-serre afin de les maintenir dans un environnement humide. La première semaine, les plants *in vitro* sont protégés de la lumière directe par des panneaux occultants. Après une semaine, la

protection est retirée et tous les deux jours, la porte des mini-serres est ouverte d'un cran. Enfin, la porte puis la mini-serre sont retirées. Toutes les semaines, un apport d'engrais Nutrivert ET 10-10-10 à 2,5% (Soufflet Vigne) est effectué. Au bout de 5 à 6 semaines, les plants ont de belles racines et sont repiqués dans du terreau (Substrat 5, Klasmann).

4) Transmission du phytoplasme FD aux plants de vigne

a) Transmission aux plantes entières utilisées pour le phénotypage des descendants (Chapitre III-C) ou la mesure de l'expression des gènes *FtsH* (Chapitre I)

Le phytoplasme de la FD (pFD) est transmis à la vigne par la cicadelle *S. titanus*. Pour cela, 7 *S. titanus* infectieux sont prélevés aléatoirement et encagés sur les plantes entières pendant 7 jours. Pour les expériences de phénotypage des descendants, 9 répétitions biologiques ont été effectuées pour chaque descendant, les parents (CF et Mag), le M et la référence sensible CS. Pour les vignes utilisées pour les expériences de mesure de l'expression des gènes *FtsH*, 8 CS et 8 M ont été infectés.

A la suite de cette période de transmission, les *S. titanus* sont récupérés et les taux de survie et leur titre en phytoplasmes sont déterminés (Matériels et Méthodes, III, B ou C). Les plantes sont également traitées aux insecticides après le prélèvement des insectes.

10 semaines post-transmission (spt) pour les vignes utilisées lors des expériences de phénotypages des descendants, les plantes sont prélevées et traitées de la manière suivante : 1 g de pétioles représentatifs de toutes la plantes est prélevé et congelé. La totalité des tiges est également prélevée et congelée, ainsi qu'1 g de racines. Les acides nucléiques de ces échantillons est ensuite extrait (Matériels et Méthodes, III, A) et les titres en phytoplasmes sont ensuite déterminés (Matériels et Méthodes, III, D).

7 spt pour les vignes utilisées dans les expériences de mesure de l'expression des gènes *FtsH*, les pétioles sont prélevés et rapidement placés dans de l'azote liquide avant conservation à -80°C. Ces pétioles sont ensuite broyés dans de l'azote liquide et 100 mg de poudre (correspondant au broyat) sont distribués dans différents tubes et conservés à -80°C. La poudre contenue dans l'un des tubes est utilisée pour extraire les acides nucléiques (Matériel de Méthodes, III, A) afin de quantifier

le titre en phytoplasmes (Matériels de Méthodes, III, D). Les ARN de la poudre des autres tubes sont extraits (Matériels et Méthodes, IV, C).

b) Transmission via un greffon Ch utilisée pour infecter les plantes en s'affranchissant des interactions plantes-*S. titanus* (Chapitres II et III-A)

La transmission se déroule de la même manière que lors de la transmission sur plantes entière, à l'exception que les 7 insectes sont uniquement encagés sur le greffon Ch pendant 7 jours.

Lors de la première expérience, 7 CS-Ch et 6 CS-Ch ont été infectés et lors de la 2^{nde}, 9 Sau-Ch, 4 CS-Ch, 8 CF-Ch, 6 M-Ch, 7 Mag-Ch et 4 Ch-Ch.

15 spt, les plantes sont prélevées. 1 g de pétioles représentatifs de chaque partie (partie Ch, partie porte-greffe et partie racine) sont prélevés et congelés avant extraction des acides nucléiques et détermination du titre en phytoplasmes dans les différentes parties des plantes.

c) Transmission sur une seule feuille utilisée pour la caractérisation de la diffusion du pFD (Chapitre III-B) ou pour la comparaison des transcriptomes du CS et du M (Chapitre IV)

La transmission se déroule de la même manière que lors de la transmission sur plantes entière, à l'exception que les 7 insectes sont uniquement encagés sur une feuille pendant 7 jours. Ces feuilles sont repérées avec un anneau de couleur.

Pour l'expérience de la caractérisation de la diffusion, 10 CF, 13 Mag et 9 Sau ont été infectés.

Pour des plantes utilisées lors des expériences de comparaison des transcriptomes, 8 CS et 12 M ont été infectés. De même, 4 CS et 4 M ont été mis en contact pendant 7 jours avec des insectes sains.

6 spt, les feuilles mises en contact avec les insectes sont prélevées et conservées à -80°C avant de quantifier le titre en phytoplasmes et d'en extraire les ARN. Puis 10 spt, les plantes entières sont prélevées et découpées en tronçons. Les acides nucléiques sont extraits afin de mesurer le titre en phytoplasmes dans ces différentes parties.

E) Escherichia coli : souches et utilisation

Plusieurs souches d'*Escherichia coli* sont utilisées en fonction de leurs caractéristiques et des besoins des différentes expériences.

La souche HST08 (Clontech, Stellar™ Competent Cells) [F⁻, endA1, supE44, thi-1, recA1, relA1, gyrA96, phoA, Φ80d lacZΔ M15, Δ (lacZYA -argF) U169, Δ (mrr -hsdRMS -mcrBC), ΔmcrA, λ⁻] est utilisée pour sa haute efficacité de transformation. En effet cette souche est recommandée pour le clonage dans le pGEM-t-easy (Promega), et a aussi été utilisée pour le clonage des produits PCR des gènes codant les FtsH dans le pET28a.

La souche BL21 Star™ (DE3) a servi lors de la production de protéines recombinantes. Elle permet d'améliorer le rendement de production dans un système d'expression utilisant le promoteur T7 comme cela est le cas pour le vecteur d'expression pET28a(+) (Novagen). En effet, elle porte une mutation dans le gène codant pour la RNase E (rne 131) qui est la principale source de dégradation des ARNm.

Ces deux souches après transformation, ont été cultivées en milieu LB (Tryptone 10 g/L, extrait de levure 5 g/L, NaCl 10 g/L, agar 15 g/L(Fisher)) à 37°C en présence d'ampicilline (100 µg/mL) ou de kanamycine (50 µg/mL). En milieu liquide, la culture s'effectue à 37°C sous agitation modérée (180-200 rpm/min).

II) Plasmides

A) pET28a (+)

Le pET28a(+) (Novagen) est un vecteur d'expression qui permet le clonage et l'expression de protéines recombinantes dans la bactérie *E. coli*. Il possède une origine de répllication identique à celle du pBR322 et un gène de résistance à la kanamycine. Les gènes cibles sont clonés dans le site multiple de clonage qui est entouré de part et d'autre par une séquence codant pour six résidus histidines (6xHis) permettant l'étiquetage des protéines aussi bien en C-terminal qu'en N-terminal. Un site de coupure à la thrombine permet de cliver le tag 6xHis placé en N-terminal. Ces gènes sont sous la dépendance du promoteur fort du bactériophage T7 inductible par l'IPTG (IsoPropyl β-D-1-ThioGalactopyranoside). Ce vecteur permet la production de protéines FtsH taguées 6xHis.

B) pGEM-T-easy

Le plasmide pGEM-T-easy est sous forme linéaire et fait une taille de 3015 paires de bases (pb). Il possède un résidu thymine à ses deux extrémités 3' sortantes, la présence de ces bases facilite la ligation des produits obtenus par amplification PCR qui peuvent contenir, en fonction de l'ADN polymérase utilisée, une adénosine à leurs extrémités 3'. Ce plasmide contient un gène de résistance à l'ampicilline. Le résidu thymine est situé au milieu de la séquence codante du peptide α de la β -galactosidase, et donc l'insertion d'un gène à ce niveau permet le criblage « blanc/bleu » des colonies bactériennes en présence du substrat X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside).

Le gène *tuf* (AM939565) est présent en un seul exemplaire dans le génome du pFD (Malembic-Maher et al., 2008). Un fragment de 1050 pb de ce gène est amplifié et cloné dans le plasmide pGEM-T-easy (Eveillard et al., 2016). Ce plasmide avec le gène *tuf* cloné est utilisé dans les qPCR de détermination du titre en phytoplasmes.

Ce plasmide a également été utilisé pour cloner les produits PCR issus de l'allongement des *FtsH*.

III) Méthodes d'analyse des ADN

A) Extraction d'acides nucléiques de plantes

Les pétioles, les tiges ou les racines des plantes sont découpés et broyés dans des pochettes d'extraction contenant du CTAB (2% cetyltriméthylammonium bromide (CTAB), 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA pH 8, 0,1 M Tris-HCl pH 8), supplémenté avec 0.2% de β -mercaptoéthanol à raison de 6 mL pour 1 g. Deux mL de broyat sont récupérés dans des tubes placés pendant 30 min dans un bain-marie à 65°C et agités par inversion après 15 min. Après centrifugation de 5 min à 960 g et prélèvement du surnageant, 1 volume de chloroforme-alcool isoamylique (24 : 1) est ajoutés et les tubes sont agités par vortex. Après une centrifugation de 5 min à 21 000 g, la phase supérieure est transférée dans un nouveau tube et 0,6 volume d'isopropanol sont ajoutés. Les tubes sont ensuite mélangés par inversion et placés à -20°C pendant minimum 1 h. Après une centrifugation de 20 min à 21 000 g à 4°C, l'ADN présent dans le culot est lavé deux fois avec 1 mL d'éthanol à 70% et dissout dans 60 μ L de TE 1X (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) pour les pétioles et les tiges et dans 60 μ L d'eau pour les racines. Les ADN issus de l'extraction de racines sont ensuite purifiés sur colonne à l'aide du kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega®) et élués dans 45 μ L d'eau auxquels sont

ensuite ajoutés 5 µL de TE 10X. Les ADN sont dosés par spectrophotométrie à 260 nm puis utilisés comme matrice dans des réactions de PCR ou de qPCR.

B) Extraction d'acides nucléiques d'insectes au TNES

Cette méthode d'extraction repose sur la digestion de l'insecte dans 190 µL de tampon TNES (50 mM Tris-HCl, 400 mM NaCl, 20 mM EDTA, 0.5% (w/v) SDS) additionné de 50 µg de protéinase K pendant une nuit à 55°C. Les protéines sont ensuite précipitées par l'ajout de 56 µL de NaCl 5 M, puis concentrées dans le culot avec les débris indésirables par centrifugation de 20 min à 21 000 g à 4°C. Ensuite, 150 µL de surnageant contenant l'ADN est transféré dans un nouveau tube avant d'être précipité avec 400 µL d'éthanol absolu et froid. Après 1 h à -20°C et une centrifugation de 30 min à 21 000 g à 4°C, les culots sont lavés deux fois avec de l'éthanol 70% et dissout dans 60 µL de TE 1X.

C) Extraction d'acides nucléiques d'insectes au TRIzol

Cette méthode d'extraction a été utilisée pour pouvoir extraire séparément les ARN totaux et l'ADN des insectes. Ainsi après broyage de 10 insectes (*E. variegatus* ou *S. titanus*) dans 1 mL de TRIzol® (Invitrogen), incubation pendant 5 min à température ambiante et centrifugation (12 000 g, 10 min, 4°C), le surnageant est récupéré et mélangé vigoureusement avec 0,25 volumes de chloroforme pur. Après 3 min d'incubation à température ambiante et une centrifugation (12 000 g, 20 min, 4°C), la phase aqueuse supérieure contenant les ARN et la phase phénolique inférieure contenant l'ADN sont transférées dans deux tubes différents afin d'en extraire séparément les ARN (cf. IV.A) et l'ADN. Après précipitation de l'ADN avec 0,75 volumes d'éthanol absolu, une incubation pendant 3 min à température ambiante et une centrifugation (2 000 g, 5 min, 4°C), le surnageant est éliminé. Le culot est ensuite lavé deux fois avec 1 mL de solution de citrate de sodium 0,1 M avec une incubation de 30 min à température ambiante (TA) en mélangeant de temps en temps et une centrifugation (2 000 g, 10 min, 4°C) puis une fois avec 1 mL d'éthanol à 75% avec une inoculation de 15 min à TA et une centrifugation (2 000 g, 5 min, 4°C). Enfin l'ADN est dissout dans 150 µL de TE 1X.

D) Détermination du titre en phytoplasmes par qPCR

Les phytoplasmes ont été détectés et quantifiés dans les plantes (vigne ou fève) et les insectes (*S. titanus* ou *E. variegatus*) par quantification absolue du gène *tuf* présent en une seule copie dans le génome du phytoplasme FD-PEY et FD92 comme décrit dans (Eveillard et al., 2016). La real-time PCR est effectuée à partir de 200 ng d'acides nucléiques de plantes ou 40 ng d'acides nucléiques d'insectes en utilisant le LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche) et les amorces 3Fbl (5'-TGAAGATCCAGTACGTGATTTAGAC-3') à 375 nM et 3RI (5'-TTTTAGTTTCTTAATACCTATGATTTTC-3') à 750 nM. L'amplification a été réalisée sur des plaques de 96 puits en utilisant un thermocycleur 480 LightCycler Real-Time PCR de Roche avec comme cycle : 1 cycle à 95°C pendant 15 min, suivi de 45 cycles à 95°C pendant 15 s, 60°C pendant 30 s et 66°C pendant 30 s. Afin d'obtenir une quantification absolue, une courbe standard a été obtenue en utilisant des dilutions de plasmides pGEM-T-easy contenant un fragment du gène *tuf*, de 10⁸ à 10¹ copies mélangées à 200 ng d'acides nucléiques d'échantillons sains. Tous les échantillons sont déposés en double et le nombre de copies du gène *tuf* est calculé par le logiciel LightCycler® 480 version 1.5.0 (Roche), qui calcule automatiquement le nombre de copies de gènes *tuf* dans chaque échantillon par rapport à la courbe standard. Enfin, comme la séquence complète du génome du phytoplasme de la FD a montré qu'il ne contient qu'une seule copie du gène *tuf*, toutes les données sont présentées comme un nombre de cellules de phytoplasmes par mg de poids frais de matière végétale (pFD/mg PF) ou par insecte (pFD/insecte) (Carle et al., 2011).

E) Amplification par PCR des gènes codant des FtsH

Les séquences codantes pour les différents gènes d'intérêt (*FtsH*) sont amplifiées à partir de 200 ng d'ADN de plantes infectées par le pFD souche FD92. La réaction est réalisée dans un volume de 25 µL en suivant les recommandations des fournisseurs.

La polymérase Phusion™ de Finnzyme® qui est une ADN polymérase de haute fidélité est utilisée pour les clonages de *FtsH* destinés à la production de protéines taguées 6xHis (Table 19).

Nom du gène	Amorce Forward (5'-3')	Amorces Reverse (5-3')	Conc finale amorces	Tm (°C) / Nombre de cycles	Taille de l'amplifiat (pb)
<i>FTSH6-Flado_0067_0046</i>	Flado_0067_0046_ NheI-F : CATATGGCTAGCGCTAC ATCTCAATTAGTCGA	Flado_0067_0046_ XhoI_R2 : GTGGTGCTCGAGTCATA ATTCACCAAAAATTCC	1 µM	50/40	1802
<i>FTSH7-Flado_0234_0001</i>	Flado_0234-1_5304-1_ NheI_F : CATATGGCTAGCAACTC TAATCCTTTAGTTTCATC	FD5304-int-XhoI-R : GTGGTGCTCGAGAAAT CGTAATGTACCTTAAAA CG	1 µM	50/40	1560
<i>FTSH8-Flado_4539_0023</i>	Flado_4539-23_426_ NheI_F : CATATGGCTAGCCTTAA CTCTAACCTCTTATATC	FD426_XhoI_R1 : GTGTGCTCGAGATTATA ATGGATCGTACTGTC	1 µM	50/40	1481

Table 19 : Couples d'amorces et conditions d'amplification utilisés pour amplifier les gènes *FTSH6-Flado_0067_0046*, *FTSH7-Flado_0234_0001* et *FTSH8-Flado_4539_0023* avec la polymérase Phusion™ de Finnzyme® avant de les cloner dans le plasmide PET28a.

La *Taq* polymérase de NEB® est utilisée pour allonger les séquences des gènes *FtsH* afin d'obtenir la séquence complète. Les amorces utilisées sont décrites dans la Table 20.

Nom du gène	Amorce Forward (5'-3')	Amorce Reverse (5'-3')	Conc finale amorces (µM)	Taille amplifiant (pb)	Tm (°C) / Nombre de cycles	Additifs
<i>FTSH3-Flado_0067_0052</i>	FD67B-F1 : TGGTTCTGAA TTTATGGATA GA	FtsH-com-R : TTCAGCTACT CTACCACCTA	10	766	56/38	/
<i>FTSH4-Flado_8115_0004</i>	8115-F : ATTTTTATGT CTATTAAACG CGA	FtsH-com-R : TTCAGCTACT CTACCACCTA	10	1047	52/35	5% DMSO 1,5 mM MgCl ₂
<i>FTSH5-Flado_5852_0016</i>	5852-F : TTTTATATTTT ATATCGCTAA TGC	FtsH-com-R : TTCAGCTACT CTACCACCTA	10	1072	56/38	/
<i>FTSH7-Flado_0234_0001</i>	234-F : CTGTATCTGG TTCTGAATTT GA	FtsH-com-R : TTCAGCTACT CTACCACCTA	10	783	54/38	/
	234-F : CTGTATCTGG TTCTGAATTT GA	5304-02-R : GGTTAACAG TAATTCAAGG G	10	1515	52/38	5% DMSO 1,5 mM MgCl ₂
<i>FTSH8-Flado_4539_0023</i>	4539-F : TTGAAAGGTA TGTCGGCGTC	FtsH-com-R : TTCAGCTACT CTACCACCTA	10	922	56/38	/
	4539-F : TTGAAAGGTA TGTCGGCGTC	426-R2 : AAAAAGACTA TCTCAAAGAT GG	10	1318	59/35	1% DMSO 1,5 mM MgCl ₂

Table 20 : Couples d'amorces et conditions d'amplification utilisés pour amplifier les différents gènes *FtsH* dont la séquence est incomplète avec la Taq polymérase de NEB®.

F) Purification d'ADN plasmidique

Les plasmides sont extraits des bactéries recombinantes avec le kit Wizard® Plus SV Miniprep DNA Purification System (Promega®). La méthode d'extraction est basée sur le principe de la lyse alcaline (Birnboim et Doly, 1979). L'extraction est réalisée avec 3 mL de culture overnight d'*E. coli*. Les bactéries sont collectées par centrifugation et lysées en milieu alcalin puis les protéines et l'ADN chromosomique sont éliminés par précipitation. L'ADN plasmidique est spécifiquement adsorbé sur une matrice composée de silice de haute capacité puis élué dans 50 µL d'eau distillée.

G) Purification des fragments d'ADN à partir de gel d'agarose

Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% en tampon TAE 1X (40 mM Tris-Acétate, 1 mM EDTA (Biosolve Chimie)) et colorés dans un bain de bromure d'éthidium (BET) à 2 µg/mL pendant 2 min. Les bandes d'intérêt sont repérées et excisées, puis l'ADN est purifié avec le kit Wizard® SV Gel and PCR Clean Up System (Promega®) selon le protocole recommandé par le fournisseur et élués dans 50 µL d'eau en vue du clonage.

H) Clonage de fragment d'ADN amplifié par PCR dans un plasmide

1) Ligation dans le plasmide pGEM-t-easy

La ligation est réalisée dans un volume réactionnel de 10 µL comprenant 50 ng du plasmide pGEM-t-easy, l'amplifiat PCR à cloner suivant un ratio 1:3, 3 unités d'ADN ligase du bactériophage T4 qui catalyse la formation de liaisons phosphodiester entre deux fragments d'ADN et son tampon de réaction en suivant les recommandations du fournisseur (Promega). La ligation s'effectue pendant au minimum 1 h à température ambiante. Ce plasmide a été utilisé pour cloner les produits PCR issus de l'allongement des *FtsH*.

2) Ligation dans le plasmide pET28a

Afin d'éliminer les enzymes, les dNTP et les amorces encore présentes dans le mélange réactionnel de la PCR, ou afin d'isoler les fragments d'ADN à cloner issus de l'hydrolyse enzymatique des produits PCR et séparés sur gel, les amplifiats sont purifiés avec le kit Wizard SV® Gel and PCR clean up system (Promega). Le temps de digestion pour la double digestion NheI-XhoI est de 2 h à 37°C.

Un µg du plasmide pET28a est linéarisé par hydrolyse avec les enzymes de restriction NheI (NEB) et XhoI (Invitrogen). Ces 2 enzymes ont également été utilisées pour couper les fragments PCR à cloner. Afin d'empêcher la recircularisation du vecteur au cours de la ligation, les extrémités 5' sont ensuite déphosphorylées par 0,05 unités de la phosphatase alcaline (Calf Intestinal Alkaline Phosphatase®, Promega) pendant 1 h à 37°C puis un nouvel ajout de 0.05 unités pendant 1 h à 37°C. Enfin, le vecteur subit une étape de purification sur colonne (kit Wizard SV® Gel and PCR clean up system (Promega)) élué dans 50 µL d'eau selon les recommandations du fournisseur.

L'ADN ligase du bactériophage T4 catalyse la formation d'une liaison phosphodiester entre les extrémités 3'-OH du vecteur déphosphorylé et les extrémités 5'-P du fragment d'ADN à cloner. Cinquante ng de vecteur est mis en présence du fragment à cloner suivant un ratio 1:3 et d'une unité de ligase dans le tampon d'activité de l'enzyme préconisé par le fournisseur (Promega) dans un volume final de 10 µL. La ligation est réalisée par incubation à température ambiante pendant 4 h ou toute la nuit à 4°C. Les fragments clonés sont issus de l'amplification de 3 gènes *FtsH* nommés *FTSH6-Flado_0067_0046*, *FTSH7-Flado_0234_0001* et *FTSH8-Flado_4539_0023*.

I) Transformation des bactéries *Escherichia coli* chimiocompétentes

1) *E. coli* souche HST08 (Stellar™ Clontech)

Cinquante µL de cellules compétentes Stellar™ (Clontech) sont mises en contact avec 5 ng de produits de ligation pendant 30 min dans la glace avant d'être plongées pendant 45 s à 42°C et refroidies sur glace. Après avoir été mises en incubation dans 500 µL de milieu SOC (tryptone 2%, extrait de levure 0,5%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM, glucose 20 mM) à 37°C pendant 1 h, 100 µL du mélange est étalé sur boîte de milieu solide de LB (Tryptone 10 g/L, extraits de levure 5 g/L, NaCl 10 g/L, agar 10% (Fisher)) additionné de kanamycine (50 µg/mL) pour les ligations dans le pET28a ou d'ampicilline (50 µg/ml) pour les ligations dans le vecteur pGEM-t-easy. Dans le cas de l'utilisation de ce dernier vecteur, 40 µL d'une solution de X-Gal à 2% et 40 µL

d'une solution d'IPTG à 100 mM ont préalablement été étalés sur les boîtes. Après une nuit à 37°C, les cellules transformées sont sélectionnées par leur résistance à l'antibiotique et par leur couleur due à leur capacité à produire la β -galactosidase par α -complémentation dans le cas de l'utilisation du pGEM-t-easy.

2) *E. coli* souche BL21 Star™ (DE3)

Les bactéries d'*E. coli* souche BL21 Star™ (DE3) sont mises en préculture la nuit à 37°C sous agitation. Une culture au 1/200^{ème} dans 120 mL de LB (Tryptone 10 g/L, extraits de levure 5 g/L, NaCl 10 g/L (Fisher)) est incubée à 37°C sous agitation jusqu'à ce que l'absorbance à 600 nm de la culture atteigne 0.5-0.6. Les cellules sont alors incubées 20 min dans la glace puis centrifugées 5 min à 5 000 g. Le culot bactérien est remis en suspension dans 60 mL de CaCl₂ à 50 mM stérile et froid. Après une incubation de 10 min sur glace et une centrifugation de 5 000 g pendant 5 min à 4°C, les cellules sont à nouveau remises en suspension dans 60 mL de CaCl₂ à 50 mM. Cette étape est renouvelée une seconde fois mais les cellules sont alors reprises dans 4 mL de CaCl₂ à 50 mM. Elles sont alors aliquotées et conservées à -80°C.

Cent mL de bactéries chimiocompétentes sont mises en contact avec 2 μ L des constructions plasmidiques pET28a et incubées 30 min sur glace. Après 45 s à 42°C et 2 min sur glace, 900 μ L de milieu LB sont ajoutés sur le mélange qui est incubé 45 min à 37°C sous agitation. Puis 100 μ L sont étalés sur milieu solide LB additionné de kanamycine à 50 μ g/mL.

IV) Méthodes d'analyses des ARN

A) Extraction des ARN d'insectes

Les ARN totaux sont extraits à partir de 10 insectes (*E. variegatus* ou *S. titanus*) broyés dans 1 mL de TRIZOL® (Invitrogen) et incubés 5 min à température ambiante. Après centrifugation (12 000 g, 10 min, 4°C), le surnageant est récupéré et mélangé vigoureusement avec 0.25 volumes de chloroforme pur. Après 3 min d'incubation à température ambiante et une centrifugation (12 000 g, 20 min, 4°C), la phase aqueuse supérieure contenant les ARN est transféré dans un nouveau tube et un volume d'isopropanol (v/v) est ajouté et mélangé. Après 10 min d'incubation et une centrifugation (12 000 g, 10 min, 4°C), le surnageant est éliminé et le culot est lavé deux fois avec 1 mL d'éthanol 70% RNase free. Après centrifugation (12 000g, 5 min, 4°C), l'élimination du

surnageant et le séchage du culot à l'air libre, ce dernier est dissout dans 80 µL d'eau RNase free. Enfin les ARN sont dosés au spectrophotomètre pour lequel une unité Do à 260 nm équivaut à 40 µg/mL d'ARN.

Un traitement à la DNase est ensuite effectué afin d'éliminer les traces d'ADN. Pour cela, 10 µg d'ARN dans 80 µL d'eau sont mélangés avec 10 µL de tampon 10X RQ1 et 10 µL de RQ1 DNase (10 unités) (Promega) et incubés 2 h à 37°C. Après ajout d'un volume de phénol saturé en TRIS (Eurobio) les tubes sont vortexés. Après une centrifugation (12 000 g, 5 min, 4°C), le surnageant contenant les ARN est transféré dans un nouveau tube et un volume de chloroforme/alcool isoamilique (v/v : 24/1) est ajouté et mélangé vigoureusement. Après une centrifugation (12 000 g, 5 min, 4°C), le surnageant est récupéré, un dixième de volume d'acétate de sodium 3 M pH 5,2 RNase free (Ambion) et 2.5 volumes d'éthanol absolu froid sont ajoutés. Après une précipitation de 2 h à -80°C et une centrifugation (12 000 g, 15 min, 4°C), le culot est lavé deux fois avec 500 µL d'éthanol à 70%. Après une centrifugation (12 000 g, 5 min, 4°C) et le séchage du culot à l'air libre, ce dernier est dissout dans 20 µL d'eau. Enfin les ARN sont dosés au spectrophotomètre à 260 nm.

La qualité des ARN est vérifiée par le rapport Do_{260}/Do_{280} (>1,8) et par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Trois volumes du mix de dénaturation composé de formamide 63% v/v, formaldéhyde 24% v/v, MOPS 10X 13% v/v (MOPS 0.4 mM, EDTA 10 mM, acétate de sodium 0.1 M), sont mélangés avec 5 µg d'ARN avant d'être dénaturés 10 min à 65°C. Puis 1/10^{ème} de volume de bleu de charge (glycérol 30%, bromophénol 0,25%, xylène cyanol FF 0,25%) est ajouté aux échantillons dénaturés avant d'être déposés sur le gel. L'électrophorèse est réalisée dans un tampon TAE 1X (40 mM Tris-Acétate, 1 mM EDTA (Biosolve Chimie)) sous une tension de 50 V pendant 4h30. Après migration, le gel est coloré dans un bain de BET à 2 µg/mL et révélé sous lumière ultraviolette (UV).

B) Extraction des ARN de fèves

Les feuilles de fèves sont broyées dans de l'azote liquide et la poudre est répartie à raison de 100 mg/tube. L'extraction des ARN totaux de fèves est réalisée à l'aide du kit RNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen) en suivant les recommandations du fournisseur. La méthode d'extraction est basée sur la dénaturation des protéines et la précipitation des acides nucléiques ainsi que leur adsorption sur membrane de silice. L'ADN et les protéines résiduelles sont éliminés par les lavages. Les ARN sont ensuite élués dans 50 µL d'eau RNase free avant de procéder à un traitement à la DNase (Ambion) afin d'éliminer les traces d'ADN, selon les recommandations du fournisseur. Enfin, les ARN sont dosés au spectrophotomètre à 260 nm.

La qualité des ARN est vérifiée par le rapport Do_{260}/Do_{280} ($>1,8$) et par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (cf. Matériels et Méthodes. IV. A).

C) Extraction des ARN de vignes

La vigne étant un matériel végétal assez difficile à travailler, et le protocole utilisé pour les fèves n'ayant pas donné de résultats satisfaisants, un autre protocole a été utilisé pour en extraire les ARN. Les feuilles ou les pétioles de vigne sont broyées dans de l'azote liquide et la poudre du broyat est répartie à raison de 100 mg/tube. L'ARN total est extrait en utilisant le kit Spectrum™ Plant Total RNA (Sigma-Aldrich) avec quelques modifications à la première étape de l'extraction (Cookson et al., 2013) : 20 mg/ml (w/v) de poly-vinylpyrrolidone sont ajoutés au tampon de lyse qui est mélangé à la poudre du broyat. Ce mélange est ensuite mis en contact avec du chloroforme/alcool isoamylique (24: 1, v/v) et le surnageant est utilisé pour les étapes suivantes du protocole selon les instructions du fabricant. Les ARN sont adsorbés sur la membrane de silice et les contaminants sont éliminés par les différentes étapes de lavage. Enfin, les ARN sont élués dans 50 μ L d'eau RNase-free avant de procéder à un traitement à la DNase (Ambion) afin d'éliminer les traces d'ADN, selon les recommandations du fournisseur. Enfin, les ARN sont dosés au spectrophotomètre à 260 nm.

La qualité des ARN est vérifiée par mesure du rapport Do_{260}/Do_{280} ($>1,8$) et sur puce Agilent RNA 6000 Pico (Agilent Technologies) pour les ARN destinés à l'étude des transcriptomes. Ils présentent un RIN (RNA Integrity Number) supérieur à 7 et un ratio des ARNr 28S/18S supérieur à 1,5 ainsi qu'un profil électrophorétique indiquant des ARN non dégradés.

D) Vérification du traitement DNase par PCR

La *Taq* polymérase de NEB® est utilisée pour vérifier l'efficacité du traitement DNase des différents échantillons aussi bien plants qu'insectes. Les séquences sont amplifiées à partir de 200 ng d'acide nucléique dans un volume de 25 μ L final en suivant les recommandations du fournisseur. Les amorces utilisées sont décrites dans la Table 21.

Organisme	Gène	Amorce Forward (5'-3')	Amorce Reverse (5'-3')	Conc finale amorces (µM)	Taille amplifiat (pb)	Tm (°C) / Nombre de cycles	Référence
<i>Vitis vinifera</i>	<i>EF1α</i>	Vv-EF1-F : GAACTGGGTG CTTGATAGGC	Vv-EF1-R : AACCAAAATAT CCGGAGTAAA AGA	10	150	55/40	(Borges et al., 2014)
<i>Vitis vinifera</i>	ARNr 18S	Vitis18S-F1 : ATGATTAACAG GGACAGTCG	Vitis18S-R1 : GGTATCTGATC GTCTTCGAG	10	150	55/45	(Roggia et al., 2014)
<i>Vicia faba</i>	<i>CYP</i>	Fb-CYP-F : TGCCGATGTCA CTCCCAGAA	Fb-CYP-R : CAGCGAACTTG GAACCGTAGA	10	200	56/38	(Gutierrez et al., 2011)
<i>Vicia faba</i>	<i>EF1α</i>	Fb-EF1-F : GTGAAGCCCG GTATGCTTGT	Fb-EF1-R : CTTGAGATCCT TGA CTGCAACA TT	10	150	56/38	(Gutierrez et al., 2011)
<i>Euscelidius variegatus</i>	<i>COX-2</i>	BarCod_Ev_F1 : AATTGAGTTAA CTCAACCAGG	BarCod_Ev-R1 : CGAGGAAATG CTATATCAGG	10	174	56/40	/
<i>Scaphoideus titanus</i>	<i>COX-2</i>	BarCod_St_F1 : AATAGAATTAG CTCAGCCTGG	BarCod_St_R1 : CGTGGGAATG CTATGTCTGG	10	174	56/40	/
pFD	<i>FTSH6-Flado_0067_0046</i>	FD67A-F1 : GTTTTGGACCT CTTTTATCTGC	FD67A-R3 : TCTTTTACGCG AAGTGTTTCG	10	500	52/40	/
pFD	<i>FTSH2-Flado_7221_0015</i>	FD7221-F2 : GTAGAAATATA CATCGGGACA	FD7221-R1 : ACAGCTTCTTC TAATTCTATCA T	10	503	52/40	/

Table 21 : Couples d'amorces et conditions d'amplification utilisés pour vérifier l'efficacité du traitement DNase.

E) RT-PCR quantitative en temps réel

1) Synthèse des ADNc par transcription inverse

La transcription inverse est réalisée selon le protocole préconisé par le fournisseur (Invitrogen™) en présence d'1 µg d'ARN préalablement traité à la DNase. Les ARN sont dénaturés 5 min à 65°C en présence de 100 µmol random hexamer primers (Invitrogen™) et de 20 mM de dNTP dans un volume final de 12 µL, avant d'être refroidis pendant 5 min dans de la glace. La réaction de transcription inverse est initiée en ajoutant du tampon 5X RNA buffer (Invitrogen), 0.1 µmol de DTT (Invitrogen), 40 unités de RNase out (Invitrogen), et 200 unités de transcriptase inverse (Invitrogen) dans un volume final de 20 µL. La réaction se déroule à 42°C pendant 1 h, puis l'enzyme est désactivée par une incubation de 6 min à 85°C. Un témoin négatif sans transcriptase inverse a été effectué pour chaque échantillon.

Pour la vérification de l'expression de certains gènes après analyse des données transcriptomiques, 2 µg d'ARN et 100 µM d'oligo-dT dans 41 µL final ont été mélangés et chauffés à 65°C pendant 5 min. Puis, ont été ajoutés 15 µL de tampon 5X RT Buffer, 9 mM de DTT, 0,5 mM de dNTP, 80 unités de RiboLock RNase Inhibitor, de 200 unités de M-MLV transcriptase dans un volume final de 75 µL. Ce mélange a été incubé à 37°C pendant 50 min, puis à 70°C pendant 10 min.

2) Amplification des ADNc par PCR en temps réel

Les amplifications des ADNc par PCR en temps réel sont effectuées en triplicat expérimental et en triplicat biologique à partir d'1 µL d'ADNc issu de la reverse transcription. Toutes les réactions sont réalisées à l'aide du thermocycler 480 LightCycler® Real-Time PCR de Roche dans un volume réactionnel de 20 µL comprenant le tampon du mix Roche 1X et les amorces à 0.1, 0.5 ou 1 µM selon les paires (Table 22). Les cycles PCR comprennent un cycle de 15 min à 95°C, suivi de 45 cycles de 20 s à 94°C, de 30 s à 56, 60, 62 ou 64°C (Table 22) et de 30 s à 68°C. Un profil des températures de courbe de fusion a été obtenu après un cycle de 10 s à 95°C, 10 s à 66°C et chauffage à 95°C avec un taux de rampe de 0,11°C/s suivi d'un refroidissement à 50°C à 2,2°C/s. Les données sont ensuite analysées avec le logiciel LightCycler 480 software release 1.5.1.62 afin de définir le nombre de cycles seuil (Ct ou Cycle Threshold) à partir duquel les amplifications sont détectées. Des amplifications avec des amorces ciblant des gènes de plantes ou d'insectes et de phytoplasmes (Table 23) ont également été réalisées comme témoin positif de reverse-transcription.

Nom du gène cible	Amorce Forward (5'-3')	Amorce Reverse (5'-3')	Conc finale amorces (μ M)	Taille amplifiat (bp)	Tm (°C)/ Nombre de cycles	Efficacité
<i>FTSH1-Flado_0314_0026</i>	FD314-F3 : TTCTGAATTTGT TGAAATGTACG	FD314-R1 : TTTTCTTGAGAT CCTCCTGAGA	1	156	60/36	100%
<i>FTSH2-Flado_7221_0015</i>	FD7221-F1 : TAGCTGGGGAA TCAGGAGTT	FD7221-R1 : ACAGCTTCTTCT AATTCTATCAT	0,1	553	60/40	90%
<i>FTSH3-Flado_0067_0052</i>	FD67B-F1 : TGGTTCTGAATT TATGGATAGA	FD67B-R1 : GTACTTCCATCA TCATTTGC	1	157	62/36	99%
<i>FTSH4-Flado_8115_0004</i>	FD8115-F2 : AATCGGCATTAA ACTCCCTCG	FD8115-R2 : TCATAAGCACCA CTAGAAACT	1	207	60/36	100%
<i>FTSH5-Flado_5852_0016</i>	FD5852-F2 : GTGTTGGTGCTT CTCGTGTC	FD5852-R3 : CACGTGCTTTAA CATCTGGC	0,1	291	60/36	90%
<i>FTSH6-Flado_0067_0046</i>	FD67A-F1 : GTTTTGGACCTC TTTTATCTGC	FD67A-R1 : GGAATTCTAGCA CCCATCAAAT	0,1	274	60/36	93%
<i>FTSH7-Flado_0234_0001</i>	234-F : CTGTATCTGGTT CTGAATTTGA	234-R : TTGAGATTCTCC TGAAAAACC	0,5	161	60/36	90%
<i>FTSH8-Flado_4539_0023</i>	FD4539-F2 : TTGTTGAAAGGT ATGTCGGCGTC	FD4539-R : TAATAATTCCTT TAGACGAAGAA	0,1	213	56/40	90%
<i>FDGyrA-Flado_5136_0003</i>	FDGyrA-F2 : CTAGAATTGTCTG GTGATGTTATGG	FD-GyrA-R2 : AGCCATTCTAC AGCTATACCCG	0,1	338	64/36	99%
<i>FDDnaB-Flado_5892_0007</i>	FDDnaB-F2 : CTTTATCAACCT TTAATAGTTTA GG	FDDnaB-R2 : TTTCTAATATTTT TTGTTCTTCGTC G	1	355	62/36	99%

Table 22 : Couples d'amorces et condition utilisés pour quantifier l'expression des différents gènes

FtsH.

Organisme	Nom du gene cible	Amorce Forward (5'-3')	Amorce Reverse (5'-3')	Conc finale amorces (μM)	Taille amplifiat (bp)	Tm (°C)/ Nombre de cycles/ efficacité	Référence
<i>Euscelidius variegatus</i> et <i>Scaphoideus titanus</i>	<i>Tub β</i>	Tub-beta-Ev-F1 : GATGCCAAGA ACATGATGGC	Tub-beta-Ev-R1 : TGGATGTTGA GCATCTGTTTCG	0,1	119	62/40 /90%	/
	<i>Act</i>	Actine_Ev_F1 : GGGAGAAGAT GACCCAGATC	Actine_Ev_R1 : GAGGTAGTCG GTCAAGTCTC	1	221	60/40 /82%	/
<i>Vitis vinifera</i>	<i>EF1α</i>	Vv-EF1-F : GAACTGGGTG CTTGATAGGC	Vv-EF1-R : AACCAAAATAT CCGGAGTAAA AGA	1	150	64/40 /98%	(Borges et al., 2014)
	<i>CYP</i>	Vv-CYP-F : ACAGCCAAGA CCTCGTG	Vv-CYP-R : GCCTTCACTGA CCACAAC	1	138	60/32 /99%	(Borges et al., 2014)
<i>Vicia faba</i>	<i>EF1α</i>	Fb-EF1-F : GTGAAGCCCG GTATGCTTGT	Fb-EF1-R : CTTGAGATCCT TGACTGCAACA TT	1	150	60/32 /91%	(Gutierrez et al., 2011)
	<i>CYP</i>	Fb-CYP-F : TGCCGATGTCA CTCCCAGAA	Fb-CYP-R : CAGCGAACTTG GAACCGTAGA	1	200	60/30 /81%	(Gutierrez et al., 2011)

Table 23 : Couples d'amorces et conditions utilisés comme témoins positifs de réverse-transcription des différents échantillons.

Certaines amplifications ayant pour but de vérifier les résultats de RNA-Seq, ont été amplifiées sur plaque fluidigm par Marie-France Corio-Costet et Marie-Cécile Dufour (UMR SAVE, Bordeaux) sur la plateforme Genotoul à Toulouse (Table 24). Une étape de pré-amplification est effectuée sur 1,3 μL de cDNA à 5 ng/μL avec les tous primers à 0,2 μM final et le tampon TaqMan PreAmp Master Mix (Applied Biosystems) dans volume final de 5 μL. Le cycle PCR comprend un cycle à 95°C pendant 10 min, puis 14 cycles de 94°C pendant 15 s et de 60°C pendant 4 min. Après avoir dilués les amplifiats au 1/5^{ème} dans du TE 1X, 1.7 μL de ces amplifiats dilués sont mélangés avec du tampon de qPCR (tampon 2X TaqMan Gene Expression Master Mix, tampon 20X DNA Binding Dye Sample Loading Reagent et tampon 20X EvaGreen) dans un volume final de 5 μL. De même, 1.7 μL d'amorces à 20 μM sont mélangés avec ce tampon de qPCR dans un volume final de 5 μL. Les

échantillons et les amorces sont chargés dans la plaque qui est placée dans le système BioMark avec un cycle à 95°C pendant 10 min, suivi de 40 cycles à 95°C pendant 15 s et 60°C pendant 1 min. Les données ont été analysées en utilisant le logiciel d'analyse BioMark 2.0 (Fluidigm Corporation, France). Les gènes de référence utilisés sont *EF1 γ* , *TIP41*, *THIORYLS8*, *TuA* et *GADPH*.

Nom du gène	Amorce Forward (5'-3')	Amorce Reverse (3'-5')	Efficacité
EF1 γ	GAAGGTTGACCTCTCGGATG	AGAGCCTCTCCCTCAAAAGG	1,09
TIP41	CAGCGGGCAGCGATCGAAGA	CATTTCCGCTCCGGCAGCCTT	1,05
THIORYLS8	TCACTCTGGATGGGCCGTCG	TCCAATCGTGGCCGAACCG	1,14
TuA	GTCGGCGCTGAAGGTGTGGA	GAGGTGGCGGGCAAACCTC	0,97
GADPH	GAAATCAACGGCCCAGCGCG	CCGGTGGATACTGGGGCGGA	0,83
<i>PR1</i>	CCCAGAACTCTCCACAGGAC	GCAGCTACAGTGTCGTTCCA	1,00
<i>GLU</i>	GGGGAGATGTGAGGGGTAT	TGCAGTGAACAAAGCGTAGG	1,18
<i>PR2</i>	CAACTTGCCACCGCCAGGGC	AGGGCTTGAGAGCAGCTTGG	0,96
<i>PR4</i>	CCCAGAGCGCCAGCAATGTGA	TTGCTGCGCCATGCCAAGGG	0,95
<i>PR5</i>	CCCCGGCACCACCAATGCTC	TGGGGGAGAACCGTAGCCCTG	1,18
<i>PR7</i>	CGTTAAGCAGCTGGAAAGGAGCA	TCCTCCGTCAGTCTGGCTGCAA	1,04
<i>CHIT3</i>	AATGATGCCAAAACGTAGC	ATAAGGCTCGAGCAAGGTCA	0,98
<i>PR8</i>	GCAACAAAGCTCAATGGCACACCAC	CAGCCAAGCTGCCCTCGTTCC	0,96
<i>CHS</i>	CCAACAATGGTGTGCTCAGTTGC	CTCGGTCATGTGCTCACTGT	1,01
<i>DFR</i>	GGCCACCGTTCGCGATCCAA	GAAGACGCCGGTGCAGCCTT	1,05
<i>LDOX</i>	TGGTGGGATGGAAGAGCTAC	CCCCTTGCCCTCATAGAAA	0,84
<i>HMGR</i>	AACGCACACTCCGCTCCACG	GCGGCGGCGATCTTCATCGA	0,93
<i>F3H</i>	TGACTCGCTCTTTCAAGCA	CACCTTGGGACGTTTCATCTT	0,87
<i>LOX2</i>	AAACCGTGCAATCCCGGCC	GGCAGGGACGTAGCCAACCC	1,02
<i>EIN3</i>	CCTCGCAAGCGGTCTCGCAT	TGGAGACCCGAGCGCAGGAG	0,98
<i>SAMT1</i>	AATCCTTGCCCAAGTTCCAG	GAGACAACCATTGGAGACTG	1,16
<i>PAL</i>	ACAACAATGGACTGCCATCA	CACTTTGACATGGTTGGTG	1,10
<i>CALS</i>	TGGAAATGCAATTCAAACGA	CGAATGCCATGTCTGTATGG	0,86
<i>CALS2</i>	ATGGCGTCCAGAAGCGGCTC	GCCGTCTGTGTCCGCGTGAT	0,86
<i>CALS3</i>	GCAGCAGATTGCCACTGCCCA	AGGCAGAATGAGGTGCTCGCC	1,14
<i>WRKY1</i>	GGAAATATGGGCAGAAAGCA	ATCTTTTGGAGAGGCGTTGGA	1,00
<i>WRKY2</i>	AGAGGCAAGGCGATGTAGAA	CTGGGGAACAAGCCTTCATA	1,01

Table 24 : Efficacité et couples d'amorces utilisées pour la préamplification et l'amplification des gènes vérifiés par RT-PCR en temps réel sur plaque (Dufour et al., 2016).

F) Analyses transcriptomiques

Les ARN de 3 Merlot (M) et 3 Cabernet-Sauvignon (CS) mis en contact pendant 7 jours avec des *S. titanus* sains, ainsi que de 3 M et 3 CS mis en contact pendant 7 jours avec des *S. titanus* infectieux ont été produits et constituent les 3 réplicats biologiques indépendants utilisés pour les analyses transcriptomiques (cf. IV, C). La suite du protocole de l'analyse par RNA-Seq est réalisée par José Caïus et Christine Paysant-Leroux (Institute of Plant Sciences Paris Saclay IPS2). La quantification des ARN est effectuée par dosage fluorométrique avec Ribogreen.

Les banques RNA-seq sont réalisées en suivant le protocole TruSeq_Stranded_mRNA_SamplePrep_Guide_15031047_D (Illumina®, USA). La qualité des banques est vérifiée sur puce Agilent DNA High Sensitivity et un dosage quantitatif est effectué au Qbit avant une PCR quantitative.

La technologie de séquençage utilisée est une Illumina Hiseq2000 en pair-end 2x100 pb 180 000 K reads (plateforme IG-CNS). Les échantillons RNA-seq ont été séquencés en extrémité jumelée (Pair-End ou PE) avec un calibrage de 260 pb et une longueur de lecture de 100 bases. Six échantillons par voie de Hiseq2000 à l'aide d'adaptateurs à code à barres individuels et donnant environ 30 millions de lectures de PE par échantillon sont générés.

Tous les échantillons RNA-Seq suivent le même protocole avec la suppression des adaptateurs des banques et un contrôle de qualité. Les données brutes (fastq) sont nettoyées à l'aide de l'outil Fastx pour un Phred Quality Score Qscore supérieur à 20, et une longueur de lecture supérieure à 30 bases, et les séquences ribosomiques ont été supprimées avec l'outil sortMeRNA (Kopylova et al., 2012).

Bowtie version 2 (Langmead and Salzberg, 2012) est utilisé pour aligner les lectures contre le transcriptome de *Vitis vinifera* du cépage Pinot Noir (avec les paramètres par défaut). Les 26 347 gènes de vigne sont affiliés aux gènes d'*Arabidopsis thaliana* par homologie de séquence (blast) à l'aide de la base de données Phytozome qui fournit le meilleur hit avec un isoforme par gène correspondant au CDS le plus long. L'abondance de chaque gène a été calculée par un script qui analyse les fichiers SAM et ne compte que des lectures paired-end pour lesquelles les deux lectures s'alignent sans ambiguïté sur la carte, en éliminant les multiples succès. Selon ces règles, environ 77% des lectures de paired-end ont été associées à un gène, 1 à 2% des lectures de paired-end non mappées et 1 à 2% de lectures de paired-end avec des multi-hits ont été supprimés.

Les choix de l'analyse différentielle sont effectués sur la base de la publication de (Rigai et al., 2016). Les gènes qui ne possédaient pas au moins une lecture par million (CPM) dans au moins la moitié des échantillons sont supprimés. La taille de la banque est normalisée en utilisant la méthode

TMM et la distribution du nombre est modélisée avec un modèle linéaire généralisé binomial négatif où la date de prélèvement est prise en compte. La dispersion est estimée par la méthode edgeR (Version 1.12.0, (McCarthy et al., 2012) dans le logiciel statistique 'R' (Version 2.15.0, R Development Core Team (2005)). Les différences d'expression sont comparées entre les CS sains (en contact avec les *S. titanus* sains) et infectés ; entre les M sains et infectés ; entre les CS et les M sains ; entre les CS et les M infectés en utilisant le test du rapport de vraisemblance. Les p-values sont ajustés par la procédure de Benjamini-Hochberg (Benjamini and Hochberg, 1995) pour contrôler la FDR (False discovery rate). Un gène est déclaré différentiellement exprimé si sa p-value ajustée est inférieure à 0,05.

V) Méthodes d'analyses des protéines

A) Production de protéines FtsH du phytoplasme de la FD souche FD92 recombinantes taguées 6xHis

Les séquences nucléotidiques codant les protéines FTSH6, FTSH7 et FTSH8 du phytoplasme de la FD souche FD92 sont amplifiées et clonées dans le plasmide pET28a avant d'être transformées dans *E.coli* souche BL21 Star™ (DE3). Les séquences codant les régions transmembranaires des protéines ne font pas partie du fragment amplifié.

Un transformant dont la séquence insérée dans le plasmide a été vérifiée par séquençage est repiqué puis cultivé dans 500 mL de milieu liquide LB additionné de 50 µg/µL de kanamycine pendant environ 4 h à 37°C. Lorsque la culture arrive en phase exponentielle (D_{600} comprise entre 0.6 et 0.8), l'expression de la protéine recombinante est induite par l'ajout dans le milieu de 1mM d'IPTG pendant 4 h à 28°C.

La culture bactérienne est ensuite centrifugée à 7000 *g* pendant 10 min à 4°C et le culot est resuspendu dans 10 mL de tampon de lyse (phosphate de sodium 50 mM pH 7.4), puis 30 µL de DNase (10 mg/mL) sont ajoutés, ainsi que 2,5 µL de lysozyme (100 mg/mL) et 1 mM de fluorure de phénylméthylsulfonyle (PMSF). Après une incubation de 30 min à température ambiante, le mélange est soniqué (30% pulse/s, 4°C, 50 W, 30 s de sonication en alternance avec 30 s dans la glace) à l'aide du Vibra-Cell Ultrasonic Processor (Sonics & Materials, Inc) jusqu'à l'obtention d'un lysat translucide. Le mélange est centrifugé à 9600 *g* pendant 10 min à 4°C et le surnageant contenant les protéines solubles tagguées 6xHis est purifié sur colonne de Nickel.

B) Purification des protéines

La colonne d'affinité de Nickel (Biorad) est d'abord équilibrée avec 5 volumes de tampon de resuspension de la protéine (phosphate de sodium 50 mM pH 7.4) nommé tampon A. Puis le lysat bactérien est passé sur la colonne de Nickel afin que la protéine taguée avec 6xHis puisse s'accrocher. Différents lavages (5 volumes de tampon A supplémenté avec 0,15 M NaCl, puis 5 volumes de tampon A supplémenté avec 0,15 M NaCl et 0,1 % de Triton-100 et enfin 5 volumes de tampon A supplémenté avec 0,15 M NaCl) permettent de décrocher les protéines qui se seraient accrochées sans affinité. La protéine 6xHis est ensuite éluée dans un tampon contenant du phosphate de sodium 50 mM, NaCl 0.15 M, imidazole 100 mM, pH 7,4.

La protéine subit ensuite un passage sur une colonne d'équilibration (PD10 Desalting Column (GE Healthcare Life Sciences)) composé de sephadex (gel de dextrane), ce qui élimine les contaminations salines laissées par l'étape précédente. La protéine est ensuite éluée dans 2,5 mL du tampon (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,5). L'ensemble de ces étapes se déroulent à 4°C. Les protéines sont dosées grâce au kit DC Reagent (Biorad). Un gel d'acrylamide à 12% permet de vérifier la présence de la protéine à la taille attendue.

C) Mesure de l'activité ATPasique des FtsH recombinantes

L'activité ATPasique des FtsH recombinantes repose sur la formation d'un complexe stable entre le phosphate libéré et le vert de malachite en solution.

Afin de préparer une gamme d'étalonnage, 120 µL de solution de KH_2PO_4 de différentes concentrations (entre 0 et 100 µM) sont préparées dans le tampon de dilution (Table 25) auquel est ajoutée de l'ATP (1 mM final) et du Nonidet (0,1% (v/v) final) durant 40 min.

Tampon de dilution	Concentration finale
Tris	50 mM
CaCl ₂	2 mM
Dithiothéitol	1 mM
Acétate de zinc	1,25 mM
Acétate de potassium	125 mM
Solution de détection (filtrée sur membrane de porosité 0,45 µm et laissée reposer 1 nuit à température ambiante)	
Solution de vert de malachite	0,027% (w/v)
Triton X-100	0,1% (w/v)
Mobylate d'ammonium	0,95% (w/v)

Table 25 : Composition du tampon de dilution et de la solution de détection.

Un mL de solution de détection (Table 25) et 80 µL de citrate de sodium C₆H₅Na₃O₇ à 34% (w/v) sont ajoutés au 120 µL de chaque point de la gamme. Après 15 min d'incubation, la Do à 650 nm est mesurée afin d'obtenir une droite de calibration.

Deux ou 6 µg de FtsH recombinantes purifiées sont mélangés avec 60 µL de tampon de dilution, d'ATP (1 mM final) et du Nonidet (0,1% final) dans un volume final de 100 µL. Un échantillon témoin sans ATP et un échantillon témoin dans lequel la FtsH est remplacée par du tampon (Tris 50 mM, NaCl 150 mM pH 7,5) sont inclus dans le test. Après 0, 15, 30 et 45 min d'incubation, 6 µL de chaque solution sont prélevés. Cinquante µL de solution de détection et 4 µL de citrate de sodium C₆H₅Na₃O₇ à 34% (w/v) y sont ajoutés. L'absorbance est mesurée et est ensuite traduite en concentration de phosphate libéré par les FtsH grâce à la corrélation obtenue avec la droite de calibration.

Toutes les mesures de la gamme, des témoins et des échantillons FtsH sont été effectuées en triplicat.

D) Mesure de l'activité protéolytique des FtsH

L'activité protéolytique des FtsH est mesurée par leur capacité d'hydrolyse de la caséine. Cette protéine adopte une conformation peu structurée en solution aqueuse et représente ainsi un modèle de substrat potentiel pour les protéines FtsH.

Les FtsH (2 ou 6 µg) sont mélangées dans un volume final de 120 µL de tampon (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5). Elles sont ensuite incubées en présence de 480 µL d'azocaséine colorée à 1%

dans le tampon de dilution (Table 25), de 1 mM d'ATP et de 0,1% de Nonidet (w/v) à 25°C pendant 2 h. La protéolyse de l'asocaséine permet le relargage de composés colorés. La réaction d'hydrolyse est arrêtée par ajout de 10% d'acide trichloroacétique. Après 30 minutes sur la glace et une centrifugation (15 000 g, 10 min, 4°C), 200 µL de NaOH 1,8 N sont ajoutés au 800 µL de surnageant. La Do à 420 nm est ensuite mesurée afin de quantifier l'intensité de la coloration.

Un témoin est réalisé avec de la protéinase K à 1 mg/mL dans du tampon de dilution auquel sont ajoutés de l'ATP (1 mM final) et du Nonidet (0,1% final). Cette réaction permet de connaître la valeur de l'absorption pour 100% de protéolyse. Un témoin sans ATP, un témoin sans acétate de zinc et un témoin dans lequel la FtsH a été remplacé par du tampon (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7,5) sont ajoutés au test.

VI) Statistiques

L'ensemble des analyses a été effectuée à l'aide du logiciel de statistique R 3.4.3. La normalité des différentes données obtenues a été vérifiée avec le test de Shapiro. Comme tous les échantillons ne respectaient pas la loi normale, le test non paramétrique de Wilcoxon a ensuite été utilisé.

Références bibliographiques

- Abbà, S., Galetto, L., Carle, P., Carrère, S., Delledonne, M., Foissac, X., Palmano, S., Veratti, F., and Marzachi, C. (2014). RNA-Seq profile of flavescence dorée phytoplasma in grapevine. *BMC Genomics* *15*, 1088.
- Adrian, M., and Jeandet, P. (2012). Effects of resveratrol on the ultrastructure of *Botrytis cinerea* conidia and biological significance in plant/pathogen interactions. *Fitoterapia* *83*, 1345–1350.
- Ahuja, I., Kissen, R., and Bones, A.M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends Plant Sci.* *17*, 73–90.
- Albertazzi, G., Milc, J., Caffagni, A., Francia, E., Roncaglia, E., Ferrari, F., Tagliafico, E., Stefani, E., and Pecchioni, N. (2009). Gene expression in grapevine cultivars in response to Bois Noir phytoplasma infection. *Plant Sci.* *176*, 792–804.
- Alma, A., Bosco, D., Danielli, A., Bertaccini, A., Vibio, M., and Arzone, A. (1997). Identification of phytoplasmas in eggs, nymphs and adults of *Scaphoideus titanus* Ball reared on healthy plants. *Insect Mol. Biol.* *6*, 115–121.
- Ambawat, S., Sharma, P., Yadav, N.R., and Yadav, R.C. (2013). MYB transcription factor genes as regulators for plant responses: an overview. *Physiol. Mol. Biol. Plants* *19*, 307–321.
- Anabestani, A., Izadpanah, K., Abbà, S., Galetto, L., Ghorbani, A., Palmano, S., Siampour, M., Veratti, F., and Marzachi, C. (2017). Identification of putative effector genes and their transcripts in three strains related to ‘*Candidatus* Phytoplasma aurantifolia.’ *Microbiol. Res.* *199*, 57–66.
- Anderson, J.P., Badruzsafari, E., Schenk, P.M., Manners, J.M., Desmond, O.J., Ehlert, C., Maclean, D.J., Ebert, P.R., and Kazan, K. (2004). Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *16*, 3460–3479.
- Angelini, E., Squizzato, F., Lucchetta, G., and Borgo, M. (2004). Detection of a Phytoplasma Associated with Grapevine Flavescence dorée in *Clematis vitalba*. *Eur. J. Plant Pathol.* *110*, 193–201.
- Anžlovar, S., and Dermastia, M. (2003). The Comparative Analysis of Osmotins and Osmotin-Like PR-5 Proteins. *Plant Biol.* *5*, 116–124.
- Apel, K., and Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Biol.* *55*, 373–399.
- Arnaud, G., Malembic-Maher, S., Salar, P., Bonnet, P., Maixner, M., Marcone, C., Boudon-Padieu, E., and Foissac, X. (2007). Multilocus Sequence Typing Confirms the Close Genetic Interrelatedness of Three Distinct Flavescence Dorée Phytoplasma Strain Clusters and Group 16SrV Phytoplasmas Infecting Grapevine and Alder in Europe. *Appl. Environ. Microbiol.* *73*, 4001–4010.
- Asada, K. (1992). Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol. Plant.* *85*, 235–241.
- Aziz, A., Heyraud, A., and Lambert, B. (2004). Oligogalacturonide signal transduction, induction of defense-related responses and protection of grapevine against *Botrytis cinerea*. *Planta* *218*, 767–774.
- Aziz, A., Trotel-Aziz, P., Dhuciq, L., Jeandet, P., Couderchet, M., and Vernet, G. (2006). Chitosan oligomers and copper sulfate induce grapevine defense reactions and resistance to gray mold and downy mildew. *Phytopathology* *96*, 1188–1194.

- Aziz, A., Gauthier, A., Bézier, A., Poinssot, B., Joubert, J.-M., Pugin, A., Heyraud, A., and Baillieul, F. (2007). Elicitor and resistance-inducing activities of beta-1,4 cellodextrins in grapevine, comparison with beta-1,3 glucans and alpha-1,4 oligogalacturonides. *J. Exp. Bot.* *58*, 1463–1472.
- Baggiolini, M. (1952). Les stades repères dans le développement annuel de la vigne et leur utilisation pratique. *Rev. Romande D’Agriculture D’Arboriculture* *8*, 4–6.
- Bai, X., Zhang, J., Ewing, A., Miller, S.A., Radek, A.J., Shevchenko, D.V., Tsukerman, K., Walunas, T., Lapidus, A., Campbell, J.W., et al. (2006). Living with Genome Instability: the Adaptation of Phytoplasmas to Diverse Environments of Their Insect and Plant Hosts. *J. Bacteriol.* *188*, 3682–3696.
- Bavaresco, L., Fregoni, C., Cantù, E., and Trevisan, M. (1999). Stilbene compounds : from the grapevine to wine. *Drugs Exp. Clin. Res.* *25*, 57–63.
- Beanland, L., Noble, R., and Wolf, T.K. (2006). Spatial and Temporal Distribution of North American Grapevine Yellows Disease and of Potential Vectors of the Causal Phytoplasmas in Virginia. *Environ. Entomol.* *35*, 332–344.
- Belhadj, A., Saigne, C., Telef, N., Cluzet, S., Bouscaut, J., Corio-Costet, M.-F., and Mérillon, J.-M. (2006). Methyl Jasmonate Induces Defense Responses in Grapevine and Triggers Protection against *Erysiphe necator*. *J. Agric. Food Chem.* *54*, 9119–9125.
- Belhadj, A., Telef, N., Cluzet, S., Bouscaut, J., Corio-Costet, M.-F., and Mérillon, J.-M. (2008). Ethephon Elicits Protection Against *Erysiphe necator* in Grapevine. *J. Agric. Food Chem.* *56*, 5781–5787.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate : A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Methodol.* *57*, 289–300.
- Berens, M.L., Berry, H.M., Mine, A., Argueso, C.T., and Tsuda, K. (2017). Evolution of Hormone Signaling Networks in Plant Defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* *55*, 401–425.
- Bézier, A., Lambert, B., and Baillieul, F. (2002). Study of Defense-related Gene Expression in Grapevine Leaves and Berries Infected with *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* *108*, 111–120.
- Bittner, L.-M., Arends, J., and Narberhaus, F. (2017). When, how and why? Regulated proteolysis by the essential FtsH protease in *Escherichia coli*. *Biol. Chem.* *398*, 625–635.
- Boerjan, W., Ralph, J., and Baucher, M. (2003). Lignin Biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Biol.* *54*, 519–546.
- Boller, T., and Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* *60*, 379–406.
- Bonfig, K.B., Schreiber, U., Gabler, A., Roitsch, T., and Berger, S. (2006). Infection with virulent and avirulent *P. syringae* strains differentially affects photosynthesis and sink metabolism in *Arabidopsis* leaves. *Planta* *225*, 1–12.
- Bonomelli, A., Mercier, L., Franchel, J., Baillieul, F., Benizri, E., and Mauro, M.-C. (2004). Response of Grapevine Defenses to UV—C Exposure. *Am. J. Enol. Vitic.* *55*, 51–59.
- Borevitz, J.O., Xia, Y., Blount, J., Dixon, R.A., and Lamb, C. (2000). Activation Tagging Identifies a Conserved MYB Regulator of Phenylpropanoid Biosynthesis. *Plant Cell Online* *12*, 2383–2393.

- Borges, A.F., Fonseca, C., Ferreira, R.B., Lourenço, A.M., and Monteiro, S. (2014). Reference Gene Validation for Quantitative RT-PCR during Biotic and Abiotic Stresses in *Vitis vinifera*. PLOS ONE 9, e111399.
- Boudon-Padieu, E. (1996). Jaunisses à phytoplasmes de la vigne. Comptes-Rendus Académie Agric. Fr.
- Boudon-Padieu, E., Larrue, J., and Caudwell, A. (1989). ELISA and dot-blot detection of flavescence dorée-MLO in individual leafhopper vectors during latency and inoculative state. Curr. Microbiol. 19, 357–364.
- Bouquet, A. (1986). Introduction dans l'espece *Vitis vinifera* L. d'un caractere de resistance a l'oïdium issu de l'espece *Muscadinia rotundifolia*. Small Vignevinii 12 (suppl), 141–146.
- Bouquet, A., Pauquet, J., Adam-Blondon, A.-F., Torregrosa, L., Merdinoglu, D., and Wiedemann-Merdinoglu, S. (2000). Vers l'obtention de variétés de vigne résistantes à l'oïdium et au mildiou par les méthodes conventionnelles et biotechnologiques. Bull. OIV 73, 445–452.
- Boursiquot, J.-M., Lacombe, T., Laucou, V., Julliard, S., Perrin, F.-X., Lanier, N., Legrand, D., Meredith, C., and This, P. (2009). Parentage of Merlot and related winegrape cultivars of southwestern France : discovery of the missing link. Aust. J. Grape Wine Res. 15, 144–155.
- Bressan, A., Girolami, V., and Boudon-Padieu, E. (2005a). Reduced fitness of the leafhopper vector *Scaphoideus titanus* exposed to Flavescence dorée phytoplasma. Entomol. Exp. Appl. 115, 283–290.
- Bressan, A., Spiazzi, S., Girolami, V., and Boudon-Padieu, E. (2005b). Acquisition efficiency of Flavescence dorée phytoplasma by *Scaphoideus titanus* Ball from infected tolerant or susceptible grapevine cultivars or experimental host plants. VITIS-GEILWEILERHOF- 44, 143.
- Bressan, A., Larrue, J., and Boudon Padieu, E. (2006). Patterns of phytoplasma-infected and infective *Scaphoideus titanus* leafhoppers in vineyards with high incidence of Flavescence dorée. Entomol. Exp. Appl. 119, 61–69.
- Broekaert, W.F., Delauré, S.L., Bolle, M.F.C.D., and Cammue, B.P.A. (2006). The Role of Ethylene in Host-Pathogen Interactions. Annu. Rev. Phytopathol. 44, 393–416.
- Browse, J. (2009). Jasmonate Passes Muster: A Receptor and Targets for the Defense Hormone. Annu. Rev. Plant Biol. 60, 183–205.
- Carle, P., Malembic-Maher, S., Arricau-Bouvery, N., Desqué, D., Eveillard, S., Carrere, S., and Foissac, X. (2011). "Flavescence dorée" phytoplasma genome : A metabolism oriented towards glycolysis and protein degradation. Bull. Insectology 64 (Supplement), S13–S14.
- Caruso, F., Mendoza, L., Castro, P., Cotoras, M., Aguirre, M., Matsuhira, B., Isaacs, M., Rossi, M., Viglianti, A., and Antonioletti, R. (2011). Antifungal activity of resveratrol against *Botrytis cinerea* is improved using 2-furyl derivatives. PloS One 6, e25421.
- Caudwell, A. (1957). Deux années d'études sur la Flavescence Dorée, nouvelle maladie grave de la Vigne. Ann. L'Amélioration Plantes 4:359-393.
- Caudwell, A. (1964). Identification d'une nouvelle maladie à virus de la vigne, la « Flavescence Dorée ». Etude des phénomènes de localisation des symptômes et de rétablissement. Ann. Epiphyt. 15 193pp.

- Caudwell, A. (1971). Etude du rôle de particules de type « mycoplasme » dans l'étiologie de la flavescence dorée de la vigne. Examen cytologique des plantes malades et des cicadelles infectieuses. *Ann Physiopathol* 3, 107–123.
- Caudwell, A., Kuszala, C., Larrue, J., and Bachelier, J. (1972). Transmission de la Flavescence dorée de la vigne par des cicadelles des genres *Euscelis* et *Eusceliditis*. Intervention possible de ces insectes dans l'épidémiologie du bois noir en Bourgogne. *Ann. Pathol. Hors Séries* 181–189.
- Caudwell, A., Larrue, J., Boudon-Padieu, E., and Mclean, G. d. (1997). Flavescence dorée elimination from dormant wood of grapevines by hot-water treatment. *Aust. J. Grape Wine Res.* 3, 21–25.
- Chang, X., Heene, E., Qiao, F., and Nick, P. (2011). The Phytoalexin Resveratrol Regulates the Initiation of Hypersensitive Cell Death in *Vitis* Cell. *PLoS ONE* 6.
- Chezem, W.R., Memon, A., Li, F.-S., Weng, J.-K., and Clay, N.K. (2017). SG2-Type R2R3-MYB Transcription Factor MYB15 Controls Defense-Induced Lignification and Basal Immunity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 29, 1907–1926.
- Chiba, S., Akiyama, Y., Mori, H., Matsuo, E., and Ito, K. (2000). Length recognition at the N-terminal tail for the initiation of FtsH-mediated proteolysis. *EMBO Rep.* 1, 47–52.
- Chiba, S., Akiyama, Y., and Ito, K. (2002). Membrane Protein Degradation by FtsH Can Be Initiated from Either End. *J. Bacteriol.* 184, 4775–4782.
- Chini, A., Fonseca, S., Fernández, G., Adie, B., Chico, J.M., Lorenzo, O., García-Casado, G., López-Vidriero, I., Lozano, F.M., Ponce, M.R., et al. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature* 448, 666–671.
- Choi, J., Huh, S.U., Kojima, M., Sakakibara, H., Paek, K.-H., and Hwang, I. (2010). The cytokinin-activated transcription factor ARR2 promotes plant immunity via TGA3/NPR1-dependent salicylic acid signaling in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* 19, 284–295.
- Choi, Y.H., Tapias, E.C., Kim, H.K., Lefeber, A.W.M., Erkelens, C., Verhoeven, J.T.J., Brzin, J., Zel, J., and Verpoorte, R. (2004). Metabolic Discrimination of *Catharanthus roseus* Leaves Infected by *Phytoplasma* Using 1H-NMR Spectroscopy and Multivariate Data Analysis. *Plant Physiol.* 135, 2398–2410.
- Christensen, A.B., Thordal-Christensen, H., Zimmermann, G., Gjetting, T., Lyngkjaer, M.F., Dudler, R., and Schweizer, P. (2004). The germinlike protein GLP4 exhibits superoxide dismutase activity and is an important component of quantitative resistance in wheat and barley. *Mol. Plant-Microbe Interact.* MPMI 17, 109–117.
- Christensen, N.M., Axelsen, K.B., Nicolaisen, M., and Schulz, A. (2005). Phytoplasmas and their interactions with hosts. *Trends Plant Sci.* 10, 526–535.
- Chuche, J., and Thiéry, D. (2014). Biology and ecology of the Flavescence dorée vector *Scaphoideus titanus*: a review. *Agron. Sustain. Dev.* 34, 381–403.
- Chuche, J., Desvignes, E., Bonnard, O., and Thiéry, D. (2015). Phenological synchrony between *Scaphoideus titanus* (Hemiptera: Cicadellidae) hatchings and grapevine bud break: could this explain the insect's expansion? *Bull. Entomol. Res.* 105, 82–91.

- Chuche, J., Boudon-Padieu, E., and Thiéry, D. (2016). Host preferences of the leafhopper *Scaphoideus titanus*, vector of “flavescence dorée” phytoplasma. *Phytopathogenic Mollicutes* 6, 38.
- Cokl, A., and Virant-Doberlet, M. (2003). Communication with substrate-borne signals in small plant-dwelling insects. *Annu. Rev. Entomol.* 48, 29–50.
- Contaldo, N., Bertaccini, A., Paltrinieri, S., Windsor, H.M., and Windsor, G.D. (2012). Axenic culture of plant pathogenic phytoplasmas. *Phytopathol. Mediterr.* 51, 607–617.
- Cookson, S.J., Clemente Moreno, M.J., Hevin, C., Nyamba Mendome, L.Z., Delrot, S., Trossat-Magnin, C., and Ollat, N. (2013). Graft union formation in grapevine induces transcriptional changes related to cell wall modification, wounding, hormone signalling, and secondary metabolism. *J. Exp. Bot.* 64, 2997–3008.
- D Amelio, R., Marzachi, C., and Bosco, D. (2007). Double infection of “*Candidatus* Phytoplasma asteris” and “flavescence doree” phytoplasma in the vector *Euscelidius variegatus*. *Bull. Insectology* 60, 223.
- Dai, G. (1995). Histochemical Responses of Leaves of In Vitro Plantlets of *Vitis* spp. to Infection with *Plasmopara viticola*. *Phytopathology* 85, 149–154.
- Daire, X., Clair, D., Reinert, W., and Boudon-Padieu, E. (1997). Detection and differentiation of grapevine yellows phytoplasmas belonging to the elm yellows group and to the stolbur subgroup by PCR amplification of non-ribosomal DNA. *Eur. J. Plant Pathol.* 103, 507–514.
- Dangl, J., Dietrich, R., and Richberg, M. (1996). Death Don't Have No Mercy: Cell Death Programs in Plant-Microbe Interactions. *Plant Cell* 8, 1793–1807.
- De Marco, F., Pagliari, L., Degola, F., Buxa, S.V., Loschi, A., Dinant, S., Le Hir, R., Morin, H., Santi, S., and Musetti, R. (2016). Combined microscopy and molecular analyses show phloem occlusions and cell wall modifications in tomato leaves in response to “*Candidatus* Phytoplasma solani.” *J. Microsc.* 263, 212–225.
- Dhekney, S.A., Li, Z.T., and Gray, D.J. (2011). Grapevines engineered to express cisgenic *Vitis vinifera* thaumatin-like protein exhibit fungal disease resistance. *Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 47, 458–466.
- Doi, Y., Teranaka, M., Yora, K., and Asuyama, H. (1967). Mycoplasma- or PLT Group-like Microorganisms Found in the Phloem Elements of Plants Infected with Mulberry Dwarf, Potato Witches' Broom, Aster Yellows, or Paulownia Witches' Broom. *Jpn. J. Phytopathol.* 33, 259–266.
- Dong, J., Chen, C., and Chen, Z. (2003). Expression profiles of the *Arabidopsis* WRKY gene superfamily during plant defense response. *Plant Mol. Biol.* 51, 21–37.
- Dufour, M.-C., Magnin, N., Dumas, B., Vergnes, S., and Corio-Costet, M.-F. (2016). High-throughput gene-expression quantification of grapevine defense responses in the field using microfluidic dynamic arrays. *BMC Genomics* 17, 957.
- EFSA Panel on Plant Health (PLH) (2014). Scientific Opinion on pest categorisation of Grapevine Flavescence dorée: Grapevine Flavescence dorée pest categorisation. *EFSA J.* 12, 3851.
- El-Showk, S., Ruonala, R., and Helariutta, Y. (2013a). Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Development* 140, 1373–1383.

- El-Showk, S., Ruonala, R., and Helariutta, Y. (2013b). Crossing paths: cytokinin signalling and crosstalk. *Dev. Camb. Engl.* *140*, 1373–1383.
- Eulgem, T., and Somssich, I.E. (2007). Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr. Opin. Plant Biol.* *10*, 366–371.
- Eulgem, T., Rushton, P.J., Robatzek, S., and Somssich, I.E. (2000). The WRKY superfamily of plant transcription factors. *Trends Plant Sci.* *5*, 199–206.
- Eveillard, S., Jollard, C., Labroussaa, F., Khalil, D., Perrin, M., Desqué, D., Salar, P., Razan, F., Hévin, C., Bordenave, L., et al. (2016). Contrasting Susceptibilities to Flavescence Dorée in *Vitis vinifera*, Rootstocks and Wild Vitis Species. *Front. Plant Sci.* *7*.
- Faurie, B., Cluzet, S., and Mérillon, J.-M. (2009). Implication of signaling pathways involving calcium, phosphorylation and active oxygen species in methyl jasmonate-induced defense responses in grapevine cell cultures. *J. Plant Physiol.* *166*, 1863–1877.
- Felix, G., Duran, J.D., Volko, S., and Boller, T. (1999). Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *Plant J.* *18*, 265–276.
- Ferreira, R.B., Monteiro, S.S., Piçarra-Pereira, M.A., and Teixeira, A.R. (2004). Engineering grapevine for increased resistance to fungal pathogens without compromising wine stability. *Trends Biotechnol.* *22*, 168–173.
- Filippin, L., Jović, J., Cvrković, T., Forte, V., Clair, D., Toševski, I., Boudon-Padieu, E., Borgo, M., and Angelini, E. (2009). Molecular characteristics of phytoplasmas associated with Flavescence dorée in clematis and grapevine and preliminary results on the role of *Dictyophara europaea* as a vector. *Plant Pathol.* *58*, 826–837.
- Fonseca, S., Chini, A., Hamberg, M., Adie, B., Porzel, A., Kramell, R., Miersch, O., Wasternack, C., and Solano, R. (2009). (+)-7-iso-Jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Nat. Chem. Biol.* *5*, 344–350.
- Foyer, C.H., and Noctor, G. (2005). Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses. *Plant Cell* *17*, 1866–1875.
- Gai, Y.-P., Han, X.-J., Li, Y.-Q., Yuan, C.-Z., Mo, Y.-Y., Guo, F.-Y., Liu, Q.-X., and Ji, X.-L. (2014). Metabolomic analysis reveals the potential metabolites and pathogenesis involved in mulberry yellow dwarf disease. *Plant Cell Environ.* *37*, 1474–1490.
- Galetto, L., Marzachi, C., Marques, R., Graziano, C., and Bosco, D. (2011). Effects of temperature and CO₂ on phytoplasma multiplication pattern in vector and plant. *Bull Insectol* *64*, S151–S152.
- Galetto, L., Miliordos, D., Roggia, C., Rashidi, M., Sacco, D., Marzachi, C., and Bosco, D. (2014). Acquisition capability of the grapevine Flavescence dorée by the leafhopper vector *Scaphoideus titanus* Ball correlates with phytoplasma titre in the source plant. *J. Pest Sci.* *87*, 671–679.
- Gambino, G., Boccacci, P., Margaria, P., Palmano, S., and Gribaudo, I. (2013). Hydrogen peroxide accumulation and transcriptional changes in grapevines recovered from flavescence dorée disease. *Phytopathology* *103*, 776–784.
- García-Limones, C., Hervás, A., Navas-Cortés, J.A., Jiménez-Díaz, R.M., and Tena, M. (2002). Induction of an antioxidant enzyme system and other oxidative stress markers associated with compatible and

incompatible interactions between chickpea (*Cicer arietinum* L.) and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* *61*, 325–337.

Ge, Z., and Taylor, D.E. (1996). Sequencing, expression, and genetic characterization of the *Helicobacter pylori* ftsH gene encoding a protein homologous to members of a novel putative ATPase family. *J. Bacteriol.* *178*, 6151–6157.

Gilroy, S., Suzuki, N., Miller, G., Choi, W.-G., Toyota, M., Devireddy, A.R., and Mittler, R. (2014). A tidal wave of signals: calcium and ROS at the forefront of rapid systemic signaling. *Trends Plant Sci.* *19*, 623–630.

Göhre, V., and Robatzek, S. (2008). Breaking the Barriers: Microbial Effector Molecules Subvert Plant Immunity. *Annu. Rev. Phytopathol.* *46*, 189–215.

Gómez-Gómez, L., Felix, G., and Boller, T. (1999). A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *18*, 277–284.

Green, R., and Fluhr, R. (1995). UV-B-induced PR-1 accumulation is mediated by active oxygen species. *Plant Cell* *7*, 203–212.

Gu, Y.-Q., Wildermuth, M.C., Chakravarthy, S., Loh, Y.-T., Yang, C., He, X., Han, Y., and Martin, G.B. (2002). Tomato transcription factors *pti4*, *pti5*, and *pti6* activate defense responses when expressed in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *14*, 817–831.

Gutierrez, N., Giménez, M.J., Palomino, C., and Avila, C.M. (2011). Assessment of candidate reference genes for expression studies in *Vicia faba* L. by real-time quantitative PCR. *Mol. Breed.* *28*, 13–24.

Hamiduzzaman, M.M., Jakab, G., Barnavon, L., Neuhaus, J.-M., and Mauch-Mani, B. (2005). beta-Aminobutyric acid-induced resistance against downy mildew in grapevine acts through the potentiation of callose formation and jasmonic acid signaling. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* *18*, 819–829.

Hammerschmidt, R. (2004). Metabolic fate of resveratrol: key to resistance in grape? *Physiol. Mol. Plant Pathol.*

Hann, D.R., and Rathjen, J.P. (2007). Early events in the pathogenicity of *Pseudomonas syringae* on *Nicotiana benthamiana*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *49*, 607–618.

Harrison, N.A., Griffiths, H.M., Carpio, M.L., and Richardson, P.A. (2001). Detection and characterization of an elm yellows (16SrV) group phytoplasma infecting Virginia creeper plants in southern Florida. *Plant Dis.* *85*, 1055–1062.

He, M., Xu, Y., Cao, J., Zhu, Z., Jiao, Y., Wang, Y., Guan, X., Yang, Y., Xu, W., and Fu, Z. (2013). Subcellular localization and functional analyses of a PR10 protein gene from *Vitis pseudoreticulata* in response to *Plasmopara viticola* infection. *Protoplasma* *250*, 129–140.

Heil, M., and Ton, J. (2008). Long-distance signalling in plant defence. *Trends Plant Sci.* *13*, 264–272.

Hématy, K., Sado, P.-E., Van Tuinen, A., Rochange, S., Desnos, T., Balzergue, S., Pelletier, S., Renou, J.-P., and Höfte, H. (2007). A receptor-like kinase mediates the response of *Arabidopsis* cells to the inhibition of cellulose synthesis. *Curr. Biol. CB* *17*, 922–931.

- Henanff, G.L., Farine, S., Kieffer-Mazet, F., Miclot, A.-S., Heitz, T., Mestre, P., Bertsch, C., and Chong, J. (2011). *Vitis vinifera* VvNPR1.1 is the functional ortholog of AtNPR1 and its overexpression in grapevine triggers constitutive activation of PR genes and enhanced resistance to powdery mildew. *Planta* 234, 405–417.
- Heredia, A., Jiménez, A., and Guillén, R. (1995). Composition of plant cell walls. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 200, 24–31.
- Herman, C., Prakash, S., Lu, C.Z., Matouschek, A., and Gross, C.A. (2003). Lack of a robust unfoldase activity confers a unique level of substrate specificity to the universal AAA protease FtsH. *Mol. Cell* 11, 659–669.
- Herrera-Vásquez, A., Salinas, P., and Holuigue, L. (2015). Salicylic acid and reactive oxygen species interplay in the transcriptional control of defense genes expression. *Front. Plant Sci.* 6.
- Hogenhout, S.A., Oshima, K., Ammar, E.-D., Kakizawa, S., Kingdom, H.N., and Namba, S. (2008). Phytoplasmas: bacteria that manipulate plants and insects. *Mol. Plant Pathol.* 9, 403–423.
- Horvath, D.P., Anderson, J.V., Chao, W.S., and Foley, M.E. (2003). Knowing when to grow: signals regulating bud dormancy. *Trends Plant Sci.* 8, 534–540.
- Hoshi, A., Oshima, K., Kakizawa, S., Ishii, Y., Ozeki, J., Hashimoto, M., Komatsu, K., Kagiwada, S., Yamaji, Y., and Namba, S. (2009). A unique virulence factor for proliferation and dwarfism in plants identified from a phytopathogenic bacterium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 6416–6421.
- Hou, X., Lee, L.Y.C., Xia, K., Yan, Y., and Yu, H. (2010). DELLAs modulate jasmonate signaling via competitive binding to JAZs. *Dev. Cell* 19, 884–894.
- Hren, M., Nikolić, P., Rotter, A., Blejec, A., Terrier, N., Ravnikar, M., Dermastia, M., and Gruden, K. (2009a). “Bois noir” phytoplasma induces significant reprogramming of the leaf transcriptome in the field grown grapevine. *BMC Genomics* 10, 460.
- Hren, M., Ravnikar, M., Brzin, J., Ermacora, P., Carraro, L., Bianco, P.A., Casati, P., Borgo, M., Angelini, E., Rotter, A., et al. (2009b). Induced expression of sucrose synthase and alcohol dehydrogenase I genes in phytoplasma-infected grapevine plants grown in the field. *Plant Pathol.* 58, 170–180.
- Hückelhoven, R. (2007). Cell Wall–Associated Mechanisms of Disease Resistance and Susceptibility. *Annu. Rev. Phytopathol.* 45, 101–127.
- Huglin, P., and Scheider, C. (1998). *Biologie et écologie de la vigne*. Tec Doc Paris.
- Iriti, M., Rossoni, M., Borgo, M., and Faoro, F. (2004). Benzothiadiazole enhances resveratrol and anthocyanin biosynthesis in grapevine, meanwhile improving resistance to *Botrytis cinerea*. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4406–4413.
- IRPCM Phytoplasma/Spiroplasma Working Team--Phytoplasma Taxonomy Group (2004). ‘*Candidatus Phytoplasma*’, a taxon for the wall-less, non-helical prokaryotes that colonize plant phloem and insects. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1243–1255.
- Ito, K., and Akiyama, Y. (2005). Cellular Functions, Mechanism of Action, and Regulation of FtsH Protease. *Annu. Rev. Microbiol.* 59, 211–231.

- Jaillon, O., Aury, J.-M., Noel, B., Policriti, A., Clepet, C., Casagrande, A., Choisne, N., Aubourg, S., Vitulo, N., Jubin, C., et al. (2007). The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* *449*, 463–467.
- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* *444*, 323–329.
- Junqueira, A., Bedendo, I., and Pascholati, S. (2004). Biochemical changes in corn plants infected by the maize bushy stunt phytoplasma. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* *65*, 181–185.
- Kakizawa, S., Oshima, K., Kuboyama, T., Nishigawa, H., Jung, H., Sawayanagi, T., Tsuchizaki, T., Miyata, S., Ugaki, M., and Namba, S. (2001). Cloning and expression analysis of Phytoplasma protein translocation genes. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* *14*, 1043–1050.
- Kakizawa, S., Oshima, K., Nishigawa, H., Jung, H.-Y., Wei, W., Suzuki, S., Tanaka, M., Miyata, S., Ugaki, M., and Namba, S. (2004). Secretion of immunodominant membrane protein from onion yellows phytoplasma through the Sec protein-translocation system in *Escherichia coli*. *Microbiol. Read. Engl.* *150*, 135–142.
- Käll, L., Krogh, A., and Sonnhammer, E.L.L. (2004). A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method. *J. Mol. Biol.* *338*, 1027–1036.
- Kessler, A., Halitschke, R., and Baldwin, I.T. (2004). Silencing the jasmonate cascade: induced plant defenses and insect populations. *Science* *305*, 665–668.
- Kihara, A., Akiyama, Y., and Ito, K. (1995). FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SecY, an essential protein translocase subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *92*, 4532–4536.
- Kolattukudy, P.E. (1985). Enzymatic Penetration of the Plant Cuticle by Fungal Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.*
- Kopylova, E., Noé, L., and Touzet, H. (2012). SortMeRNA: fast and accurate filtering of ribosomal RNAs in metatranscriptomic data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *28*, 3211–3217.
- Krnjajic, S., Mitrovic, M., Cvrkovic, T., Jovic, J., Petrovic, A., Forte, V., Angelini, E., and Tosevski, I. (2007). Occurrence and distribution of *Scaphoideus titanus* in multiple outbreaks of “flavescence doree” in Serbia. *Bull. Insectology* *60*, 197.
- Krzywda, S., Brzozowski, A.M., Verma, C., Karata, K., Ogura, T., and Wilkinson, A.J. (2002). The Crystal Structure of the AAA Domain of the ATP-Dependent Protease FtsH of *Escherichia coli* at 1.5 Å Resolution. *Structure* *10*, 1073–1083.
- Kurusu, T., Yagala, T., Miyao, A., Hirochika, H., and Kuchitsu, K. (2005). Identification of a putative voltage-gated Ca²⁺ channel as a key regulator of elicitor-induced hypersensitive cell death and mitogen-activated protein kinase activation in rice. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *42*, 798–809.
- Kuske, C.R. (1992). Distribution and Multiplication of Western Aster Yellows Mycoplasma-like Organisms in *Catharanthus roseus* as Determined by DNA Hybridization Analysis. *Phytopathology* *82*, 457.
- Lam, E., Kato, N., and Lawton, M. (2001). Programmed cell death, mitochondria and the plant hypersensitive response. *Nature* *411*, 848–853.

- Lamb, C., and Dixon, R.A. (1997). The Oxidative Burst in Plant Disease Resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* *48*, 251–275.
- Langcake, P. (Shell R.L., and Pryce, R.J. (1976). The production of resveratrol by *Vitis vinifera* and other members of the Vitaceae as a response to infection or injury. *Physiol. Plant Pathol.* UK.
- Lange, J., Mohr, U., Wiemken, A., Boller, T., and Vögeli-Lange, R. (1996). Proteolytic processing of class IV chitinase in the compatible interaction of bean roots with *Fusarium solani*. *Plant Physiol.* *111*, 1135–1144.
- Langklotz, S., Baumann, U., and Narberhaus, F. (2012). Structure and function of the bacterial AAA protease FtsH. *Biochim. Biophys. Acta* *1823*, 40–48.
- Langmead, B., and Salzberg, S.L. (2012). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* *9*, 357–359.
- Lartigue, C., Glass, J.I., Alperovich, N., Pieper, R., Parmar, P.P., Hutchison, C.A., Smith, H.O., and Venter, J.C. (2007). Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. *Science* *317*, 632–638.
- Lartigue, C., Vashee, S., Algire, M.A., Chuang, R.-Y., Benders, G.A., Ma, L., Noskov, V.N., Denisova, E.A., Gibson, D.G., Assad-Garcia, N., et al. (2009). Creating bacterial strains from genomes that have been cloned and engineered in yeast. *Science* *325*, 1693–1696.
- Le, M.H., Cao, Y., Zhang, X.-C., and Stacey, G. (2014). LIK1, a CERK1-interacting kinase, regulates plant immune responses in *Arabidopsis*. *PLoS One* *9*, e102245.
- Lebel, E., Heifetz, P., Thorne, L., Uknes, S., Ryals, J., and Ward, E. (1998). Functional analysis of regulatory sequences controlling PR-1 gene expression in *Arabidopsis*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *16*, 223–233.
- Lee, I.M., Davis, R.E., and Gundersen-Rindal, D.E. (2000). Phytoplasma: phytopathogenic mollicutes. *Annu. Rev. Microbiol.* *54*, 221–255.
- Lefol, C., Lherminier, J., Boudon-Padieu, E., Larrue, J., Louis, C., and Caudwell, A. (1994). Propagation of Flavescence dorée MLO (Mycoplasma-like Organism) in the Leafhopper Vector *Euscelidius variegatus* Kbm. *J. Invertebr. Pathol.* *63*, 285–293.
- Lepka, P., Stitt, M., Moll, E., and Seemüller, E. (1999). Effect of phytoplasmal infection on concentration and translocation of carbohydrates and amino acids in periwinkle and tobacco. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* *55*, 59–68.
- Lherminier, J., Courtois, M., and Caudwell, A. (1994). Determination of the distribution and multiplication sites of Flavescence Dorée mycoplasma-like organisms in the host plant *Vicia faba* by ELISA and immunocytochemistry. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* *45*, 125–138.
- Li, J., Brader, G., and Palva, E.T. (2004). The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense. *Plant Cell* *16*, 319–331.
- Li, X., Wu, J., Yin, L., Zhang, Y., Qu, J., and Lu, J. (2015). Comparative transcriptome analysis reveals defense-related genes and pathways against downy mildew in *Vitis amurensis* grapevine. *Plant Physiol. Biochem.* *95*, 1–14.

- Liehl, P., Blight, M., Vodovar, N., Boccard, F., and Lemaitre, B. (2006). Prevalence of Local Immune Response against Oral Infection in a *Drosophila/Pseudomonas* Infection Model. *PLOS Pathog.* *2*, e56.
- Linder, C., Kehrli, P., Jermini, M., Bünter, M., and Blaser, S. (2017). Distribution du vecteur de la flavescence dorée *Scaphoideus titanus* en Suisse. *Rev. Suisse Vitic. Arboric. Hortic.* *49*, 63–65.
- Lithgow, J.K. (2004). Role of the hprT-ftsH locus in *Staphylococcus aureus*. *Microbiology* *150*, 373–381.
- Loake, G., and Grant, M. (2007). Salicylic acid in plant defence--the players and protagonists. *Curr. Opin. Plant Biol.* *10*, 466–472.
- van Loon, L.C., Rep, M., and Pieterse, C.M.J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* *44*, 135–162.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J.J., and Solano, R. (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR 1 integrates signals from ethylene and jasmonate pathways in plant defense. *Plant Cell* *15*, 165–178.
- Lortzing, T., and Steppuhn, A. (2016). Jasmonate signalling in plants shapes plant-insect interaction ecology. *Curr. Opin. Insect Sci.* *14*, 32–39.
- Lu, Y.-T., Li, M.-Y., Cheng, K.-T., Tan, C.M., Su, L.-W., Lin, W.-Y., Shih, H.-T., Chiou, T.-J., and Yang, J.-Y. (2014). Transgenic plants that express the phytoplasma effector SAP11 show altered phosphate starvation and defense responses. *Plant Physiol.* *164*, 1456–1469.
- Ma, W., and Berkowitz, G.A. (2007). The grateful dead: calcium and cell death in plant innate immunity. *Cell. Microbiol.* *9*, 2571–2585.
- Mackey, D., and McFall, A.J. (2006). MAMPs and MIMPs: proposed classifications for inducers of innate immunity. *Mol. Microbiol.* *61*, 1365–1371.
- MacLean, A.M., Sugio, A., Makarova, O.V., Findlay, K.C., Grieve, V.M., Tóth, R., Nicolaisen, M., and Hogenhout, S.A. (2011). Phytoplasma effector SAP54 induces indeterminate leaf-like flower development in Arabidopsis plants. *Plant Physiol.* *157*, 831–841.
- MacLean, A.M., Orlovskis, Z., Kowitwanich, K., Zdziarska, A.M., Angenent, G.C., Immink, R.G.H., and Hogenhout, S.A. (2014). Phytoplasma effector SAP54 hijacks plant reproduction by degrading MADS-box proteins and promotes insect colonization in a RAD23-dependent manner. *PLoS Biol.* *12*, e1001835.
- Maixner, M., Reinert, W., Darimont, H., and others (2000). Transmission of grapevine yellows by *Oncopsis alni* (Schrank)(Auchenorrhyncha: Macropsinae). *Vitis* *39*, 83–84.
- Makarova, O., MacLean, A.M., and Nicolaisen, M. (2015). Phytoplasma adapt to the diverse environments of their plant and insect hosts by altering gene expression. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* *91*, 81–87.
- Malembic-Maher, S., Constable, F., Cimerman, A., Arnaud, G., Carle, P., Foissac, X., and Boudon-Padiou, E. (2008). A chromosome map of the Flavescence doree phytoplasma. *Microbiol. Read. Engl.* *154*, 1454–1463.
- Malembic-Maher, S., Khalil, D., Labroussaa, F., Bordenave, L., Hévin, C., Perrin, M., Masson, J.E., Foissac, X., and Eveillard, S. (2015). Flavescence dorée, sensibilité du matériel végétal : impact sur le

développement de la maladie, l'expression des symptômes et la mortalité des ceps. 12ème Journ. Tech. CIVB.

Margaria, P., and Palmano, S. (2011). Response of the *Vitis vinifera* L. cv. "Nebbiolo" proteome to Flavescence dorée phytoplasma infection. *Proteomics* *11*, 212–224.

Margaria, P., Ferrandino, A., Caciagli, P., Kedrina, O., Schubert, A., and Palmano, S. (2014). Metabolic and transcript analysis of the flavonoid pathway in diseased and recovered Nebbiolo and Barbera grapevines (*Vitis vinifera* L.) following infection by Flavescence dorée phytoplasma. *Plant Cell Environ.* *37*, 2183–2200.

Mason, M.G., Mathews, D.E., Argyros, D.A., Maxwell, B.B., Kieber, J.J., Alonso, J.M., Ecker, J.R., and Schaller, G.E. (2005). Multiple type-B response regulators mediate cytokinin signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* *17*, 3007–3018.

Maust, B.E., Espadas, F., Talavera, C., Aguilar, M., Santamaría, J.M., and Oropeza, C. (2003). Changes in carbohydrate metabolism in coconut palms infected with the lethal yellowing phytoplasma. *Phytopathology* *93*, 976–981.

McCarthy, D.J., Chen, Y., and Smyth, G.K. (2012). Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Res.* *40*, 4288–4297.

McGuinness, D.H., Dehal, P.K., and Pleass, R.J. (2003). Pattern recognition molecules and innate immunity to parasites. *Trends Parasitol.* *19*, 312–319.

Miliordos, D.E., Galetto, L., Ferrari, E., Pegoraro, M., Marzachi, C., and Bosco, D. (2017). Acibenzolar-S-methyl may prevent vector-mediated flavescence dorée phytoplasma transmission, but is ineffective in inducing recovery of infected grapevines. *Pest Manag. Sci.* *73*, 534–540.

Miozzi, L., Napoli, C., Sardo, L., and Accotto, G.P. (2014). Transcriptomics of the interaction between the monopartite phloem-limited geminivirus tomato yellow leaf curl Sardinia virus and *Solanum lycopersicum* highlights a role for plant hormones, autophagy and plant immune system fine tuning during infection. *PLoS One* *9*, e89951.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci.* *7*, 405–410.

Miyaji, N., Shimizu, M., Miyazaki, J., Osabe, K., Sato, M., Ebe, Y., Takada, S., Kaji, M., Dennis, E.S., Fujimoto, R., et al. (2017). Comparison of transcriptome profiles by *Fusarium oxysporum* inoculation between *Fusarium* yellows resistant and susceptible lines in *Brassica rapa* L. *Plant Cell Rep.* doi.org/10.1007/s00299-017-2198-9

Monteiro, S., Barakat, M., Piçarra-Pereira, M.A., Teixeira, A.R., and Ferreira, R.B. (2003). Osmotin and thaumatin from grape: a putative general defense mechanism against pathogenic fungi. *Phytopathology* *93*, 1505–1512.

Morone, C., Boveri, M., Giosuè, S., Gotta, P., Rossi, V., Scapin, I., and Marzachi, C. (2007). Epidemiology of Flavescence Dorée in Vineyards in Northwestern Italy. *Phytopathology* *97*, 1422–1427.

Morrell, P.L., Buckler, E.S., and Ross-Ibarra, J. (2012). Crop genomics: advances and applications. *Nat. Rev. Genet.* *13*, 85–96.

- Mur, L.A.J., Kenton, P., Lloyd, A.J., Ougham, H., and Prats, E. (2008). The hypersensitive response; the centenary is upon us but how much do we know? *J. Exp. Bot.* *59*, 501–520.
- Murray, R.G., and Schleifer, K.. (1994). Taxonomic Notes - a Proposal for Recording the Properties of Putative Taxa of Prokaryotes. *44*, 174–176.
- Musetti, R., Marabottini, R., Badiani, M., Martini, M., Toppi, L.S. di, Borselli, S., Borgo, M., and Osler, R. (2007). On the role of H₂O₂ in the recovery of grapevine (*Vitis vinifera* cv. Prosecco) from Flavescence dorée disease. *Funct. Plant Biol.* *34*, 750–758.
- Narberhaus, F., Obrist, M., Führer, F., and Langklotz, S. (2009). Degradation of cytoplasmic substrates by FtsH, a membrane-anchored protease with many talents. *Res. Microbiol.* *160*, 652–659.
- Narendra, S., Venkataramani, S., Shen, G., Wang, J., Pasapula, V., Lin, Y., Kornyejev, D., Holaday, A.S., and Zhang, H. (2006). The *Arabidopsis* ascorbate peroxidase 3 is a peroxisomal membrane-bound antioxidant enzyme and is dispensable for *Arabidopsis* growth and development. *J. Exp. Bot.* *57*, 3033–3042.
- Naumann, T.A., Wicklow, D.T., and Price, N.P.J. (2011). Identification of a Chitinase-modifying Protein from *Fusarium verticillioides*. *J. Biol. Chem.* *286*, 35358–35366.
- Nilsson, D., Lauridsen, A.A., Tomoyasu, T., and Ogura, T. (1994). A *Lactococcus lactis* gene encodes a membrane protein with putative ATPase activity that is homologous to the essential *Escherichia coli* *ftsH* gene product. *Microbiol. Read. Engl.* *140 (Pt 10)*, 2601–2610.
- Nimchuk, Z., Eulgem, T., Holt, B.F., and Dangl, J.L. (2003). Recognition and Response in the Plant Immune System. *Annu. Rev. Genet.* *37*, 579–609.
- Niwa, H., Tsuchiya, D., Makyio, H., Yoshida, M., and Morikawa, K. (2002). Hexameric Ring Structure of the ATPase Domain of the Membrane-Integrated Metalloprotease FtsH from *Thermus thermophilus* HB8. *Structure* *10*, 1415–1424.
- Noctor, G., and Foyer, C.H. (1998). ASCORBATE AND GLUTATHIONE: Keeping Active Oxygen Under Control. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* *49*, 249–279.
- Ogura, T., Inoue, K., Tatsuta, T., Suzuki, T., Karata, K., Young, K., Su, L.-H., Fierke, C.A., Jackman, J.E., Raetz, C.R.H., et al. (1999). Balanced biosynthesis of major membrane components through regulated degradation of the committed enzyme of lipid A biosynthesis by the AAA protease FtsH (HflB) in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* *31*, 833–844.
- Osborn, A.E. (1996). Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* *8*, 1821.
- Pagliari, L., Martini, M., Loschi, A., and Musetti, R. (2016). Looking inside phytoplasma-infected sieve elements: A combined microscopy approach using *Arabidopsis thaliana* as a model plant. *Micron* *89*, 87–97.
- Papura, D., Delmotte, F., Giresse, X., Salar, P., Danet, J.L., Van Helden, M., Foissac, X., and Malembic-Maher, S. (2009). Comparing the spatial genetic structures of the Flavescence dorée phytoplasma and its leafhopper vector *Scaphoideus titanus*. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* *9*, 867–876.

- Park, C.-J., Kim, K.-J., Shin, R., Park, J.M., Shin, Y.-C., and Paek, K.-H. (2004). Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway. *Plant J.* *37*, 186–198.
- Park, S.-W., Kaimoyo, E., Kumar, D., Mosher, S., and Klessig, D.F. (2007). Methyl salicylate is a critical mobile signal for plant systemic acquired resistance. *Science* *318*, 113–116.
- Park, S.-W., Liu, P.-P., Forouhar, F., Vlot, A.C., Tong, L., Tietjen, K., and Klessig, D.F. (2009). Use of a Synthetic Salicylic Acid Analog to Investigate the Roles of Methyl Salicylate and Its Esterases in Plant Disease Resistance. *J. Biol. Chem.* *284*, 7307–7317.
- Perrin, M., Gertz, C., and Masson, J.E. (2004). High efficiency initiation of regenerable embryogenic callus from anther filaments of 19-grapevine genotypes grown worldwide. *Plant Sci.* *167*, 1343–1349.
- Pezet, R., Gindro, K., Viret, O., and Spring, J.L. (2004). Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downey mildew. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*
- Pieterse, C.M.J., Leon-Reyes, A., Van der Ent, S., and Van Wees, S.C.M. (2009). Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat. Chem. Biol.* *5*, 308–316.
- Pitzschke, A., Schikora, A., and Hirt, H. (2009). MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.* *12*, 421–426.
- Poinssot, B., Vandelle, E., Bentéjac, M., Adrian, M., Levis, C., Brygoo, Y., Garin, J., Sicilia, F., Coutos-Thévenot, P., and Pugin, A. (2003). The endopolygalacturonase 1 from *Botrytis cinerea* activates grapevine defense reactions unrelated to its enzymatic activity. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *16*, 553–564.
- Pourcel, L., Routaboul, J.-M., Cheynier, V., Lepiniec, L., and Debeaujon, I. (2007). Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends Plant Sci.* *12*, 29–36.
- Prezelj, N., Covington, E., Roitsch, T., Gruden, K., Fragner, L., Weckwerth, W., Chersicola, M., Vodopivec, M., and Dermastia, M. (2016). Metabolic Consequences of Infection of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) cv. “Modra frankinja” with Flavescence Dorée Phytoplasma. *Front. Plant Sci.* *7*, 711.
- Purcell, A.H. (1982). Insect Vector Relationships with Prokaryotic Plant Pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* *20*, 397–417.
- Quéré, C., and Sermier, J.-M. (2015). Rapport d’information de Mme Catherine Quéré et M. Jean-Marie Sermier déposé en application de l’article 145 du règlement, par la commission du développement durable et de l’aménagement du territoire sur les maladies de la vigne et du bois.
- Razin, S., Yogev, D., and Naot, Y. (1998). Molecular Biology and Pathogenicity of Mycoplasmas. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *62*, 1094–1156.
- Ren, C., Liu, X., Zhang, Z., Wang, Y., Duan, W., Li, S., and Liang, Z. (2016). CRISPR/Cas9-mediated efficient targeted mutagenesis in Chardonnay (*Vitis vinifera* L.). *Sci. Rep.* *6*.
- Renaud, S., and de Lorgeril, M. (1992). Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *Lancet Lond. Engl.* *339*, 1523–1526.

- Renaudin, J., Béven, L., Batailler, B., Duret, S., Desqué, D., Arricau-Bouvery, N., Malembic-Maher, S., and Foissac, X. (2015). Heterologous expression and processing of the flavescence dorée phytoplasma variable membrane protein VmpA in *Spiroplasma citri*. *BMC Microbiol.* *15*, 82.
- Repka, V., Fischerová, I., and Šilhárová, K. (2004). Methyl Jasmonate is a Potent Elicitor of Multiple Defense Responses in Grapevine Leaves and Cell-Suspension Cultures. *Biol. Plant.* *48*, 273–283.
- Reynier, A. (2016). *Manuel de viticulture: Guide technique du viticulteur*. 4ème Édition Lavoisier.
- Rigaill, G., Balzergue, S., Brunaud, V., Blondet, E., Rau, A., Rogier, O., Caius, J., Maugis-Rabusseau, C., Soubigou-Taconnat, L., Aubourg, S., et al. (2016). Synthetic data sets for the identification of key ingredients for RNA-seq differential analysis. *Brief. Bioinform.* doi.org/10.1093/bib/bbw092
- Rodriguez, F., Arsène-Ploetze, F., Rist, W., Rüdiger, S., Schneider-Mergener, J., Mayer, M.P., and Bukau, B. (2008). Molecular basis for regulation of the heat shock transcription factor sigma32 by the DnaK and DnaJ chaperones. *Mol. Cell* *32*, 347–358.
- Roggia, C., Caciagli, P., Galetto, L., Pacifico, D., Veratti, F., Bosco, D., and Marzachi, C. (2014). Flavescence dorée phytoplasma titre in field-infected Barbera and Nebbiolo grapevines. *Plant Pathol.* *63*, 31–41.
- Rojas, C.M., Senthil-Kumar, M., Tzin, V., and Mysore, K.S. (2014). Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Front. Plant Sci.* *5*.
- Rotter, A., Camps, C., Lohse, M., Kappel, C., Pilati, S., Hren, M., Stitt, M., Coutos-Thévenot, P., Moser, C., Usadel, B., et al. (2009). Gene expression profiling in susceptible interaction of grapevine with its fungal pathogen *Eutypa lata* : Extending MapMan ontology for grapevine. *BMC Plant Biol.* *9*, 104.
- Rushton, P.J., and Somssich, I.E. (1998). Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens. *Curr. Opin. Plant Biol.* *1*, 311–315.
- Salar, P., Charenton, C., Foissac, X., and Malembic-Maher, S. (2013). Multiplication kinetics of Flavescence dorée phytoplasma in broad bean. Effect of phytoplasma strain and temperature. *Eur. J. Plant Pathol.* *135*, 371–381.
- Santi, S., Grisan, S., Pierasco, A., DE Marco, F., and Musetti, R. (2013). Laser microdissection of grapevine leaf phloem infected by stolbur reveals site-specific gene responses associated to sucrose transport and metabolism. *Plant Cell Environ.* *36*, 343–355.
- Scharte, J., Schön, H., and Weis, E. (2005). Photosynthesis and carbohydrate metabolism in tobacco leaves during an incompatible interaction with *Phytophthora nicotianae*. *Plant Cell Environ.* *28*, 1421–1435.
- Schneider, C., Prodo, E., Onimus, C., Ley, L., Forget, D., Barbeau, G., Audeguin, L., and Merdinoglu, D. (2014). ResDur, le programme INRA de création de variétés de vignes de cuve résistantes aux maladies cryptogamiques et de bonne qualité oenologique. *Union Girondine Vins Bordx.* 62–68.
- Schommer, C., Palatnik, J.F., Aggarwal, P., Chételat, A., Cubas, P., Farmer, E.E., Nath, U., and Weigel, D. (2008). Control of jasmonate biosynthesis and senescence by miR319 targets. *PLoS Biol.* *6*, e230.
- Schumann, W. (1999). FtsH--a single-chain charonin? *FEMS Microbiol. Rev.* *23*, 1–11.

- Schvester, D., Carle, P., and Moutous, G. (1963). Transmission de la flavescence dorée de la vigne par *Scaphoideus titanus* littoralis ball. *Ann Epiphyt.* *14*, 175–198.
- Seemüller, E., and Schneider, B. (2007). Differences in Virulence and Genomic Features of Strains of ‘*Candidatus Phytoplasma mali*’, the Apple Proliferation Agent. *Phytopathology* *97*, 964–970.
- Seemüller, E., Kiss, E., Sule, S., and Schneider, B. (2010). Multiple infection of apple trees by distinct strains of “*Candidatus Phytoplasma mali*” and its pathological relevance. *Phytopathology* *100*, 863–870.
- Seemüller, E., Kampmann, M., Kiss, E., and Schneider, B. (2011). HflB gene-based phytopathogenic classification of “*Candidatus phytoplasma mali*” strains and evidence that strain composition determines virulence in multiply infected apple trees. *MPMI* *24*, 1258–1266.
- Seemüller, E., Sule, S., Kube, M., Jelkmann, W., and Schneider, B. (2013). The AAA+ ATPases and HflB/FtsH proteases of “*Candidatus Phytoplasma mali*”: phylogenetic diversity, membrane topology, and relationship to strain virulence. *MPMI* *26*, 367–376.
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M.A., Cammue, B.P.A., and De Bolle, M.F.C. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.* *46*, 941–950.
- Seo, H.S., Song, J.T., Cheong, J.-J., Lee, Y.-H., Lee, Y.-W., Hwang, I., Lee, J.S., and Choi, Y.D. (2001). Jasmonic acid carboxyl methyltransferase: A key enzyme for jasmonate-regulated plant responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *98*, 4788–4793.
- Serrano, M., Coluccia, F., Torres, M., L’Haridon, F., and Métraux, J.-P. (2014). The cuticle and plant defense to pathogens. *Front. Plant Sci.* *5*.
- Shi, W.M., Muramoto, Y., Ueda, A., and Takabe, T. (2001). Cloning of peroxisomal ascorbate peroxidase gene from barley and enhanced thermotolerance by overexpressing in *Arabidopsis thaliana*. *Gene* *273*, 23–27.
- Sieprawska-Lupa, M., Mydel, P., Krawczyk, K., Wójcik, K., Puklo, M., Lupa, B., Suder, P., Silberring, J., Reed, M., Pohl, J., et al. (2004). Degradation of Human Antimicrobial Peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-Derived Proteinases. *Antimicrob. Agents Chemother.* *48*, 4673–4679.
- Singh, K., Foley, R.C., and Oñate-Sánchez, L. (2002). Transcription factors in plant defense and stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* *5*, 430–436.
- Sirand-Pugnet, P., Citti, C., Barré, A., and Blanchard, A. (2007). Evolution of mollicutes: down a bumpy road with twists and turns. *Res. Microbiol.* *158*, 754–766.
- Slavokhotova, A.A., Naumann, T.A., Price, N.P.J., Rogozhin, E.A., Andreev, Y.A., Vassilevski, A.A., and Odintsova, T.I. (2014). Novel mode of action of plant defense peptides – hevein-like antimicrobial peptides from wheat inhibit fungal metalloproteases. *FEBS J.* *281*, 4754–4764.
- Smoliga, J.M., Baur, J.A., and Hausenblas, H.A. (2011). Resveratrol and health--a comprehensive review of human clinical trials. *Mol. Nutr. Food Res.* *55*, 1129–1141.
- Song, J.T., Lu, H., McDowell, J.M., and Greenberg, J.T. (2004). A key role for ALD1 in activation of local and systemic defenses in *Arabidopsis*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *40*, 200–212.

- Srinivasan, R., Anilkumar, G., Rajeswari, H., and Ajitkumar, P. (2006). Functional characterization of AAA family FtsH protease of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* *259*, 97–105.
- Steffek, R., Reisenzein, H., and Zeisner, N. (2007). Analysis of the pest risk from Grapevine flavesence dorée phytoplasma to Austrian viticulture - Steffek - 2007 - EPPO Bulletin - Wiley Online Library. *EPPO Bull.* *37* : 191-203.
- Sugimoto, K., Takeda, S., and Hirochika, H. (2000). MYB-Related Transcription Factor NtMYB2 Induced by Wounding and Elicitors is a Regulator of the Tobacco Retrotransposon Tto1 and Defense-Related Genes. *Plant Cell Online* *12*, 2511–2527.
- Sugio, A., MacLean, A.M., Kingdom, H.N., Grieve, V.M., Manimekalai, R., and Hogenhout, S.A. (2011). Diverse targets of phytoplasma effectors: from plant development to defense against insects. *Annu. Rev. Phytopathol.* *49*, 175–195.
- Tak, H., and Mhatre, M. (2013). Cloning and molecular characterization of a putative bZIP transcription factor VvbZIP23 from *Vitis vinifera*. *Protoplasma* *250*, 333–345.
- Tamagnone, L., Merida, A., Parr, A., Mackay, S., Culianez-Macia, F.A., Roberts, K., and Martin, C. (1998). The AmMYB308 and AmMYB330 Transcription Factors from *Antirrhinum* Regulate Phenylpropanoid and Lignin Biosynthesis in Transgenic Tobacco. *Plant Cell Online* *10*, 135–154.
- Tan, P.Y., and Whitlow, T. (2001). Physiological responses of *Catharanthus roseus* (periwinkle) to ash yellows phytoplasmal infection. *New Phytol.* *150*, 757–769.
- Thimm, O., Bläsing, O., Gibon, Y., Nagel, A., Meyer, S., Krüger, P., Selbig, J., Müller, L.A., Rhee, S.Y., and Stitt, M. (2004). mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. *Plant J.* *37*, 914–939.
- Thoma, I., Loeffler, C., Sinha, A.K., Gupta, M., Krischke, M., Steffan, B., Roitsch, T., and Mueller, M.J. (2003). Cyclopentenone isoprostanes induced by reactive oxygen species trigger defense gene activation and phytoalexin accumulation in plants. *Plant J. Cell Mol. Biol.* *34*, 363–375.
- Thomma, B.P., Eggermont, K., Penninckx, I.A., Mauch-Mani, B., Vogelsang, R., Cammue, B.P., and Broekaert, W.F. (1998). Separate jasmonate-dependent and salicylate-dependent defense-response pathways in *Arabidopsis* are essential for resistance to distinct microbial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *95*, 15107–15111.
- Thomma, B.P., Eggermont, K., Tierens, K.F., and Broekaert, W.F. (1999). Requirement of functional ethylene-insensitive 2 gene for efficient resistance of *Arabidopsis* to infection by *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* *121*, 1093–1102.
- Tomoyasu, T., Yamanaka, K., Murata, K., Suzaki, T., Bouloc, P., Kato, A., Niki, H., Hiraga, S., and Ogura, T. (1993). Topology and subcellular localization of FtsH protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *175*, 1352–1357.
- Tomoyasu, T., Gamer, J., Bukau, B., Kanemori, M., Mori, H., Rutman, A.J., Oppenheim, A.B., Yura, T., Yamanaka, K., and Niki, H. (1995). *Escherichia coli* FtsH is a membrane-bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor sigma 32. *EMBO J.* *14*, 2551–2560.
- Tör, M., Lotze, M.T., and Holton, N. (2009). Receptor-mediated signalling in plants: molecular patterns and programmes. *J. Exp. Bot.* *60*, 3645–3654.

- Tsarmopoulos, I., Gourgues, G., Blanchard, A., Vashee, S., Jores, J., Lartigue, C., and Sirand-Pugnet, P. (2016). In-Yeast Engineering of a Bacterial Genome Using CRISPR/Cas9. *ACS Synth. Biol.* *5*, 104–109.
- Tully, J.G., Bové, J.M., Laigret, F., and Whitcomb, R.F. (1993). Revised taxonomy of the class Mollicutes: proposed elevation of a monophyletic cluster of arthropod-associated Mollicutes to ordinal rank (Entomoplasmatales ord. nov.), with provision for familial rank to separate species with nonhelical morphology (Entomoplasmataceae fam. nov.) from helical species (Spiroplasmataceae), and emended descriptions of the order Mycoplasmatales, family Mycoplasmataceae. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* *43*, 378–385.
- Vance, R.E., Isberg, R.R., and Portnoy, D.A. (2009). Patterns of pathogenesis: discrimination of pathogenic and non-pathogenic microbes by the innate immune system. *Cell Host Microbe* *6*, 10–21.
- Vandelle, E., Poinssot, B., Wendehenne, D., Bentéjac, M., and Pugin, A. (2006). Integrated signaling network involving calcium, nitric oxide, and active oxygen species but not mitogen-activated protein kinases in BcPG1-elicited grapevine defenses. *Mol. Plant. Microbe Interact.* *19*, 429–440.
- Velasco, R., Zharkikh, A., Troggio, M., Cartwright, D.A., Cestaro, A., Pruss, D., Pindo, M., Fitzgerald, L.M., Vezzulli, S., Reid, J., et al. (2007). A high quality draft consensus sequence of the genome of a heterozygous grapevine variety. *PLoS One* *2*, e1326.
- Villarreal, F., Martín, V., Colaneri, A., González-Schain, N., Perales, M., Martín, M., Lombardo, C., Braun, H.-P., Bartoli, C., and Zabaleta, E. (2009). Ectopic expression of mitochondrial gamma carbonic anhydrase 2 causes male sterility by anther indehiscence. *Plant Mol. Biol.* *70*, 471–485.
- Vlot, A.C., Dempsey, D.A., and Klessig, D.F. (2009). Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* *47*, 177–206.
- Wasternack, C., and Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Ann. Bot.* *111*, 1021–1058.
- Wei, G., and Shirsat, A.H. (2006). Extensin over-expression in *Arabidopsis* limits pathogen invasiveness. *Mol. Plant Pathol.* *7*, 579–592.
- Weintraub, P.G., and Beanland, L. (2006). Insect Vectors of Phytoplasmas. *Annu. Rev. Entomol.* *51*, 91–111.
- Weisburg, W.G., Tully, J.G., Rose, D.L., Petzel, J.P., Oyaizu, H., Yang, D., Mandelco, L., Sechrest, J., Lawrence, T.G., and Van Etten, J. (1989). A phylogenetic analysis of the mycoplasmas: basis for their classification. *J. Bacteriol.* *171*, 6455–6467.
- Wen, X., Zhang, C., Ji, Y., Zhao, Q., He, W., An, F., Jiang, L., and Guo, H. (2012). Activation of ethylene signaling is mediated by nuclear translocation of the cleaved EIN2 carboxyl terminus. *Cell Res.* *22*, 1613–1616.
- Woese, C.R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* *51*, 221–271.
- Wu, L., Chen, H., Curtis, C., and Fu, Z.Q. (2014). Go in for the kill: How plants deploy effector-triggered immunity to combat pathogens. [Corrected]. *Virulence* *5*, 710–721.

- Xu, Y., Chang, P., Liu, D., Narasimhan, M.L., Raghothama, K.G., Hasegawa, P.M., and Bressan, R.A. (1994). Plant Defense Genes Are Synergistically Induced by Ethylene and Methyl Jasmonate. *Plant Cell* **6**, 1077–1085.
- Yamamoto, T., Iketani, H., Ieki, H., Nishizawa, Y., Notsuka, K., Hibi, T., Hayashi, T., and Matsuta, N. (2000). Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Rep.* **19**, 639–646.
- Yan, J., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z., Zhang, W., Qi, T., Cheng, Z., Peng, W., Luo, H., Nan, F., et al. (2009). The *Arabidopsis* CORONATINE INSENSITIVE1 Protein Is a Jasmonate Receptor. *Plant Cell* **21**, 2220–2236.
- Yang, S., Yang, H., Grisafi, P., Sanchatjate, S., Fink, G.R., Sun, Q., and Hua, J. (2006). The BON/CPN gene family represses cell death and promotes cell growth in *Arabidopsis*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **45**, 166–179.
- Yu, X., Feng, B., He, P., and Shan, L. (2017). From Chaos to Harmony: Responses and Signaling upon Microbial Pattern Recognition. *Annu. Rev. Phytopathol.* **55**, 109–137.
- Zacheo, G., Orlando, C., and Bleve-Zacheo, T. (1993). Characterization of Anionic Peroxidases in Tomato Isolines Infected by *Meloidogyne incognita*. *J. Nematol.* **25**, 249–256.
- Zeidler, D., Zähringer, U., Gerber, I., Dubery, I., Hartung, T., Bors, W., Hutzler, P., and Durner, J. (2004). Innate immunity in *Arabidopsis thaliana*: lipopolysaccharides activate nitric oxide synthase (NOS) and induce defense genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 15811–15816.
- Zhao, Y., and Davis, R.E. (2016). Criteria for phytoplasma 16Sr group/subgroup delineation and the need of a platform for proper registration of new groups and subgroups. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66**, 2121–2123.
- Zimmerli, L., Métraux, J.-P., and Mauch-Mani, B. (2001). β -Aminobutyric Acid-Induced Protection of *Arabidopsis* against the Necrotrophic Fungus *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol.* **126**, 517–523.
- Zipfel, C., and Felix, G. (2005). Plants and animals: a different taste for microbes? *Curr. Opin. Plant Biol.* **8**, 353–360.

Annexes

I) Annexe 1

Nom du gène	Description	Catégorie de récepteurs kinases	Log2 (CS-S/CS-I)	Log2 (M-S/M-I)	Log2 (CS-S/M-S)	Log2 (CS-I/M-I)
<i>GSVIVT01016937001</i>	FRK1	LRR I	0	0	3,78	2,57
<i>GSVIVT01006397001</i>	CRLK1		0	0	2,46	2,01
<i>GSVIVT01016915001</i>			0	0	2,38	2,71
<i>GSVIVT01028662001</i>			4,41	5,39	0	0
<i>GSVIVT01002201001</i>		LRR II	0	0	2,92	2,98
<i>GSVIVT01022070001</i>		LRR III	2,15	0	0	0
<i>GSVIVT01008472001</i>	RLK902		2,94	3,48	0	0
<i>GSVIVT01030274001</i>	IMK3		0	4,37	0	0
<i>GSVIVT01010376001</i>			0	2,18	0	0
<i>GSVIVT01003162001</i>			4,39	0	0	0
<i>GSVIVT01011857001</i>			3,02	3,23	0	0
<i>GSVIVT01033749001</i>			2,77	3,53	0	0
<i>GSVIVT01037446001</i>			0	2,89	0	0
<i>GSVIVT01027636001</i>		LRR IV	2,59	0	0	0
<i>GSVIVT01004912001</i>			0	2,59	0	0
<i>GSVIVT01004806001</i>	SRF8	LRR V	3,14	2,4	0	0
<i>GSVIVT01034604001</i>		LRR VI	3,34	3,03	0	0
<i>GSVIVT01032670001</i>	IRK	LRR VII	2,88	3,1	0	0
<i>GSVIVT01018814001</i>			4,05	2,67	0	0
<i>GSVIVT01021293001</i>		LRR VIII-2	2,17	0	-2,16	0
<i>GSVIVT01021285001</i>	LIK1		0	-2,04	0	2,98
<i>GSVIVT01021282001</i>	RKF1		2,45	0	-1,44	0
<i>GSVIVT01016024001</i>			2,33	0	2,25	3,54
<i>GSVIVT01026300001</i>	TMK1	LRR IX	2,1	0	0	0
<i>GSVIVT01033288001</i>	PXC3	LRR X	2,44	2,32	0	0
<i>GSVIVT01035307001</i>		LRR XI	0	2,44	0	0
<i>GSVIVT01032973001</i>	GSO1		2,03	0	0	0
<i>GSVIVT01004465001</i>	BAM1		2,36	2,16	0	0
<i>GSVIVT01014037001</i>	TDR		2,46	2,82	0	0
<i>GSVIVT01038628001</i>	PEPR1		0	3,4	0	0
<i>GSVIVT01014750001</i>			2,83	0	0	0
<i>GSVIVT01021645001</i>	GSO2		0	0	-6,04	-7,7
<i>GSVIVT01021118001</i>	HSL1		3,46	4,22	0	0
<i>GSVIVT01002253001</i>			0	2,16	0	0
<i>GSVIVT01029149001</i>	FLS2		0	2,21	0	0
<i>GSVIVT01035211001</i>	MIK2	LRR XII	0	2,15	2,02	2,12
<i>GSVIVT01008070001</i>		LRR XIII	0	5,03	2,81	0
<i>GSVIVT01028870001</i>		RLK1	2,75	2,37	0	0
<i>GSVIVT01036854001</i>	CRK17	DUF 26	0	0	2,8	0
<i>GSVIVT01005158001</i>	CRK29		0	0	3,01	2,58
<i>GSVIVT01007713001</i>	CRK42		0	0	2,32	0
<i>GSVIVT01015799001</i>	CRK25		0	0	2,05	2,23
<i>GSVIVT01036853001</i>	CRK10		0	0	2,89	2,01

<i>GSVIVT01026418001</i>		legume- lectin	0	0	3,27	3,39
<i>GSVIVT01037075001</i>			0	2,1	0	0
<i>GSVIVT01014693001</i>			0	3,16	0	0
<i>GSVIVT01014523001</i>		S-locus glycoprotein like	0	0	2,39	0
<i>GSVIVT01038331001</i>			0	0	2,15	2,76
<i>GSVIVT01006478001</i>			0	0	-2,66	-2,55
<i>GSVIVT01021452001</i>			0	-2,13	0	0
<i>GSVIVT01034766001</i>			0	0	2,62	0
<i>GSVIVT01008212001</i>		wall associated kinase	0	0	2,82	2,4
<i>GSVIVT01037112001</i>	WAK2		0	0	3,15	3,26
<i>GSVIVT01008780001</i>	WAK1		0	0	3,05	2,61
<i>GSVIVT01009442001</i>		autres	3,95	5,17	0	0
<i>GSVIVT01015972001</i>	RLP1		0	0	3,06	2,89
<i>GSVIVT01030681001</i>	PDLP7		2,34	0	0	0
<i>GSVIVT01033343001</i>			2,7	3,55	0	0

Annexe 1 : Expression différentielle de gènes codants des récepteurs kinases entre CS-S et CS-I, entre M-S et M-I, entre CS-S et M-S et entre CS-I et M-I exprimés en log₂ (FDR<0,05 et Log₂ fold change>2). Dans les colonnes CS-S/CS-I et M-S/M-I, les valeurs positives représentent une expression augmentée dans les plantes infectées et dans les colonnes CS-S/M-S et CS-I/M-I, les valeurs positives représentent une expression régulée à la hausse chez les CS. Les valeurs 0 indiquent qu'il n'y a pas de différences d'expression statistiquement significative.

II) Annexe 2

Nom du gène	Description	Catégories fonctionnelles	Log2 (CS-I/CS-S)	Log2 (M-I/M-S)	Log2 (CS-S/M-S)	Log2 (CS-I/M-I)
GSVIVT01031405001	CSLA2	Synthèse cellulose	3,49	3,79	0	0
GSVIVT01033168001	CSLC5		2,54	2,34	0	0
GSVIVT01009290001	CSLC12		3,09	2,89	0	0
GSVIVT01023643001	CESA7		0	2,51	0	0
GSVIVT01013471001	CESA6		2,6	2	0	0
GSVIVT01028402001	CESA4		2,58	5,54	0	0
GSVIVT01019587001	CSLG3		3,02	0	-2,02	0
GSVIVT01027717001	CSLG1		2	4,89	0	0
GSVIVT01021248001	CESA8		2,09	3,9	0	0
GSVIVT01006760001	CSLE1		0	0	-2,95	-2,51
GSVIVT01028071001	CSLD5		3,34	4,39	0	0
GSVIVT01036565001	COBL4		3,1	6,19	0	0
GSVIVT01008128001	COB		3,76	2,31	0	0
GSVIVT01031644001	KAM1		Synthèse hémicellulose	2,92	3,72	0
GSVIVT01014592001	IRX8	3,31		5,84	0	0
GSVIVT01015140001	PAL2	Synthèse lignine	2,95	3,88	0	0
GSVIVT01015123001	PAL4		2,93	3,8	0	0
GSVIVT01025214001	PAL1		4,62	3,27	0	0
GSVIVT01022642001	PPR1		0	0	0	-2,28
GSVIVT01008765001	CAD9		0	0	-3,22	-2,59
GSVIVT01025167001	FLA11	Protéines de paroi cellulaire AGP	2,13	7,24	0	0
GSVIVT01028741001	AGP20		2,79	2,83	0	0
GSVIVT01030085001	FLA2		2,81	0	0	0
GSVIVT01015416001			2,97	0	0	0
GSVIVT01021521001	RLP29	Protéines de paroi cellulaire LRR	0	2,12	0	0
GSVIVT01034267001	LRX2		0	3,86	0	0
GSVIVT01027401001			3,66	2,84	0	0
GSVIVT01012244001	RGP3	Protéines de paroi cellulaire RGP	2,23	0	0	0
GSVIVT01037542001		Dégradation	3,55	3,74	0	0
GSVIVT01018923001			2,68	3,17	0	0
GSVIVT01013328001	XYL4		0	2,24	0	0
GSVIVT01029162001	XTH24		3,66	0	0	2,33
GSVIVT01028104001	BXL2		2,68	5,27	0	0
GSVIVT01009003001			3,51	4,55	0	0
GSVIVT01007582001			2,01	0	0	0
GSVIVT01016208001			3,04	3,61	0	0
GSVIVT01033671001			3,04	3,61	0	0
GSVIVT01003984001			0	2,06	0	0
GSVIVT01032447001			3,91	3,14	0	0
GSVIVT01019405001			3,51	2,63	0	0
GSVIVT01033359001	ADPG1		0	0	0	-3,2
GSVIVT01028861001			0	3,82	0	0
GSVIVT01028548001			2,02	2,8	0	0
GSVIVT01038023001			0	0	0	0

GSVIVT01007771001	ADPG2		3,14	3,5	0	0
GSVIVT01031576001	XTH15	Modification	3,45	2,18	0	0
GSVIVT01013208001	EXLB1		0	4,17	0	0
GSVIVT01001124001	XTH5		4,25	3,35	0	0
GSVIVT01023919001	EXLA2		3,3	0	0	0
GSVIVT01023857001	EXP20		0	2,51	0	0
GSVIVT01029174001	XTR6		4,52	3,71	0	2,81
GSVIVT01000416001	XTH9		5,02	3,13	0	0
GSVIVT01032681001	EXP8		0	-2,69	0	0
GSVIVT01011437001	EXPA1		5,06	2,9	0	0
GSVIVT01029166001	XTH16		3,33	2,43	0	0
GSVIVT01020228001	XTH33		4,4	0	0	0
GSVIVT01031486001	XTH32		2,87	2,7	0	0
GSVIVT01018163001	EXPB2		0	3,27	0	0
GSVIVT01017296001	EXLB3		0	-2,7	0	2,13
GSVIVT01037018001	XTH10		2,01	3,11	0	0
GSVIVT01029411001	EXPA15		3,1	3,13	0	0
GSVIVT01016525001	EXPA4		0	2,86	0	0
GSVIVT01031165001		Pectine esterases	0	2,82	0	0
GSVIVT01001327001			0	2,83	0	0
GSVIVT01038546001			2,08	0	0	0
GSVIVT01023135001			2,01	2,52	0	0
GSVIVT01031164001			0	2,53	0	0
GSVIVT01012639001	PMEPCRA		3,59	2,55	-2,9	0
GSVIVT01016667001	PME1		3,52	2,72	0	0
GSVIVT01036914001			2,09	0	0	0
GSVIVT01028231001			2,45	0	0	0
GSVIVT01025362001	GSL12	Métabolisme callose	2,14	2,76	0	0
GSVIVT01000622001	GSL04		3,18	3,39	0	0
GSVIVT01020854001	GSL07		0	2,48	0	0

Annexe 2 : Expression différentielle des gènes impliqué dans la biosynthèse, la dégradation et les modifications de la paroi cellulaire entre le CS infecté et sain (\log_2 (CS-I/CS-S)), entre le M infecté et sain (\log_2 (M-I/M-S)), entre le CS et le M sain (\log_2 (CS-S/M-S)) et entre le CS et le M infecté (\log_2 (CS-I/M-I)). Dans les colonnes \log_2 (CS-I/CS-S) et \log_2 (M-I/M-S), les valeurs positives représentent une expression augmentée dans les plantes infectées et dans les colonnes \log_2 (CS-S/M-S) et \log_2 (CS-I/M-I), les valeurs positives représentent une expression régulée à la hausse chez les CS. Les valeurs 0 indiquent qu'il n'y a pas de différences d'expression statistiquement significative (FDR<0,05 et \log_2 fold change>2 ou <-2).

La Flavescence Dorée de la vigne : Identification et caractérisation des protéases de surface FtsH du phytoplasme de la FD et Caractérisation de la sensibilité variétale par comparaison de cépages très sensibles et peu sensibles.

La Flavescence Dorée (FD) est une maladie épidémique infectant les vignes européennes causée par un phytoplasme (pFD) qui est transmis de vigne à vigne par l'insecte vecteur *Scaphoideus titanus*. Aucun cépage actuellement cultivé n'est totalement résistant, mais des différences de sensibilité existent. En France, les méthodes de lutte réglementaires se concentrent sur la plantation de pieds certifiés sains, l'arrachage des plants contaminés et des traitements insecticides contre le vecteur dans les zones touchées par la FD. En plus du coût économique de ces moyens de lutte, l'usage des produits phytosanitaires impacte l'environnement et la santé humaine. Une meilleure compréhension des relations entre les différents acteurs du pathosystème vigne-pFD-*S. titanus* est donc essentielle pour pouvoir appliquer d'autres stratégies de lutte. Dans ce contexte, les principaux objectifs de ma thèse étaient (1) d'identifier et de caractériser au niveau fonctionnel des gènes codant des protéases de surface, les FtsH, potentiellement impliquées dans la virulence du pFD, (2) de caractériser la multiplication et la diffusion du pFD dans la vigne en s'affranchissant des interactions vigne-*S. titanus*, (3) d'initier la caractérisation du déterminisme génétique de la résistance par analyse d'un pool de descendants issus du croisement entre un cépage sensible (CF) et un cépage peu sensible (Mag) et (4) d'identifier des différences de dérégulations géniques entre le cépage très sensible CS et le cépage peu sensible M par comparaison des transcriptomes.

Les résultats indiquent que (1) huit gènes *FtsH* sont codés par le pFD et s'expriment de manière différentielle selon l'hôte, (2) les différences de sensibilité à la FD chez la vigne sont dues au moins en partie aux interactions vigne-pFD, (3) une ségrégation des caractères « infection des plantes » et « multiplication du pFD » dans cette descendance est obtenue et (4) le M active des voies métaboliques différentes par rapport au CS lors de l'infection.

A terme, la compréhension puis l'exploitation des différences de sensibilités des cépages pourront contribuer à l'élaboration de pistes alternatives à la lutte actuelle contre la FD dans le cadre d'une réduction des intrants.

Mots clefs : Flavescence Dorée, phytoplasme, vigne, *Scaphoideus titanus*, transcriptomique, protéases

Grapevine Flavescence Dorée : Identification and characterization of FD phytoplasma surface proteases (FtsH) and characterization of varietal susceptibility by comparison of highly susceptible and poorly susceptible grapevine cultivars.

Flavescence Dorée (FD) is a severe epidemic disease of grapevine caused by a wall-less bacteria, a phytoplasma (pFD), transmitted by the insect vector *Scaphoideus titanus*. There is no resistant variety, but differences in susceptibility between *Vitis* exist. In France, the actual control consists in insecticide treatments against the vector, up-rooting of diseased plants and sanitary control of plants. It has high economic and environmental impacts. A better understanding of the pathosystem FDp-grapevine-*S. titanus* is essential to develop alternative measures. In this context, the main objectives of my thesis were (1) to identify and characterize the expression of genes encoding surface proteases, FtsH, potentially involved in the virulence of the pFD, (2) to characterize the FDp multiplication and diffusion in *Vitis* without taking into account grapevine-*S. titanus* interactions, (3) to initiate the characterization of genetic determinism by phenotyping a pool of progeny from the cross between the susceptible variety CF and the poorly susceptible variety Mag and, (4) to identify differences in gene expression between the very susceptible variety CS and the poorly susceptible variety M by transcriptomes comparison. Results indicate that (1) eight *FtsH* genes are encoded by the FDp and are differentially expressed between plant and insect hosts, (2) differences in FD susceptibility in *Vitis* are caused, at least in part, by *Vitis*-FDp interactions, (3) a segregation of the characters "plant infection" and "pFD multiplication" is obtained in the progeny and, (4) M activates different metabolic pathways than CS to respond to FDp infection. Such knowledge can contribute to the development of alternative methods for limiting phytosanitary inputs.

Keywords: Flavescence Dorée, phytoplasma, grapevine, *Scaphoideus titanus*, transcriptomic, proteases