HAL
open science

Durabilité de la résistance et mécanisme de tolérance au virus Y de la pomme de terre (PVY) chez Nicotiana tabacum

Vincent Michel

To cite this version:

Vincent Michel. Durabilité de la résistance et mécanisme de tolérance au virus Y de la pomme de terre (PVY) chez Nicotiana tabacum. Biologie végétale. Université de Bordeaux, 2017. Français. NNT : 2017BORD0925 . tel-01772713

HAL Id: tel-01772713

https://theses.hal.science/tel-01772713

Submitted on 20 Apr 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

ÉCOLE DOCTORALE des Sciences de la Vie et de la Santé

SPÉCIALITÉ BIOLOGIE VÉGÉTALE

Par

Vincent MICHEL

Durabilité de la résistance et mécanisme de tolérance au virus Y de la pomme de terre (PVY) chez *Nicotiana tabacum*

Sous la direction de : Sylvie German-Retana

Soutenue le 18 décembre 2017

Membres du jury :

Mme HEBRARD Eugénie, Chargée de Recherche, IRD Montpellier	Rapporteur
M. ROBAGLIA Christophe, Professeur, Université Aix-Marseille	Rapporteur
Mme LACROIX Christelle, Chargée de Recherche, INRA Avignon	Examinatrice
Mme LAUVERGEAT Virginie, Maitre de conférences, Université de Bordeaux	Examinatrice
Mme JULIO Emilie, Docteur, ITL, Bergerac	Membre invité

Durabilité de la résistance et mécanisme de tolérance au virus Y de la pomme de terre (PVY) chez *Nicotiana tabacum*

Résumé :

Le virus Y de la pomme de terre (PVY) est l'un des virus les plus dommageables sur tabac. Pour contrôler les épidémies de PVY, différents allèles du gène de résistance récessive *va* ont été introgressés dans des variétés de tabac. Ce gène récemment cloné code pour une copie du facteur d'initiation de la traduction (*eIF4E-1*). Toutefois, l'émergence de variants de PVY contournant *va*, dont des isolats nécrotiques particulièrement sévères, montre que cette résistance n'est pas toujours durable. L'objectif du travail de thèse était *i*) de comprendre les mécanismes génétiques modulant la durabilité de la résistance *va ii*) d'identifier des facteurs génétiques différents de *va*, contrôlant une tolérance aux symptômes de nécrose nervaire induits par certains isolats de PVY.

Le phénotypage, le génotypage et l'analyse du transcriptome de 13 variétés résistantes portant *va* montrent que le type de mutation affectant le locus *eIF4E-1* ainsi que la fonctionnalité et le niveau d'expression d'autres copies d'*eIF4E* impactent la durabilité de *va*. Nos données permettent de proposer un modèle de leurre où la surexpression de la copie *eIF4E-2*, sous l'effet de la délétion complète du gène *eIF4E-1* et partielle du gène *eIF4E-3*, limiterait l'apparition de variants contournants, augmentant ainsi la durabilité de la résistance contrôlée par *va*.

En parallèle, un gène R de type NB-LRR nommé *NtTPN1* (pour *Nicotiana tabacum* Tolerance to PVY-induced Necrosis1) a été identifié comme étant directement impliqué dans l'absence de développement de la nécrose nervaire induite par les isolats nécrotiques de PVY. Le phénotype de tolérance au PVY conféré par *NtTPN*1 ouvre de nouvelles perspectives de contrôle du PVY et en particulier des isolats nécrotiques capables de contourner la résistance liée à *va*

Mots clés : Tabac, *Potyvirus*, résistance récessive, durabilité, gène *va*, eIF4E, tolérance, gène *R*

Resistance durability and tolerance mechanism of *Potato virus Y* (PVY) in *Nicotiana tabacum*

Abstract :

Potato virus Y (PVY) is one of the most damaging viruses on tobacco crops. To control PVY, allelic forms of the recessive resistance gene *va* were introgressed into many tobacco cultivars. This gene was recently identified and encodes a copy of eukaryotic initiation translation factor (eIF4E-1). However, the *va*-mediated resistance is sometimes overcome by resistance-breaking variants including particularly severe necrotic isolates. The present PhD project had two objectives i) to further our understanding of the mechanism(s) modulating *va*-mediated resistance durability ii) to identify new, *va*-independent genetic factors confering tolerance to veinal necrosis symptoms induced by necrotic PVY isolates.

Phenotypic, genetic and transcriptomic analyses of 13 resistant tobacco accessions showed that the type of mutation at the locus *eIF4E-1,* together with the functionality and expression levels of other *eIF4E* copies, impact *va*-mediated resistance durability. The results obtained support a decoy model where the overexpression of the *eIF4E-2* gene*,* as a consequence of the complete deletion of *eIF4E-1* and of the partial deletion of *eIF4E-3*, would limit the ability of PVY to evolve towards resistance-breaking, increasing *va*-mediated resistance durability.

In parallel, a *NB-LRR R* gene, called *NtTPN1* (for *Nicotiana tabacum* Tolerance to PVY-induced Necrosis1) directly involved in the tolerance to PVY-induced systemic veinal necrosis symptoms in tobacco was identified. The phenotype of tolerance to PVY conferred by *NtTPN1* opens novel breeding options to minimize the impact of the emerging and so far uncontrolled *va*-mediated resistance breaking necrotic PVY isolates.

Keywords : Tobacco, Potyvirus, recessive resistance, durability, *va* gene, eIF4E, tolerance, R gene

---

Unité de recherche

Biologie du Fruit et Pathologie, n° 1332, INRA Bordeaux-Aquitaine, 71, av. Edouard Bourlaux, 33882 Villenave d'Ornon Cedex – France

" Une utopie est un projet réalisable, qui n'a pas encore été réalisé. "

Théodore André Monod

Remerciements

Je souhaite remercier tout d'abord Thierry Candresse de m'avoir accueilli au sein de l'équipe de virologie végétale de l'UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie. Je te remercie pour tes discussions passionnées et passionnantes, pour ton regard aiguisé sur le monde de la virologie et ton honnêteté. Ton sens de la critique, tes remarques constructives et ton exigence bienveillante m'ont tellement apporté, comment oublier, merci.

J'envoie mes plus sincères remerciements à tous les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'accepter d'évaluer ce travail, Mesdames Eugénie Hébrard, Emilie Julio, Christelle Lacroix, Virginie Lauvergeat et Monsieur Christophe Robaglia.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse, Messieurs Vincent Arondel, François Dorlhac de Borne, Jean-Luc Gallois, Laurent Glais, Emmanuel Jacquot et Benoit Moury.

Un grand merci à toute l'équipe de Bergerac sans qui ce travail n'aurait pu être réalisé. Merci vraiment à vous Emilie, Julien, Roxane, Christophe et François, pour le matériel, votre travail acharné de génotypage, vos explications, et bien sûr votre réactivité qui m'ont permis d'avancer sans jamais reculer.

Un immense merci à toi Laurent de m'avoir accueilli dans ton « équipe ». Tu as été l'un des premiers à me former dans cette grande aventure, merci pour tes connaissances, ton ouverture d'esprit, et bien sûr ta gentillesse débordante qui m'ont été d'un grand réconfort pendant ces 5 mois passés loin des miens. C'est évidemment sans oublier l'aide précieuse de Maryse et de Fred mais également la bonne humeur de Nicolas et de Romain. Tout ça sous l'œil avisé de Manu que je souhaite remercier tout particulièrement.

Evidemment un immense MERCI à toi Sylvie ! En plus d'avoir été une directrice de thèse hors pair tu as su me faire confiance et me redonner confiance à des moments où j'en avais le plus besoin, et rien que pour ça merci. Merci pour ta disponibilité sans faille, ta patience et tes nombreuses explications qui m'ont tellement appris. Merci pour ta bienveillance et ta gentillesse qui ont permis de rendre ces trois années formidables. Ta pédagogie et tes nombreux conseils ont été si précieux dans ce travail que je ne saurai te remercier assez. Tu as permis d'aiguiser mon esprit critique et scientifique qui me serviront plus tard, merci !

Véro, merci ! Tu as toujours été là pour répondre à mes questions, ta précision et tes connaissances hors pair m'ont toujours inspiré et m'ont permis d'aborder avec plaisir les concepts de génétiques les plus fous. Ton regard critique et tes nombreux conseils m'habiteront encore longtemps.

Merci Coralie pour ton travail acharné en serre qui m'a permis d'avoir le matériel végétal toujours à disposition, ta réactivité et ton implication ont été vitaux dans ce travail.

Merci à toute l'équipe de virologie, vous avez tous participé à l'accomplissement de cette thèse. Merci à toi Pat pour ton humour décapant, tes nombreux conseils et tes coups de main qui m'ont été si précieux (pour la hotte et ça y est je passe le flambeau pour l'eau). Merci Luc et Amandine pour tous vos conseils techniques et votre bonne humeur.

Merci à toi grand Vincent pour ton aide lors des agro-infiltrations et de nos petites sorties microscopiques, merci Marie-Christine pour les extractions précieuses que tu m'as faites. Merci Stéphane pour ton aide en statistique et tes nombreux conseils lors des extractions (et pour la hotte aussi). Merci Joce et Timi pour votre humanisme ; refaire le monde avec vous reste un véritable plaisir. Merci Armelle, Laurence, Geneviève, Amandine (félicitations !), Val (tu verras le petit très vite !), Aurélie, Patrice, Laure, Jean-Phi, Michel, Thierry & Thierry, Seb, David, Pascal, Olivier, Mélo, et merci Chantal pour ces petites heures de ménage passées à tes côtés.

Un grand merci à toi Claudine de ta gentillesse et de m'avoir aidé dans toutes les démarches administratives.

Merci à mes compagnons de route et de bureau qui ont su amener un peu de légèreté dans des moments où il en fallait, sans compter les coups de main de dernière minute, merci surtout à vous de m'avoir supporté pendant trois ans. Merci Xav, Valie, Cécile (courage t'y es presque !) et Zoé qui prendra bientôt le relais, Shuo, Bernadette (et voilà c'est fait !). Merci également à Justine et maintenant Yuxin, d'avoir bien voulu partager un bout de bureau et de n'avoir rien dit lors de mes nombreux râles matinaux. Merci Ahmed pour tes moments de discussion et ton ouverture sur le monde qui nous font bien relativiser.

Un grand merci à tous mes amis, Cyril pour ces bons fous rires autour d'une Guinness, merci Marina, Laurianne, Kiki, Pierrot, qui avez toujours prêté une oreille intéressée même quand je parlais de mon sujet pendant des heures. Merci évidemment à Dan et au Ramblin' qui a été le lieu de prédilection pendant ces trois dernières années. Merci à Moktar, pour ces petits partages musicaux et merci Fix pour ces conversations enflammées et passionnées autour de la science et des éléphants.

Evidemment, un énorme merci à ma famille, sans qui tout ceci n'aurait pu être possible. Et oui, merci maman et papa Michel d'avoir cru en moi et de m'avoir épaulé. Merci à mon frérot et à ma sœurette de m'avoir montré le chemin, et oui c'est un peu grâce à vous que je suis là aujourd'hui. Merci Greg et MF qui avez toujours été un soutien, parfois même sans le voir. Merci Julie pour tes nombreux conseils, ton soutien moral et ton optimisme. Merci Thio et Thenang d'avoir été en plus d'une force et une motivation, un véritable soutien pour ce travail mais cela va bien au-delà ! Merci Som et Moj d'avoir été là et surtout auprès de votre sœur pendant mes longues journées passées au labo. Bien sûr merci à Nico (les prochains donuts ne seront pas pour tout de suite, sorry ;) et Mimile qui ont également fait partie de ce petit bout de chemin.

Et enfin un grand merci à toi Monethip, de m'avoir supporté pendant ces trois dernières années qui ont été émotionnellement très intenses. Merci pour ton amour inconditionnel. Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir porté toujours plus loin que mes propres ambitions. Merci pour ta force juste et bienveillante, merci de rendre chaque jour passé à tes côtés un véritable bonheur. Merci de m'avoir rendu père et de m'avoir offert le plus beau des cadeaux, Paul. Vous êtes ce qu'il y a de plus important à mes yeux, mes deux amours, cette thèse vous revient.

Sommaire

Remerciements I

Sommaire V

Production scientifique XII

Liste des virus XIV

Listes des figures XVII

Liste des tables XXII

Avant-Propos XXV

Chapitre I : Introduction générale 1

1. Les mécanismes de résistance des plantes aux phytovirus 1

1.1. Le système immunitaire chez les plantes 3

1.2. La défense antivirale basée sur le « RNA silencing » 7

1.3. Les résistances monogéniques qualitatives 11

1.3.1. Les résistances dominantes contrôlées par les gènes *R* 11

1.3.2. Les gènes de type « NB-LRR » 15

1.3.3. La réponse hypersensible (HR) 17

1.3.4. La résistance systémique acquise (SAR) et signalisation hormonale 19

1.3.5. Les gènes de résistance dominante autres que les NB-LRR 21

1.4. Les résistances récessives par perte de facteur de sensibilité 22

1.4.1. Les facteurs d'initiation de la traduction dans la plante 23

1.4.2. Implication des eIFs dans l'infection virale 25

1.4.3. Les phénotypes de résistance conférée par des mutations dans les facteurs de sensibilité eIFs 26

1.4.4. Autres facteurs de sensibilité impliqués dans des résistances récessives monogéniques 28

1.5. Les résistances polygéniques 29

2. La durabilité d'une résistance 30
2.1. Concept d'une résistance durable 30
2.2. Les différentes étapes du contournement des résistances 31
2.3. Les forces évolutives influençant le contournement 33
2.4. Identification des déterminants viraux impliqués dans le contournement 35
2.5. La fréquence de contournement comme indicateur de durabilité d'une résistance 36
3. La tolérance des plantes aux virus : une alternative aux résistances classiques ? 36
3.1. Définition et concept de la tolérance des plantes aux virus 36
3.2. Mécanismes et exemples de gènes impliqués dans la tolérance 37
4. Le pathosystème Tabac/PVY 38
4.1. Le tabac cultivé 38
4.1.1. Origine, histoire et botanique 38
4.1.2. Génétique 41
4.1.3. Contexte industriel et scientifique 43
4.2. Le virus Y de la pomme de terre (*Potato virus Y*) : un pathogène majeur du tabac 44
4.2.1 Caractéristiques du *Potato virus Y* 44
4.2.2. Organisation génétique, fonction des protéines virales et transmission du virus 46
4.2.3. Classification complexe des isolats de PVY 49
4.3. Le gène majeur de lutte contre le PVY : le gène de résistance récessive *va* 50
5. Objectifs de la thèse 57

Chapitre II : Identifier les mécanismes génétiques modulant la durabilité de la résistance conférée par *va* 59

Article: Redundancy among *eIF4E* genes impacts the durability of *va* resistance to *Potato virus Y* in tobacco 61
Abstract 63
1. Introduction 65
2. Results 68
3. Discussion 84
4. Experimental procedures 93

5. Supporting information 100
5.1. Supplemental figure 100
5.2. Supplemental table 105
6. Résultats complémentaires 111
6.1. Analyse de la distribution des génotypes et des isolats en fonction du taux de contournement des différentes formes alléliques du gène de résistance *va*. 111
6.2. Le locus complexe eIF4E-2-3-4 influence la durabilité de la résistance conférée par le locus *va* quelle que soit la forme allélique présente au locus eIF4E-1 (eIF4E-1^{LD} ou eIF4E-1^{SD}). 114
References 121

Chapitre III : Identification de facteurs génétiques autres que *va* contrôlant la tolérance aux symptômes de nécrose nervaire induits par certains isolats de PVY chez le tabac 127

Article: *NtTPN1*, a *RPP8-like R* gene, controls *Potato virus Y*-induced veinal necrosis in tobacco 127
Abstract 131
1. Introduction 132
2. Results 136
3. Discussion 151
4. Concluding remarks 159
5. Experimental procedures 160
6. Supporting information 168
6.1. Supplemental figure 168
6.2. Supplemental table 176
7. Résultats complémentaires 180
7.1. Estimation du niveau d'accumulation du PVY^{N}-RB dans trois des accessions tolérantes aux symptômes de nécrose nervaire. 180
7.2. Validation fonctionnelle du gène *NtTPN1* par expression transitoire du gène *NtTPN1* non muté, chez des plantes tolérantes 181
7.3. Implication de HcPro dans l'induction des symptômes de nécrose nervaire. 184
References 186

Chapitre IV : Conclusion et perspectives 191

I. Synthèse des résultats et discussion 191

A. Analyse génétique de la durabilité de la résistance conférée par *va* chez le tabac..... 192

1. La fréquence de contournement : un bon estimateur de la durabilité 192

2. Deux régions génomiques sont impliquées dans la durabilité de la résistance conférée par *va* chez le tabac 193

3. Influence du fonds génétique ?..... 197

4. Comment expliquer le contournement de la résistance *va* ? 198

5. Perspectives 199

B. Mécanisme de tolérance au PVY chez le tabac..... 200

1. La nécrose nervaire induite par le PVY^N peut-elle être assimilée à une HR systémique ? 202

2. HcPro comme déterminant moléculaire du PVY^N induisant une réaction de HR après reconnaissance par la protéine NtTPN1 ? 204

3. La validation fonctionnelle de *NtTPN1* par complémentation 204

II. Conclusion générale..... 205

Références bibliographiques..... 206

Production scientifique

Publications

Michel V.*, **Julio E.***, **Candresse T.***, **Cotucheau J.**, **Decorps C.**, **Volpatti R.**, **Moury B.**, **Glais L.**, **Jacquot E.**, **Dorlhac de Borne F.**, **Decroocq V.**, **Gallois J.-L.** and **German Retana S**. Redundancy among eIF4E genes impacts the durability of va resistance to Potato virus Y in tobacco. *En preparation pour Molecular Plant Pathology*.

Michel V.*, **Julio E.***, **Candresse T.***, **Cotucheau J.**, **Decorps C.**, **Volpatti R.**, **Moury B.**, **Glais L.**, **Jacquot E.**, **Dorlhac de Borne F.**, **Decroocq V.** and **German Retana S** (2017). *NtTPN1*, a *RPP8*-like *R* gene, controls *Potato virus Y*-induced veinal necrosis in tobacco. *Soumis dans The Plant Journal*.

Communications orales

Michel V., **Julio E.**, **Cotucheau J.**, **Dorlhac de Borne F.**, **Glais L.**, **Jacquot E.**, **Decroocq V.**, **Candresse T.**, **German-Retana S**. (2017) Genetic and functional analysis of va resistance durability to Potato virus Y in tobacco. *American Phytopathological Society Annual Meeting*. San Antonio (USA).

Michel V., **Julio E.**, **Cotucheau J.**, **Dorlhac de Borne F.**, **Glais L.**, **Jacquot E.**, **Decroocq V.**, **Candresse T.** and **German-Retana S**. (2017) Genetic and functional analysis of va resistance durability to Potato virus Y in tobacco. *Rencontres de Virologie Végétale, plant virology meeting*. Aussois (France).

Posters

Michel V., **Glais L.**, **Julio E.**, **Dorlhac de Borne F.**, **Jacquot E.**, **German-Retana S.**, **Decroocq V.**, and **Candresse T.** (2015) va & co" : genetic and functional analysis of Potato virusY resistance in tobacco. *Rencontres de Virologie Végétale, plant virology meeting*. Aussois (France).

Michel V., **Glais L.**, **Julio E.**, **Dorlhac de Borne F.**, **Jacquot E.**, **Decroocq V.**, **German-Retana S.** and **Candresse T.** (2015) Genetic and functional analysis of resistance to Potato virus Y in tobacco. *12th solanaceae conference*. Bordeaux (France).

Michel V., **Glais L.**, **Julio E.**, **Dorlhac de Borne F.**, **Jacquot E.**, **Decroocq V.**, **German-Retana S.** and **Candresse T.** (2015) Genetic and functional analysis of resistance to Potato virus Y in tobacco. *15ème Journée scientifique de l'Ecole Doctorale Sciences de la Vie et de la Santé*. Arcachon (France).

**Premiers co-auteurs*

Acronyme	*Espèce*	*Genre*
BaMMV	*Barley mild mosaic virus*	*Bymovirus*
BaYMV	*Barley yellow mosaic virus*	*Bymovirus*
BCMV	*Bean common mosaic virus*	*Potyvirus*
BCTV	*Beet curly top virus*	*Curtovirus*
BYMV	*Bean yellow mosaic virus*	*Macluravirus*
CaMV	*Cauliflower mosaic virus*	*Caulimovirus*
ClYVV	*Clover yellow vein virus*	*Potyvirus*
CMG	*Cassava mosaic geminivirus*	*Begomovirus*
CMV	*Cucumber mosaic virus*	*Cucumovirus*
CymbRSV	*Cymbidium ringspot virus*	*Tombusvirus*
LMV	*Lettuce mosaic virus*	*Potyvirus*
MNSV	*Melon necrotic spot virus*	*Gamacarmovirus*
PlAMV	*Plantago asiatica mosaic virus*	*Potyvirus*
PoMV	*Poplar mosaic virus*	*Carlavirus*
PPV	*Plum pox virus*	*Potyvirus*
PSbMV	*Pea seed-borne mosaic virus*	*Potyvirus*
PVA	*Potato virus A*	*Potyvirus*
PVX	*Potato virus X*	*Potexvirus*
PVY	*Potato virus Y*	*Potyvirus*
RDV	*Rice dwarf Phytoreovirus*	*Reovirus*
RSV	*Rice stripe tenuivirus*	*Tenuivirus*
RTSV	*Rice tungro spherical virus*	*Waikivirus*
RTBV	*Rice tungro bacilliform virus*	*Tungrovirus*
RYMV	*Rice yellow mottle virus*	*Sobemovirus*
TBSV	*Tomato bushy stunt virus*	*Tombusvirus*
TCV	*Turnip crinkle virus*	*Carmovirus*
TEV	*Tobacco etch virus*	*Potyvirus*
TMV	*Tobacco mosaic virus*	*Tobamovirus*
TNV	*Tobacco necrosis virus*	*Tombusvirus*
ToMV	*Tomato mosaic virus*	*Tobamovirus*
ToRSV	*Tomato ringspot virus*	*Nepovirus*
TRSV	*Tobacco ringspot virus*	*Nepovirus*
TRV	*Tobacco rattle virus*	*Tobravirus*
TSWV	*Tomato spotted wilt virus*	*Tospovirus*
TuMV	*Turnip mosaic virus*	*Potyvirus*
TVMV	*Tobacco vein mottling virus*	*Potyvirus*
TYLCV	*Tomato Yellow Leaf Curl Virus*	*Begomovirus*
VMYMV	*Vigna mungo yellow mosaic virus*	*Begomovirus*
WMV	*Watermelon mosaic virus*	*Potyvirus*
ZYMV	*Zucchini yellow mosaic virus*	*Potyvirus*

Chapitre I : Introduction générale

Figure I-1. Modèle de la « course aux armements » dans les interactions plantes-virus.

Figure I-2. L'immunité innée antivirale.

Figure I-3. Mode d'action de l'ARN interférant (RNA silencing) dans la défense antivirale.

Figure I-4. Diversité des stratégies utilisées par les virus pour supprimer le RNA silencing.

Figure I-5. Le modèle de résistance « gène pour gène ».

Figure I-6. Représentation des modèles de garde et de leurre.

Figure I-7. Les différents domaines des principales protéines NB-LRR chez les plantes.

Figure I-8. Modèle d'activation « bait and switch » de la protéine NB-LRR.

Figure I-9. Représentation schématique du « continuum de réponses » observable chez l'hôte lors d'une interaction plante-pathogène.

Figure I-10. Résistance systémique acquise « SAR » mise en place lors d'une primo infection par un pathogène.

Figure I-11. Représentation du complexe d'initiation de la traduction chez les eucaryotes.

Figure I-12. Scénario du contournement des résistances de plante.

Figure I-13. Les trois principaux tabacs cultivés en France en champ

Figure I-14. Principaux symptômes observés en systémie sur feuilles de tabac.

Figure I-15. Représentation structurale des potyvirus.

Figure I-16. Représentation de la protéine eIF4E-1 présente dans les accessions de tabac résistantes *va*.

Chapitre II : Identifier les mécanismes génétiques modulant la durabilité de la résistance conférée par va

Figure II-1. Type of mutation at the eIF4E-1 locus on chromosome 21 in the different N. tabacum va-accessions.

Figure II-2. Boxplot representing the distribution of the numbers of infected plants per genotype at 30 dpi, taking into account the results obtained for each of the nine PVY isolates used.

Figure II-3. Phylogenetic analysis of the eIF4E protein family in *N. tabacum*.

Figure II-4. Relative quantification of *eIF4E-2* gene expression by quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (Q-RT-PCR).

Figure II-5. Relative quantification of *eIF4E-2* gene expression by Q-RT-PCR in various 'LD' tobacco accessions.

Figure II-6. Model of eIF4E-mediated *va* resistance durability in tobacco.

Figure II-S1. Position of the *eIF4E-2, eIF4E-3, and eIF4E-4* genes on the *N. tabacum* chromosome 14.

Figure II-S2. Amino acid sequence alignment of the various *eIF4E* proteins of *Nicotiana tabaccum*.

Figure II-S3. Mapping of the RNASeq reads against the *eIF4E-3* consensus sequence for the 'LD' accessions VAM, TN86, Wislica, PBD6, Sk 70 and Start, the EMS1 mutant and the susceptible BB16 accession.

Figure II-S4. Schematic representation of the coding sequence of *eIF4E-3* alleles in different tobacco accessions.

Figure II-S5. *eIF4E-2* gene expression and *va* resistance durability in TN90 and its derived EMS mutant TN90-4E3*.

Figure II-S6. Distribution des isolats de PVY et des génotypes portant différents allèles au niveau du locus de résistance va.

Chapitre III : Identification de facteurs génétiques autres que va contrôlant la tolérance aux symptômes de nécrose nervaire induits par certains isolats de PVY chez le tabac.

Figure III-1. Symptoms induced by the PVY^N (RB) isolate on the tolerant accessions Hercegovac, Lechia A, Zamojska 4 and on the sensitive controls BB16 and VAM.

Figure III-2. Mapping of the locus that confers tolerance to PVY^N-induced veinal necrosis (*NtTPN1*) on *N. tabacum* chromosome 13.

Figure III-3. Schematic representation of the NtTPN1 protein structure.

Figure III-4. DAB staining of tobacco leaves systemically infected with PVY^N (RB) at 30 dpi.

Figure III-5. Potential role of the *NtTPN1* gene in PVY^N-induced veinal necrosis in tobacco.

Figure III-S1. Symptoms induced by various PVY^N isolates on the tolerant accessions Bahia and Bresil Bahia and on the sensitive controls.

Figure III-S2. Symptoms induced by PVY^N isolate 10.26 on plants of F1 progenies of crosses between various tolerant accessions, 30 dpi.

Figure III-S3. Amino acid alignment of the Leucine Rich Repeat domains between *NtTPN1* and its *RPP8-like* orthologs in other *Solanaceae* species.

Figure III-S4. Symptoms induced at 30 dpi by the PVY^N (RB) on M3 plants fixed for the P457L and G521E mutations.

Figure III-S5. Accumulation, visualized under UV illumination, of fluorescent compounds in the leaves of the tolerant accessions and of the sensitive controls during PVY^N (RB) infection.

Figure III-S6. Relative quantification of *hsr203J* gene expression by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Figure III-S7. HR elicitation by the transient expression of AvrA, CP_{PVX} and *Rx* on the tolerant accessions and on the sensitive control.

Figure III-S8. 3D prediction structure of the LRR domain of NtTPN1 protein.

Figure III-S9. Dosage de l'accumulation en systémie de l'isolat PVY^N-RB.

Figure III-S10. Vecteur d'expression utilisé pour l'expression transitoire du gène *NtTPN1* dans les plantes tolérantes infectées par le PVY^N-N605.

Figure III-S11. Expression transitoire de *NtTPN1* dans les variétés tolérantes infectées par l'isolat de N605 du PVY^N.

Figure III-S12. Symptômes induits par des isolats de PVY recombinants sur les variétés tolérantes.

Chapitre IV : Conclusion et perspectives

Figure IV-1. Modèle fonctionnel expliquant le rôle des copies protéiques eIF4E-1, eIF4E-2 et eIF4E-3 dans la durabilité de la résistance *va* chez le tabac.

Chapitre I : Introduction générale

Table I-1. Classification du genre *Nicotiana*.

Table I-2. Origine et caractéristiques des accessions de tabac dont certaines ont été utilisées dans des programmes de sélection pour introgresser le gène de résistance récessive *va*.

Chapitre II : Identifier les mécanismes génétiques modulant la durabilité de la résistance conférée par *va*

Table II-1. Response of the four 'Large Deletion' *va*-genotypes, EMS1 mutant and susceptible BB16 tobacco to PVY isolates O139 and SN3.

Table II-2. Amino acid substitutions identified in the VPg central region (aa 101-123) of the progenies of PVY^N and PVY^O isolates after passaging in the 13 different *va* tobacco accessions.

Table II-3. RNASeq expression analysis of all *eIF4E* orthologs in the four groups of resistant accessions.

Table II-4. The deletion at the locus $eIF4E\text{-}3^{\Delta}$ on chromosome 14 co-segregates with the resistance durability character.

Table II-5. The deletion at the locus $eIF4E\text{-}1^{LD}$ on chromosome 21 co-segregates with the resistance durability character.

Table II-S1. Response of *va* tobacco genotypes to PVY isolates.

Table II-S2. Response of representative *va* tobacco genotypes to various PVY isolates.

Table II-S3. Amino acid changes in the VPg central region (aa 101-123) of the progenies of five PVY^N isolates.

Table II-S4. Amino acid changes in the VPg central region (aa 101-123) of the progenies of four PVY^O isolates.

Table II-S5. Heredity of the locus $eIF4E\text{-}3^{\Delta}$ in F1 and F2 populations of a cross between VAM and EMS1 mutant.

Table II-S6 A. La troncature de l'allèle $eIF4E\text{-}3^{\Delta}$ au niveau du locus *eIF4E-2-3-4* sur le chromosome 14 co-ségrège avec le caractère de durabilité de la résistance.

Table II-S6 B. La troncature de l'allèle $eIF4E\text{-}3^{\Delta}$ au locus *eIF4E-2-3-4* sur le chromosome 14 co-ségrège avec le caractère de durabilité de la résistance.

Table II-S7 A. La délétion $eIF4E\text{-}^{LD}$ au locus *va* sur le chromosome 21 co-ségrège avec le caractère de durabilité de la résistance.

Table II-S7 B. La délétion $eIF4E\text{-}1^{\Delta}$ au locus *va* sur le chromosome 21 co-ségrège avec le caractère de durabilité de la résistance.

Table II-S8. Hérédité de l'allèle *eIF4E-3*$^{\Delta}$ dans une population F2 issue d'un croisement entre les génotypes VAM et Wika.

Chapitre III : Identification de facteurs génétiques autres que va contrôlant la tolérance aux symptômes de nécrose nervaire induits par certains isolats de PVY chez le tabac.

Table III-1. Symptoms induced by PVY^{O} and PVY^{N} isolates on the 10 tolerant tobacco accessions.

Table III-2. Tobacco super-scaffolds containing the various SSR markers linked to the tolerance locus.

Table III-3. Mutations identified and analyzed in the *NtTPN1* gene among the M2 segregating families of the tobacco TILLING population.

Table III-S1. Details of the symptoms induced by other necrotic PVY isolates on four tolerant tobacco accessions.

Table III-S2. Phenotype displayed upon infection by PVY^{N} (RB) isolate by plants of F2 progenies from crosses between each tolerant tobacco accession and a sensitive parent.

Table III-S3. Symptoms induced by PVY^{N} and PVY^{O} isolates on the F1 progenies plants derived from crosses between the 10 tolerant tobacco accessions (allelism test).

Table III-S4. Details of all primers used in this study

Au fil des siècles, les pratiques agricoles ont subi de véritables transformations afin d'assurer une suffisance alimentaire à l'humanité. L'agriculture connaît un élan considérable au cours de la deuxième moitié du XXe siècle grâce aux progrès scientifiques et techniques, après la seconde guerre mondiale. Plus connue sous le nom de « révolution verte », l'agriculture s'intensifie et s'industrialise massivement à partir des années soixante, marquée par l'essor de l'agrochimie, de la mécanisation, de l'irrigation et de la sélection de variétés à haut rendement. Cette optimisation incessante des productions agricoles est devenue très peu respectueuse des écosystèmes et risque d'être malgré tout insuffisante dans les prochaines décennies. En effet, la population mondiale devrait augmenter de plus de 2,3 milliards pour atteindre 9,1 milliards en 2050 (Food and Agriculture Organisation of the United Nations, 2009). En parallèle, il a été estimé que la production agricole devra alors croître de plus de 70% pour satisfaire les besoins alimentaires de chaque individu (Tester et Langridge, 2010). Pour assurer une sécurité alimentaire durable, l'agriculture devra s'engager dans une démarche raisonnée en ayant un impact environnemental positif. En effet, l'augmentation des rendements de l'agriculture de ces quarante dernières années est malheureusement associée à l'utilisation de 1,7 fois plus de terres irriguées, d'environ 3,5 fois plus d'engrais phosphorés et de 6,9 fois plus d'engrais azotés (Tilman, 1999).

Le terme 'd'intensification durable' décrit « un processus ou système, où les rendements sont augmentés sans impact environnemental défavorable et sans conversion de terres supplémentaires non agricoles » (Garnett *et al.*, 2013; Pretty et Bharucha, 2014). Pour assurer une production suffisante, l'agriculture de demain devra faire face aux nouveaux défis du XXIe siècle qui seront l'augmentation de la population mondiale, la diminution de la disponibilité des ressources en eau, la surface limitée des terres arables, le changement climatique et évidemment le contrôle des agents phytopathogènes (Bommarco *et al.*, 2013; Garnett *et al.*, 2013; Tester et Langridge, 2010; Tilman, 1999).

Les maladies des plantes sont à l'origine de grandes crises alimentaires entraînant des pertes humaines et économiques considérables comme en Irlande durant la « Grande famine » de 1845, provoquée par *Phytophtora infestans* entrainant la perte de près de 40% des cultures de pomme de terre. D'autre cas similaires sont à déplorer et à imputer cette fois aux virus de plantes. En effet, en 2003 il a été estimé en Ouganda que la maladie de la mosaïque du manioc (provoquée par des *Begomovirus*) avait engendré une famine

importante, entraînant de nombreuses pertes humaines mais également des pertes économiques de l'ordre de 1,9 milliards de dollars sur tout le continent Africain (Legg et Fauquet, 2004). En Asie du Sud-Est, des maladies virales du riz telles que le tungro causée par le *Rice tungro spherical virus* (RTSV, *Waikivirus*) et le *Rice tungro bacilliform virus* (RTBV, *Tungrovirus*), la bigarrure jaune ou la marbrure jaune provoquée par le *Rice yellow mottle virus* (RYMV, *Sobemovirus*) et la striure du riz engendrée par le *Rice stripe virus* (RSV, *Tenuivirus*), causent des pertes de rendement estimées entre 50 et 100% et une perte économique de plus de 1,5 milliard de dollars chaque année (Hull, 2013). La gestion au niveau international de la maladie de la Sharka, causée par le *Plum pox potyvirus* (PPV, *Potyvirus*) sur les arbres fruitiers, a coûté plus de 10 milliards d'euros depuis les années 1970 (Cambra *et al.*, 2006). Globalement, dans le monde entier les pertes de rendement causées par des virus de plantes entraineraient un coût économique annuel de plus de 30 milliards de dollars (Sastry et A. Zitter, 2014). Les phytovirus sont donc des pathogènes majeurs retrouvés dans les cultures du monde entier, et représenteront une menace de plus en plus sérieuse dans un futur proche. En effet, il a été montré que le changement climatique était impliqué dans l'apparition de maladies émergentes chez les plantes cultivées (Anderson *et al.*, 2004; Bebber *et al.*, 2013; Garrett *et al.*, 2011). Parmi les maladies infectieuses émergentes, les virus représentent à eux seuls près de la moitié des pathogènes impliqués, soit 47% contre 30% pour les champignons, et seulement 16% pour les bactéries (Anderson *et al.*, 2004). Il est nécessaire de mettre en place des moyens de lutte efficaces et durables contre les virus (García-Arenal et McDonald, 2003 ; Malmstrom *et al.,* 2011).

Pour lutter efficacement contre les virus de plante qui sont des pathogènes intracellulaires obligatoires, la mise en place de méthodes prophylactiques est nécessaire (Nicaise, 2014). Les traitements curatifs étant impossibles, pour limiter la propagation du virus dans une parcelle, l'arrachage des plants contaminés ou le contrôle des semences reste la seule solution. La majorité des virus sont transmis par des arthropodes, des nématodes ou des zoospores et la lutte contre le virus, peut passer par la lutte contre ces vecteurs, par l'emploi de pesticides. Toutefois, les effets négatifs des produits phytosanitaires sur la biodiversité et la santé humaine ne sont plus à démontrer (Bommarco *et al.*, 2013; Colborn *et al.*, 1993; Horrigan *et al.*, 2002; Potts *et al.*, 2010).

Dans ce contexte, le déploiement de variétés végétales porteuses de gènes de résistance contre les phytovirus reste l'approche la plus efficace dans le contrôle de ces pathogènes (García-Arenal et McDonald, 2003; McDonald, 2014; Tester et Langridge, 2010).

Cependant, les populations virales possèdent un potentiel évolutif très élevé. Cette évolution rapide entraîne une apparition de variants viraux capables de contourner et de s'adapter aux résistances génétiques des plantes (García-Arenal et McDonald, 2003; Parlevliet, 2002). C'est pourquoi, l'un des critères majeurs pour les sélectionneurs, est d'obtenir des variétés possédant une résistance durable c'est-à-dire qui demeure efficace durant une longue période lorsque la variété est cultivée de manière intensive dans un milieu propice au développement de la maladie (Johnson, 1979, 1981).

C'est dans ce cadre général que s'inscrivent les objectifs de cette thèse qui visent à identifier et caractériser les mécanismes impliqués dans la durabilité d'une résistance et les gènes contrôlant la sévérité des symptômes en cas d'infection, dans le cadre du pathosystème tabac/PVY (*Potato virus Y*, *Potyvirus*).

Chapitre I :

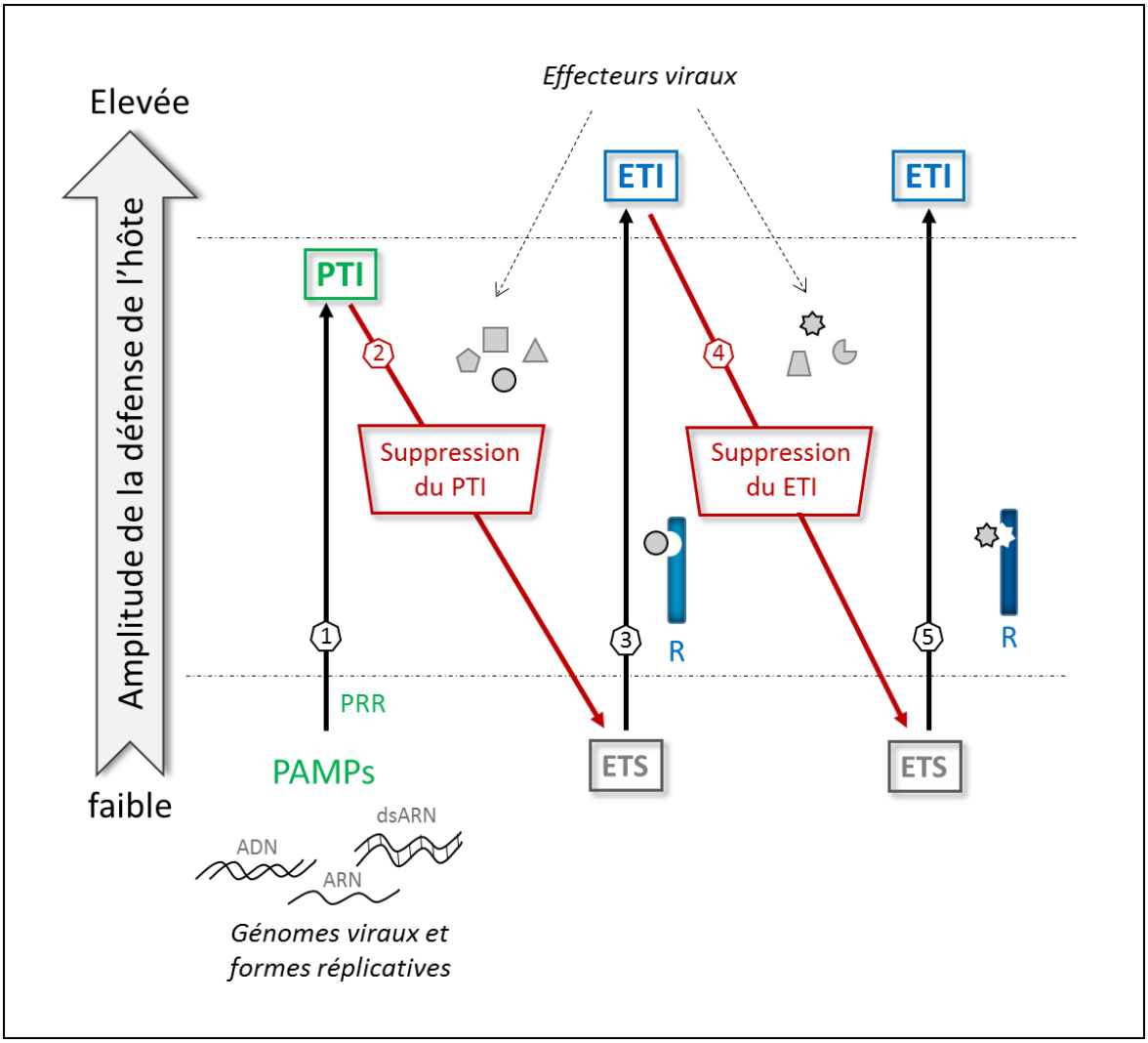
Introduction générale

Chapitre I : Introduction générale

1. Les mécanismes de résistance des plantes aux phytovirus

Les plantes sont généralement considérées comme des êtres vivants immobiles, vulnérables, et passifs mais elles ont su développer au cours de l'évolution, un système de défense perfectionné. Il est généralement admis que la plupart des variétés sont résistantes à la majorité des pathogènes et que la sensibilité reste l'exception (Kang *et al.,* 2005*a*). Cette forme de résistance qui protège la majorité des espèces végétales est dite « non-hôte ». L'un des scénarios permettant d'expliquer l'incapacité d'infection du virus dans l'espèce non hôte serait lié à une impossibilité du virus à accomplir une étape cruciale de son cycle d'infection et ce, de manière très précoce. Le principe de la non-compatibilité de la résistance non-hôte pourrait être intéressant à exploiter et à transférer dans des espèces d'intérêt agronomique, mais les bases génétiques de cette résistance sont difficiles à étudier du fait de l'absence de génotypes sensibles au sein de l'espèce végétale non-hôte. En effet, les mécanismes et les voies de signalisation mis en jeux dans la résistance non-hôte sont peu connus, surtout dans le cas des virus de plante.

Lorsque les virus sont capables de se multiplier dans une plante, on dit alors que la plante est sensible ou plante hôte. Le cycle de vie du virus commence par la pénétration des virions (particules virales infectieuses) dans les cellules hôtes, à la faveur de blessures ou piqûres engendrées par leur vecteur par exemple. Le virion est alors décapsidé puis les cellules hôtes prennent en charge l'expression du génome viral en fournissant l'appareil de traduction adéquat pour tous les virus à ARN et la machinerie de transcription pour les virus à ADN. Les ARNm viraux sont traduits dans le cytoplasme, en au moins trois protéines virales nécessaires à l'accomplissement du cycle viral : la protéine de réplication une RNA dependant RNA polymerase (RdRp), la protéine de mouvement (MP) et la protéine d'enveloppe ou de capside (CP). Les protéines de réplication virale se combinent avec des protéines cellulaires de l'hôte pour produire de multiples copies du génome viral. Ces nouveaux génomes interagissent avec les CP pour former de nouveaux virions ou des complexes ribonucléoprotéiques viraux (vRNP). Lors de leur mouvement dans la plante, les virus agissent sur les plasmodesmes pour permettre le passage du génome viral de cellule à cellule, puis migrent via le phloème pour envahir la plante de façon systémique (mouvement à longue distance).



<u>Figure I-1.</u> Modèle de la « course aux armements » dans les interactions plantes-virus.
Après introduction des particules virales à l'intérieur de la cellule et décapsidation, le génome viral ou ses formes réplicatives, agissent comme des PAMPs (Pathogen-Associated Molecular Patterns) détectés par les PRR (Patterns Recognition Receptor), conduisant au PTI (①). Les virus capables de surmonter cette première ligne de défense codent pour des effecteurs qui interfèrent avec les voies du PTI, entraînant la sensibilité de l'hôte ou ETS (Effector Triggered Susceptibility) (②). Les protéines codées par des gènes de résistance (R) chez la plante reconnaissent les effecteurs viraux et induisent l'ETI (③). Certains virus évoluent pour échapper à la reconnaissance de l'hôte soit en modifiant leurs effecteurs, soit en obtenant de nouveaux effecteurs dans le but de supprimer les mécanismes de l'ETI, rendant de nouveau la plante sensible (④). La sélection va favoriser de nouvelles protéines R capables de reconnaître ces nouveaux effecteurs, restaurant ainsi à nouveau l'ETI (⑤). Adapté de Jones et Dangl, (2006) et de Nicaise, (2017).

Tout processus qui, chez une plante, interdit ou limite le développement du virus est appelé résistance. Pour éviter toute confusion il est important de définir les différents qualificatifs utilisés pour nommer une résistance de plante. Les résistances sont généralement classées selon trois critères, i) l'hérédité ii) l'efficacité et iii) la spécificité. Selon l'hérédité, l'on distingue : des résistances sous le contrôle d'un seul gène, résistances dites monogéniques, qui peuvent être soit dominante soit récessive, ou des résistances sous le contrôle de plusieurs gènes, dites poly-ou multigéniques. L'efficacité à la résistance est qualitative ou quantitative. Une résistance qualitative confère à la plante une résistance complète ou totale vis-à-vis d'un pathogène (incapacité d'infection et d'accumulation en systémie du pathogène). En revanche, une résistance quantitative confère une résistance partielle ou incomplète, le cycle du pathogène dans la plante n'est pas entièrement bloqué et la plante peut subir des dégâts (Parlevliet, 1979). Au sein d'une même espèce végétale certains génotypes (ou des variétés dans le cas d'espèces cultivées) sont sensibles et d'autres sont résistants. La résistance peut être qualifiée de verticale, conférant une résistance très spécifique, reposant sur un gène unique en général dominant, ou horizontale, reposant sur plusieurs gènes, et moins spécifique car efficace vis à vis d'un spectre plus large de pathogènes. La plupart des résistances monogéniques (récessives ou dominantes) sont qualitatives et qualifiées de verticales, et les résistances polygéniques sont généralement contrôlées par des QTL « quantitative traits loci » et donc considérées comme quantitatives et horizontales avec un spectre d'action plus large.

1.1. Le système immunitaire chez les plantes

La coévolution entre les virus et leurs hôtes a pour conséquence une adaptation perpétuelle des mécanismes de défense de la plante, appelée « course aux armements » et conceptualisée par le modèle en « zig-zag » (figure I-1) (Jones et Dangl, 2006). Les fondements de la résistance hôte sont basés sur la reconnaissance du non-soi, gouvernée par des récepteurs membranaires spécialisés nommés PRR pour « Patterns Recognition Receptor » qui déclenchent, après détection de l'agent pathogène, des réponses de défense de l'hôte. Il est généralement admis qu'il existe principalement deux voies dans le système immunitaire des plantes le PTI pour « PAMP-Triggered Immunity » et l'ETI pour « Effector Triggered Immunity » (Jones et Dangl, 2006). Le PTI pourra être inhibé par des protéines effectrices de virulence codées par les pathogènes induisant une sensibilité de la plante et conduisant à l'ETS (Effector Triggered Susceptibility). Puis le système de défense évoluant, des protéines de type

R capables de reconnaître (directement ou indirectement) l'effecteur sont produites et sont impliquées dans la seconde voix de défense l'ETI (figure I-1).

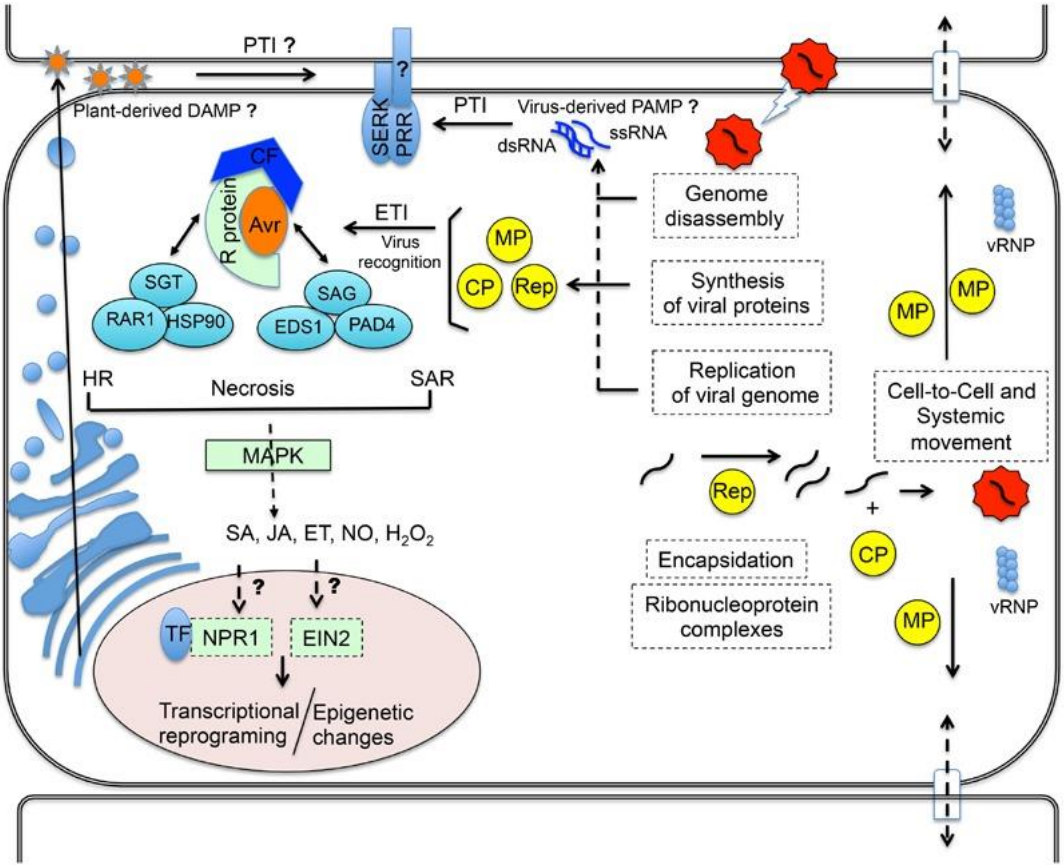
En premier lieu, la résistance basale ou PTI est coordonnée par les PRRs incluant des RLK (Receptor Like-Kinase) qui perçoivent dans le milieu extracellulaire des signaux moléculaires associés aux microbes ou agents pathogènes (MAMPs ou PAMPs pour « Microbial- or Pathogen-Associated Molecular Patterns »), comme par exemple, la chitine provenant de la paroi cellulaire des champignons ou la flagelline provenant des flagelles de bactéries (Chisholm *et al.*, 2006; Nürnberger et Kemmerling, 2006).

Cette première ligne de défense basée sur une reconnaissance extracellulaire du non-soi est difficilement applicable aux virus qui sont des parasites intracellulaires obligatoires. Un PAMP viral ne répond pas aux critères établis pour les autres pathogènes. En effet, un PAMP se caractérise par une signature moléculaire hautement conservée au sein d'une même famille de pathogènes (Nicaise, 2017). La variabilité élevée des génomes viraux rend donc difficile l'identification de telles molécules. De ce fait, la réponse des plantes aux virus ne semble pas répondre aux grands concepts du PTI établis pour d'autres pathogènes de plantes (Bent et Mackey, 2007; Mandadi et Scholthof, 2013). Toutefois, des études récentes suggèrent qu'il existerait chez les virus l'équivalent des PAMPs impliqués dans le PTI (Boualem *et al.*, 2016; de Ronde *et al.*, 2014; Nicaise, 2017; van der Hoorn et Kamoun, 2008). L'une des hypothèses, serait que le génome viral (ADN ou ARN) et en particulier les formes ARN double brins issues de la réplication des virus à ARN simple brin, joueraient le rôle de PAMP dans l'activation du PTI (figure I-1). Ceci induirait en parallèle de la voie du PTI, l'un des mécanismes du système immunitaire inné « l'ARN interférant » ou « ARNi » impliqué dans la résistance des plantes aux virus (*voir section 1.2.*) (de Ronde *et al.*, 2014; Ding, 2010; Niehl *et al.*, 2016). D'autres résultats indiquent que certains récepteurs cellulaires parmi les PRRs sont impliqués dans la reconnaissance des PAMP viraux. Il a été montré que NIK1 [NSP (Nuclear Shuttle Protein)-Interacting Kinase 1] hautement similaire à BAK1 [BRI1 (Brassinosteroid Intensive1)-Associated Kinase 1] l'un des récepteurs clefs des PAMPs (Kørner *et al.*, 2013), est impliqué dans la restriction du mouvement et de l'accumulation de geminivirus (figure I-2) (Carvalho *et al.*, 2008; Gouveia *et al.*, 2017). Un autre récepteur identifié chez *Nicotiana benthamiana* possédant un domaine kinase serait probablement un récepteur de type PRR, le NbIRK (Induced Receptor-like Kinase), impliqué dans la résistance au *Tobacco mosaic virus* (TMV, *Tobamovirus*) (Caplan *et al.*, 2009). De plus, la mise en évidence des voies de signalisation induites par les PAMPs ont de fortes similitudes avec celles induites lors d'une infection virale,

comme la production de ROS (reactive oxygen species) (Diaz-Vivancos *et al.*, 2008), le dépôt de callose (Zavaliev *et al.*, 2013) ou encore la production d'acide salicylique (SA) chez le tabac, la courge et *Arabidopsis thaliana* (Mayers *et al.*, 2005; Naylor *et al.*, 1998). Il semble donc que le PTI soit aussi une voie de défense des plantes contre les virus.

Pour contourner cette défense basale, les virus codent pour des protéines effectrices de virulence capable d'inhiber les réponses liées au PTI (Jones et Dangl, 2006). Récemment, il a été montré que le PTI contribue à la résistance au PPV chez *Arabidopsis thaliana*. Le PPV va supprimer les réponses de défenses induites lors du PTI durant l'infection virale grâce à sa protéine de capside (CP) qui agit comme un effecteur viral capable de supprimer le PTI restaurant une sensibilité de l'hôte (Nicaise et Candresse, 2017).

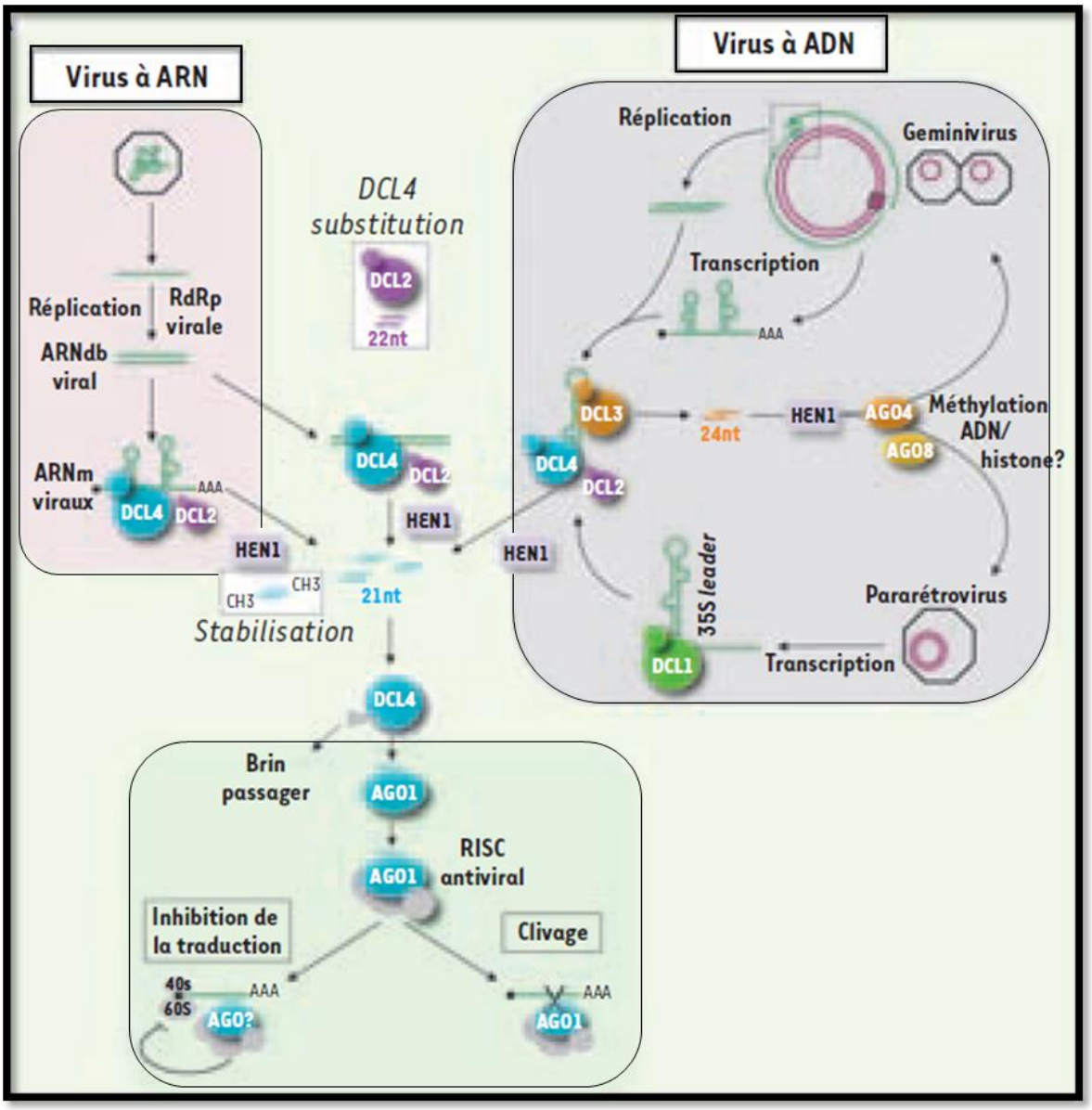
Les plantes ont su rebondir en développant des gènes de résistance *R,* qui codent généralement pour des protéines de type NB-LRR « Nucleotide Binding-Leucine-Rich Repeat » interagissant spécifiquement avec un facteur d'avirulence (Avr) du virus. Cette deuxième ligne de défense robuste et rapide correspond à la résistance de type ETI « Effector triggered immunity » et conduit généralement à une réaction d'hypersensibilité « HR » entrainant la mort cellulaire localisée (figure I-2). L'interaction spécifique entre la plante et le pathogène a été conceptualisée par le modèle de gène pour gène par Harold Henry Flor dans les années 1950 (Flor, 1955; 1971), et ensuite plusieurs modèle en ont découlé (van der Hoorn et Kamoun, 2008) qui seront détaillés dans la section sur les résistances dominantes (*voir section 1.3.1.*).



<u>Figure I-2.</u> L'immunité innée antivirale présente des caractéristiques conservées avec les réponses immunitaires antibactériennes et antifongiques. Les virus de plante (particules rouges) sont des parasites biotrophes obligatoires et, une fois dans les cellules hôtes (éclair blanc), détournent la machinerie de l'hôte pour assurer leur traduction/réplication et mouvement. Les ARNm viraux sont traduits dans le cytoplasme, produisant la protéine de réplication (Rep), la protéine de mouvement (MP) et la protéine d'enveloppe ou de capside (CP). Les génomes viraux néoformés interagissent avec les CP pour former de nouveaux complexes ribonucléoprotéiques viraux (vRNP). Certaines de ces protéines virales constituent des facteurs avirulent (Avr) reconnus par des récepteurs NB-LRR cytosoliques (*e.g.,* des protéines R), déclenchant ainsi l'ETI, qui entraîne une HR, une nécrose ou une SAR (résistance systémique acquise). Les protéines R, leurs Co-Facteurs (CF) et les facteurs Avr forment un complexe interagissant avec les modules SGT1 / RAR1 / HSP90 et EDS1 / PAD4 / SAG101 pour moduler les changements en aval des niveaux d'acide salicylique(SA), acide jasmonique (JA), ethylène (ET), oxydes d'azote (NO) et du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) via une cascade de MAP kinases, aboutissant à l'induction de gènes de défense. Le complexe formé de NPR1 et de facteur de transcription (FT) va induire l'expression de gènes de défense via une signalisation de SA, alors que EIN2 est un régulateur de la signalisation via l'ET. L'infection virale peut également déclencher des changements épigénétiques. Les formes de réplication des génomes viraux (dsRNA) ou des formes d'ARN aberrantes pour la cellule, représentent des PAMPs viraux qui déclenchent le (PTI). Adapté de Gouveia *et al.* (2017).

1.2. La défense antivirale basée sur le « RNA silencing »

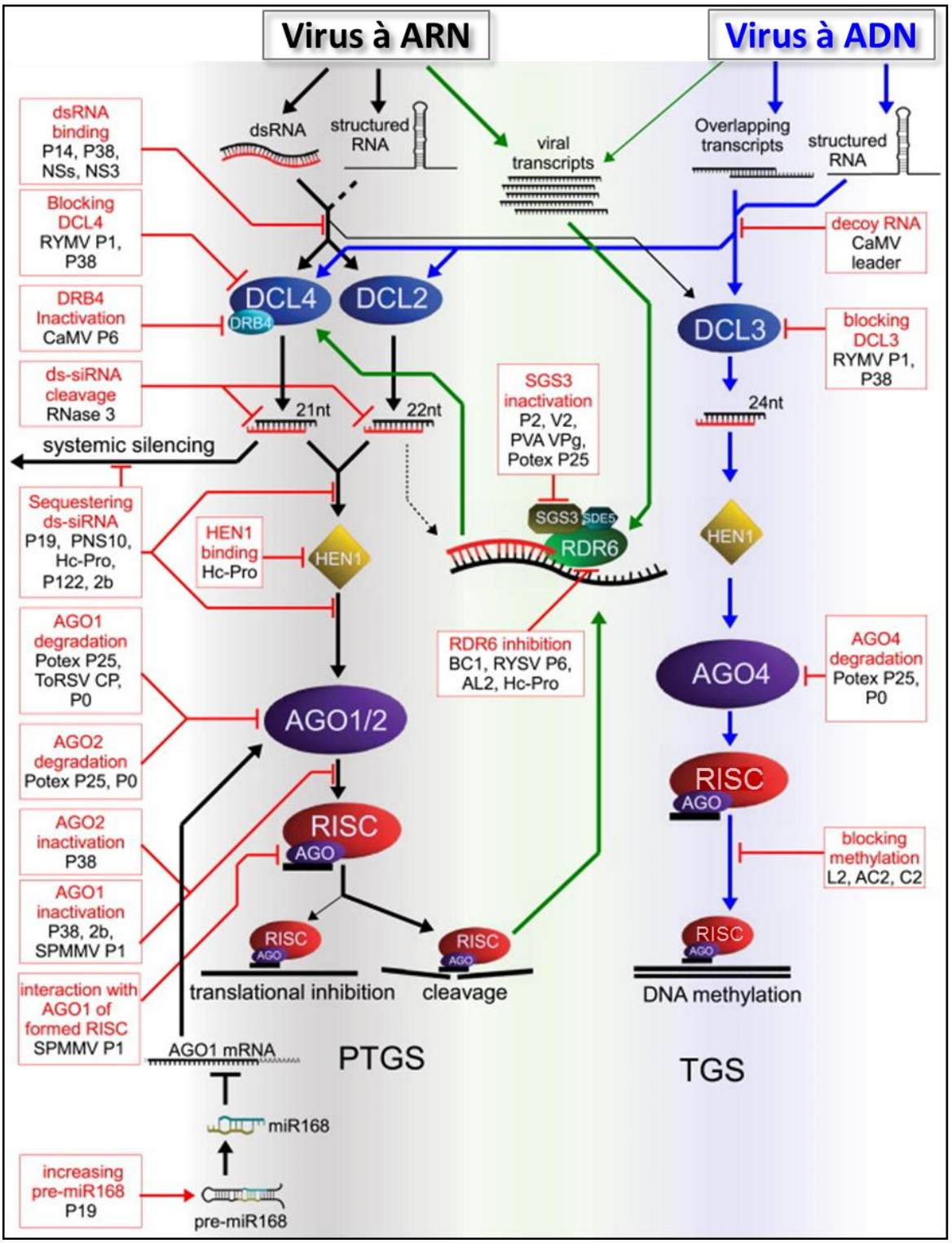
Comme on l'a vu précédemment, l'un des mécanismes impliqué dans le système immunitaire basal est le « RNA silencing » ou « 'ARN interférant ». Il s'agit d'un moyen de défense relativement bien conservé et présentant des similitudes avec celui des animaux mais ayant tout de même divergé au cours de l'évolution (Ding, 2010). Les mécanismes sont complexes mais le point de départ est le même, la détection de la présence d'ARN double brin (ARNdb) présents dans la cellule végétale. Pour la plante il s'agit d'un moyen de régulation des éléments transposables et de la régulation de l'expression de gènes au niveau transcriptionnel (TGS, « transcriptional gene silencing ») ou post-transcriptionnel (PTGS « post-transcriptional gene silencing ») mais également un mécanisme de défense antivirale performant. Les ARN viraux double brin (ARNdb) produits dans la cellule végétale lors du cycle de réplication du virus sont les « déclencheurs » communs du «RNA silencing » (figure I-3). Au cours de la première étape de la réplication des virus à ARNsb, l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) virale synthétise une molécule complémentaire de l'ARN génomique (ARN+ infectieux), appelée ARN anti-messager (ARN négatif ou ARN-). Cet ARN(-) est tout d'abord attaché à l'ARN(+) par des liaisons hydrogène, formant une structure d'ARN bicaténaire (appelée forme réplicative). Ces ARN viraux double brin (ARNdb) sont reconnus par la plante via une RNase de type III, Dicer like (DCL), qui les clive en petits ARNdb appelés siARN (short interference RNA ou siRNA) de 21-22 nucléotides (nt). Dans ce cas on parle de vsiARN pour « virus-derived small RNA » (figure I.3). L'hybridation des ARNdb avec DCL se fait grâce à son domaine PAZ (Piwi-Argonaute/Zwille), puis le clivage des ARNdb grâce à son domaine enzymatique de type RNase III. Les vsiARN de 21-22 nt ainsi formés sont ensuite pris en charge par un complexe multi-protéique dénommé RISC (RNA-Induced Silencing Complex) porteur d' activités hélicase ATP-dépendante et RNase. Un seul des deux brins des vsiARN servira de brin guide en restant associé au complexe RISC. Ce brin guide va permettre de cibler par hybridation spécifique, un brin d'ARN complémentaire (ARN cible) présent dans la cellule. La protéine Argonaute (AGO), présente dans le complexe RISC, possède une activité endonucléolytique, qui va cliver cet ARN cible (les fragments générés seront ensuite dégradés par des RNases cellulaires). Le mécanisme de « RNA silencing » sera maintenu et amplifié par la synthèse de nouveaux ARNdb via l'action de RdRp endogène. Le « RNA silencing » se généralise à la plante entière au moyen d'éléments mobiles que sont les siARN qui ont la capacité de se propager en systémie en empruntant les tissus vasculaires (Ding, 2010; Dunoyer *et al.*, 2013; Molnar *et al.*, 2010) (figure I-3)



<u>Figure I-3.</u> Mode d'action de l'ARN interférant (« RNA silencing ») dans la défense antivirale. Dans le cas des virus à ARN, DCL4 est l'enzyme Dicer principale de la réponse antivirale et DCL2 celle de substitution quand DCL4 n'est pas fonctionnelle. Pour les virus à ADN, DCL1 facilite l'accès de DCL4 et de DCL3 (les deux Dicer antivirales principales) à l'ARN double brin viral. DCL2 agit également de manière redondante avec DCL4 pour ces virus à ADN. Les vsiARN produits sont tous stabilisés par l'ajout d'un groupement méthyl à leur extrémité 3' catalysé par la protéine HEN1. Les deux brins du duplexe de vsiARN sont ensuite séparés et seul l'un des deux brins est incorporé dans le complexe RISC antiviral, l'autre brin étant dégradé. AGO1 est ici représentée comme l'Argonaute principale intervenant dans la réponse antivirale mais d'autres protéines AGO sont très probablement impliquées. Le complexe RISC va ensuite reconnaître les ARN messagers viraux complémentaires au brin guide incorporé ainsi que tout transcrit cellulaire possédant une homologie de séquence avec l'ARN viral initiateur. Cette reconnaissance entraînera le clivage ou l'inhibition de la traduction des messagers ciblés. Dans le cas des virus à ADN, les vsiARN de 24nt produits par DCL3 peuvent également inhiber la réplication de l'ADN génomique viral en étant incorporés dans AGO4 et/ou AGO6, induisant un silencing transcriptionnel par méthylation de l'ADN ou des histones présentes sur le génome viral qui se réplique dans le noyau sous forme de mini-chromosomes (d'après Dunoyer, 2009).

Pour les virus à ADN, la formation d'ARNdb dépend de la nature de la molécule d'ADN viral qui peut être simple (ADNsb) ou double brin (ADNdb). Par exemple le *Vigna mungo yellow mosaic virus* (VMYMV, *Begomovirus*) de la famille des *Geminiviridae*, possède un ADNsb et la formation d'ARNdb cytoplasmique se fait par appariement entre transcrits sens et anti-sens formés durant la transcription (Chellappan *et al.*, 2004; Pooggin *et al.*, 2003). L'ARNdb ainsi formé sera également reconnu par des DCL qui produiront cette fois des vsiARN de 24nt de long. Pour les pararetrovirus à ADNdb comme les *Caulimoviridae* dont fait partie le *Cauliflower mosaic virus* (CaMV, *Caulimovirus*), la transcription nucléaire de son génome par une ARN polymérase II endogène va conduire en un ARN polycistronique. L'ARNm 35S pourra dans le cytoplasme former une structure secondaire en se repliant sur lui-même qui sera reconnue comme un ARNdb par les DCL qui le « couperont » en fragments de 24nt (figure I-3).

Certaines protéines virales sont capables de supprimer le « RNA silencing » et sont nommées VSR pour « viral suppressor of RNA silencing ». Ces suppresseurs viraux peuvent intervenir à différentes étapes (Csorba *et al.*, 2015; Incarbone et Dunoyer, 2013) comme le montre la figure I-4, qui reflète la très grande diversité des stratégies déployées par les virus de plantes pour contrecarrer le « RNA silencing » (figure I-4). Ainsi, la protéine 2b du CMV est capable de réduire la quantité de vsiARN en interagissant probablement avec RdRp1 chez *A. thaliana* (Diaz-Pendon *et al.*, 2007). La protéine P19 du *Cymbidium ringspot virus* (CymbRSV, *Tombusvirus*) agit en séquestrant les siARNs produits dans la cellule et empêchent leur incorporation dans le complexe RISC (Silhavy *et al.*, 2002; Szittya, 2002).
Chez les potyvirus la protéine HC-Pro du *Tobacco etch virus* (TEV, *Potyvirus*) et du *Turnip mosaic virus* (TuMV, *Potyvirus*), sont capables d'inhiber la voix du PTGS en diminuant la quantité de siARN et probablement des vsiARN (Garcia-Ruiz *et al.*, 2015; Kasschau *et al.*, 2003; Mallory *et al.*, 2001).



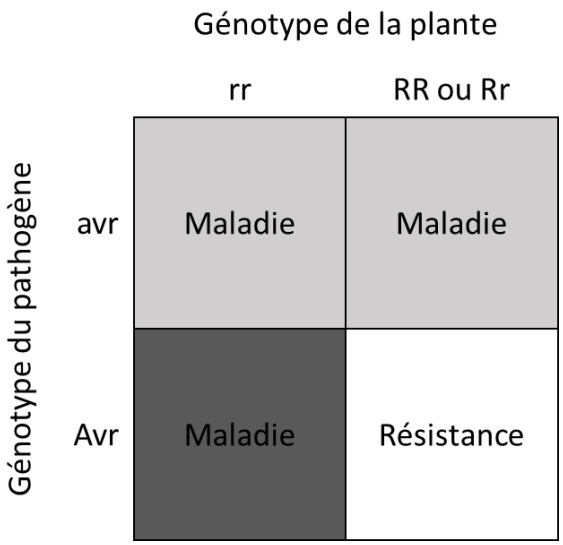
<u>Figure I-4.</u> Diversité des stratégies utilisées par les virus pour supprimer le RNA silencing. La RdRp endogène RDR6 est représentée ici avec ses cofacteurs SGS3 et SDE5. Les VSR viraux inhibant sont indiqués en noir et leur mode d'action en rouge. D'après Csorba *et al.* (2015).

1.3. Les résistances monogéniques qualitatives

1.3.1. Les résistances dominantes contrôlées par les gènes *R*

La plupart des gènes *R* contrôlent des résistances monogéniques dominantes : la résistance est contrôlée par un seul gène et la présence d'un seul allèle de ce gène suffit à l'expression du phénotype de résistance (figure I-5). Les gènes *R* contrôlent la voie de l'immunité déclenchée par l'effecteur (ETI) qui est la deuxième ligne de défense mise en place après la suppression du PTI par le déploiement d'effecteurs de pathogènes. La majorité des gènes *R* caractérisés codent pour des protéines de type NB-LRR (également appelées NLR, pour « Nucleotide-Binding-Leucine Rich Repeat »). Ces protéines NB-LRR confèrent une résistance spécifique à plusieurs types de pathogènes, bactéries, oomycètes, nématodes, insectes et virus.

Les mécanismes de résistance sont induits quand la protéine NLR "reconnaît" la protéine codée chez l'agent pathogène par un gène dit "d'avirulence" (gène ou facteur Avr) (figure I-5). L'interaction physique, directe ou non, des produits de ces gènes a pour conséquence l'activation d'une cascade de signalisation qui va coordonner les réponses de défense de la plante, visant à bloquer l'invasion des tissus végétaux par le pathogène en induisant dans la majorité des cas le développement d'une HR (réaction d'hypersensibilité) au niveau local, et l'induction de la résistance systémique acquise (SAR), mécanisme de défense non spécifique du pathogène.



<u>Figure I-5.</u> Le modèle de résistance « gène pour gène ». Le gène dominant *R* confère une résistance spécifique au pathogène. Cela dépend de la présence ou non de l'allèle de virulence (avr) ou d'avirulence (Avr) chez le pathogène. Lorsque le pathogène est virulent la protéine avr ainsi codée n'est pas reconnue par le produit du gène *R*, conduisant à la maladie (en gris clair et gris foncé). En revanche l'acquisition de mutation dans le facteur de virulence peut conduire à la production d'un facteur Avirulent (Avr), reconnu par le produit du gène *R* ce qui conduit à la résistance de la plante (en blanc). D'après Moffett, (2009).

Le modèle ligand-récepteur correspond à une interaction directe entre le facteur d'avirulence et la protéine R. Une interaction directe entre le produit du gène *N* du tabac et le domaine hélicase (p50) de la protéine de 126 kDa du TMV a été proposée (Ueda *et al.,* 2006). Lorsque le tabac porteur du gène *N* est infecté par le TMV il y a induction d'une HR localisée confinant le pathogène au point d'inoculation et rendant la plante résistante (Whitham *et al.,* 1996). Ueda et ses collaborateurs (2006) ont montré que le domaine p50 interagissait avec le domaine NB du facteur N, dans un système double hybride dans la levure et *in planta* (Ueda *et al.,* 2006). Cette interaction directe entre N et p50 a cependant été remise en question plus tard, suite aux travaux de Caplan *et al.* (2008). Ils ont montré qu'une protéine chloroplastique nommée NRIP1 pour « N Receptor Interacting Protein 1 » serait recrutée par la p50, et formerait un complexe p50-NRIP1 qui serait reconnu par le domaine TIR de la protéine N pour activer les réactions de défense (Caplan *et al.,* 2008; Caplan *et al.,* 2015). L'interaction entre le facteur N et le domaine p50 ne serait donc pas directe et NRIP1 jouerait le rôle de protéine cible gardée par le facteur N. L'un des rares exemples d'interaction directe démontrée entre le produit d'un gène de type *R* et un facteur d'avirulence viral provient des travaux de Zhu *et al.* (2017). Ces auteurs ont récemment montré que la protéine codée par le gène de résistance dominante *Sw-5b* de tomate, interagissait directement avec l'effecteur viral, la protéine de

mouvement NSm codée par un tospovirus. Il s'agit plus particulièrement du domaine NB-ARC-LRR de la protéine Sw-5b qui interagit directement *in vitro* et *in planta* avec un peptide de 21 acides aminés (NSm21) correspondant à une région conservée de la protéine de mouvement chez les tospovirus (Zhu *et al.,* 2017).

Le modèle de garde est basé sur une interaction indirecte entre l'effecteur et la protéine NB-LRR via une protéine de garde (figure I-6). Deux hypothèses permettent d'expliquer la transduction du signal de défense *i*) la protéine de garde interagit avec la protéine R après reconnaissance par la protéine gardéee de l'effecteur (facteur Avr); *ii*) La protéine R et la protéine de garde sont liées et la présence du facteur Avr entraîne une dissociation du complexe protéine R/protéine de garde. *In fine*, la protéine de garde interagit directement avec le facteur d'avirulence entraînant la dissociation ou la modification de conformation de la protéine R, ce qui conduira à la résistance. Cette perception indirecte de l'effecteur permettrait à la plante de reconnaître une multitude de pathogènes avec une seule protéine R (Dangl et Jones, 2001). De manière implicite, ce modèle de garde sous-tend que la cible de l'effecteur (qui est « gardée » par R) est indispensable à la fonction de virulence de l'effecteur (en l'absence de R).

Dans le cas du modèle du leurre la cible de l'effecteur est « gardée » par la protéine R, qui mime la cible « opérationnelle » de l'effecteur, mais ne conduit pas à la maladie (figure I-6). Ainsi les leurres limiteraient les cibles des effecteurs pour piéger le pathogène dans un système de reconnaissance en présence de R.

Récemment un quatrième modèle a été proposé : le modèle du leurre intégré ou « integrated decoy » (Cesari *et al.*, 2014). Les travaux de Leroux *et al* (2015) décrivent un mécanisme de défense très ingénieux chez Arabidopsis, permettant de convertir l'activité de virulence d'un effecteur bactérien en déclencheur d'une réponse immunitaire. La bactérie *Ralstonia solanacearum* possède en effet un effecteur PopP2 qui cible une protéine chez la plante (RRS1-R) qui se révèle être un leurre directement intégré à un récepteur immunitaire (RPS4). En s'attaquant à ce leurre, PopP2 déclenche involontairement le système d'alarme. PopP2 acétyle un acide aminé (Lysine) dans le domaine C-terminal de RRS1-R, le domaine 'WRKY' propre aux facteurs de transcription et impliqué dans la fixation à l'ADN. Cette acétylation conduit à la dissociation de RRS1 de l'ADN, permettant l'activation des réactions de défense médiées par RPS4. En l'absence des gènes R codant pour RRS1 et RPS4, l'effecteur PopP2 est capable de cibler et d'inactiver des facteurs de transcription impliqués dans les mécanismes de défense des plantes, permettant ainsi l'infection par la bactérie. L'intégration

d'un « leurre » au sein même du récepteur immunitaire constitue un système de surveillance difficilement contournable par la bactérie : même si PopP2 évolue, tant que son activité demeure inchangée, il active inévitablement les mécanismes de défense de la cellule.

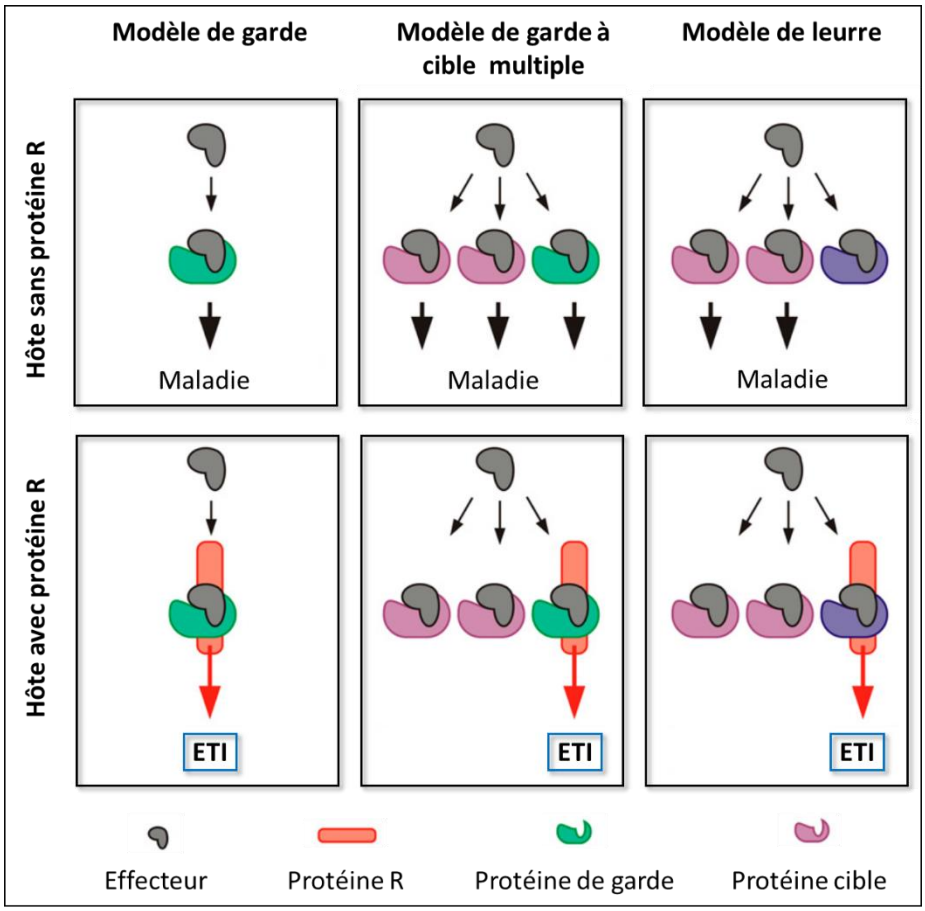


Figure I-6. Représentation des modèles de garde et de leurre. Adaptée de van der Hoorn et Kamoun (2008).

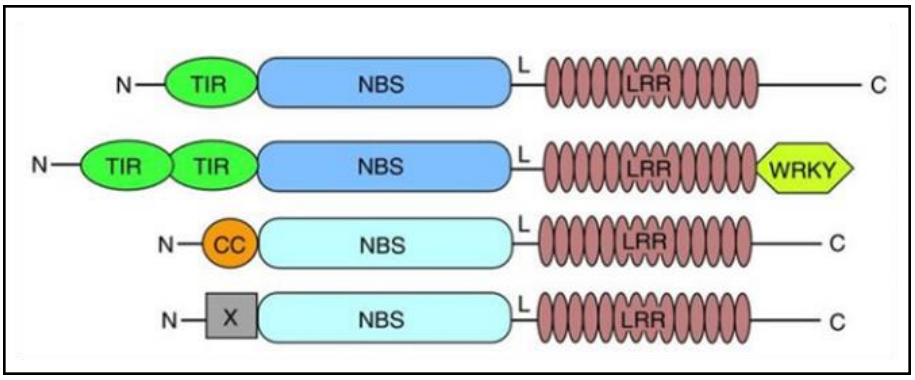


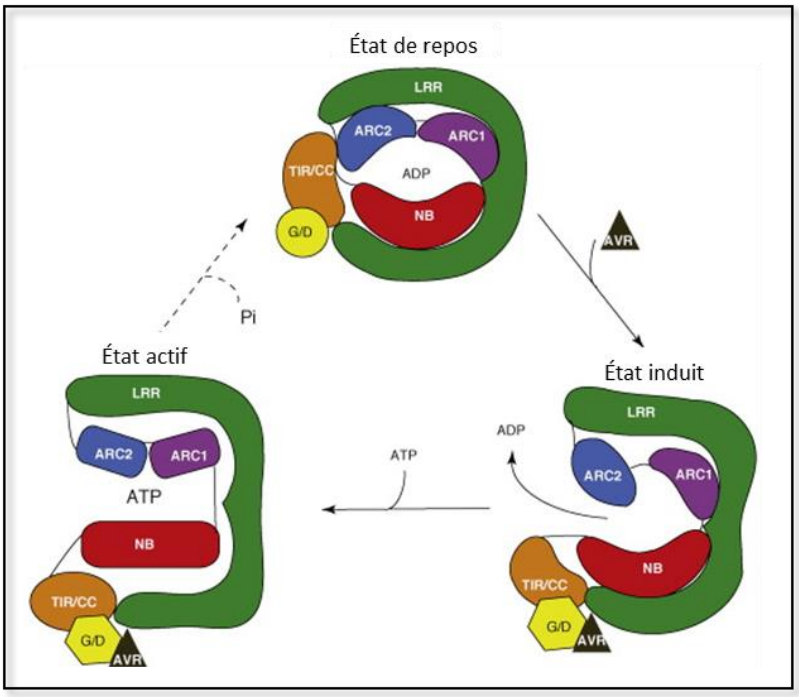
Figure I-7. Les différents domaines des principales protéines NB-LRR chez les plantes. « N » et « C » indiquent les régions N- et C-terminales de la protéine ; TIR : « Toll/Interleukin-1 Receptor » ; CC : « Coiled-Coil » ; X sans domaine N-terminal identifié ; NBS : « Nucleotide Binding Site » ; « L » : Linker (ARC1 et 2) ; LRR : « Leucine Rich Repeat ». WRKY : facteur de transcription possédant un domaine « zinc-finger-like » capable de se fixer à l'ADN. D'après McHale *et al.* (2006).

1.3.2. Les gènes de type « NB-LRR »

Les gènes de type « NB-LRR » (Nucleotide Binding site-Leucine Rich Repeat) font partie d'une famille multigénique qui s'est diversifiée rapidement, et qui comprend un très grand nombre de gènes variables identifiés dans les plantes (Clark *et al.*, 2007). Ils codent pour des protéines, réparties en deux groupes en fonction du domaine présent à l'extrémité N-terminale : domaine TIR (Toll/Interleukin-1 Receptor), domaine CC (Coiled-Coil), ou aucun domaine X) (figure I-7). Les gènes de type TIR-NB-LRR (ou TNL) appartiennent à la famille des gènes *R* les plus conservés, que l'on retrouve dans la majorité des systèmes immunitaires innés du monde vivant (Moffett, 2009). Toutefois, dans les plantes, la majorité des gènes *R* identifiés font partie des CC-NB-LRR (ou CNL) (Moffett, 2009). Le rôle des domaines TIR et CC dans la résistance des plantes n'est toujours pas clairement élucidé même si un rôle dans la transmission du signal de défense suite à la reconnaissance du facteur Avr leur serait attribué.

La région NB (Nucleotide binding site) est reliée au domaine LRR grâce à ses deux sous-unités ARC1 et ARC2 pour « Apaf1 (Apoptotic protease-activating factor 1), R proteine, et CED4 (Caenorhabditis Elegans Death-4 protein) » (figure I-8). On parle alors de domaine NB ou NB-ARC ou encore de NBS (Nucleotide Binding Site) (Van Der Biezen et Jones, 1998). Ce grand domaine NB, avec ses deux sous-unités ARC1 et 2, forme une poche multifonctionnelle capable de se fixer aux nucléotides et d'hydrolyser l'ATP pour changer de conformation (adénosine triphosphate) (Albrecht et Takken, 2006; Tameling *et al.*, 2002).

Des études récentes ont permis d'établir un modèle parfois nommé « bait and switch » décrivant la cinétique d'activation des protéines de la famille des NB-LRR en montrant l'implication du domaine NB qui jouerait le rôle d'interrupteur « on » ou « off » régulant les voies de signalisation en aval de la reconnaissance (Lukasik et Takken, 2009; Qi et Innes, 2013). (Collier et Moffett, 2009; Lukasik et Takken, 2009) (figure I-8). Ce modèle s'applique en particulier à la protéine Rx qui confère la résistance au *Potato virus X* (PVX, *Potexvirus*) chez la pomme de terre (Collier et Moffett, 2009; Moffett, 2009).



<u>Figure I-8.</u> Modèle d'activation « bait and switch » de la protéine NB-LRR. En l'absence de pathogène le domaine LRR stabilise la conformation fermée et la protéine NB-LRR est dans son état de repos. La reconnaissance de la protéine AVR (triangle noir) implique probablement un complexe comportant la région C-terminale du domaine LRR et le domaine CC ou TIR. La perception du facteur Avr se fait de manière directe ou indirecte (interaction avec la protéine de garde (G) ou avec la protéine de leurre (D pour Decoy). Ceci modifie la surface d'interaction entre la partie N-terminale du domaine LRR et la sous-unité ARC2, libérant ainsi l'auto-inhibition conférée par LRR. Ce changement de conformation va déclencher un second changement en modifiant les interactions du domaine NB-ARC et les domaines CC/LRR (état induit). Dans l'état activé, le domaine NB deviendrait accessible pour interagir avec les partenaires de signalisation en aval. L'hydrolyse de l'ATP pourrait ramener la protéine à son état de repos. D'après Lukasik et Takken (2009).

En absence d'effecteur, la protéine NB-LRR est à l'état de repos, inactive, le domaine LRR exerçant une régulation négative en stabilisant la liaison entre l'ADP (adénosine diphosphate) situér dans la poche multifonctionnelle du domaine NB. A l'inverse, la présence du facteur Avr reconnue via le domaine LRR entraîne un changement de conformation du domaine NB, induisant la libération de l'ADP et la fixation d'ATP au niveau du domaine NB, ce qui déclenche un changement de conformation au niveau du domaine N-terminal (CC chez le gène *Rx*) qui se désolidarise du domaine NB-ARC et peut alors intervenir dans l'initiation de la transduction du signal (figure I-8). Cependant il a été montré que la surexpression du domaine NB de la protéine Rx était suffisant pour induire des réponses de défense telles que l'induction d'une réponse hypersensible chez *Nicotiana benthamiana* (Rairdan *et al.*, 2008). Ceci indique le rôle probable de NB dans la reconnaissance du facteur d'avirulence.

Le domaine répété riche en leucine LRR a une structure centrale conservée et répétée de type « LxxLxLxxN » (L : Leucine ; N : Asparagine ; x : acide aminé variable) formant un brin β suivi d'une séquence en acides aminés plus variable (Padmanabhan *et al.,* 2009). Chaque répétition forme une boucle qui se réitère pour former une super-hélice. Les brins β s'alignent d'un côté et créent un feuillet β continu créant une surface concave. Les résidus de leucine hydrophobes, sont tournés vers l'intérieur pour former un noyau hydrophobe stable. L'asparagine conservée et les domaines variables entre les feuillets vont imposer une courbure observée dans les structures prédites 3D de domaines LRR (Kobe et Kajava, 2001). Cette structure hydrophobe et polymorphe du domaine LRR lui a valu l'attribution du rôle privilégié dans la reconnaissance spécifique d'effecteurs. Ceci a été mis en évidence, en double hybride dans la levure dans le cas du gène *L* de résistance du lin (*Linum usitatissimum*) à *Melampsora lini*). De multiples formes de NB LRR sont codées par les variants alléliques L5, L6 et L7 du gène *L* et sont capables d'interagir directement et de manière spécifique avec différentes versions de la protéine Avr567 issues de plusieurs souches de la rouille du lin (*Melampsora lini*) (Dodds *et al.*, 2006). Lors d'une approche d'évolution artificielle, des expériences de mutagenèse aléatoire du domaine LRR de la protéine Rx ont permis d'obtenir des variants de Rx capables de reconnaître et de déclencher une résistance contre la seule souche virulente connue de PVX (PVX_{HB}), mais également contre un virus appartenant à un autre genre viral, le *Poplar mosaic virus* (PoMV, *Carlavirus*) (Farnham et Baulcombe, 2006).

1.3.3. La réponse hypersensible (HR)

L'interaction (directe ou pas) entre une protéine R et un effecteur, induit dans la plante une réponse rapide et efficace conduisant généralement à la mort cellulaire localisée.

La HR peut être schématiquement subdivisée en deux phases : une étape de reconnaissance entre la plante résistante et l'agent pathogènes avirulent (théorie « gène pour gène », Flor, 1971) et une étape de transduction du signal déclenchant la modulation de l'activité de transcription d'un ensemble de gènes, aboutissant à la réponse hypersensible entrainant la mort cellulaire programmée (PCD). Le but étant de confiner le plus rapidement possible et de manière contrôlée le pathogène au niveau du site d'infection. Parfois l'activation des gènes NB-LRR conduit à un phénotype d'Extrême Résistance (ER) qui se manifeste par une absence de HR. Cette ER a été caractérisée chez la pomme de terre possédant le gène *Rx* infectée par le PVX. Il a été montré que cette résistance avait lieu dans les protoplastes (Kohm *et al.*, 1993). L'ER serait le résultat d'une action efficace et très rapide

pour empêcher la propagation du pathogène et le déclenchement d'une HR (Bendahmane *et al.*, 1999). Il a été démontré que la résistance conférée par *Rx* peut conduire aussi à la mise en place d'une mort cellulaire programmée de type HR. La résistance extrême serait cependant « épistatique » sur la HR : l'ER se mettrait en place si rapidement, en inhibant la réplication des souches de PVX avirulentes, que celles-ci ne s'accumuleraient pas à un niveau suffisant pour déclencher la HR. Par contre, l'expression transitoire de la protéine de capside (CP, facteur d'avirulence) du PVX dans des plantes exprimant Rx, induit une HR dans la zone infiltrée (Bendahmane *et al.*, 1999; Baurès *et al.*, 2008). La HR est un processus impliquant des mécanismes actifs dans les plantes. Le transgène *BAX*, membre de la famille pro-apoptotique *Bcl2* chez les animaux, est capable d'induire une mort cellulaire similaire à la HR quand il est exprimé chez le tabac. Cette mort cellulaire est bloquée par l'application d'inhibiteurs de phosphatases, indiquant qu'un processus actif est lié à cette mort cellulaire (Lacomme et Santa Cruz, 1999). Ceci suggère également que certains processus de défenses liés à une mort cellulaire chez les plantes et les animaux ont des caractéristiques communes.

Tandis que l'ER est une réponse très précoce, la HR serait une réponse de défense plus tardive. Parfois cela peut conduire à une HR généralisé que l'on appelle « HR systémique » (SHR). Ceci peut se traduire par une HR entraînant des lésions nécrotiques foliaires parfois même le long des nervures comme cela a été décrit chez le mutant *vad1* (pour « vascular associated death1 ») chez *Arabidopsis thaliana* (Lorrain *et al.,* 2004). Ce mutant présente de façon spontanée (en l'absence de pathogène) des lésions nécrotiques de type HR, qui sont lumière-dépendantes et induites spécifiquement au niveau des vaisseaux conducteurs. En raison de la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène), de l'accumulation d'acide salicylique (SA) et de l'expression de gènes impliqués dans les réactions de défense, cette mort cellulaire a été considérée comme une PCD de type HR (Lorrain *et al.,* 2004).

Récemment Künstler *et al.* (2016) ont explicité le concept de « continuum of host response », introduit au préalable par Bendahmane *et al.* (1999) et Cooley *et al.* (2000). Ce concept décrit la gamme de réponses possibles de la plante en cas d'infection par un pathogène, depuis la résistance extrême, en passant par la mise en place de « micro-HR », de la HR, d'une «HR systémique» et jusqu'à la « sensibilité totale » (figure I-9). Ainsi, l'efficacité d'une résistance conférée par un gène de type *R*, dépend du timing et de l'efficacité de la reconnaissance du pathogène après inoculation. Une élicitation extrêmement précoce des réactions de défense, confère une résistance efficace sans mort cellulaire, de type Extrême Résistance, et à l'opposé, une mise en place trop tardive de réactions de défense n'empêche

pas la propagation et l'infection de l'hôte par le pathogène. Les différents types de HR (cellulaire, tissulaire ou en systémie) seraient le reflet de réactions de défense déclenchées de plus en plus tardivement ou avec de moins en moins d'efficacité après inoculation (infection) du pathogène (figure I-9).

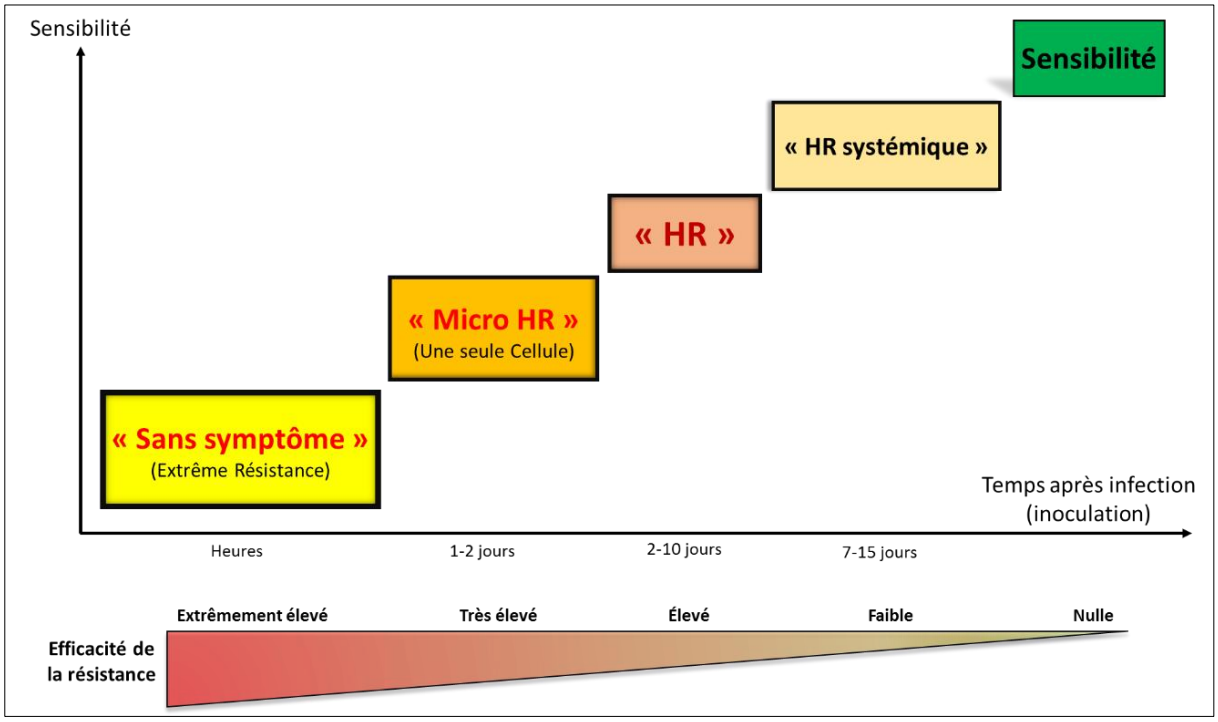


Figure I-9. Représentation schématique du « continuum de réponses » observable chez l'hôte lors d'une interaction plante-pathogène. D'après Künstler *et al.,* (2016).

1.3.4. La résistance systémique acquise (SAR) et signalisation hormonale

Les réponses de défense conférées par un gène *R* peuvent entraîner une protection à distance des tissus sains situés en aval du site d'infection ; on parle de résistance systémique acquise (SAR) (Figure I-10). La HR entraîne la production d'un signal mobile, qui suite à sa translocation vers les tissus distants, va activer une résistance à large spectre. Il s'agit d'un mécanisme impliquant notamment les phytohormones comme molécules médiatrices. Ce mécanisme décrit pour la première fois en 1961 par Ross montrait que l'inoculation du TMV protégeait la plante contre une nouvelle infection par le même virus, et que cela s'étendait à des virus appartenant à d'autres genres, tels que le *Tobacco necrosis virus* (TNV, famille *Tombusviridae*), le *Tobacco ringspot virus* (TRSV, *Nepovirus*) et le *Tomato ringspot virus* (ToRSV, *Nepovirus*). Il s'agit d'une forme de « mémoire immunitaire » de la plante, qui se met en place dès 24 heures après la primo-infection, et peut rester effective pendant plusieurs mois (Fu et Dong, 2013). Cette mémoire immunitaire n'est pas encore clairement élucidée

mais pourrait impliquer des modifications de la chromatine via des processus épigénétiques par méthylation/déméthylation d'histones (Fu et Dong, 2013). Plusieurs molécules interviennent dans la SAR, comme l'accumulation intracellulaire d'acide salicylique (SA) qui va engendrer un remodelage du paysage transcriptionnel comme l'induction de gènes *PR* (*Pathogenesis Related*). Les protéines PR sont des indicateurs de la SAR et correspondent à de petites protéines sécrétées dans l'apoplasme ou vacuolaires et participent à la résistance aux pathogènes (Pieterse *et al.*, 1996; Van Loon, 1997). Il existe un grand nombre de familles de protéines PR induites lors d'une infection virale. Certaines protéines PR, notamment PR1, PR2 (β -1,3-glucanase) et PR5 (thaumatin-like protein) sont connues pour être induites par le SA et sont utilisées comme marqueurs de la SAR (Scherer *et al.*, 2005; Fu et Dong, 2013). La résistance en systémie permettant de protéger les tissus non infectés est liée au déplacement du SA via le phloème sous forme d'acide méthyle-salicylique (MeSA) Des études réalisées sur plantes de tabac infectés par le TMV ont mis en évidence que le MeSA agissait sur le maintien de la SAR (Dempsey et Klessig, 2012).

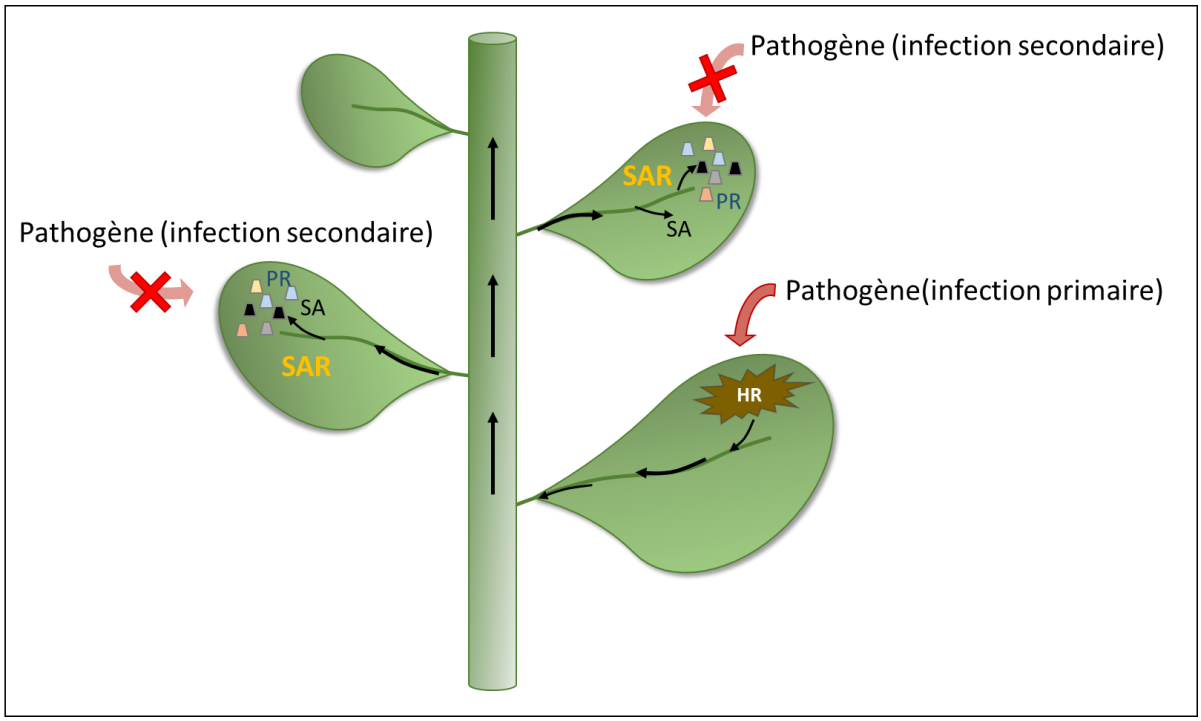


Figure I-10. Résistance systémique acquise « SAR » mise en place lors d'une primo infection par un pathogène. Lors d'une infection primaire par un pathogène, sa reconnaissance via les protéines R va induire une réaction de défense locale généralement associée à une réponse hypersensible (HR). Un signal d'acide methyl-salicylique (MeSA), serait généré et migrerait dans le reste de la plante, induisant la synthèse d'acide salicylique (SA) en systémie. Le SA active via des facteurs de transcription l'expression de gènes de défense de type PR (Pathogenesis Related) dans les parties supérieures de la plante permettant l'établissement d'une résistance dans les parties distales de la plante.

Un autre acteur majeur impliqué dans la défense des plantes contre les virus initiée par une HR, est l'acide jasmonique (JA), une phytohormone de la famille des jasmonates dont le rôle n'est pas clairement élucidé. Il a été montré qu'un apport exogène de JA méthylé (MeJA) chez le tabac portant le gène de résistance *N,* infecté par le TMV, diminue la résistance de la plante au niveau local et permet le mouvement viral en systémie. Il semblerait que l'acide jasmonique soit un régulateur négatif de la SAR dans ce pathosystème (Oka *et al.*, 2013). Alors qu'il a récemment été montré dans un autre pathosystème que le JA était nécessaire à la mise en place d'une résistance en systémie au TMV chez *N. benthamiana*. Les auteurs montrent que l'acide jasmonique est produit en amont de l'acide salicylique à un stade très précoce de l'infection, ce qui suggère que le JA jouerait le rôle de molécule signal induisant une production de SA pour activer la SAR (Zhu *et al.*, 2014).

1.3.5. Les gènes de résistance dominante autres que les NB-LRR

Il existe très peu de gènes caractérisés capables de conférer une résistance dominante aux virus et ne codant pas pour des NB-LRR. C'est le cas notamment des gènes *RTM* pour « Restricted TEV mouvement » chez *A. thaliana*, qui codent pour des protéines capable de supprimer le mouvement à longue distance de plusieurs potyvirus, tels que le TEV, le *Lettuce mosaic virus* (LMV, *Potyvirus*) et le PPV (Decroocq *et al.*, 2006; Mahajan *et al.*, 1998). Trois gènes ont été clonés *RTM1*, *RTM2 et RTM3* et une seule mutation dans l'un de ces trois gènes suffit à abolir la restriction du mouvement à longue distance (Whitham *et al.*, 1999). RTM1 correspond à une protéine de la famille des jacalines, capables de se lier à des glycoprotéines impliquées dans la défense contre les insectes et les champignons (Chisholm *et al.*, 2000). RTM2 est une protéine similaire aux HSP « Heat Shock Proteins » (Whitham *et al.*, 2000) et RTM3, capable d'interagir avec RTM1, possède un domaine de type MATH en N-terminal (Cosson *et al.*, 2010). Il est probable que la résistance conférée par *RTM* soit contournée par des mutations dans le facteur d'avirulence, la CP des potyvirus, même si aucune interaction directe n'a pu être prouvée (Cosson *et al.*, 2010; Decroocq *et al.*, 2009). Un autre gène dominant de la famille des jacalines proche de *RTM1* a également été identifié chez *A. thaliana*, le gène *JAX1* (Jacalin-type lectin Required for Potexvirus resistance 1). Par opposition à *RTM1* qui limite le mouvement à longue distance, *JAX1* limite le mouvement d'un potexvirus,le *Plantago asiatica mosaic virus* (PlAMV), mais à un stade plus précoce, en diminuant l'accumulation des ARN viraux au niveau cellulaire (Yamaji *et al.*, 2012).

Deux autres gènes de résistance dominante partielle ne répondant pas aux caractéristiques des NB-LRR, et longtemps considérés comme étant 2 QTLs (Quantitative Traits Loci) ont été caractérisés. Ils'agit de deux versions alléliques du gène *Ty*, *Ty-1* et *Ty-3* pour *« TYLCV resistance 1 et 3* », identifiés chez une espèce de tomate sauvage (*Solanum chilense*) et qui confèrent la résistante à un begomovirus le *Tomato Yellow Leaf Curl Virus* (TYLCV). Ces gènes codent pour une RdRp (Verlaan *et al.*, 2013; Zamir *et al.*, 1994). Le phénotype de résistance correspond à une absence de symptômes sur plante infectée, et une faible accumulation du TYLCV, ce qui suggère que *Ty-1* et *Ty-3* activent le mécanisme du RNAi au niveau du TGS, en augmentant la production de siARN via une hyperméthylation du génome viral (Butterbach *et al.*, 2014).

1.4. Les résistances récessives par perte de facteur de sensibilité

C'est en 1990 que Fraser propose l'hypothèse de la présence de gènes de Sensibilité (gènes *S*) pour expliquer les mécanismes moléculaires des résistances récessives (Fraser, 1990). Il suggère qu'une résistance récessive est la conséquence d'une perte (par délétion ou mutation) d'un facteur de l'hôte nécessaire à l'accomplissement d'une étape cruciale du cycle viral. Les virus possèdent un génome très restreint codant pour un petit nombre de protéines (au minimum trois). Par conséquent, pour réaliser leur cycle d'infection et s'accumuler suffisamment afin d'être transmis à une nouvelle plante, les virus doivent détourner la machinerie cellulaire de leur hôte (Pallas et Garcia, 2011; Robaglia et Caranta, 2006). C'est pourquoi ces résistances récessives sont principalement associées à des gènes codant pour des protéines nécessaires au cycle viral (Fraser, 1990; van Schie et Takken, 2014). D'un point de vue génétique, une résistance récessive confère un phénotype de résistance uniquement lorsque les 2 allèles de résistances sont présents, dans le cas d'une plante diploïde. Contrairement à la plupart des résistances dominantes aux virus qui entraînent une réponse hypersensible ou un phénotype de résistance extrême, les résistances récessives présentent une grande diversité de phénotypes (Maule *et al.*, 2007). La majorité des facteurs de sensibilité identifiées chez les plantes conférant une résistance aux virus, dont la moitié aux *potyviridae,* correspondent à des facteurs eucaryotes d'initiation de la traduction (eIFs) (Nicaise, 2014).

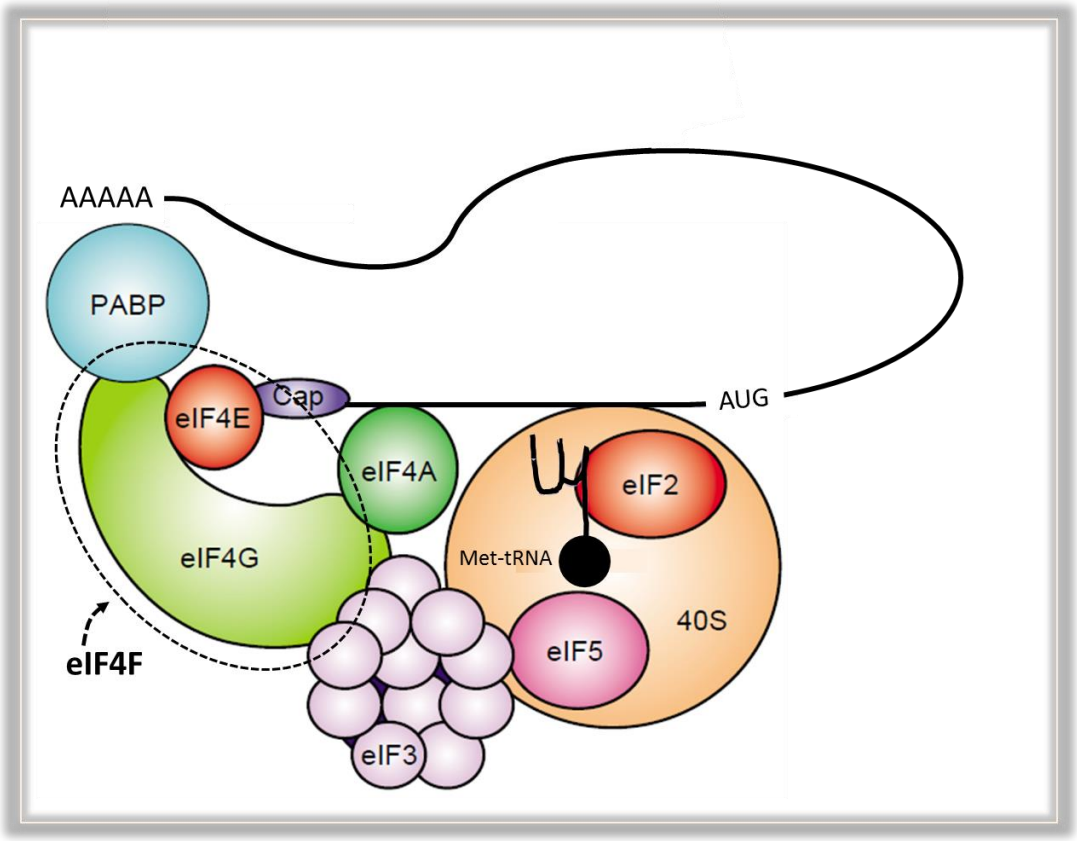
1.4.1. Les facteurs d'initiation de la traduction dans la plante

Pour éviter la production de protéines anormales la plante a mis en place un mécanisme de circularisation des ARNm en amont de l'étape d'initiation de la traduction. Ainsi les ARNm matures pourvus d'une coiffe en 5' (guanosine triposphate méthylée en position N7 (5'm7G) et d'une queue poly(A) en 3' passent ce « contrôle qualité » et peuvent être traduits, à l'inverse des ARNm partiels ou clivés. La circularisation des ARNm fait intervenir un complexe multi-protéique formé en particulier de facteurs d'initiation de la traduction (eIFs) (Jackson *et al.*, 2010). Ainsi, les virus utilisent les eIFs pour assurer la traduction de leur génome dans la plante (pour revue Sanfaçon, 2015) (figure I-11).

La coiffe (ou Cap) en 5' des ARNm se fixe au facteur eIF4E. La queue poly(A) de l'extrémité 3' de l'ARNm interagit avec la protéine PABP (« poly(A)-binding protein ») (figure I-11). La circularisation de l'ARNm se fait grâce au recrutement du facteur eIF4G échafaudage, qui interagit avec eIF4E et PABP. Les facteurs eIF4E et eIF4G constituent le noyau du complexe nommé eIF4F qui, en s'associant avec eIF4A, recrute le complexe de pré-initiation 43S (constitué de la petite sous-unité du ribosome 40S, de l'ARN de transfert initiateur et des facteurs d'initiation eIF1, eIF1A, et eIF3). Cet assemblage constitue le complexe 48S qui va ensuite glisser jusqu'au premier codon de démarrage AUG. Des facteurs d'initiation additionnels interviennent : eIF5 et eIF5B favorisent l'hydrolyse du GTP lié à eIF2 et libèrent eIF2-GDP et d'autres eIFs (eIF1, eIF3, eIF4B, eIF4F et eIF5) et permettant l'accrochage de la sous-unité 60S. Ceci conduit finalement après libération du eIF1A et du eIF5B à la formation du complexe ribosomique fonctionnel 80S.

Chez les plantes, les eIFs constituent une famille multigénique et chaque facteur du complexe eIF4F possède au moins une iso-forme. Chez *Arabidopsis thaliana*, ces facteurs appartiennent à une petite famille multigénique : les gènes *eIF4E1* et l'isoforme *eIFiso4E* sont nécessaires au développement de la plante, les gènes *eIF4E1b* et *eIF4E1c* sont faiblement exprimés et peu caractérisés, et le gène *nCBP* « nouvelle protéine de liaison à la coiffe » (novel Cap Binding Protein) code pour un eIF4E atypique (Patrick *et al.*, 2014; Ruud *et al.*, 1998; Browning et Bailey-Serres, 2015). La nCBP est capable de se lier à la coiffe des ARNm mais contrairement aux autres facteurs eIF4E, possède une substitution de deux tryptophanes (W) sur les 8 essentiels et très conservés au sein des eIF4E (Morino *et al.*, 1996; Ruud *et al.*, 1998). Le rôle des nCBP dans les plantes reste peu compris mais ces protéines pourraient séquestrer les ARNm, pour diminuer ou inhiber leur traduction, puisque leur affinité pour la coiffe est plus élevée que celle des facteurs eIF4E, mais elles n'interagissent pas avec les facteur eIF4G

(Browning et Bailey-Serres, 2015; Choi *et al.*, 2012). Cette famille multigénique pourrait être la conséquence de phénomènes de duplications de gènes au cours de l'évolution des plantes. La démultiplication des facteurs pourrait augmenter leur degré de spécificité et permettre une régulation plus fine des processus de traduction. Même si ce sont majoritairement les complexes eIF4E-eIF4G et eIFiso4E-eIFiso4G qui se forment, il existe également des complexes mixtes (eIF4E-eIFiso4G ou eIFiso4E-eIF4G) pouvant se former lorsque l'un des partenaires n'est pas disponible (Mayberry *et al.*, 2011). Une hypothèse serait que le complexe eIFiso4F (formé de eIFiso4E et eIFiso4G) traduirait préférentiellement les ARNm présentant peu de structures secondaires et porteurs d'une coiffe hyperméthylée alors que le complexe eIF4F, prendrait lui en charge les ARNm avec des structures secondaires en 5' et non coiffés et/ou dicistroniques (Cawley et Warwicker, 2012). L'hypothèse d'une redondance fonctionnelle des eIFs a été émise : en l'absence d'une forme une autre isoforme prendrait le relais pour assurer la traduction (Duprat *et al.*, 2002; Gauffier *et al.*, 2016; Ruffel *et al.*, 2006).



<u>Figure I-11.</u> Représentation du complexe d'initiation de la traduction chez les eucaryotes. Les ARNm coiffés (Cap) recrutent le complexe eIF4F (en pointillé), composé de deux sous-unités, eIF4E et eIF4G. Le facteur eIF4E se lie directement à la coiffe (m7G). Le facteur eIF4G est une protéine «échafaudage» qui interagit avec la protéine de liaison polyA (PABP), eIF4A (une hélicase DEAD box pour le déroulement des structures secondaires) et eIF3 (un complexe multi-protéique qui se lie au ribosome 40S). D'après Robaglia et Caranta (2006).

1.4.2. Implication des eIFs dans l'infection virale

Durant ces 15 dernières années, les facteurs d'initiation de la traduction ont été décrits comme étant des acteurs cruciaux détournés par les virus et constituent la majorité des gènes majeurs de résistance récessive décrits à ce jour vis-à-vis des virus de plante, chez une large gamme d'espèces de plantes cultivées incluant les mono- (orge, riz) et les dicotylédones (piment, laitue, pois, tomate, melon et tabac). La plupart de ces gènes sont dirigés contre des virus à ARN (+) dont 40% contre les potyvirus (Diaz-Pendon *et al.*, 2004; Nicaise, 2014; Truniger et Aranda, 2009).

Chez *Arabidopsis thaliana*, des études par « perte de fonction » (mutants Knock-Out « KO » ou EMS) ont pu démontrer que les facteurs eIF4E1 et eIFiso4E sont principalement impliqués dans les résistances aux potyvirus (Lellis *et al.*, 2002). Un mutant KO *eIF4E1* est résistant au *Clover yellow vein virus* (ClYVV) et un mutant KO *eIFiso4E* est résistant au TuMV, au TEV, au PPV, et au LMV, révélant une spécificité d'utilisation des facteurs eIF4E selon les potyvirus (Nicaise *et al.*, 2007). Le mutant EMS *cum1-1* (présence d'un codon stop dans *eIF4E1*) est résistant au ClYVV, alors que ce dernier est capable d'infecter des plantes mutées pour le gène *eIFiso4E* (Sato *et al.*, 2005).Par ailleurs, ce même mutant *cum1-1* est capable de limiter l'accumulation d'un autre virus appartenant à un autre genre viral le CMV chez *A. thaliana* (Yoshii *et al.*, 2004).

En parallèle, les eIF4G et eIFiso4G sont également associés à des résistances récessives, comme le mutant *cum2-1* d'*A. thaliana* qui est résistant au CMV et au TCV et qui possède une seule substitution en acide aminé dans la protéine eIF4G (Yoshii *et al.*, 1998; Yoshii *et al.*, 2004).

Chez les espèces d'intérêt agronomique, de nombreux gènes *eIF4E* de résistance ont été isolés dans la variabilité naturelle des plantes, qui présentent des mutations codantes dans la séquence de l'allèle de résistance, comme *pvr2*, *mo1* et *sbm1* dans le piment (*Capsicum annuum*), la laitue (*Lactuca sativa*) et le pois (*Pisum sativum*) respectivement (Gao *et al.*, 2004; Nicaise *et al.*, 2003; Ruffel *et al.*, 2002). Récemment, il a été cloné chez le tabac le gène *va* correspondant à la délétion d'un gène *eIF4E* conférant une résistance au *Potato virus Y* (PVY, *Poytyvirus*) (Julio *et al.*, 2014). Finalement, eIF4E apparait comme le facteur de sensibilité le plus représenté avec un spectre d'action très large car impliqué dans la résistance à plusieurs genres viraux. C'est le cas du gène *rym4* « *resistance to yellow mosaic 4* » qui confère la résistance au *Barley yellow mosaic virus* (BaYMV, *Bymovirus*) chez l'orge (Kanyuka *et al.*, 2005), et du gène *nsv* qui confère la résistance au *Melon necrotic spot virus* (MNSV,

Gamacarmovirus) chez le melon (Morales *et al.*, 2005; Nieto *et al.*, 2006). Le gène *Rymv1* qui correspond à une version mutée d'un facteur eIFiso4G dans la variété Gigante du riz cultivé, confère une résistance élevée au *Rice yellow mottle virus* (RYMV, *Sobemovirus*) (Albar *et al.*, 2006).

Les facteurs eIFs peuvent aussi être impliqués dans des résistances à des virus dont le génome n'est ni coiffé, ni ne possède une VPg en (Hyodo et Okuno, 2016). Par exemple, le MNSV, ne possède ni VPg ni de pseudo coiffe en 5', est contrôlé par le gène *nsv* (*eIF4E*) chez le melon (Nieto *et al.*, 2006). La sensibilité s'expliquerait grâce à une interaction entre eIF4E et la partie 3'-UTR (Untranslated Translated Region) du virus qui possède une structure particulière 3'-CITE (Cap Independant Translation Enhancer) (Nieto *et al.*, 2011).

A côté des gènes contrôlant des résistances récessives naturelles et des mutants identifiés chez *A. thaliana*, la co-ségrégation génétique entre des facteurs de résistance récessive et des gènes codant pour eIF4E ou eIF4G a été mise en évidence chez plusieurs espèces végétales. Les co-ségrégations suivantes ont été montrées entre un QTL (Quantitative Trait Loci) de résistance au PPV et le gène codant pour *eIFiso4E* chez *Prunus davidiana* (Marandel *et al.,* 2009), entre le gène *retr01* de résistance au TuMV et *eIFiso4E* chez le chou chinois (Rusholme *et al.,* 2007), entre le gène *tsv1* de résistance au *Rice tungro spherical virus* (RTSV, *Waikivirus*) et *eIF4G* chez le riz (Lee *et al.*, 2010), entre le gène *bc-3* de résistance au *Bean common mosaic virus* (BCMV, *Potyvirus*) et *eIF4E* chez le haricot (Naderpour *et al.*, 2010) et finalement, entre le facteur de résistance récessive au *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, *Potyvirus*) et *eIF4E* chez la pastèque (Ling *et al.*, 2009). Ces gènes contrôlent la résistance à des potyvirus, sauf le gène *tsv1* qui contrôle la résistance au RTSV et qui présente un polymorphisme de type SNP (Single Nucleotide Polymorphism) dans le gène *eIF4G* (Lee *et al.*, 2010).

1.4.3. Les phénotypes de résistance conférée par des mutations dans les facteurs de sensibilité eIFs

Le phénotype de la résistance conférée par les mutations dans les facteurs eIF4E varie selon les pathosystèmes plantes/virus (Robaglia et Caranta, 2006). Ainsi, le phénotype de résistance au TEV et au PVY chez le piment portant l'allèle *pvr2*^{2} (*eIF4E*) affecte directement la multiplication virale au niveau cellulaire (Charron *et al.,* 2008; Deom *et al.,* 1997). Alors que l'allèle *pvr2*^{1} limite le mouvement de cellule à cellule du PVY (Arroyo et *al.,* 1996; Kang *et al.,* 2005*b*). Chez le pois, c'est le même allèle de résistance au locus *eIF4E* qui confère la résistance

à trois espèces de potyvirus : le *Pea seed-borne mosaic virus* (PSbMV) (*sbm-1*), le *Bean yellow mosaic virus* (BYMV, *Macluravirus*) (*wlm*) et le ClYVV (*cyv-2*) (Andrade *et al.*, 2009). Toutefois, le phénotype de la résistance est virus-dépendant : ainsi le PSbMV est restreint à une seule cellule après inoculation par biolistique d'un clone d'ADNc infectieux, alors que le ClYVV est capable de se déplacer de cellule à cellule (Andrade *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2004).

Chez, les potyvirus la protéine virale VPg (Virus Protein linked to the genome) liée en 5' de l'ARN viral pourrait mimer la coiffe des ARNm (Michon *et al.*, 2006). Il a été récemment montré qu'une molécule de VPg serait liée à l'une des extrémités de la particule virale (Tavert-Roudet *et al.*, 2017). Ceci permettrait au virus une fois dans la cellule d'augmenter l'affinité d'interaction entre son ARN viral (via la VPg) et un eIF4E endogène (Michon *et al.*, 2006; Miyoshi *et al.*, 2006; Tavert-Roudet *et al.*, 2017). Toute modification dans un eIF (par mutation ou délétion) abolirait l'interaction avec la VPg entraînant ainsi une résistance de la plante par absence de traduction de l'ARN viral.

Plusieurs études ont révélé le rôle des eIFs dans la propagation du virus (de cellule à cellule ou en systémie). Ainsi, la résistance conférée par *Rymv1* dans le riz se manifeste par une diminution du mouvement de cellule à cellule du RYMV, sans modifier significativement le niveau de réplication du virus (Albar *et al.*, 2003, 2006). L'une des hypothèses concernant le phénotype d'une altération du mouvement de cellule à cellule du virus, serait que les eIFs puissent interagir avec des structures du cytosquelette impliqués dans le mouvement intracellulaire viral. Il a été montré *in vitro* dans des cellules de maïs, qu'eIFiso4G de blé était capable de se lier à la tubuline induisant un remodelage des microtubules (Bokros *et al.*, 1995). Lellis *et al.* (2002) ont suggéré que l'interaction entre la VPg/eIF4G/eIF4E joue un rôle sur le transport intracellulaire du virus.

Les travaux de thèse de Sorel (2013) ainsi que ceux de Contreras-Paredes *et al*. (2013) démontrent que le facteur eIF4E pourrait être un facteur de sensibilité impliqué dans le mouvement à longue distance du virus, en coopération avec la CI. Ceci pourrait également se faire avec l'aide de la protéine HC-Pro, interacteur à la fois de eIF4E (Ala-Poikela *et al.*, 2011) et de la CI (Guo *et al.*, 2001), et qui intervient dans le mouvement à longue distance du virus (Cronin *et al.*, 1995; Kasschau *et al.*, 1997; Klein *et al.*, 1994). Il a été démontré par ailleurs que le rôle de HC-Pro dans le mouvement systémique du virus reposait sur sa capacité à inhiber la réaction de silencing induite par le virus (Garcia-Ruiz *et al.*, 2010). En outre, il a été démontré que la protéine P1, qui est elle aussi un déterminant de virulence vis-à-vis de la résistance eIF4E chez le pois (Nakahara *et al.*, 2010), stimule l'inhibition du silencing lié à HC-Pro

(Kasschau et Carrington, 1998; Rajamäki *et al.*, 2005; Tena Fernández *et al.*, 2013). Une hypothèse sur l'implication d'eIF4E dans la suppression du silencing a été avancée par Wang et Krishnaswamy (2012), en relation avec la VPg, HC-Pro et P1 mais sans y intégrer la CI.

1.4.4. Autres facteurs de sensibilité impliqués dans des résistances récessives monogéniques

La diversité génétique naturelle d'Arabidopsis a été exploitée pour rechercher de nouveaux facteurs récessifs de résistance aux potyvirus (*i.e.*, distincts des facteurs d'initiation de la traduction de type eIF4E et eIF4G). Ceci a permis d'identifier deux gènes de résistance récessive *rwm1* (*resistance to watermelon mosaic virus 1*) et *rpv1* (*restricted Plum pox virus 1*) qui codent pour une cPGK2 (chloroplasts Phosphoglycerate Kinase 2) et confèrent une résistance au *Watermelon mosaic virus* (WMV, *Potyvirus*) et une résistance partielle au PPV respectivement (Ouibrahim *et al.*, 2014; Poque *et al.*, 2015). Les PGKs font partie d'une famille comprenant trois gènes : deux gènes codant pour une protéine PGK chloroplastique (cPGK1 et cPGK2) et un gène codant pour une protéine PGK cytoplasmique (PGK3). Ces protéines sont considérées comme des protéines multifonctionnelles ou « *moonlighting protein* » provenant du verbe « *to moonlight »* signifiant cumul d'emploi. La cPGK 2 est une iso-enzyme située dans le cytosol des chloroplastes intervenant dans la photosynthèse et les cycles de la glycolyse (Rosa-Téllez *et al.*, 2017). La présence d'une seule substitution en acide aminé distingue la protéine cPGK2 codée par l'allèle dominant de sensibilité de celle codée par l'allèle de résistance *rwm1.* Des expériences de Virus-induced gene silencing (VIGS) chez *Nicotiana benthamiana*, montrent une importante diminution de l'accumulation de l'ARN et de la protéine de capside du WMV au niveau des feuilles « silencées » pour la cPGK. La résistance au WMV conférée par le gène *rwm1* agit donc à un stade très précoce de l'infection en limitant l'accumulation virale (Ouibrahim *et al.*, 2014). De plus, les travaux de Lin *et al.* (2007) montrent l'implication de la protéine cPGK de *N. benthamiana* dans la réplication du *Bamboo mosaic virus* (BaMV, *Potexvirus*) où une diminution du niveau de transcrits *PGKs* (obtenue par VIGS), est corrélée à une diminution de l'accumulation de la protéine CP du virus (Lin *et al.*, 2007). Cependant, le rôle exact des PGK dans le cycle viral est peu connu. Récemment, Prasanth *et al* (2017) ont montré que la phosphoglycerate kinase PGK1 était recrutée par un tombusvirus, le *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) au niveau des complexes de réplication où de par sa fonction glycolytique, cette enzyme faciliterait la production d'ATP pour la réplication virale (Prasanth *et al.*, 2017).

D'autre part, chez des espèces cultivées, l'exploration de la variabilité naturelle de l'orge a permis d'identifier un gène de résistance récessive codant pour une protéine disulfure isomérase (PDI) nommé PDI5-1 (Protein disulfide isomerase like 5-1). Le clonage positionnel suivi d'une validation fonctionnelle en utilisant notamment une population TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes), a permis d'identifier ce gène présent sur le locus *rym11* comme induisant une résistance récessive à large spectre aux *Bymovirus*, *le Barley yellow mosaic virus* (BaYMV) et le *Barley mild mosaic virus* (BaMMV). Les PDI catalysent le repliement correct des protéines et peuvent retarder la réplication de plusieurs virus humains et animaux (par exemple le VIH *Virus de l'immunodéficience humaine*, *Retrovirus*), cependant leur rôle dans les interactions avec les virus de plantes reste inconnu (Yang *et al.*, 2014). Chez la pomme de terre, le gène de résistance récessive *ra* contrôle le passage du *Potato virus A* (PVA, *Potyvirus*) dans les tissus vasculaires de la pomme de terre (Hämäläinen *et al.*, 2000). Le gène n'a pas encore été identifié mais pourrait se situer sur le chromosome XI proche d'un autre gène de résistance dominante Ry_{adg} qui induit une résistance de type HR ou ER lors d'une infection par le PVA ou le PVY respectivement (Hämäläinen *et al.*, 2000).

1.5. Les résistances polygéniques

Les résistances des plantes aux virus peuvent également être polygéniques. Ces résistances sont sous le contrôle de plusieurs gènes à effet quantitatif nommés QTL (Quantitative Trait Loci). La plupart des caractères agronomiques des plantes cultivées ne se distinguent pas par des caractères monogéniques qualitatifs mais par des caractères quantitatifs polygéniques (Maule *et al.*, 2007).

Il est généralement admis que les résistances polygéniques sont plus efficaces et plus durables qu'un seul gène de résistance majeur (Quenouille *et al.*, 2013*a*; Palloix *et al.*, 2009; Parlevliet, 2002). En effet, pour qu'une résistance polygénique puisse être contournée, le virus devra acquérir un nombre de mutations plus important que lorsqu'il est soumis à une pression de sélection causée par une seule résistance majeure et la probabilité que toutes ces mutations au sein d'un même génome viral se fixent reste peu probable (Palloix *et al.*, 2009).

Les QTL, restent de bons candidats pour de futurs programmes de sélection aussi bien pour leur spectre d'action que pour leur durabilité. Cependant, la sélection de ce type de résistance est un processus long, lourd et coûteux comparé à la sélection de gènes de résistance monogénique. La cartographie de QTL nécessite des populations de descendants de grandes tailles, avec suffisamment de marqueurs pour saturer des cartes génétiques

associées à un phénotypage fin et fiable. C'est pourquoi à l'heure actuelle, relativement peu d'analyses QTL ont été effectuées dans des interactions avec les virus comparés aux autres pathogènes de plantes (Palloix et Ordon, 2011). De nombreux exemples ont été cités dans la partie sur les résistances conférées par *eIF4E* (*section 1.4.2.*). Chez le piment par exemple il a été d'identifié, un QTL à effet majeur, et plusieurs QTLs à effets mineurs sont associés à une restriction partielle du mouvement à longue distance du CMV (Caranta *et al.,* 2002). Plus récemment des QTL affectant la durabilité de la résistance au PVY conférée par le gène majeur *pvr2*^{3} chez le piment ont été identifiés (Quenouille *et al.*, 2014).

2. La durabilité d'une résistance

Les populations virales qui font face à de fortes pressions de sélection induite par les résistances majeures, vont évoluer et s'adapter à cette contrainte en contournant la résistance. Par exemple le gène dominant *Tm-1* chez la tomate conférant une résistance au *Tomato mosaic virus* (ToMV, *Tobamovirus*) est contourné rapidement lors d'une culture en plein champ, à la suite de l'émergence de variants virulents (Moury *et al.*, 2010*a*; Harrison, 2002; Ishibashi *et al.*, 2014). Il est donc nécessaire de pouvoir caractériser en amont et d'identifier les facteurs influençant la durabilité d'une résistance, généralement constatée a *posteriori* après avoir été largement déployée.

2.1. Concept d'une résistance durable

La notion de résistance durable a été introduite pour la première fois par Johnson et Law en 1975 pour qualifier la résistance à la rouille jaune (*Puccinia striiformis*) de certains cultivars Hybride de blé (*Triticum aestivum L.*). A cette époque, ces variétés de blé avaient été cultivées pendant plus de 20 ans dans des zones où le pathogène était présent et elles conservaient toujours « un haut niveau de résistance sous de graves épidémies ». Finalement, Johnson et Law ont établi qu'une résistance était durable lorsqu'elle restait efficace pendant de nombreuses années et que les variétés sont cultivées suffisamment longtemps pour favoriser la sélection de races plus virulentes du pathogène (Johnson et Law, 1975). La durabilité apparait comme mesure a *posteriori* qui par extrapolation correspond au temps nécessaire pour qu'une résistance soit contournée après son déploiement (Johnson, 1979). Cela reste une notion difficile à anticiper c'est pourquoi de nombreuse études se sont ensuite intéressées à l'identification de déterminants majeurs pour identifier des critères prédictifs.

Ceci a notamment permis l'identification moléculaire de gènes de résistance puis d'établir que les résistances quantitatives étaient plus durables que les résistances monogéniques (Lindhout, 2002). Plusieurs stratégies de pyramidage de gènes ont permis d'augmenter la durabilité d'une résistance. Les mécanismes restent encore peu compris mais la combinaison d'une résistance quantitative avec un gène majeur (Fournet *et al.*, 2013; Palloix *et al.*, 2009) ou le cumul de plusieurs gènes majeurs (McDonald et Linde, 2002*b*; Pink, 2002) semblent être des stratégies de sélection prometteuses en terme de durabilité. La notion d'évolution du pathogène apparait comme un déterminant essentiel dans l'estimation de la durabilité d'une résistance. C'est pourquoi ces dernières années les scientifiques se sont penchés sur l'étude de la génétique et de la dynamique des populations de pathogènes et des virus en particulier.

Il a notamment été établi que le potentiel adaptatif des virus visés par une résistance était un critère majeur pour pouvoir estimer a priori la durabilité de cette dernière (García-Arenal et McDonald, 2003; Janzac *et al.*, 2009, 2014; Moury *et al.*, 2014). Ainsi, la diversité et le devenir des populations virales vont être influencés et déterminés par cinq forces évolutives qui sont, la mutation, la recombinaison, la sélection, la dérive génétique, et la migration. La durabilité d'une résistance contre un virus peut alors être prédite en estimant le taux de mutation propre au virus, le nombre et la nature des mutations nécessaires au contournement ainsi que le coût de *fitness* occasionné par ces mutations (Ayme *et al.*, 2007; Fabre *et al.*, 2009; Janzac *et al.*, 2009; Moury et Simon, 2011; Rolland *et al.*, 2009).

2.2. Les différentes étapes du contournement des résistances

Le contournement d'une résistance se traduit temporellement par l'émergence et la propagation d'un variant virulent à l'échelle de la cellule puis de la plante pour finir au niveau de la parcelle entière. La virulence d'un pathogène, selon la définition des phytopathologistes, désigne la composante qualitative du pouvoir pathogène c'est-à-dire la capacité ou non à infecter un génotype porteur d'une résistance donnée (Moury *et al.*, 2010*a*; Van der Plank, 1968). Les forces évolutives vont être fortement impliquées dans l'apparition de variants virulents, qui ne préexistent pas naturellement dans un agroécosystème. Le scénario du contournement d'une résistance faisant intervenir les différentes forces évolutives se divise en trois étapes (figure I-12).

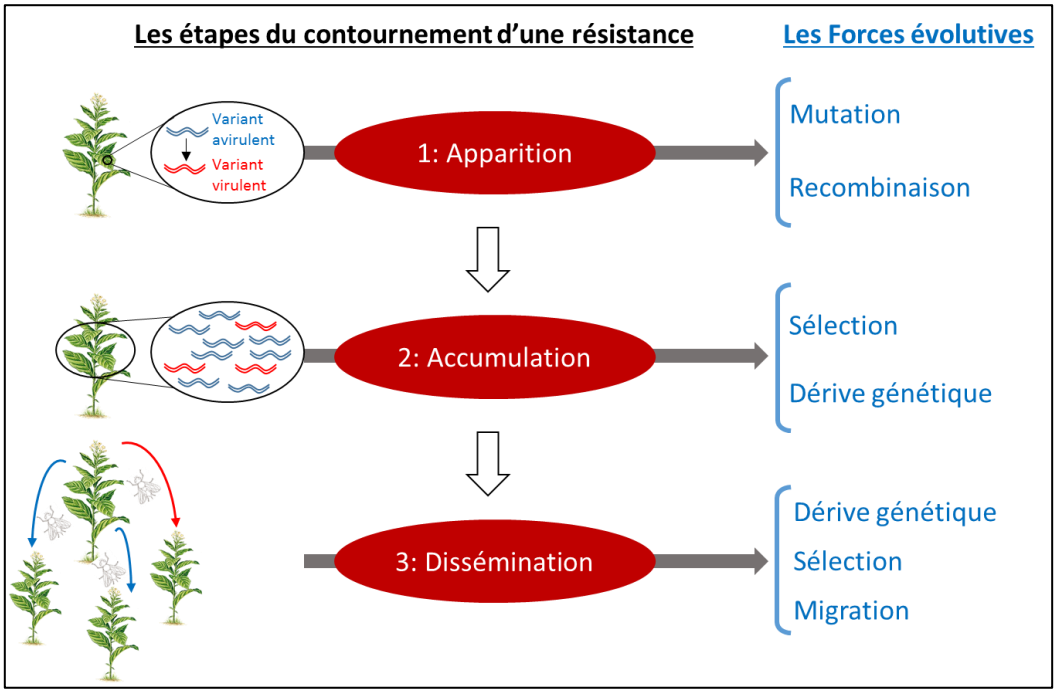


Figure I-12. Scénario du contournement des résistances de plante par une population virale. Adapté de Moury *et al.* (2010*a*).

La première étape correspond à **l'apparition** au niveau cellulaire d'un variant virulent capable d'infecter une plante possédant un gène de résistance dans le cas d'une interaction de type gène pour gène (Sacristán et García-arenal, 2008). Cela signifie qu'il accumule les mutations nécessaires dans son facteur d'avirulence pour devenir virulent. Par exemple il a été montré que dans la VPg une seule ou plusieurs mutations sont suffisantes pour le contournement d'une résistance récessive dans les pathosystèmes RYMV/riz, PVY/piment et PVY/Tabac (Hébrard *et al.*, 2006; Moury *et al.*, 2004; Janzac *et al.*, 2014).

La deuxième étape du scénario, se caractérise par **l'accumulation** du variant virulent dans la plante, qui rentre en compétition avec la population de virus avirulents et seront soumis tous deux au phénomène de sélection et de dérive génétique. A ce stade, la sélection dépendra de la fitness du variant virulent, une forte accumulation correspond à un faible coût de fitness. Chez le colza, la capacité des isolats de TuMV à contourner la résistance *TuRB01* est associée à un coût de fitness (Jenner *et al.*, 2002). En revanche le gain de virulence n'est pas toujours associé à un coût de fitness. Par exemple, après plusieurs passages successifs sur des cultivars sensibles de riz, des variants virulents de RYMV capables de contourner une résistance partielle (polygénique) ou une résistance forte (contrôlé par *rymv1*), n'ont pas été contre-sélectionnés sur hôte sensible (en l'absence de pression de sélection) (Sorho *et al.*, 2005). De plus la co-infectiondes variants contournants avec les isolats sauvages avirulents,

n'a pas révélé de sélection dirigée en faveur de l'un des deux isolats (Sorho *et al.*, 2005). Ces résultats indiquent que la capacité du virus à contourner une résistance n'entraîne pas toujours un coût de fitness.

Durant la troisième étape, la **dissémination**, la population virale sera soumise à la dérive génétique, à la sélection, et à la migration qui participeront au maintien ou non du variant contournant.

2.3. Les forces évolutives influençant le contournement

Chaque force évolutive intervenant dans ce scénario de contournement de résistance va marquer singulièrement le devenir de la population virale.

La **mutation** est la source principale de la variation génétique des espèces. Elle correspond à une ou plusieurs modifications nucléotidiques dans le génome d'un individu. C'est le mécanisme principal de l'apparition de variants virulents chez les virus qui est conditionnée par la taille de la population (McDonald et Linde, 2002*b*). Les taux de mutation par cycle de réplication les plus élevés sont attribués aux viroïdes (entre 10^{-2} et 10^{-3}), alors que les eucaryotes supérieurs ont le taux le plus bas (entre 10^{-9} et 10^{-11}) (Gago *et al.*, 2009). Par exemple un tobamovirus, le TMV, présente un taux de mutation estimé à 10^{-5} par nucléotide et par cycle de réplication (Malpica *et al.*, 2002). Il existe deux types de mutations : les substitutions et les insertion/délétions (in/del). Les substitutions correspondent à un changement d'un seul nucléotide qui entraîne une mutation synonyme (sans modification de l'acide aminé) ou non-synonyme (en modifiant l'acide aminé).

La **recombinaison**, apporte également de la diversité et correspond à un échange de fragments génomiques entre deux génomes différents ayant pour conséquence l'apparition de nouveaux variants génétiques. Elle intervient lors de la reproduction sexuée chez les eucaryotes, lors de la conjugaison bactérienne chez les procaryotes et au niveau de la population virale présente dans la cellule infectée (McDonald et Linde, 2002*b*). La recombinaison représente un avantage dans l'acquisition de la virulence par rapport à l'acquisition de mutation, notamment pour contourner une résistance polygénique. En effet, lorsque plusieurs allèles de virulence sont nécessaires au contournement d'une résistance, un recombinant peut accumuler ces allèles en un seul événement évolutif alors que, par mutation, plusieurs événements successifs sont nécessaires (McDonald et Linde, 2002*b*).

La **sélection**, va conduire à sélectionner positivement (augmentation en fréquence) ou négativement (diminution en fréquence) en fonction de la valeur sélective (ou fitness) certaines mutations. La distribution des différents traits phénotypiques associés à une

population dépendra des trois formes possibles de la sélection qui pourra être stabilisante, diversifiante ou directionnelle. Actuellement les cultures ont des tailles de parcelles très élevées sur lesquelles une seule et même variété résistante est exploitée ce qui entraîne une homogénéité des pressions de sélection et confère ainsi un avantage sélectif aux variants virulents. La sélection est considérée comme la force évolutive ayant le plus d'impact sur la structure des populations pathogènes (McDonald et Linde, 2002*b*).

La **dérive génétique** a pour effet de modifier la fréquence des génotypes dans une population de taille limitée et ce, de manière aléatoire. Elle sera très dépendante de la taille de la population, ainsi elle sera très impactante sur une population de taille réduite et sera nulle sur une population de grande taille (infinie). A l'inverse de la sélection, la dérive génétique agit sans distinction sur tous les variants et peut entraîner de ce fait une érosion de la diversité (Ohta, 1992). Le taux de mutation (voir paragraphe ci-dessus) et la taille efficace de la population (*Ne*) sont des paramètres importants pour l'évolution des populations virales. Cependant l'estimation de la taille efficace d'une espèce est difficille à évaluer car la taille des populations virales fluctue et n'est jamais stable. Cette variation de taille est due à plusieurs goulets d'étranglement présents tout au long du cycle d'infection comme par exemple lors de la transmission par le vecteur qui va réduire la taille de la population (Moury *et al.*, 2007) ou lors du mouvement de cellule à cellule qui entrainera une érosion de la diversité génétique par perte de variants (Gutiérrez *et al.*, 2015; Miyashita et Kishino, 2010; Monsion *et al.*, 2008). Finalement plus le goulet d'étranglement sera fort plus la *Ne* de la population sera diminuée et plus l'effet de la dérive sera grand. Dans le contexte de la durabilité des résistances, ces forts goulets d'étranglement pourraient entraîner, par dérive génétique, la perte d'une mutation de virulence au sein de la population.

La **migration**, Cette force participe activement à l'évolution des populations de pathogènes (Brown et Hovmøller, 2002) et se caractérise par les flux de génotypes dans l'espace permettant l'échange d'individus géographiquement éloignés. Ceci fait intervenir évidement la capacité de dispersion qui est propre à chaque pathogène (Thrall et Burdon, 1999). Dans le cas de maladie virale, les vecteurs naturels tels que les insectes seront la principale source de dispersion. L'homme également agit de manière importante sur la migration des virus de par les pratiques agricoles, et le commerce. Tout ceci aura pour conséquence une augmentation probable du contournement des résistances.

Certains axes de recherche ont visé à quantifier les forces évolutives pour évaluer le devenir des populations virales afin d'avoir une estimation de la durabilité d'une résistance.

Les analyses de la durabilité de la résistance faite par (McDonald et Linde, 2002*a*, 2002*b*) ont montré que le facteur déterminant la durabilité n'était pas moins la nature du gène que le « potentiel évolutif » (PE). Cette mesure composite du PE regroupes plusieurs forces évolutives qui sont, les flux de gènes et de génomes (recombinaison, migration), la reproduction et la taille de la population (*Ne*, sélection, goulets d'étranglement, dérive). Toutefois cette approche à des limites, notamment parce que chaque virus aura son propre PE et la quantification de ces phénomènes naturels reste difficile à mesurer en laboratoire. Cependant les forces évolutives sont des déterminants puissants dans la construction de modèles prédictifs de gestion et d'estimation de la durabilité d'une résistance (Fabre *et al.*, 2009).

2.4. Identification des déterminants viraux impliqués dans le contournement

Après Johnson, García-Arenal et McDonald en 2003 ont considéré qu'une résistance était durable si elle demeure efficace ou si elle ne présente aucun variant contournant signalé durant 25 ans et plus. Harrison (2002) avait établi, en comparant la durabilité de la résistance dans différents pathosystèmes, que plus le nombre de mutations nécessaires à la virulence était élevé, plus la résistance était durable (Harrison, 2002; Janzac *et al.*, 2009). Finalement, l'étude et l'identification des déterminants viraux portant ces mutations seront indispensables pour comprendre et évaluer le contournement et ainsi la durabilité d'une résistance. L'analyse des déterminants viraux se fait généralement au laboratoire en inoculant un variant avirulent sur plante résistante. Ensuite lorsqu'il y a apparition de variants contournant, une analyse par comparaison de séquence est réalisée entre variants virulents et avirulents. Une fois le déterminant viral identifié il est généralement validé par génétique inverse en utilisant des clones viraux d'ADNc complets infectieux. Ainsi, des mutations dans la VPg permettent au virus variant de contourner la résistance conférée par un eIF. Il a été montré que la VPg du PSbMV était le déterminant moléculaire impliqué dans le contournement du gène *sbm-1* chez le pois (Keller *et al.*, 1998). Dans le pathosystème PVY/Tabac, grâce à des expériences de génétique inverse il a été montré qu'une mutation ponctuelle dans le domaine central de la VPg du PVY était suffisante pour le contournement du gène de résistance récessif *va* conféré par eIF4E (Janzac *et al.*, 2014; Julio *et al.*, 2014). Ce modèle simple de co-évolution n'est pas applicable au pathosystème Laitue/LMV, où la VPg n'a été associée qu'au contournement de l'un des deux allèles de résistance, *mo1*[1]. Un deuxième facteur de virulence entre en jeu : la

protéine CI (Cylindrical Inclusion, helicase caractéristique des potyvirus), responsable du contournement des résistances *mo1*[1] et *mo1*[2] (Abdul-Razzak *et al.*, 2009; German-Retana *et al.*, 2008; Sorel *et al.*, 2014).

2.5. La fréquence de contournement comme indicateur de durabilité d'une résistance

Il a été clairement montré dans le pathosystème piment/PVY, que la fréquence de contournement d'un gène de résistance majeur *pvr2*[3] est un caractère héritable (Quenouille *et al.*, 2014), et la mesure de la fréquence de contournement permet d'apprécier la durabilité de la résistance. Ceci est vérifié en laboratoire en inoculant un nombre important de plantes qui permet de mesurer le nombre d'individus infectés par des variants contournants.
Comme il a été montré en particulier par Lacroix *et al.* (2011*a*), en mesurant la fréquence de contournement des deux allèles du gène *va* (*va*[0] et *va*[2]), conférant une résistance du tabac au PVY. Ces travaux indique que l'allèle *va*[2] est plus fréquemment contourné avec 11.5% de plantes infectées présentant des variants contournants, contre 0% pour les plantes portant l'allèle *va*[0] (Lacroix *et al.*, 2011*a*). Ceci était en accord avec les niveaux de résistance précédemment décrits indiquant que *va*[0] confère une résistance plus durable que l'allèle *va*[2] (Lacroix *et al.*, 2010). De la même manière, chez le piment, l'émergence de PVY virulents vis-à-vis du gène de résistance récessif *pvr2*[3] se produit dans 37% des plantes porteuses de cette résistance, considérée comme faiblement durable (Ayme *et al.*, 2006).

3. La tolérance des plantes aux virus : une alternative aux résistances classiques ?

Comme on vient de le voir dans le paragraphe précédent, l'efficacité des résistances contrôlées par des gènes majeurs peut être compromise. Dans le but de développer des moyens de lutte plus durables, la tolérance des plantes aux virus pourrait être une bonne alternative, notamment dans le cas d'écosystèmes agricoles favorables au contournement des résistances (ex. présence d'isolats contournants dans l'environnement).

3.1. Définition et concept de la tolérance des plantes aux virus

Il peut parfois y avoir certaines confusions entre les termes utilisés en pathologie végétale comme les notions de virulence et d'agressivité d'un pathogène.

La définition de « virulence » proposé par Van der Plank (1968), toujours employée en pathologie végétale correspond à un caractère qualitatif. Elle se définit comme la capacité d'un pathogène à infecter un hôte spécifique. En comparaison, le concept d'agressivité d'un pathogène peut se définir comme la composante quantitative du pouvoir pathogène en situation compatible (Pariaud *et al.*, 2009). La virulence et l'agressivité d'un virus constituent ainsi deux traits d'histoire de vie pouvant évoluer séparément et sont directement liés à sa fitness.

D'un point de vue expérimental, l'agressivité d'un virus étant un caractère quantitatif elle pourra être estimée en mesurant plusieurs composantes : le niveau d'accumulation, la vitesse d'infection, ou encore la quantité et la nature des symptômes exprimés. Du côté de l'hôte, on pourra parler de sensibilité ou de résistance comme on l'a vu dans la section 1 du chapitre I, mais également de tolérance.

D'après Cooper et Jones en 1983, repris par Bos et Parlevliet en 1995, le terme de tolérance employé en pathologie végétale est défini comme la capacité d'une plante à endurer une infection par un pathogène particulier (ici un virus), sans montrer de maladie grave et sans présenter de symptômes (Bos et Parlevliet, 1995; Cooper et Jones, 1983). Il faut rajouter à cette définition que le pathogène n'est pas impacté dans son cycle infectieux. La plante tolérante sera donc infectée par le pathogène de manière similaire à une plante sensible qui, elle, par contre, présentera des symptômes plus ou moins sévères. Cependant, chez les plantes ne présentant pas de symptômes, si l'un ou l'autre des traits d'histoire de vie du pathogène est impacté (multiplication, propagation, transmission etc…), on ne parlera plus de tolérance mais de « résistance partielle » ou « résistance incomplète » (Bos et Parlevliet, 1995). Dans les deux cas, tolérance et résistance incomplète, l'absence de symptômes constitue un intérêt agronomique évident puisque l'infection par le pathogène n'affectera pas les rendements.

3.2. Mécanismes et exemples de gènes impliqués dans la tolérance

A ce jour, la plupart des études menées sur le déterminisme génétique de la symptomatologie font référence à des gènes de résistance partielle ou incomplète conférant un phénotype de tolérance. En comparaison, très peu de gènes de tolérance comme définie par Bos et Parlevliet ont été identifiés. Dans une étude précédente réalisée au laboratoire sur

Arabidopsis thaliana (Sicard *et al.*, 2008), des loci distincts ont été associés soit au développement de symptômes, soit à l'accumulation virale (PPV). Il convient donc de distinguer les déterminants génétiques de la tolérance des facteurs de résistance, même partielle.

Comme on l'a vu dans le chapitre sur les gènes de type NB-LRR, les gènes *R* semblent impliqués dans le contrôle de l'apparition de symptômes. Cependant des mécanismes indépendants des gènes *R* peuvent aussi être impliqués dans les mécanismes de tolérance. Ainsi, les voies de signalisation des hormones végétales impliquées dans les mécanismes de défense ont été associées à des phénotypes de tolérance. Par exemple, la surexpression du gène *SlMAPK3* (codant pour une MAP Kinase) chez *Solanumm lycopersicum* induit une tolérance au TYLCV (Li *et al.*, 2017). La dérégulation de l'expression de ce gène entraine une diminution de la concentration en H_2O_2 et une activation au niveau transcriptionel des gènes de défense impliqués dans les voies de signalisation médiée par l'acide salicylique (SA) et l'acide jasmonique (JA). (Li *et al.*, 2017).

Le caractère de tolérance peut être tout aussi instable que la résistance en terme de durabilité comme c'est le cas pour la tolérance au *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV) (Lecoq *et al.*, 2004). Dans cette étude, les variétés porteuses du gène *Zym* (dominant monogènique) sont rapidement infectées par des isolats de ZYMV capables d'induire des symptômes sévères après seulement deux passage sur plantes tolérantes en conditions contrôlées (Lecoq *et al.*, 2004). Il est à remarquer ici que le gain d'agressivité a eu un impact négatif sur la fitness relative des variants agressifs. Par conséquent, ces variants virulents seraient contre-sélectionnés sur génotypes sensibles. Dans le cadre du déploiement de ces variétés tolérantes, il conviendrait donc de réaliser des rotations avec des variétés sensibles d'une année à l'autre.

4. Le pathosystème Tabac/PVY

4.1. Le tabac cultivé

4.1.1. Origine, histoire et botanique

Le tabac du Genre *Nicotiana* (*Solanaceae*: Linnaeus 1753) est une plante dicotylédone de la famille des *solanacées* originaire d'Amérique centrale. Les indiens le cultivaient il y a plus de 3000 ans pour en inhaler la fumée, à partir des feuilles séchées, à l'aide d'un bâton creux taillé en Y, appelé « *tobago »* ou « *tobaca* ». A cette époque, le tabac est une plante sacrée, utilisée de manière curative par les chamanes pour apaiser le corps et l'esprit. Il est introduit

en Europe pour la première fois en 1492 par Christophe Colomb, après l'avoir découvert à Cuba lors de son grand voyage aux Indes occidentales (Kirsch, Genèse d'une épidémie, 2010). Il est alors utilisé en Espagne et au Portugal comme plante ornementale. C'est ensuite Jean Nicot, alors ambassadeur de France au Portugal, qui croit aux vertus curatives du tabac, qui l'introduit en 1560 en France pour traiter les terribles migraines de François II. Le traitement fonctionna et c'est ainsi que le tabac connut son succès en France comme plante médicinale, dont la vente sous forme de poudre resta réservée aux apothicaires. Le tabac toujours utilisé comme médicament, deviendra de plus en plus consommé par plaisir.

C'est en l'honneur de Jean Nicot que Lonitzer créa en 1565 le nom du genre qui fut ensuite consacré en 1753 par Linné. Les tabacs appartiennent au genre *Nicotiana*, qui fait partie de la famille des Solanacées comme la tomate (*Lycopersicon esculentum*), la pomme de terre (*Solanum tuberosum*) ou le poivron (*Capsicum annuum*). Il est généralement admis que le genre comprend 76 espèces, de distribution principalement tropicale et subtropicale, sur quatre continents, dont la majorité en Amérique du Sud et en Australie (Knapp *et al.*, 2004). Les différentes espèces de *Nicotiana* sont réparties au sein de trois sous genres *Tabacum*, *Rustica* et *Petunioïdes* (Goodspeed, 1954) (Table I-1). Cette classification est basée sur les caractères morphologiques des espèces, leur répartition géographique, leurs caractères cytologiques, et la répartition des chromosomes (caryotype) chez les hybrides interspécifiques. Une nouvelle classification au sein du genre *Nicotiana* a été proposée en 2004, en fonction d'études récentes des génomes nucléaires et plastidiques des espèces (Knapp *et al.*, 2004)

Sous-genre	Section	Espèce	Auteur	Nombre chromosomique (2n)
	Paniculatae	*glauca*	Graham	24
		paniculata	Linnaeus	24
		knightiana	Goodspeed	24
		solanifolia	Walpers	24
Rustica		*benavidesii*	Goodspeed	24
		cordifolia	Philippe	24
		raimondii	Macbride	24
	Thyrsiflorae	*thyrsiflora*	Bitter ex Goodspeed	24
	Rusticae	*rustica*	Linneaus	48
	Tomentosae	*tomentosa*	Ruiz et Pavon	24
		tomentosiformis	Goodspeed	24
		otophora	Grisebach	24
Tabacum		*kawakamii*	Ohashi	24
		setchellii	Goodspeed	24
		glutinosa	Linnaeus	24
	Genuinae	*tabacum*	Linnaeus	48
	Undulatae	*undulata*	Ruiz et Pavon	24
		arentsii	Goodspeed	48
		wigandioïdes	Koch et Fintelman	24
	Trigonophyllae	*trigonohylla*	Dunal	24
		palmeri	Gray	24
	Alatae	*sylvestris*	Spegazzini et Comes	24
		langsdorffii	Weinmann	18
		alata	Link et Otto	18
		forgetiana	Hort ex Hemsley	18
		bonariensis	Lehmann	18
		longiflora	Cavanilles	20
		plumbaginifolia	Viviani	20
	Repandae	*repanda*	Willdenow ex Lehmann	48
		stocktonii	Brandegee	48
		nesophila	Johnston	48
	Noctiflorae	*noctiflora*	Hooker	24
		petunioïdes	(Griseback) Millan	24
		acaulis	Spegazzini	24
		ameghinoi	Spegazzini	?
	Acuminatae	*acuminata*	(Graham) Hooker	24
		pauciflora	Remy	24
		attenuata	Torrey ex Watson	24
		longibracteata	Philippi	?
		miersii	Remy	24
		corymbosa	Remy	24
Pétunioïdes		*linearis*	Philippi	24
		spegazzinii	Milan	24
	Bigelovianae	*bigelovii*	(Torrey) Watson	48
		clevelandii	Gray	48
	Nudicaules	*nudicaulis*	Watson	48
	Suaveolentes	*benthamiana*	Domin	38
		umbratica	Burbidge	46
		cavicola	Burbidge	46
		debneyi	Domin	48
		stenocarpa	Wheeler	?
		gossei	Domin	36
		amplexicaulis	Burbidge	36
		maritima	Wheeler	32
		velutina	Wheeler	32
		hesperis	Burbidge	42
		occidentalis	Wheeler	42
		simulans	Burbidge	40
		megalosiphon	Heurck et Mueller	40
		rotundifolia	Lindley	44
		excelsior	Black	38
		suaveolens	Lehmann	32
		ingulba	Black	40
		exigua	Wheeler	32
		goodspeedii	Wheeler	40
		rosulata	(S. Moore) Domin	40
		fragrans	Hooker	48
		africana	Merxmüller et Buttler	46

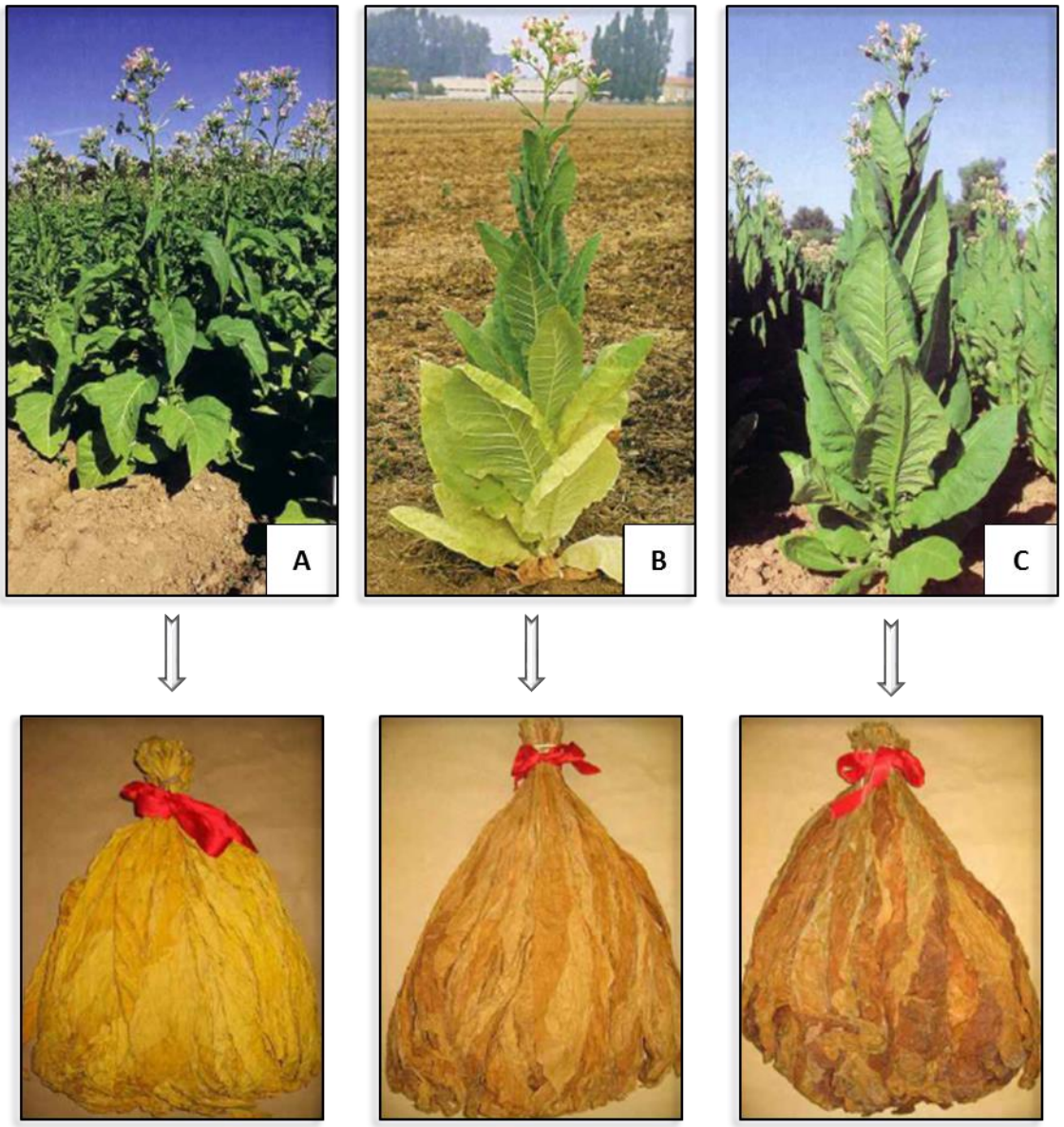
Table I-1. Classification du genre *Nicotiana*. D'après Goodspeed (1954)

Les plantes du sous-genre *Rustica* sont des herbes vigoureuses à feuilles généralement pétiolées originaires d'Amérique du Sud. Les plantes du groupe *Pétunioides* sont généralement des herbes à feuilles pétiolées ou sessiles. Ce sous genre est plus hétérogène. On y trouve les tabacs d'ornement dont les espèces proviennent d'Amérique du Sud ou du Nord, d'Australie ou des îles du Pacifique Sud (Gisquet et Hitier, 1961). Le sous-genre *Tabacum* comprend des plantes vigoureuses, herbacées ou sub-arborescentes, à feuilles généralement de grande taille. Les fleurs présentent une corolle régulière ou zygomorphe, et la couleur du limbe varie du blanc au pourpre. Toutes les espèces du sous-genre *Tabacum* sont d'origine sud-américaine. Bien qu'il existe des cultures de *N. rustica*, du sous-genre *Rustica*, la majorité des tabacs cultivés appartient à l'espèce *Nicotiana tabacum*.

La classification des variétés industrielles des tabacs, créée par le département de l'agriculture des Etats-Unis se base sur le type de tabac (Brun, Burley, Virginie) et de séchage employé (à l'air naturel dans l'obscurité « dark air-cured », à l'air chaud « flue-cured », par le soleil « oriental »). Le tabac industriel est donc traditionnellement subdivisé en 4 grands types, 1) le type Virginie ou flue-cured, 2) le type Burley, 3) le type Brun ou dark air-cured et 4) le type Oriental. En France ce sont les types Virginie, Burley et Brun qui sont les plus cultivés (figure I-13).

4.1.2. Génétique

Nicotiana tabacum est un amphidiploïde possédant 48 chromosomes (2n=48) et serait le résultat d'un événement de tétraploidisation (Clarkson *et al.*, 2005) entre les parents *Nicotiana tomentosiformis* (2n=24, sous-genre *Tabacum*, section *Tomentosae*,) et *Nicotiana sylvestris* (2n=24, sous-genre *Pétunioides*, section *Alatae*) (Table I-1). Ces deux lignées parentales *N. tomentosiformis* et *N. sylvestris* auraient respectivement contribué au génome-T-paternel et au génome-S maternel. La taille du génome du tabac est estimée à 4,5 Gb, ce qui le classe parmi les génomes les plus importants des Solanaceae (Arumuganathan et Earle, 1991). En plus de cette grande taille, la nature de son génome est très complexe, avec une forte proportion de séquences répétées, estimée notamment entre 72 % et 75% chez *N. tomentosiformis* (Sierro *et al.*, 2013a). Le génome de tabac présente une taille inférieure à celle de la somme des deux génomes parentaux (*N. sylvestris* 2,22 Gb et *N. tomentosiformis* 2,59 Gb), due à la perte préférentielle de séquences répétitives du génome-T (Renny-Byfield *et al.*, 2011).



<u>Figure I-13.</u> Les trois principaux tabacs cultivés en France en champ et après séchage
Panel du haut : plants de tabac en champ. Panel du bas : feuilles de tabac conditionnées après séchage A : tabac de type Virginie séché à l'air chaud « Flue-cured ». B : tabac de type Burley séché à l'air naturel à l'obscurité « dark air-cured ». C : tabac de type Brun séché à l'air naturel à l'obscurité « dark air-cured ». Adapté de Julio (2005).

Malgré cette complexité génétique, plusieurs efforts de séquençage ont été réalisés permettant de séquencer plus de 90% des séquences génomiques de N. *tabacum* (Gadani *et al.*, 2003). Plus tard, Bindler *et al.* (2011) ont réalisé une carte génétique, en développant 2 317 marqueurs microsatellites polymorphes (entre les parents utilisés pour générer la F2 étudiée) à partir des séquences disponible dans GenBank. Ces marqueurs SSR ont permis de générer une carte de haute résolution avec une distance moyenne entre les marqueurs SSR inférieure à 2 millions de paires de bases soit environ de 1,5 cM et d'assigner l'origine des chromosomes au génome-T ou -S. Ensuite, des génomes de référence ont été annotés et assemblés pour *N sylvestris* et *N. tomentosiformis* (Sierro *et al.*, 2013a), et une carte physique de *N. tabacum* obtenue par une approche de WGP (Whole Genome Profiling) (Sierro *et al.*, 2013b). Les génomes de trois variétés de tabac, Basma Xanthi (Oriental), K326 (Flue-cured) sensibles au PVY, et TN90 (Burley) résistante au PVY, ont également été séquencés, annotés et assemblés avec un taux de recouvrement du génome de 81% (3.6 Gb) (Sierro *et al.*, 2014). Plus récemment encore, un assemblage *de novo* du génome de tabac a été réalisé par une approche de séquençage du génome complet à haut débit ou WGS pour « whole genome sequencing » (méthode Illumina, HiSeq 2000) qui couvre cette fois près de 90% du génome soit 4 Gb (Edwards *et al.*, 2017) et qui est accessible sur le site *Solanaceae Genomics Network* (SGN : *https://solgenomics.net*).

4.1.3. Contexte industriel et scientifique

D'un point de vue scientifique, le tabac fut l'une des premières plantes utilisables en culture tissulaire *in vitro*, et parmi les premières à être génétiquement modifiées, apportant ainsi deux contributions clés à la biologie moléculaire chez les plantes. D'autres avantages sont attribués à cette plante modèle comme son intérêt potentiel dans la production biopharmaceutique (Ma *et al.*, 2015) et/ou de biocarburants (Vanhercke *et al.*, 2014). Il est également utilisé comme modèle pour l'étude de la sensibilité aux maladies, avec d'autres *Solanaceae*, comme la pomme de terre, la tomate et le piment. Le tabac est aussi la plante sur laquelle a été découvert le premier virus, le virus de la mosaïque du tabac (TMV) à la fin du 19ème siècle (Lecoq, 2001). Le pathosystème tabac/TMV a également joué un rôle majeur dans l'identification du mécanisme de HR avec la découverte du gène de résistance dominante *N* chez *Nicotiana glutinosa* (Holmes, 1938; Marathe *et al.*, 2002).

Au niveau industriel, même si la production française a fortement diminué depuis les années soixante, la France restait en 2010 le cinquième producteur européen avec une

production d'environ 18 000 tonnes. Le tabac est également une culture mondiale et représente une source importante d'emplois permanents notamment en Chine et au Brésil, qui sont les principaux producteurs actuels. Par exemple environ 135 000 familles d'agriculteurs auraient comme principale activité économique la production de tabac au Brésil. Son exploitation est considérée comme l'une des rares cultures qui produit un revenu sur de petites parcelles (Food and Agriculture Organisation of the United Nations, 2004). C'est pourquoi sa production doit être maintenue en limitant en particulier l'impact des maladies virales qui causent des pertes de rendement importantes.

4.2. Le virus Y de la pomme de terre (*Potato virus Y*, PVY) : un pathogène majeur du tabac

Plus de 115 virus sont capables d'infecter le tabac, appartenant aux genres *Tobamovirus* (TMV*)*, *Cucumovirus* (CMV), et majoritairement au genre des *Potyvirus,* dont le *Tobacco vein mottling virus* (TVMV), TEV, et le PVY (Blancard, 1998; Lacroix *et al.*, 2010). Les phénotypes d'infection varient en fonction des isolats de virus, des variétés de tabac et des conditions environnementales. Les principaux symptômes induits par les isolats de PVY vont de l'éclaircissement des nervures (vein clearing), à des mosaïques liées à des plages de décoloration du limbe, en passant par des tâches chlorotiques ou des déformations par gaufrages de la feuille (figure I.14). Les symptômes les plus sévères sont causés par des isolats de PVY de type nécrotique du groupe N et sont des nécroses nervaires qui se généralisent à la plante entière. Les infections virales entraînent une diminution des rendements mais également impactent négativement la qualité du produit. Par exemple, les feuilles de tabac présentant des nécroses foliaires induites par le PVY sont plus riches en taux d'azote total et en nitrates après séchage, affectant les qualités gustatives des feuilles, les rendant inaptes à la vente (Verrier *et al.*, 2001).

4.2.1 Caractéristiques du *Potato virus Y*

Le virus Y de la pomme de terre (PVY, *Potato virus Y*) fait partie du genre *Potyvirus* au sein de la famille des *Potyviridae* regroupant actuellement huit genres contenant près de 200 espèces répertoriées (Wylie *et al.*, 2017). Le PVY considéré comme le membre type de son genre viral (Potyvirus) a été classé dans le top 10 des virus les plus importants économiquement ou scientifiquement chez les végétaux (Scholthof *et al.*, 2011; Wylie *et al.*, 2017). Il est distribué dans le monde entier, et infecte une large gamme d'hôtes dans la famille des Solanacées, notamment la pomme de terre, la tomate, le piment et le tabac.

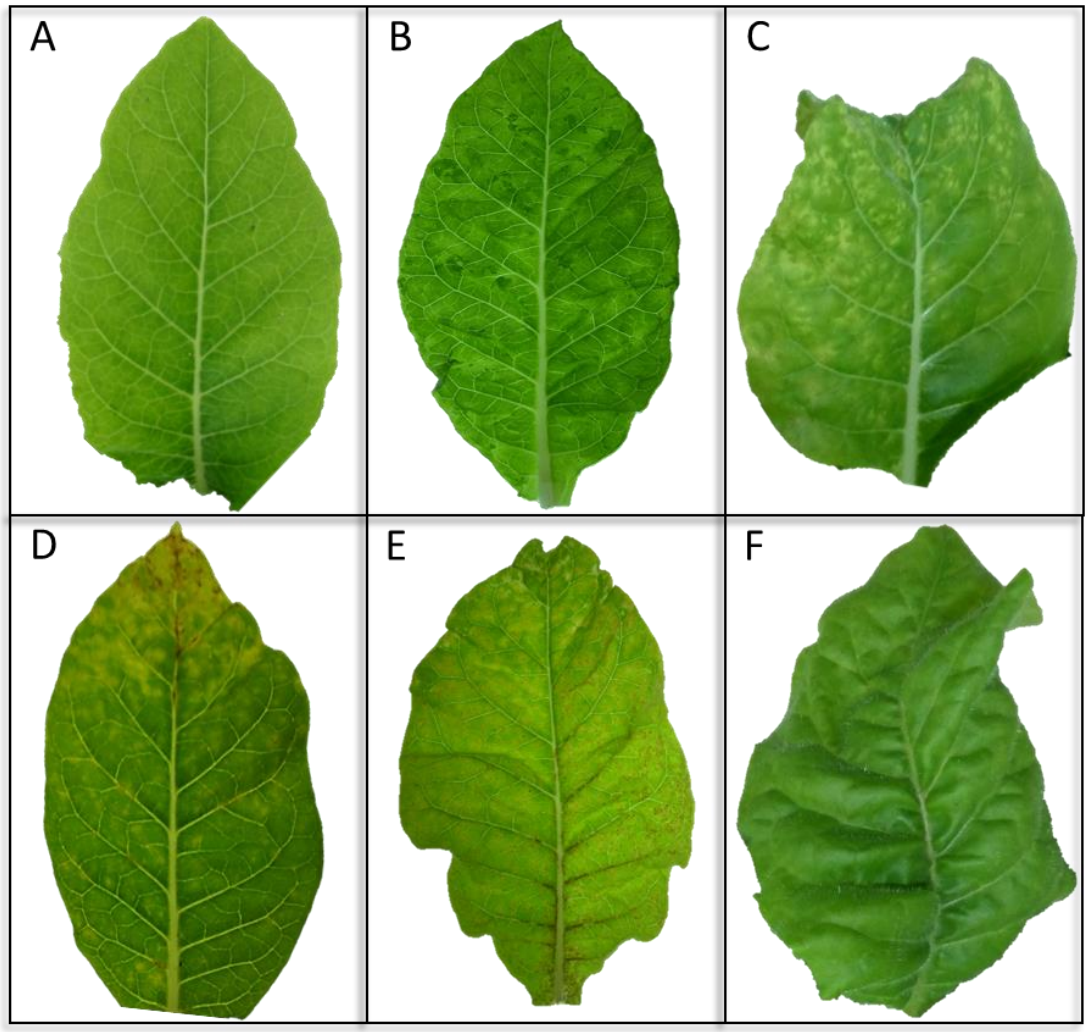


Figure I-14. Principaux symptômes observés en systémie sur feuilles de tabac de type Burley 30 jours après infection par le PVY^O (images A et B) ou par le PVY^N (images C à F). **A** : éclaircissement du réseau nervaire ou « **vein clearing** ». **B** : plages de décoloration plus ou moins marquées sur tout le limbe (symptômes de« **mosaïque** »). **C** : Présence de **tâches chlorotiques** inter-nervaires pouvant se nécroser et entraîner une déformation de la feuille. **D** : Plusieurs **halos jaunes** de type chlorotique puis nécrotique apparaissent entre les nervures, associés à une **nécrose nervaire**. **E** : Nécrose nervaire ou « **vein necrosis** », symptômes très sévères, caractéristiques des isolats de PVY de type nécrotique. **F** : Les nervures principales se **nécrosent** peu à peu entrainant un **gaufrage généralisé** de la feuille.

Il provoque sur le tabac, l'une des maladies les plus dommageables impactant le rendement et la qualité des feuilles entraînant des pertes économiques importantes (Latorre *et al.,* 1984; Verrier et Doroszewska, 2004).

4.2.2. Organisation génétique, fonction des protéines virales et transmission du virus

Le PVY se présentent sous la forme de particules filamenteuses flexueuses d'environ 730 à 740 nm de long et de 12nm de large (figure I-15). Le génome est constituée d'un ARN simple brin de polarité positive (qui peut servir directement de matrice pour la traduction) d'environ 9,7 Kb (Quenouille *et al.*, 2013*b*; Revers et García, 2015), polyadénylé au niveau de son extrémité 3' et lié de manière covalente à la protéine VPg à son extrémité 5' (Ivanov *et al.*, 2014). L'ARN viral est traduit en une polyprotéine d'environ 340 à 370 KDa codée par un premier cadre ouvert de lecture principal (ORF ou Open Reading Frame). Cette grande polyprotéine est alors clivée par trois protéases virales (P1, Hc-Pro et NIa) en 10 protéines multifonctionnelles.

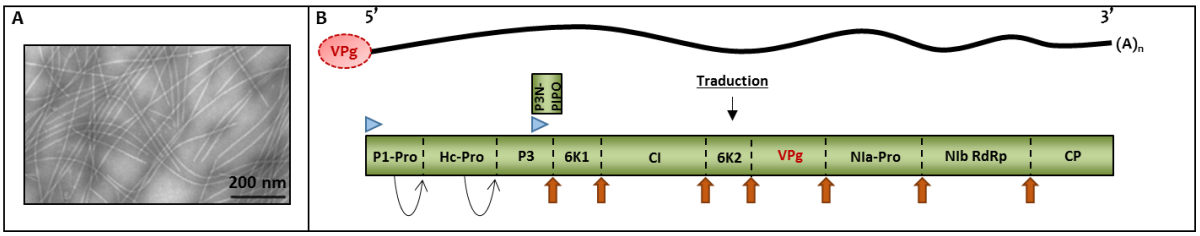


Figure I-15. Représentation structurale des potyvirus. A- Particules virales flexueuses et filamenteuses observées au microscope électronique (d'après Quenouille *et al.*, 2013*b*). **B**- Représentation de la polyprotéine codée par l'ARN viral lié à son extrémité 5' à la protéine VPg, et qui possède une queue poly A à son extrémité 3'. Les triangles bleus représentent les 2 ORFs permettant la traduction des polyprotéines dont les sites de clivage sont indiqués par des pointillés. Les flèches noires représentent les sites d'auto-clivage en C-ter, effectués par les protéases P1 et Hc-Pro. Les flèches en orange indiquent les sites de clivage reconnus par NIa-Pro (d'après Revers et García, 2015).

Un deuxième petit ORF appelé « Pretty Interesting Potyviridae ORF » (PIPO) enchâssé dans la séquence de P3, entraîne la traduction d'une onzième protéine fonctionnelle de fusion avec la région N-terminale de P3 appelée P3N-PIPO, conséquence d'un glissement de la réplicase virale lors de la synthèse de l'ARN viral (Chung *et al.*, 2008; Olspert *et al.*, 2015; Rodamilans *et al.*, 2015; White, 2015). Cette protéine P3N-PIPO produite en très petite quantité, est impliquée dans le mouvement de cellule à cellule des potyvirus, probablement via le recrutement de la protéine d'inclusion cylindrique CI au niveau des plasmodesmes (Vijayapalani *et al.*, 2012; Wei *et al.*, 2010). Récemment, un troisième ORF situé dans le gène

P1 a été découvert chez des potyvirus infectant la patate douce, entraînant la traduction d'une protéine de fusion P1N-PISPO (« Pretty Interesting Sweet Potato potyvirus ORF), résultant là encore d'un glissement de la polymérase lors de la réplication virale (Mingot *et al.*, 2016; Untiveros *et al.*, 2016). Les auteurs ont confirmé le rôle de cette protéine P1N-PISPO en tant que suppresseur de silencing, (Mingot *et al.*, 2016; Untiveros *et al.*, 2016), une fonction attribuée précédemment à la protéine P1 (Brigneti *et al.,* 1998 retracted).

La protéine **P1** est la première protéase codée par le génome, et une fois activée par un facteur de l'hôte encore inconnu, elle agit en cis à son extrémité C-terminale et entraîne le clivage de la polyprotéine à la jonction P1-HcPro (Pasin *et al.*, 2014). Cette protéine désordonnée est impliquée dans l'amplification du génome et la régulation de la traduction de l'ARN viral (Verchot et Carrington, 1995). **La protéine Hc-Pro** (Helper component - Protéase) est une protéase à cystéine (agissant en cis), qui est responsable de son propre clivage comme P1. Cette protéine multifonctionnelle (au-delà de son activité protéolytique), intervient en tant que suppresseur de silencing ainsi que dans la transmission du virus par l'insecte vecteur (Syller, 2005; Valli *et al.*, 2017). Elle est impliquée dans l'accrochage des particules virales à l'extrémité des stylets maxillaires de l'insecte (Blanc *et al.*, 1998). Elle intervient aussi dans le mouvement du virus de cellule à cellule et en systémie (Rojas *et al.*, 1997; Saenz *et al.*, 2002). Hc-Pro intervient dans l'accumulation virale, probablement en stabilisant les protéines de capside, ce qui aurait pour effet, l'augmentation de la quantité de particule virales (Valli *et al.*, 2014; Valli *et al.*, 2017). C'est également l'un des déterminants moléculaires impliqués dans la nécrose nervaire dans le cas du PVY chez le tabac (Faurez *et al.*, 2012; Quenouille *et al.*, 2013*b*; Tribodet *et al.,* 2005). **P3** joue un rôle dans l'accumulation virale et dans la réplication mais aussi dans le mouvement de cellule à cellule (Merits *et al.*, 1999; Suehiro, 2004) et serait capable de s'associer aux inclusions cylindriques formées par la CI (Rodriguez-Cerezo *et al.*, 1993). Récemment, Cui *et al.*, (2017) ont montré que la region C-terminale de la protéine P3 est indispensable à l'infection virale en permettant l'adressage de la P3 au niveau des complexes de réplication (Cui *et al.*, 2017). **6K1** correspond à une petite protéine de 6 kDa, associée à la membrane du réticulum endoplasmique et qui est impliquée dans la réplication du virus (Cui et Wang, 2016; Restrepo-Hartwig et Carrington, 1994). La protéine **CI** (Cylindrical Inclusion) est responsable de la formation d'inclusions en roue à aube au sein des cellules végétales infectées par des potyvirus. Elle possède une activité hélicase nécessaire à la réplication du virus (Fernández et García, 1996) mais est également impliquée dans le mouvement local et systémique du virus, et dans les interactions impliquant des gènes

de résistance dominante et récessive (voir pour revue Sorel *et al.*, 2014). La **6K2** est également une petite protéine membranaire de 6 kDa impliquée dans la réplication du virus (Wei et Wang, 2008) en ancrant le complexe de réplication viral au réticulum endoplasmique. Plus récemment l'équipe de J.F Laliberté a montré que le mouvement intercellulaire du TuMV était dépendant de la protéine 6K2 (Wan *et al.*, 2015). La proteine 6K2 induit la formation de vésicules de réplication dérivées du réticulum endoplasmique, associées à des vésicules de Golgi, qui seraient impliquées dans le transport intracellulaire et intercellulaire des potyvirus (Agbeci *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2015). La **VPg** des potyvirus est une petite protéine d'environ 21 kDa, issue du clivage de la polyprotéine par la protéase NIa-Pro, et liée de manière covalente à l'extrémité 5' de l'ARN viral via une liaison phosphodiester entre une sérine ou tyrosine et le nucléotide uridine 5' de l'ARN (Murphy *et al.*, 1996). Il a été montré que la VPg est une protéine intrinsèquement désordonnée, et que cette flexibilité structurale lui permettrait d'interagir avec un grand nombre de protéines pour mener à bien ses multiples fonctions (Charon *et al.*, 2017; Grzela *et al.*, 2008; Hébrard *et al.*, 2009; Jiang et Laliberté, 2011; Rantalainen *et al.*, 2011). La VPg est impliquée en particulier dans la réplication virale, interagit avec les facteurs eIF4E en jouant un rôle dans la traduction et la multiplication virale (Eskelin *et al.*, 2011; Robaglia et Caranta, 2006; Tavert-Roudet *et al.*, 2017). Elle intervient également dans la réplication et le mouvement à longue distance (Schaad *et al.*, 1997). Récemment, Cheng et Wang ont confirmé le rôle de la VPg en tant que suppresseur de silencing (Cheng et Wang, 2017). **NIa-Pro** est la troisième protéase des potyvirus, qui agit en trans pour le clivage de la polyprotéine (Hwang *et al.*, 2000) et aurait aussi une activité DNase en plus de son activité protéase (Anindya et Savithri, 2004). De façon très intéressante, il a été montré que l'infection par le TuMV augmente l'attraction des pucerons vecteurs pour les plantes infectées, et leur reproduction sur ces plantes. Le rôle crucial joué par la protéase NIa dans ce processus vient d'être démontré par Bak *et al.* (2017). **NIb** est une RdRp virale responsable de la réplication du génome viral (Fellers *et al.*, 1998; Hong et Hunt, 1996; Li et Carrington, 1995). La protéine de structure **CP** (Protéine de capside) a comme rôle principal de protéger le génome viral encapsidé dans les particules virales. Au-delà de son rôle structural, la CP des potyvirus est impliquée dans de nombreuses étapes du cycle viral, dont le mouvement dans la plante et la transmission par les pucerons *Myzus persicae* et *Aphis gossypii* (Dolja *et al.*, 1994; Moury *et al.*, 2011; Rojas *et al.*, 1997). Des études récentes ont aussi montré que la phosphorylation de la CP du PVA et son interaction avec des protéines chaperonnes de type « Heat-shock » sont essentielles à la réplication de ce potyvirus (Lõhmus *et al.*, 2017).

L'importance de modifications post-traductionnelles de la CP du PPV (phosphorylation et O-GlcNAcylation) permettant de réguler la quantité de protéines de CP lors des différentes étapes du cycle viral, a été aussi démontrée dans le cas du PPV (Martínez-Turiño *et al.*, 2017).

Les protéines codées par le génome des potyvirus sont donc multifonctionnelles, interagissent entre elles et avec les facteurs de l'hôte, et sont impliquées dans toutes les étapes du cycle viral (traduction-réplication, le mouvement et la transmission du virus).

Le PVY en particulier, peut être transmis par plus de 40 espèces de pucerons de la famille des *Aphididae* (Kerlan, 2006; Quenouille *et al.*, 2013*b*). *Myzus persicae* est le vecteur qui présente la plus grande efficacité de transmission et, en raison de sa grande répartition géographique, est responsable d'une grande partie de la propagation naturelle du PVY. La transmission par puceron est dite non persistante, quelques minutes sont suffisantes pour l'acquisition ou l'inoculation du PVY durant la piqûre ou la succion du puceron. Cela ne nécessite pas de période de latence pour que le virus soit transmissible après l'acquisition par l'insecte (Quenouille *et al.*, 2013*b*).

4.2.3. Classification complexe des isolats de PVY

La diversité du PVY aussi bien au niveau biologique (gamme d'hôtes et symptomatologie), sérologique et moléculaire a conduit à une classification très complexe des isolats de cette espèce virale. Trois groupes majoritaires notés PVY^O PVY^N et PVY^C regroupent des isolats en fonction de leur capacité à contourner les gènes d'hypersensibilité chez la pomme de terre (Nc_{tbr}, Ny_{tbr} et/ou *Nz*) et/ou à induire des nécroses nervaires chez le tabac (*N. tabacum* cv Xanthi). Le groupe C correspond à des isolats capables d'induire une HR sur pomme de terre porteuse du gène Nc_{tbr} et d'induire des symptômes légers de type mosaïque sur tabac. Les isolats du groupe O pour « ordinaire » sont capables d'induire une réaction hypersensible chez la pomme de terre porteuse du gène Ny_{tbr} et induisent des symptômes d'éclaircissement nervaire, de mosaïque ou des marbrures chez le tabac. En revanche, les isolats du groupe PVY^N sont capables de contourner les trois gènes d'hypersensibilité chez *S. tuberosum* mais également de provoquer des réactions de type nécrotique et en particulier de nécroses nervaires chez le tabac. L'expansion de la biologie moléculaire a permis de réaliser des analyses phylogénétiques plus précises des isolats de PVY en utilisant les séquences de la CP ou du génome complet des virus (Blanco-Urgoiti *et al.,* 1998; Feki et Bouslama, 2008; Moury *et al.,* 2002). Ceci a confirmé la présence des trois groupes déjà identifiés O, N et C avec une division de ce dernier en deux sous-groupes C1 et C2. Le groupe C1 regroupe des isolats

capables d'infecter le piment (*Capsicum annuum*), contrairement au groupe C2 (Blanco-Urgoiti *et al.,* 1998). Il a également été trouvé un cinquième groupe comprenant des isolats chiliens, le groupe « Chile », capables d'induire des nécroses sur tabac (Sudarsono *et al.,* 1993; Moury, 2010*b*). D'autres isolats provenant de tabacs cultivés en Chine, capables d'induire des nécroses sur tabac et sur tubercules de pomme terre, nommé PVY^{NTN} et $PVY^{N\text{-}Wi}$ ont été caractérisés comme étant des lignées recombinantes entre PVY^{O} et PVY^{N} (Glais *et al.,* 2002; Li *et al.,* 2006; Singh *et al.,* 2008). Finalement même si la classification des PVY reste complexe il y a tout de même une bonne corrélation entre la phylogénie et les caractères biologiques (spécificité d'hôte, symptômes) (Moury, 2010*b*). On peut également remarquer que le tabac est une plante hôte pour la majorité des groupes de PVY ce qui fait d'elle une plante vulnérable surtout face aux isolats nécrotiques du groupe N. De surcroît il a été montré qu'en Europe et en Amérique du Nord, les isolats nécrotiques prédominent dans la diversité naturelle du PVY (Rolland *et al.,* 2009; Lacroix *et al.,* 2010). Un autre exemple récent montre que la diversité génétique des isolats de PVY qui infectent les tabacs cultivés dans cinq grandes provinces Chinoise sont à 88% des isolats nécrotiques (Tian *et al.,* 2011).

4.3. Le gène majeur de lutte contre le PVY : le gène de résistance récessive *va*

En raison d'un manque d'efficacité des méthodes de lutte (basées en particulier sur le contrôle chimique des insectes vecteurs), la résistance génétique s'est imposée comme le moyen le plus performant pour protéger les plantes de tabac contre les infections liées au PVY. La principale source de résistance contre les potyvirus et particulièrement contre le PVY est le gène de résistance récessive *va*. Cette résistance provient de la lignée de tabac de type flue-cured nommée Virgin A Mutant (VAM), qui a été obtenue après mutagenèse induite par rayon X (Koelle, 1961). Une grande délétion de près de 1 Mb a été caractérisée par des marqueurs polymorphes d'amplification aléatoire d'ADN (RAPD) chez VAM ,pouvant expliquer la résistance (Noguchi *et al.,* 1999). De plus, le développement de marqueurs moléculaires de type SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) a permis le transfert assisté par marqueurs de *va* lors de rétrocroisements chez le tabac cultivé (Julio *et al.*, 2006). Ainsi, la résistance récessive *va*, a été introduite dans la majorité des variétés de tabac intensivement cultivées en France depuis plusieurs décennies (Blancard, 1998). En effet en 2006, 77.5% des tabacs cultivés en France seraient des génotypes portant *va* (Lacroix *et al.*, 2011*a*). Malgré l'efficacité démontrée du gène *va*, l'identification et la caractérisation d'isolats contournant

cette résistance indique qu'aucune source de *va* n'est capable de fournir une résistance complète a tous les isolats de PVY (Janzac *et al.*, 2014; Lacroix *et al.*, 2010, 2011*a*; Masuta *et al.*, 1999). Au cours de ces dernières années, des symptômes de type nécrotique associés au PVY ont été signalés dans des cultures de tabac résistants en France et dans d'autres pays. Ceci suggère la propagation de variant viraux capables de surmonter la résistance *va*. C'est pourquoi plusieurs études se sont intéressées aux mécanismes d'émergence de variants contournants (Lacroix *et al.*, 2010; Janzac *et al.*, 2014). Trois niveaux de résistance, élevé (0), modéré (1) et bas (2) ont été définis selon la quantité de symptômes nécrotiques induits par une gamme d'isolats de PVY sur différents cultivars de *N. tabacum* (Ano *et al.*, 1995; Blancard *et al.*, 1995; Lacroix *et al.*, 2010). Par exemple, l'allèle présent chez VAM, nommé $va^{0,}$ correspond au degré de résistance le plus élevé, l'allèle va^{1} porté par Wislica à un niveau moyen, l'allèle va^{2} présent dans PBD6 au niveau faible et la sensibilité totale est représentée par l'allèle de sensibilité *VA* chez la variété BB16 par exemple. Ainsi le pathotype noté 0 est attribué aux isolats de PVY capables d'infecter VAM, alors qu'un isolat capable d'infecter Wislica et PBD6 sera de type 1-2. En France, la forme allélique va^{0} présente dans VAM a été introgressée dans les types Burley alors que la forme allélique va^{2} provenant des génotypes VD et Paraguay P48, a été déployée dans les variétés de tabac Brun de type « flue-cured » et « dark air-cured » comme PBD6 (JL Verrier communication personnelle dans Lacroix *et al.*, 2010). L'origine de la variété Wislica (flue-cured) reste floue mais proviendrait de variété « Oriental » (Verrier et Doroszewska, 2004). L'accession PBD6 a été obtenue par croisement entre les variétés Paraguay P48 (va^{2}) et Bel 61-10 (*VA*) (Schiltz, 1967) (Table I-2).

Accessions	Type de tabac	Origine	Forme allélique de *va*†	Type de mutation au locus *va*‡	Provenance§
VAM	Burley	Irradiation RX de Virgin A	*va^0*	*LD*	Germany (LFPF)
TN86	Burley	VAM x Burley 49	*va^0*	*LD*	U.S.A. (ITB)
Wislica	Virginie (Flue-cured)	Tabac oriental	*va^1*	*LD*	Pologne (ISSPC)
PBD6	Brun (Dark air-cured)	Paraguay 48 x Bel 61-10	*va^2*	*LD*	France (ITB)
Elka 245	Virginie (Flue-cured)	*nd*	*$va^?$*	*SD*	*nd*
Little C.	Brun (Dark air-cured)	*nd*	*$va^?$*	*SD*	*nd*
Philippin	Brun (Dark air-cured)	*nd*	*$va^?$*	*SD*	*nd*
Wika	Virginie (Flue-cured)	*nd*	*$va^?$*	*SD*	*nd*
Burley DC	Burley	*nd*	*$va^?$*	*Fs*	France (ITB)
Semoy	Brun (Dark air-cured)	*nd*	*$va^?$*	*Fs*	*nd*
Skro.L56	Brun (Dark air-cured)	*nd*	*$va^?$*	*Fs*	*nd*
Sk70	Burley	*nd*	*va^0*	*LD*	*nd*
Start	Burley	*nd*	*va^0*	*LD*	*nd*
VZ37.1.9	Virginie (Flue-cured)	*nd*	*va^0*	*LD*	France (ITB)
D.Vert	Brun (Dark air-cured)	*nd*	*va^0*	*LD*	France (ITB)
TN90	Burley	*nd*	*va^0*	*LD*	U.S.A. (TN)
Paraguay P48	Brun (Dark air-cured)	*nd*	*va^2*	*LD*	France (ITB)
VD	Virginie (Flue-cured)	*nd*	*va^2*	*LD*	Allemagne (LFPF)
NC 744	Virginie (Flue-cured)	*nd*	*va^2*	*nd*	U.S.A.
NC 745	Virginie (Flue-cured)	*nd*	*va^2*	*LD*	U.S.A.
BB16	Burley	Bel 61-10 x Burley 21	*VA*	*nd*	France (ITB)
Xanthi	Oriental	*nd*	*VA*	*nd*	Grèce
K326	Virginie (Flue-cured)	*nd*	*VA*	*nd*	U.S.A. (GLS)
MN944	Virginie (Flue-cured)	*nd*	*VA*	*nd*	U.S.A.
Bel 61-10	Brun (Dark air-cured)	*nd*	*VA*	*nd*	U.S.A. (Beltsville)
Burley 21	Burley	*nd*	*VA*	*nd*	U.S.A. (Beltsville)

Table I-2. Origine et caractéristiques des accessions de tabac dont certaines ont été utilisées dans des programmes de sélection pour introgresser le gène de résistance récessive *va*.

† La notation $va^{0\text{-}1\text{-}2}$ correspond au pathotype selon un niveau de résistance, élevé (0), modéré (1) et bas (2) (Lacroix *et al.*, 2010*b*).

‡ D'après Julio *et al.* (2014). LD : Large Deletion ; SD : Small Deletion ; Fs Frameshift mutant.

§ LFPF: Landesanstalt Für Pflazenbau, Forchheim, Allemagne; ITB: ALTADIS, Institut du tabac, Bergerac, France; TN: Univ. of Tennessee, TN, U.S.A.; ISSPC: Institute for Soil Science and Plant Conservation, Pulawy, Poland; GLS: Gold Leaf Seed Co., U.S.A.; Beltsville Ag. Res. Station, Crops Res. Div, USDA, Beltsville, Maryland, U.S.A. (Julio *et al.*, 2006).

Il a été suggéré que les composantes fonctionnelles de la résistance *va* présentes dans la lignée VAM seraient contrôlées par deux gènes de résistance récessive *i*) *va* lui-même qui limiterait le mouvement de cellule à cellule du PVY et *ii*) un deuxième locus *va2* qui serait impliqué dans le contrôle de l'accumulation virale (Acosta-Leal et Xiong, 2008). Cela pourrait expliquer les différences de durabilité de la résistance observées entre VAM et d'autres tabac porteurs de la résistance *va*.

Malgré sa large utilisation, plusieurs effets néfastes liés à l'introgression du gène *va* ont été observés. Les lignées résistantes peuvent en effet perdre leurs qualités agronomiques, ayant des feuilles courtes et étroites entraînant une baisse de productivité (Noguchi *et al.*, 1999). La délétion de 1 Mb liée à *va* entraînerait la perte de gènes impliqués dans la qualité agronomique du tabac et qui ne seraient pas transmis à la descendance lors de rétrocroisements dû à un déséquilibre de liaison dans le chromosome E porteur de *va* (Lewis, 2005). D'autre part, la perte de la capacité à produire des exudats à la surface des feuilles, importants pour la qualité de la fumée du tabac, a été signalée dans certaines variétés résistantes possédant *va* (Nielsen *et al.*, 1982; Komari *et al.*, 1986). Des efforts ont été réalisés pour développer de nouveaux marqueurs afin d'introgresser seulement *va* en limitant ses effet négatifs lors de rétrocroisements, mais ceci n'a pas été concluant, des caractères non désirés étant toujours transmis (Tajima *et al.*, 2002). Cependant, une source supplémentaire de résistance au PVY autre que *va* a été identifiée chez *Nicotiana africana* (Lewis, 2005). La combinaison de *va* et de la résistance de *N. africana* semble offrir un bon compromis en termes de résistance, de rendement et de qualité des feuilles de tabac (Lewis, 2007).

Ce n'est que récemment, dans le cadre d'une collaboration menée entre l'Institut du Tabac de Bergerac et l'INRA de Bordeaux, que le gène *va* a enfin été cloné (Julio *et al.*, 2014). L'analyse comparative par RNAseq du transcriptome d'une douzaine de lignées recombinantes RILs (Recombinant Inbred Lines) en ségrégation pour la résistance au PVY, a permis de dresser une liste de gènes exprimés différemment chez les plantes sensibles et résistantes. C'est en particulier le cas du gène *S10760* codant pour une copie du facteur eIF4E (nommée ici *eIF4E-1*), qui est fortement exprimé chez les plantes sensibles (20 fois plus) et qui n'est plus exprimé chez les plantes résistantes (Julio *et al.,* 2014). Il a ensuite été montré que le gène *S10760* co-localisait avec *va* sur la carte génétique du tabac, au niveau du chromosome 21. Enfin, des mutants EMS qui présentent une mutation non-synonyme entraînant un codon stop prématuré dans le gène *S10760*, sont résistants au PVY (Julio *et al.*, 2008; Julio *et al.*, 2014) (figure I-16). Ces résultats démontrent que la suppression particulière du gène *eIF4E-1*

(*S10760)* provenant du S-génome est responsable de la résistance au PVY conférée par *va* (Julio *et al.,* 2014). En revanche, contrairement aux lignées possédant le locus *va*, la résistance des mutants EMS semble être plus facilement contournée et donc beaucoup moins durable.

La région génomique du locus *va* a été caractérisée grâce à des marqueurs moléculaires associés au gène *S10760* et à la délétion, pour 163 accessions de tabac dont le statut de résistance ou sensibilité au PVY était connu (Julio *et al.*, 2014). Ce travail a permis d'identifier 4 types de mutations affectant le locus *va*. Le premier groupe correspond aux variétés possédant une grande délétion, noté 'LD' pour « Large Deletion » telle que celle présente dans les variétés VAM, TN86, Wislica et PBD6 (Table I-2). La deuxième catégorie comprend deux variétés « dark air-cured » (Little C. et Philippin) et deux variétés « flue-cured » (Elka 245 et Wika) ; dans ces plantes, le gène *S10760* n'est pas amplifié, suggérant qu'il est aussi probablement délété, mais d'autres marqueurs moléculaires liés à *va* sont présents, suggérant que la délétion est probablement plus petite que chez VAM. C'est pourquoi on parle de petite délétion ou 'SD' pour « Small Deletion » pour ce groupe. Ces variétés sont en particulier intéressantes si elles ne présentent pas les effets négatifs liés à la grande délétion englobant *va*. Le troisième groupe de variétés résistantes nommé « Fs » pour « Frameshift » sont des mutants naturels dans lesquels le gène *S10760* est présent et qui ne présentent pas de délétion sur le chromosome 21. En revanche ces variétés présentent une mutation au niveau du gène *S10760* (délétion de deux paires de bases) entraînant un décalage du cadre de lecture et un codon stop prématuré. La protéine eIF4E-1 codée par ce gène mutée est donc tronquée et comporte 163 acides aminés au lieu des 219 dans la version non mutée (figure I-16). Ce troisième groupe regroupe les 3 variétés, Burley DC (Burley), Semoy (Brun) et de Skro.L56 (Brun)

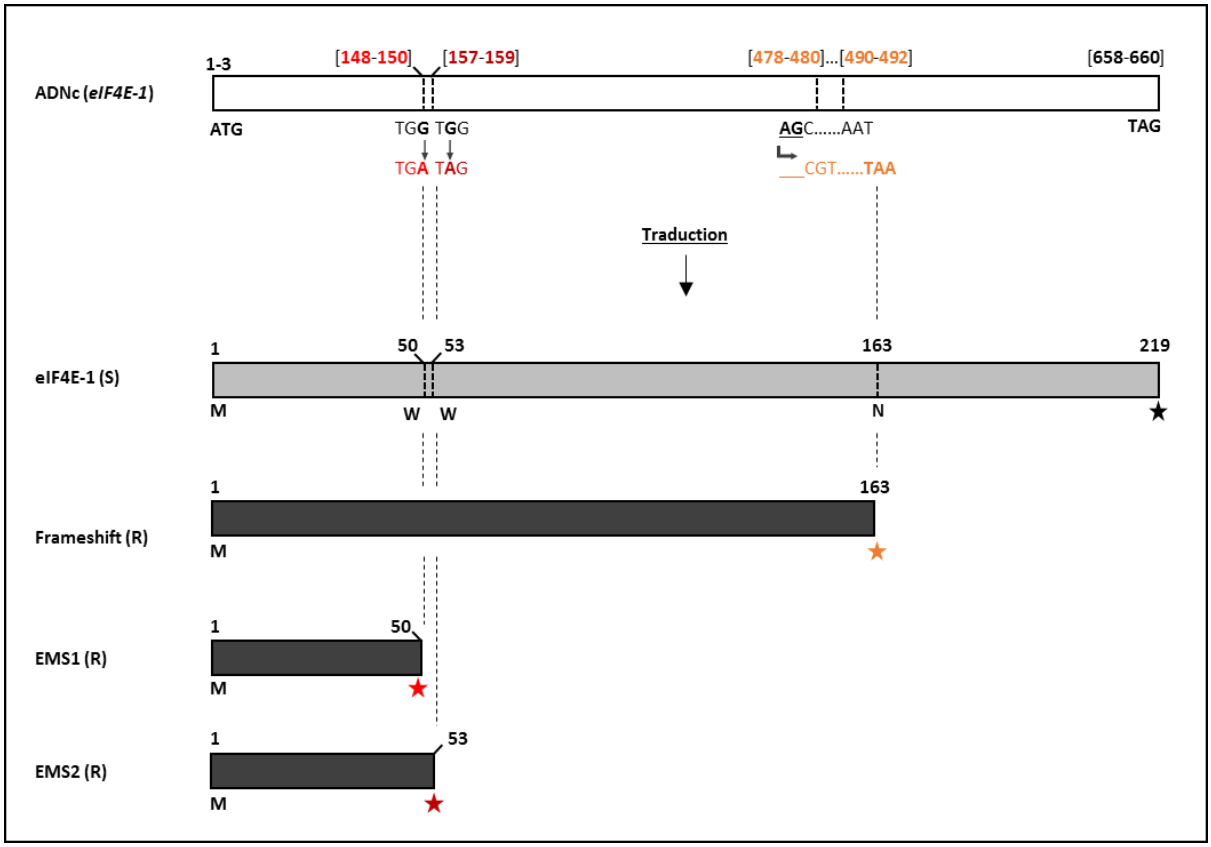


Figure I-16. Représentation de la protéine eIF4E-1 présente dans les accessions de tabac résistantes *va*. Représentation des différentes protéines eIF4E-1 codées par le locus *S10760* chez les mutants EMS et « Frameshift ». La protéine eIF4E-1 (S) de 219 acides aminés exprimée dans les variétés sensibles de tabac est indiquée en gris clair. Les positions des acides aminés remplacés par des codons stop (étoiles) dans les mutants Frameshift et EMS sont indiquées. W = tryptophane. En orange : mutations présentes dans les trois variétés Frameshifts qui codent pour une protéine de 163 acides aminés (N = Asparagine). La position 1 indiquée sur l'ADNc (en blanc) correspond à l'adénosine du codon d'initiation ATG, et pour la protéine à la première Méthionine (M).

5. Objectifs de la thèse

Les résultats démontrant que la suppression du gène *eIF4E-1* (*S10760)* , provenant du génome parental *N. sylvestris* (parent sensible) est responsable de la résistance au PVY conférée par *va* (Julio *et al.,* 2014), sont particulièrement intéressants. Toutefois, contrairement aux lignées possédant le locus *va*, la résistance des mutants EMS semble être moins durable. Ceci suggère que la durabilité du gène *va* implique soit une mutation spécifique du gène *S10760*, soit la présence d'un (des) facteur(s) génétique(s) supplémentaire(s) (Julio *et al.,* 2014).

Par ailleurs, l'analyse phénotypique de 163 cultivars de tabac a permis l'identification de 10 accessions tolérantes au PVY, qui n'expriment pas de symptômes de nécroses nervaires lors de l'infection par des isolats de PVY nécrotiques (groupe N). Ces accessions ne possèdent pas le gène de résistance *va*, suggérant ainsi un autre mécanisme de tolérance au PVY. Il existerait donc dans ces cultivars une source de tolérance aux PVY de type nécrotique, contrôlant l'apparition des symptômes de nécrose nervaire. Cette source de tolérance est potentiellement très intéressante, notamment pour résoudre les problèmes posés par l'émergence d'isolats de PVY de type nécrotique capables de contourner la résistance *va*.

Dans ce contexte, l'objectif général de cette thèse est d'améliorer notre capacité à manipuler et à déployer une résistance durable dans le tabac, contre l'un de ses principaux agents pathogènes le PVY. Plus particulièrement, l'objectif du travail de thèse était de

(i) Comprendre les mécanismes génétiques modulant la durabilité de la résistance *va*, en caractérisant finement les différences de durabilité de la résistance observées entre plusieurs génotypes de tabac *va* (présentant différentes tailles de délétions des mutations STOP ou de type « Frameshift » au niveau du locus *eIF4E-1*).

(ii) Identifier le(s) facteur(s) génétique(s) différent(s) de *va*, contrôlant une tolérance aux isolats nécrotiques de PVY.

Chapitre II :

Identifier les mécanismes génétiques modulant la durabilité de la résistance conférée par *va*

Chapitre II : Identifier les mécanismes génétiques modulant la durabilité de la résistance conférée par *va*

Article: Redundancy among *eIF4E* genes impacts the durability of *va* resistance to *Potato virus Y* in tobacco

Dans cette première partie la question était de savoir quels facteurs influencent la durabilité de la résistance au PVY conférée par le gène de résistance *va* chez différentes accessions de tabacs: le type de mutation au locus *va* ? D'autres facteurs génétiques, liés ou pas au locus *va* ?

Cela a nécessité de caractériser finement la durabilité de la résistance de 13 accessions de tabacs portant différentes formes alléliques de *va* (tailles variables de la délétion, mutations naturelles de type 'frameshift' ou mutations EMS conduisant à un codon Stop prématuré), après inoculation mécanique d'une grande diversité de souches avirulentes de PVY. En parallèle, des analyses transcriptomiques et génétique ont été menées pour tenter d'expliquer les différences de durabilité observées entre les différentes accessions.

L'analyse phénotypique a montré que la durabilité de la résistance était fortement influencée par le type de mutation au niveau du locus va. Il s'avère qu'une délétion complète du gène *eIF4E-1* au niveau de ce locus entraîne une durabilité de la résistance au PVY plus grande que toute autre forme de mutation impactant *eIF4E-1*. Il semble qu'un gradient de durabilité de la résistance soit observé, la résistance *va* étant plus durable dans les accessions portant une «Large Deletion», suivie des accessions «Small Deletions» et «Frameshift» puis des deux mutants EMS. Le génotypage et l'analyse du transcriptome des 13 variétés résistantes portant *va* ont montré qu'en plus du type de mutation affectant le locus *eIF4E-1*, la fonctionnalité et le niveau d'expression d'autres copies d'eIF4E impactent la durabilité de *va*. En particulier, un second locus qui co-ségrège avec le caractère de durabilité. Ce locus complexe est formé de trois autres copies d'*eIF4E*, *eIF4E-2*, *eIF4E-3* et *eIF4E-4*, dont l'une est tronquée chez les génotypes les plus durables (*eIF4E-3*), tandis qu'une autre est différentiellement exprimée entre les variétés résistantes et sensibles (*eIF4E-2*). Tous ces résultats suggèrent que la durabilité de la résistance conférée par *va* peut être expliquée en grande partie par des effets de redondance dans la famille des gènes *eIF4E* présents chez le tabac. Nos données permettent de proposer un modèle de leurre où la surexpression de la

copie *eIF4E-2*, sous l'effet de la délétion complète du gène *eIF4E-1* et partielle du gène *eIF4E-3*, limiterait l'apparition de variants contournants, augmentant ainsi la durabilité de la résistance contrôlée par *va*

Les résultats rapportés dans ce chapitre font l'objet d'une publication en préparation pour soumission au journal ***Molecular Plant Pathology.***

Le travail réalisé dans ce chapitre a été le fruit d'une collaboration étroite entre l'équipe d'Impérial Tobacco situé à Bergerac, l'équipe de la FN3PT (Fédération national des producteurs de plan de pomme de terre) situé à l'INRA de Rennes et notre équipe de Virologie à l'INRA de Bordeaux. J'ai réalisé la plupart des expériences rapportées dans cet article, excepté les croisements génétiques, le génotypage des individus des populations F2 et le criblage des populations de mutants EMS TILLING qui ont été réalisés par nos collègues de Bergerac.

Redundancy among *eIF4E* genes impacts the durability of *va* resistance to *Potato virus Y* in tobacco

Vincent Michel[1*], Emilie Julio[2*], Thierry Candresse[1*], Julien Cotucheau[2], Christophe Decorps[2], Roxane Volpatti[2], Benoît Moury[3], Laurent Glais[4], Emmanuel Jacquot[5], François Dorlhac de Borne[2], Véronique Decroocq[1], Jean-Luc Gallois[6] and Sylvie German Retana[1✉].

[1] UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie, INRA, Univ. Bordeaux, 71 Av. E. Bourlaux, CS 20032, 33882 Villenave d'Ornon Cedex, France

[2] Seita Imperial Tobacco, La Tour, 24100 Bergerac, France

[3] Unité de Pathologie Végétale, INRA, Centre Recherche PACA, Domaine Saint Maurice, CS 60094, F84143 Montfavet Cedex, France

[4] UMR IGEPP, INRA, Domaine de la Motte, BP 35327, 35653 Le Rheu cedex, France

[5] INRA-Cirad-Supagro Montpellier, UMR BGPI, 34398 Montpellier Cedex, France

[6] INRA-UR 1052. GAFL Domaine St Maurice - CS 60094 - F-84143 Montfavet cedex

* First-co-authors

✉ Corresponding author: Sylvie GERMAN-RETANA

UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie, INRA, Univ. Bordeaux, 71 Av. E. Bourlaux, CS 20032, 33882 Villenave d'Ornon Cedex, France ; Tel. + 33 5 57 12 23 83; Fax. + 33 5 57 12 23 84;

sylvie.german-retana@inra.fr

Running head: *eIF4E redundancy impacts va resistance durability* (<50 letters and spaces)

Keywords: eIF4E, tobacco, potyvirus, recessive resistance, durability, *va* gene, EMS mutant

(To be submitted to Molecular Plant Pathology)

Abstract

Many recessive resistances against potyviruses are mediated by eukaryotic translation initiation factors 4E (eIF4E). In tobacco, the *va* resistance gene commonly used to control PVY corresponds to a large (almost 1Mbp) deletion affecting the *S10760-eIF4E* gene (hereafter referred as *eIF4E-1*). Here, we compared the resistance durability conferred by various types of mutations affecting *eIF4E-1* (deletions of various sizes, frameshift or nonsense mutations). Thirteen tobacco genotypes were challenged with nine different PVY isolates according to their biological and molecular characteristics. The "large deletion" genotypes display the broadest and most durable resistance towards the 9 tested PVY isolates, whereas frameshift and nonsense mutants display a less durable resistance, with rapid and frequent apparition of resistance-breaking isolates. Genetic and transcriptomic analyses revealed that resistance durability is strongly impacted by a complex genetic locus which contains three other *eIF4E* copies. One of which, *eIF4E-3*, is truncated in the genotypes showing the most durable resistance, while another one, *eIF4E-2*, is differentially expressed between the tested varieties. Surprisingly, RNA-seq transcriptomic data and Q-RT-PCR experiments demonstrate that the expression level of *eIF4E-2* is positively correlated with resistance durability. These results suggest a model in which eIF4E-2 might act as a decoy, in a virus-plant non-productive interaction, limiting the ability of PVY to evolve towards resistance-breaking. Taken together these results show that *va* resistance durability can in large part be explained by redundancy effects in the *eIF4E* gene family.

1. Introduction

Potato virus Y (PVY) has been classified in the Top 10 of the most economically or scientifically important plant viruses (Scholthof *et al.*, 2011). It is the type member of the genus Potyvirus in the *Potyviridae* family, one of the largest genera of plant viruses (Wylie *et al.*, 2017). PVY is transmitted by aphids and infects a large range of host plants worldwide, mostly within the *Solanaceae* family (including potato, tomato, pepper and tobacco) (Quenouille *et al.*, 2013*a*). In particular, it causes one of the most damaging diseases on cultivated tobacco (Verrier and Doroszewska, 2004). PVY isolates are distributed into three biotypes, with the PVY^N and PVY^O biotypes separated by their ability (or inability in the case of PVY^O) to cause systemic veinal necrosis on tobacco (Moury, 2010; Singh *et al.*, 2008). Although mosaic symptoms impact less dramatically yield and quality of tobacco crops, severe leaf necrosis and necrotic stalk lesions induced by PVY^N isolates are a major concern for tobacco producers (Verrier *et al.*, 2001).

As for other potyviruses, the PVY genome consists of a single RNA molecule, polyadenylated at its 3' end and covalently linked to a 25 kDa virus-encoded VPg protein at its 5' end (Leonard *et al.*, 2000; Revers and García, 2015). The completion of the viral cycle involves a complex interplay between virus- and host-encoded factors, also called susceptibility factors. In this scheme, absence or non-adequacy of a single susceptibility factor can result in the plant resistance, a mechanism described as 'loss-of-susceptibility' (Van Schie and Takken, 2014). Such recessive resistance genes against potyviruses have been identified mainly among the translation initiation factors including eukaryotic initiation factors 4E (eIF4E) and 4G (eIF4G) or their isoforms (Robaglia and Caranta, 2006; Sanfaçon, 2015; Truniger and Aranda, 2009; Wang and Krishnaswamy, 2012). Translation initiation factors 4E are essential components encoded by a small multigene family (Browning and Bailey-Serres, 2015) and that bind to the mRNA cap structure at the 5' end of most mRNAs. Natural resistance to potyviruses in crops such as lettuce (Nicaise, 2003), pepper (Ruffel *et al.*, 2002), pea (Gao *et al.*, 2004) and tomato (Ruffel *et al.*, 2005) has been shown to result from non-synonymous substitutions in eIF4E genes. Even if the exact mechanism(s) involved in eIF4E-mediated resistance are still unclear (Robaglia and Caranta,

2006; Truniger and Aranda, 2009; Wang and Krishnaswamy, 2012), it has been shown that the viral genome linked protein (VPg) can interact with eIF4E, mimicking the 5' cap structure of messenger RNAs (mRNAs). In addition, potyviruses can evolve towards resistance-breaking through the acquisition of mutations that either restore compatibility of their VPg with the host mutant eIF4E or that possibly create an interaction with another member of the eIF4E family (Charron *et al.*, 2008; Gallois *et al.*, 2010; Lebaron *et al.*, 2016). However, other potyviral factors have also been demonstrated to be involved in circumventing eIF4E-mediated resistance: the P1 protein in the case of *Clover yellow vein virus* (Nakahara *et al.*, 2010), and the Cylindrical Inclusion protein (CI) in the case of *Lettuce mosaic virus* (Abdul-Razzak *et al.*, 2009; Sorel *et al.*, 2014a; Sorel *et al.*, 2014b; Tavert-Roudet *et al.*, 2012). Although translation initiation factors belong to small multigenic families, potyviruses are in general only able to productively interact with a limited number (1 or 2) of the eIF4E isoforms (Nicaise *et al.*, 2007). In *Solanaceae* species, mutations in eIF4E are correlated with resistance against potyviruses, with the *pvr2* locus controlling PVY (Ruffel *et al.*, 2002) in pepper, and its ortholog *pot-1* controlling PVY in tomato (Ruffel *et al.*, 2005). Other potyviruses, like *Chili veinal mottle virus* or *Pepper veinal mottle virus* have been shown to be controlled in pepper by the simultaneous mutation of *eIF4E* and *eIFiso4E* genes (Hwang *et al.*, 2009; Ruffel *et al.*, 2006). In tobacco, the main source of resistance against PVY is the *va* gene. This resistance originates from the Virgin A Mutant (VAM) tobacco line, which was obtained after X-irradiation-induced mutagenesis (Koelle, 1961; Singh *et al.,* 2008). A large deletion of almost 1 Mbp has been characterized in VAM using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers (Noguchi *et al.*, 1999). Recently, Julio *et al.* (2014) showed that a deletion of a particular copy of *elF4E* (hereafter named *eIF4E*-1) encoded by the *S10760* gene on chromosome 21, is responsible for the resistance to PVY conferred by *va*. In particular, EMS mutants with nonsense mutations in the *S10760* gene showed PVY resistance, confirming the direct involvement of the *S10760 (eIF4E-1* isoform) in the *va*-mediated resistance (Julio *et al.*, 2014).

However, redundancy among *eIF4E* genes may reduce eIF4E-based resistance durability by making other eIF4E factors available to viruses (Bastet *et al.*, 2017). Interestingly, in tomato, a comparison

between a natural functional eIF4E resistance allele and an engineered loss-of-function KO (Knock-Out) allele, unveiled an unexpected regulatory process between the members of the eIF4E family, reducing the durability and therefore the effectiveness of a resistance strategy based on *eIF4E-KO* development (Gauffier *et al.*, 2016). Indeed, the accumulation levels of each eIF4E protein suggested that a regulatory cross-talk may exist between *eIF4E* genes. In tobacco, contrary to the situation in *va* resistant plants, the resistance of EMS-*KO eIF4E-1* mutants appears to be unstable, with the rapid and frequent emergence of PVY resistance-breaking (RB) variants (Julio *et al.*, 2014). These observations suggest a possible role of the particular type of mutation affecting *eIF4E-1* or of additional genetic factor(s) in the durability of the *va*-mediated resistance. It has been suggested that functional components of the *va*-mediated resistance from the VAM line were independently controlled by two different segregating recessive genes: *va* itself would be responsible for limiting potyvirus cell to cell movement while the *va2* locus would be involved in limiting virus accumulation (Acosta-Leal and Xiong, 2008). This could potentially explain the difference in resistance durability observed between VAM and other sources of *va*-mediated resistance.

The objectives of the present study were to better characterize the differences in resistance durability observed between tobacco genotypes differing in the *va* allele they possess (i.e. deletion, frameshift or nonsense mutations at the *eIF4E-1* locus). Through genetic and transcriptomic analyses we show here that resistance durability is strongly influenced by a complex genetic locus which contains three *eIF4E* copies, one of which is truncated in the genotypes with most stable resistance, while another one is differentially expressed between the tested varieties. Taken together these results show that *va*-mediated resistance durability can be explained by redundancy/competition effects between members of the *eIF4E* gene family, parallel to what was recently shown in tomato (Gauffier *et al.*, 2016).

2. Results

Phenotypic evaluation of the durability of the resistance conferred by different types of mutations at the va locus

In a previous study, Julio *et al.* (2014) identified among their germplasm collection 35 tobacco accessions carrying a *va* resistant allele. Depending on the type of mutation at the *va* locus, four groups of resistant genotypes were distinguished (Figure II-1). The first group named 'LD' for 'Large deletion', corresponds to tobacco varieties carrying a ca. 1Mbp deletion on chromosome 21 ('VAM' 'TN86', 'Wislica' and 'PBD6'). The second group, named 'SD' for 'Small Deletion', gathers tobacco varieties carrying a smaller deletion on chromosome 21 (as judged by the presence of markers absent within the LD group) that anyhow results in a complete deletion of *eIF4E-1* ('Elka 245', 'Little C.', 'Philippin' and 'Wika'). The third category named 'Fs' for 'Frameshift' does not display any chromosomal deletion but a natural 2 bp deletion in the *eIF4E-1* gene, leading to a C-terminal truncated eIF4E-1 protein of only 163 amino acids ('Burley DC', 'Semoy' and 'Skro. L56'). The fourth group includes two EMS stop codons mutants 'EMS1' and 'EMS2', that encode C-terminal truncated eIF4E-1 proteins of only 50 and 53 amino acids respectively (corresponding to mutants W50* and W53* in Julio *et al.*, 2014). Each of the 13 accessions listed in Figure II-1 was challenged in two independent experiments, by nine isolates avirulent on VAM and representative of the PVY genetic diversity (five belonging to the 'N' Clade and four to the 'O' clade, see the experimental procedures section). The systemic infection of 12 inoculated plants per isolate was checked by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) at 15 and 30 days post-inoculation (dpi), from non-inoculated leaves. The susceptible BB16 genotype was used as a positive control for infection. For each of the 117 tobacco genotype-PVY isolate combinations, the infection rates (number of infected plants over number of inoculated plants) at 15 dpi and 30 dpi, are detailed in Table II-S1. Based on these results, Figure II-2 presents a graphical representation of the distribution of the numbers of infected plants per genotype at 30 dpi, taking into account the results obtained for each of the nine PVY isolates used.

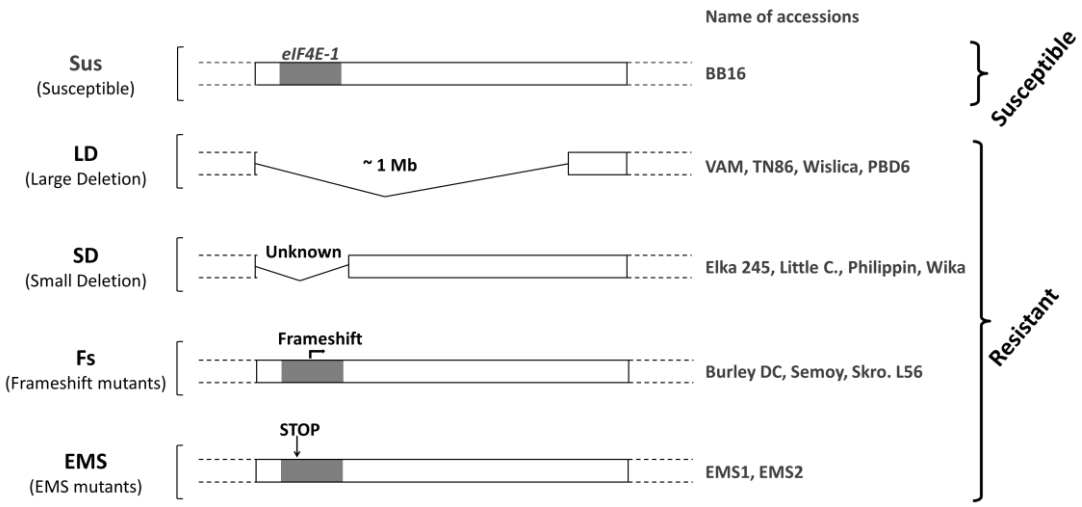


Figure II-1. Type of mutation at the *eIF4E-1* locus on chromosome 21 in the different *N. tabacum va*-accessions. The *va*-accessions listed on the right are classified into four categories ('LD', 'SD', 'Fs' and 'EMS') according to the type of mutation at the *eIF4E-1* locus. The 'EMS1' and 'EMS2' mutants correspond to W50* and W53* mutants described in Julio *et al.* (2014).

On the BB16 susceptible control, systemic viral accumulation was detected in 94% of inoculated plants at 15 dpi and in 100% of the plants at 30 dpi, whatever the PVY isolate used (Table II-S1), giving a median of 12 infected plants at 30 dpi (Figure II-2). On the opposite, the resistant 'LD' VAM and TN86 accessions displayed the lowest proportion of plants showing PVY accumulation, with a low interquartile range and a median of zero or close to zero (0.56) infected plant at 30 dpi per PVY isolate, respectively (Figure II-2). Indeed, at 15 dpi PVY accumulation could not be detected in a single inoculated plant, and at 30 dpi only 2% and 5% of the plants showed detectable PVY accumulation for VAM and TN86, respectively (Table II-S1). The two other varieties with the large deletion, Wislica and PBD6, display a slightly higher proportion of plants with PVY accumulation, with higher median (5 and 4 plants, respectively) and higher overall proportion of infected plants (29 and 33% at 30 dpi, respectively). The 'SD' group (Elka 245, Little C., Philippin and Wika accessions) displays even higher frequency of infected plants, with a median comprised between 6 and 7 plants, except for the variety Little C (median of 11 plants). Finally, the group showing the most variable results between PVY isolates and the highest frequency of infected plants corresponds to the 'FS' group (Burley DC, Semoy and Skro.L56 accessions) and to the two EMS mutants, with medians higher than 8 infected plants and

overall infection rates ranging from 60 % to 78 % at 30 dpi. Taken together, these results show that the number of infected plants follows a gradient ranging from a very efficient resistance for the 'LD' genotypes, to a very ineffective one for the 'FS' and 'EMS' (Figure II-2).

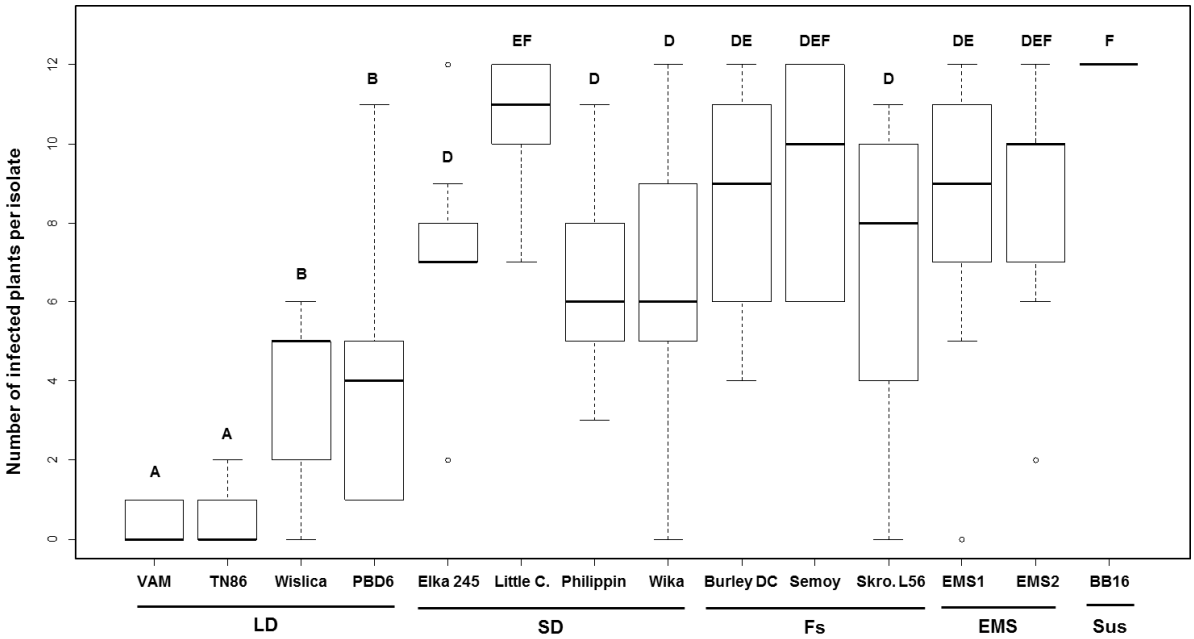


Figure II-2. Boxplot representing the distribution of the numbers of infected plants per genotype at 30 dpi, taking into account the results obtained for each of the nine PVY isolates used. Each tobacco accession was challenged in two independent experiments by nine avirulent PVY isolates. Twelve plants were inoculated per isolate for each genotype. Viral accumulation was analyzed at 30 dpi by ELISA. The values given are the average of the results obtained for each of the 9 PVY isolates, for each of the two experiments. Multiple *Chi-squared* tests for pairwise comparisons were performed using the *R* software v 3.2.5. Tobacco genotypes with same letter are statistically identical (*P*-value < 0.05).

Within the 'LD' group, the VAM and TN86 accessions seem to display a higher level of resistance efficiency compared to the Wislica and PBD6 accessions (Figure II-2). In order to confirm this observation, a larger number of plants of the four 'LD' genotypes were challenged in three independent experiments, by two PVY isolates, SN3 and O139 (for which we observed the highest infection rate in all the challenged tobacco accessions). The EMS1 mutant and the susceptible BB16 genotype were used as controls. Table II-1 shows that at 15 dpi, the four LD genotypes display significantly higher resistance efficiency than EMS1 and BB16, with 0% to 32% of infection cases monitored for the LD genotypes, compared to 57% to 93% of infection cases monitored for EMS1 and BB16, respectively (Table II-1). At 30 dpi, there is no significant difference in the infection cases

monitored on PBD6 and EMS1 genotypes for the two PVY isolates, varying from 46% to 78%. The VAM genotype displays significantly lower percentages of infection cases (1% to 2%) than the other 'LD' genotypes (Table II-1). Depending on the isolate, TN86 and Wislica display a significantly higher level of resistance than PDB6, confirming our previous observations showing that the efficiency of the resistance in the 'LD' genotype differs, with the VAM genotype displaying significantly a significantly lower percentage of infection cases (Figure II-2).

We further challenged one tobacco genotype representative of each group ('VAM' for 'LD', 'Elka 245' for 'SD', 'Skro.L56' for 'FS' and 'EMS1') with a larger collection of PVY isolates representatives of O and C clades. Table II-S2 shows that overall the resistance effectiveness is still statistically higher in 'VAM' (Large deletion) than in the other tested genotypes, with only 9 infected plants out of 192 inoculated plants (5%) when taking in consideration all PVY isolates used. The three other tested tobacco accessions, representatives of the 'LD', 'FS' and 'EMS mutant' groups provided very similar results, with overall infection rates of 83 to 88%, which are not statistically different (Table II-S2). As before, 100% infection was recorded in the BB16 variety used as a susceptible control.

Infection of *va* tobacco genotypes is associated with the emergence of resistance-breaking variants.

Previously, Masuta *et al.* (1999) and Lacroix *et al.* (2011) identified amino acid changes in the central part of the VPg of PVY which were associated with the ability to overcome the *va* resistance. In the present study, in order to confirm that the infection cases observed in the tested *va* genotypes were due to the emergence of resistance-breaking (RB) variants, the nucleotide sequence of the region encoding the central portion of the VPg was determined for a number of infected plants representing the vast majority of the viral isolate/tobacco genotype combinations tested. In total, the sequence of 91 independent viral progenies was determined for PVY^N isolates propagated in *va* tobacco accessions (Table II-S3) and of 90 progenies for PVY^0 isolates (Table II-S4). The sequences obtained were then compared with the sequence of the viral inoculum used.

Table II-1. Response of the four 'Large Deletion' *va*-genotypes, EMS1 mutant and susceptible BB16 tobacco to PVY isolates O139 and SN3.

		Phenotype †											
		VAM		TN86		Wislica		PBD6		EMS1		BB16	
PVY isolate	Experiment	15 dpi	30 dpi	15 dpi	30 dpi	15 dpi	30 dpi	15 dpi	30 dpi	15 dpi	30 dpi	15 dpi	30 dpi
PVY^{O}-O139	1	0/30	1/30	2/30	3/30	6/30	8/30	2/30	17/30	9/30	10/30	10/13	13/13
	2	0/30	0/30	3/30	16/30	15/30	19/30	16/30	29/30	30/30	30/30	15/15	15/15
	3	1/30	1/30	0/30	2/30	2/30	10/30	2/30	16/30	27/30	30/30	15/15	15/15
	Infection rate (%)	**1% *a***	**2% *A***	**6% *a***	**23% *B***	**26% *b***	**41% *B***	**22% *b***	**69% *C***	**73% *c***	**78% *C***	**93% *c***	**100% *D***
PVY^{O}-SN3	1	0/30	0/30	0/30	0/30	1/30	1/30	1/30	2/30	0/30	0/30	10/13	10/13
	2	0/30	0/30	7/30	17/30	22/30	24/30	22/30	25/30	30/30	30/30	15/15	15/15
	3	0/30	1/30	0/30	3/30	3/30	8/30	6/30	14/30	21/30	30/30	15/15	15/15
	Infection rate (%)	**0% *a'***	**1% *A'***	**8% *a'***	**22% *B'***	**29% *b'***	**37% *B'C'***	**32% *b'***	**46% *C'D'***	**57% *c'***	**67% *D'***	**93% *d'***	**93% *E'***

† Number of infected plants /number of inoculated plants for each independent experiment (1, 2, or 3). Viral accumulation was analyzed at the analyzed time (dpi, days post inoculation) by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Multiple *Chi-squared* tests for pairwise comparisons were performed using the *R* software v 3.2.5. For each PVY isolate, the infection rates labelled with the same letter (lower cases or upper cases for infection rates observed at 15 dpi or 30 dpi respectively) are statistically identical (*P*-value < 0.05).

In the susceptible BB16 control accession, no mutation was observed in the total of 40 viral progenies analyzed, irrespective of the PVY isolate inoculated (Tables II-S3 and II-S4). On the *va* accessions, a very different situation was observed. For the five PVY isolates belonging to the N clade, mutations in the central portion of the VPg were observed in all progenies analyzed, with amino acid substitutions affecting the amino acid Lysine (K) at position 105 observed in 66 of the 91 analyzed progenies (73 %, Tables II-2 and II-S3). This position has previously been identified as a major genetic determinant for overcoming the *va*-mediated resistance (Janzac *et al.*, 2014; Masuta *et al.*, 1999). In addition to VPg residue 105, point mutations at positions 101, 108, 109 and 119 were also observed, alone or in combination and always at much lower rates (Tables II-2 and II-S3). Positions 101, 108 and 109 have also been previously reported as being associated with *va*-mediated resistance breaking in tobacco (Janzac *et al.*, 2014; Lacroix *et al.*, 2011). For the four PVY isolates belonging to the O clade, a total of 65 out of 90 analyzed progenies (72%, Tables II-2 and II-S4) displayed mutations in the central portion of the VPg, with again mutations at residue 105 being by far the most frequently observed (64% see Table II-2). A few viral variants were also observed with mutations affecting VPg residues 101, 119, 120 and 121 (Table II-2 and Table II-S4). However, despite the presence of symptoms and detectable viral accumulation, no VPg mutation was detected in 28 % of the PVY^0 derived variants analyzed on eight different *va* genotypes, and in particular in 4 viral progenies on the EMS2 mutant (Table II-S4 and Table II-2). However, upon further propagation on EMS2 plants of two viral variants (derived respectively from SN3 and LA4 isolates) a high infection rate was noted (92 %) and a mutation at position 105 of the VPg was detected, suggesting that resistance-breaking variants were probably already present, although in low proportion, in the first passage progenies (Table II-S4). Altogether, these results indicate that the PVY infections observed on the different *va* tobacco accessions correspond to the emergence of resistance-breaking (RB) variants having mutations at already identified key RB positions in the central region of the VPg.

Table II-2. Amino acid substitutions identified in the VPg central region (aa 101-123) of the progenies of PVY^N and PVY^O isolates after passaging in the 13 different *va* tobacco accessions.

Amino acid change	Frequency	
	PVY^N variants	PVY^O variants
K105E; T; Q ; M	73% (66/91)	64% (58/90)
K105T + G119H	-	1% (1/90)
S101G	24% (22/91)	4% (4/90)
S101G + V108I	1% (1/91)	-
V108I + G119C	1% (1/91)	-
E109D	1% (1/91)	-
S120R	-	1% (1/90)
N121Y	-	1% (1/90)
No mutation identified	-	28% (25/90)
TOTAL	91	90

The amino acid positions are numbered according to the VPg sequence of PVY-N605 (GenBank X97895) and PVY-O139 (GenBank U09509) for PVY^N and PVY^O isolates respectively. Single and double mutations are listed. The nomenclature 'K105E' indicates the substitution of a lysine (K) by a glutamic acid (E) at position 105. For single mutations at position 105, the four substitutions oberved (K105E, or K105T, or K105Q or K105M) are regrouped. C = cysteine; D = aspartic acid, E = glutamic acid, G = glycine, H = histidine, I = isoleucine, K = lysine, M = methionine, N = asparagine, Q = glutamine, R = arginine, S = serine, T = threonine, and V = valine, Y= tyrosine. '–' indicates no mutation detected in the progenies at this position.

Overexpression of the eIF4E-2 copy in the 'LD' genotypes correlates with a higher durability of va-mediated resistance

Recently, a TILLING approach to generate broad-spectrum resistance to potyviruses in tomato was shown to be hampered by *eIF4E* gene redundancy (Gauffier *et al.*, 2016). The large difference observed above in *va*-mediated resistance durability between the 'LD' *va* genotypes and the 'FS' or 'EMS' mutants could result either from the particular type of mutation affecting *eIF4E-1* or to additional genetic factor(s) and we therefore decided to evaluate the possibility that changes in expression levels of other *eIF4E* family members might correlate with resistance durability. In tobacco, sequences annotated as *eIF4E* or its isoforms [*eIFiso4E* and novel cap-binding protein (*nCBP*)] have been previously identified in the transcriptomes of the two parental genomes of tobacco (*Nicotiana tomentosiformis* and *N. sylvestris*, respectively resistant and susceptible to PVY) (Julio *et al.*, 2014). Six copies of *eIF4E* are known in tobacco: four are derived from the *N. tomentosiformis* genome (T-

genome), T015277, T021658, T021287, and T025160, and two from the *N. sylvestris* genome (S-genome), S10760 and S05588. In the present study, '*eIF4E-1'* will stand for the *S10760* gene (*va* locus), '*eIF4E-2*-3-4-5 and-*6'* for the *T021658, T025160*, *T021287*, *S05588* and *T015277* genes, respectively, as indicated in Figure II-3. The 'Blast function' available on the Sol Genomics Network server (*https://solgenomics.net/*) (Edwards *et al.*, 2017) showed a localization of the *eIF4E-4, eIF4E-3* and *eIF4E-2* genes on chromosome 14, respectively starting at position 109292645, 109399608, and 109418388, indicating these three genes are located within a ca. 132 kbp region (Figure II-S1). The short distance between *eIF4E-2* and *eIF4E-3* was confirmed using SSR markers (Bindler *et al.*, 2011) (see experimental procedure).

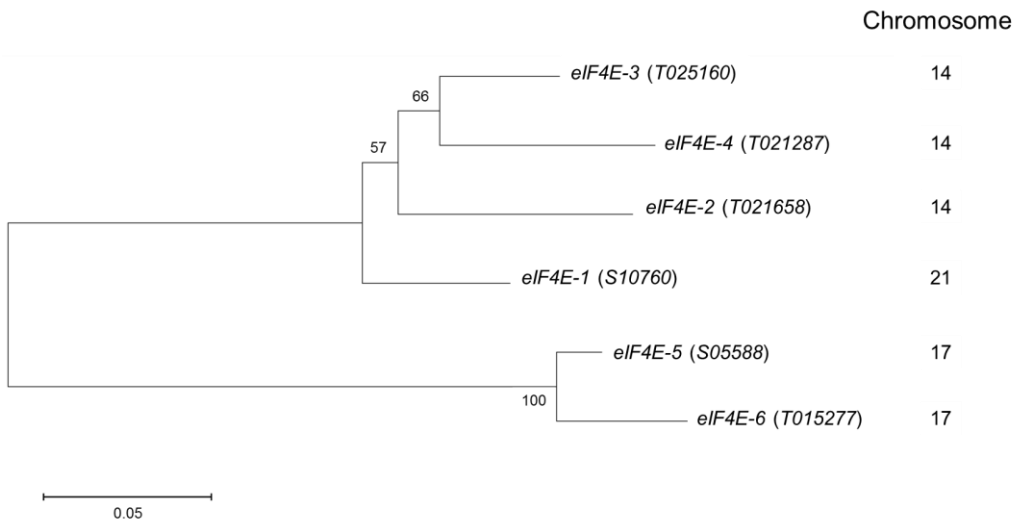


Figure II-3. Phylogenetic analysis of the eIF4E protein family in *N. tabacum*. The phylogenetic tree was obtained using the maximum likelihood method, from the alignment of amino acid sequences of eukaryotic initiation factor 4E proteins using the MEGA6 software with default parameters. The sequences used are as follows: *eIF4E-1* (S10760, GenBank KF155696); *eIF4E-2* (T021658, GenBank KM202068); *eIF4E-3* (T025160, GenBank KM202070); *eIF4E-4* (T021287, GenBank KM202069); *eIF4E-5* (S05588, GenBank KM202071); *eIF4E-6* (T015277, GenBank KM202067). Bootstrap values are shown on the branches, and the branch length is proportional to the number of substitutions per site (sps).

Therefore, *eIF4E-2*, *eIF4E-3* and *eIF4E-4* can be considered as one locus of chromosome 14. The two other *eIF4E-5* and *eIF4E-6* copies map on chromosome 17 (Nt17, position: 79984931 and 70652013 respectively). The chromosome 17 may have undergone chromosomal rearrangements between the *N. tomentosiformis* and *N. sylvestris* genomes according to Edwards *et al.* (2017), which explains the mapping of the *eIF4E-5* gene (*S05588,* S-genome origin) on the same chromosome as *eIF4E-6* (*T015277,* T-genome origin).

An initial analysis of RNA-seq data suggested that the *eIF4E-2 (T021658)* gene was more highly expressed in the resistant VAM accession (Julio *et al.*, 2014), suggesting the possible existence of an expression compensation mechanism between *eIF4E* orthologs genes derived from the two parental genomes in the amphidiploid *N. tabacum*. The results of a more extensive RNA-seq analysis on a range of tobacco accessions carrying different types of mutations affecting the *eIF4E-1* gene are shown in Table II-3. The results obtained show that for all seven accessions with the large genomic deletion ('LD' group) a higher level of expression of the *eIF4E-2* gene is observed as compared to the other *va* genotypes (Table II-3). It is also worth noting that among the large deletion accessions, three (VAM, Sk70 and Start) show a particularly striking overexpression of *eIF4E-2* (Table II-3). Real-time RT-PCR was then used in order to confirm these RNA-seq results, using two different housekeeping genes for normalization (Figure II-4).

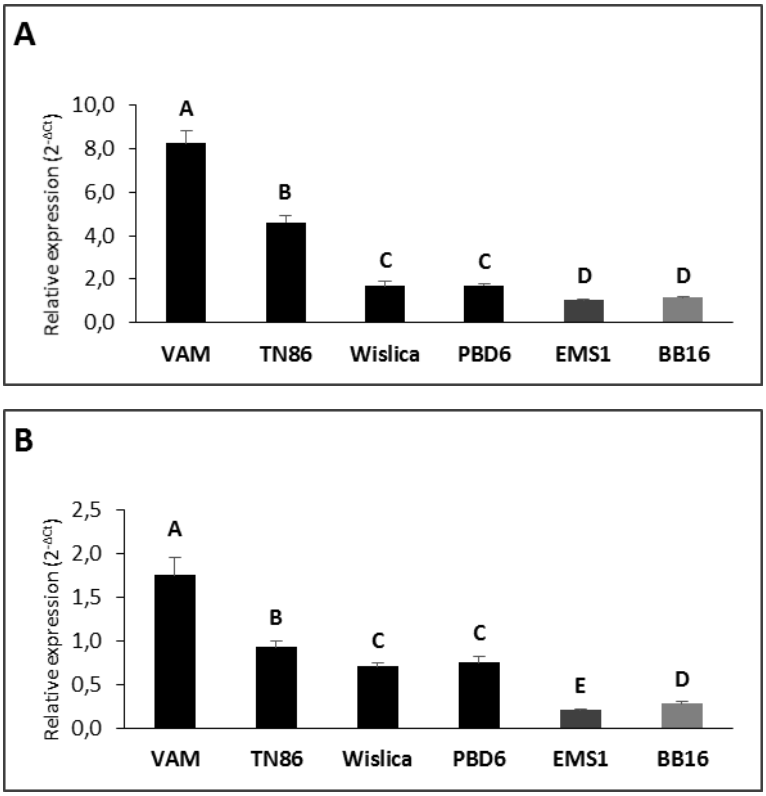
The expression level of the *eIF4E-2* gene was systematically increased by a factor 4 to 7 as compared to BB16 in the accessions TN86 and VAM, respectively, and by a factor of 1.5 in Wislica and PBD6. In contrast, there was no significant overexpression in the EMS1 mutant (Figure II-4A). The same trend was observed using another house-keeping gene (*EF1-α*) as reference (Figure II-4B). Overall, both RNA-seq data and Q-RT-PCR indicate that the overexpression of *eIF4E-2* is significantly higher in the VAM and TN86 accessions as compared to Wislica and PBD6. The high overexpression level seen by RNA-seq in Start and Sk70, was also confirmed by real-time PCR, while TN90 showed an intermediate behavior (Figure II-5A and II-5B).

Table II-3. RNASeq expression analysis of all *eIF4E* orthologs in the four groups of resistant accessions

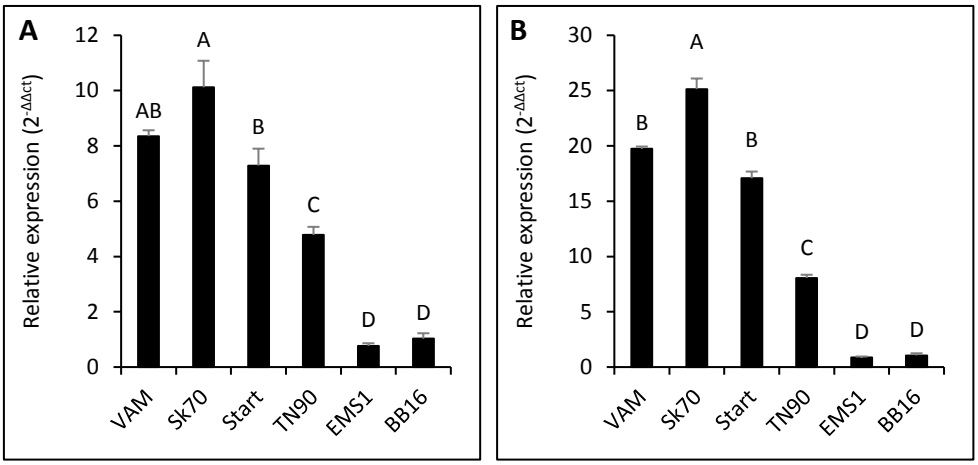
Genotype	Accession	*eIF4E-1*	*eIF4E-2*	*eIF4E-3*	*eIF4E-4*	*eIF4E-5*	*eIF4E-6*
Large Deletion	VAM	0,4	**173,1**	4,0	4,9	16,9	20,0
	TN86	1,0	**50,9**	7,4	2,5	8,5	13,2
	Wislica	0,0	**34,2**	34,5	2,0	18,2	21,0
	PBD6	0,0	**38,3**	32,1	0,0	22,0	32,6
	Sk70	2,3	**147,5**	8,5	0,0	17,5	6,5
	Start	0,4	**107,8**	2,4	2,7	19,8	15,5
	TN90	0,0	**78.5**	18,5	1,9	15,4	12,7
Small Deletion	Elka 245	0,4	11,3	11,8	2,1	14,2	15,6
	Little C.	0,0	19,2	13,4	1,2	16,8	14,9
	Philippin	0,0	17,6	13,0	1,2	22,6	14,6
	Wika	0,0	13,9	14,4	2,4	16,6	9,1
Frameshift	Burley DC	4,7	18,2	12,4	0,8	14,3	14,8
	Semoy	5,5	19,6	11,7	1,5	16,6	18,1
	Skro. L56	4,6	17,8	9,8	1,0	17,7	18,1
EMS mutant	EMS1	0,4	21,4	15,5	3,2	16,3	18,5

Normalized expression levels were obtained from RNA-Seq transcriptome analysis for uninfected tobacco accessions representative of the four categories of resistant plants (Julio et al., 2014). Data were analyzed with the "Set Up Experiment function" and "two groups comparison", by comparing characterized resistance to PVY (Resistant versus Susceptible). Data were normalized with the "Normalize function", using default parameters (Method: Scaling; Values: Original Expression Value; Normalization value: Mean, *CLC Genomics Workbench v5.5 software*). Normalized data for each contig are shown. Values corresponding to *eIF4E-2* expression in the 'LD' genotypes are indicated in bold.

The RNA-seq data show the FS mutants and the small deletion accessions to behave similarly to EMS1 and BB16 in this respect. These results therefore demonstrate the existence of a very good correlation between va-mediated resistance durability and the expression level of eIF4E-2 (Figure II-2 and Table II-1). This correlation is further reinforced by the observation that, similar to VAM, the Sk70 and Start accessions show the highest level of expression of eIF4E-2 as well as a very high level of resistance durability when confronted with the PVY-O139 isolate (Figure II-5C). A contrario the TN90 accession displayed a lower overexpression level and an intermediate level of resistance durability (Figure II-5C, compare 46% infection with 100% for the BB16 control and only 4-9% for the VAM, Start and Sk70 accessions).



<u>Figure II-4.</u> Relative quantification of *eIF4E-2* gene expression by quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (Q-RT-PCR). *EIF4E-2* transcript levels were normalized to the expression of (**A**) *RL2* (*60S ribosomal protein L2*) or (**B**) *EF1-α* (*elongation factor 1 alpha*) housekeeping genes, respectively. Gene expression was quantified in four pools of leaves sampled from six independent plants. The relative expression level (fold induction) was derived from the mean value of the 4 pools, by comparing the two housekeeping genes to obtain the ΔCt ($Ct_{eIF4E-2} - Ct_{RL2\ or\ EF1-\alpha}$) and was then calculated with formula $2^{-\Delta Ct}$ (as described by Schmittgen and Livak, 2008). The standard deviation between the four pools is indicated by vertical lines. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis rank sum test in R software v 3.2.5. Significantly different values are noted with upper cases when comparing the expression level of *eIF4E-2* between each genotype. Tobacco genotypes labelled with the same letter are statistically identical (*P*-value < 0.05). GenBank accessions numbers of the genes used: *eIF4E-2* (KM202068); *RL2* (GenBank); *EF1-α* (XM_009784954).



C

	Phenotype †		Infection rate
VAM	2/23	0/23	4% (2/46) [A]
Sk70	3/23	0/23	7% (3/46) [A]
Start	4/23	0/23	9% (4/46) [A]
TN90	8/23	13/23	46% (21/46) [B]
EMS1	23/23	23/23	100% (46/46) [C]
BB16	23/23	23/23	100% (46/46) [C]

Figure II-5. Relative quantification of *eIF4E-2* gene expression by Q-RT-PCR in various 'LD' tobacco accessions. *EIF4E-2* transcript levels were normalized to the expression of (**A**) *RL2* (60S ribosomal protein L2) and (**B**) *EF1-α* (elongation factor 1 alpha) housekeeping genes respectively. Gene expression was quantified from 2 pools of 6 independent plants. The relative expression level (fold induction) derived from the mean of the 2 pools, by comparing the two housekeeping genes to obtain the ΔCt ($Ct_{eIF4E-2} - Ct_{RL2\ or\ EF1-\alpha}$) and BB16 (susceptible reference) value was used as the calibrator to determine the $\Delta\Delta$Ct and then calculated with formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (as described by Schmittgen and Livak, 2008). The standard deviation between the two pools is indicated by vertical lines. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis rank sum test in *R* software v 3.2.5. Significantly different values are noted with capital letter (*P*-value ≤ 0.05) when comparing the expression level of *eIF4E-2 g*ene between each genotype. GenBank accessions numbers of the genes used: *eIF4E-2* (KM202068); *RL2* (X62500); *EF1-α* (XM_009784954). (**C**) The different tobacco genotypes were challenged with PVY-O139 isolate. **†** Number of infected plants / number of inoculated plants at 30 dpi. Infection rates correspond to the total number of infected plants / number of inoculated plants for the tow experiments. Statistical analysis was performed using the multi comparison *Chi square* test in *R* software v 3.2.5. Infection rates labelled with the same letter are statistically identical (*P*-value < 0.05).

A truncated eIF4E-3 gene is present in three 'LD' genotypes showing the highest va-mediated resistance durability and eIF4E-2 overexpression

The obtained RNA-seq data also provides access to sequence polymorphism that could result in amino acid changes in the various encoded *eIF4E* proteins. However, we failed to identify any amino acid polymorphism in one or another of the eIF4E copies that would have separated accessions with durable or unstable *va*-mediated resistance. The six predicted eIF4E protein sequences are shown in Figure II-S2. However, very interestingly, the RNA-seq analysis revealed that for *eIF4E-3* (*T025160)* there is only a partial coverage of the gene by the mapped reads for the three 'LD' accessions VAM, Start and Sk70, while a complete coverage is observed in the other 'LD' accessions (TN86, Wislica and PBD6), in the EMS1 mutant, BB16 (Figure II-S3) and TN90 accessions (data not shown). This would indicate that truncated transcripts are expressed from an altered *eIF4E-3* gene in those genotypes where the 5' end of the gene is missing. Assuming translation of these transcripts is not impaired, it would potentially generate N-terminally truncated variants of the eIF4E-3 protein which is then long of 98 amino acids instead of 223 aa (Figure II-S4). A specific amplification of *eIF4E-3* with a forward primer designed in the 5-prime truncated region was performed on the genomic DNA of a panel of tobacco accessions (see experimental procedures). Compared to other accessions (i.e. TN86, Wislica, PBD6, TN90, EMS1 mutant and BB16) from which the expected PCR product of 324 bp was readily amplified, no amplification product was observed in VAM, Start and Sk70, confirming the existence of a genomic deletion affecting the 5' region of the *eIF4E-3* gene in these accessions. In the last part of the paper, we will refer to this truncated *eIF4E-3* gene present in VAM as *eIF4E-3*$^{\Delta}$.

Genetic analysis indicates that the durability of *va*-mediated resistance is influenced by the type of mutation at the eIF4E-1 locus and the complex eIF4E-2-3-4 locus

We first checked whether the truncated *eIF4E-3*$^{\Delta}$ allele at the *eIF4E-2-3-4* locus co-segregates with the resistance durability character. Resistance of the F1 progeny of crosses between VAM and EMS1 was more durable than the EMS1 parent as evidenced by a 12% of infection rate within 30 dpi comparable to the parental VAM level of resistance (Table II-4). In this regard, the F1 hybrids behaved as the parental VAM genotype, showing that the resistance durability character is dominant. The

Table II-4. The deletion at the locus *eIF4E-3*$^{\Delta}$ on chromosome 14 co-segregates with the resistance durability character

	Genotype		Phenotype	*P*-value (*Chi*^{2})
	eIF4E-1 locus	***eIF4E-3 locus***		
VAM	*eIF4E-1*^{LD}/*eIF4E-1*^{LD}	*eIF4E-3*$^{\Delta}$/*eIF4E-3*$^{\Delta}$	6% (2/33)	
EMS1	*eIF4E-1*^{KO}/*eIF4E-1*^{KO}	eIF4E-3/eIF4E-3	98% (32/33)	
F1	*eIF4E-1*^{LD}/*eIF4E-1*^{KO}	eIF4E-3/ eIF4E-3$^{\Delta}$	12% (4/33)	0.16 $^{\$}$
F2	*eIF4E-1*^{LD}/*eIF4E-1*^{LD} *eIF4E-1*^{KO}/*eIF4E-1*^{KO} *eIF4E-1*^{LD}/*eIF4E-1*^{KO}	*eIF4E-3*$^{\Delta}$/*eIF4E-3*$^{\Delta}$	5% (3/59)	1 †
	eIF4E-1^{LD}/*eIF4E-1*^{LD} *eIF4E-1*^{KO}/*eIF4E-1*^{KO} *eIF4E-1*^{LD}/*eIF4E-1*^{KO}	eIF4E-3/eIF4E-3	100% (17/17)	1 ‡
	eIF4E-1^{LD}/*eIF4E-1*^{LD} *eIF4E-1*^{KO}/*eIF4E-1*^{KO} *eIF4E-1*^{LD}/*eIF4E-1*^{KO}	eIF4E-3/ eIF4E-3$^{\Delta}$	22% (40/180)	0.31 §

The allele *eIF4E-3*$^{\Delta}$ corresponds to the form with a 5' deletion of *eIF4E-3* gene on chromosome 14 as present in the VAM accession. The allele *eIF4E-3* corresponds to the complete *eIF4E-3* gene seen in most tobacco accessions. The allele *eIF4E-1*^{LD} corresponds to the large deletion on chromosome 21 which results in the complete deletion of the *eIF4E-1* gene as seen in the VAM accession. The *eIF4E-1*^{KO} allele corresponds to the point mutation seen in the EMS1 mutant and leading to a C-terminally truncated eIF4E-1 proteins of 50 aa. F2 population (256 plants) from the cross (VAM x EMS1) segregating for the deletion eIF4E3$^{\Delta}$ were inoculated with PVY-O139. The phenotype corresponds to the infection ratio (number of infected plants / number of inoculated plants) estimated by ELISA at 30 dpi. χ2 statistic tests were used to investigate whether the resistance durability phenotype (estimated as the infection rates) differed between ($^{\$}$) F1 plants and the parental VAM; (†) F2 plants homozygous *eIF4E-3*$^{\Delta}$/*eIF4E-3*$^{\Delta}$ and the parental VAM; (‡) F2 plants homozygous *eIF4E-3*/*eIF4E-3* and the parental EMS1; (§) F2 plants heterozygous *eIF4E-3*$^{\Delta}$/*eIF4E-3* and the F1 progeny. The χ2 test was used to test the null hypothesis, stating that there is no significant difference between the expected and observed result. By statistical convention, we used the 0.05 probability level as our critical value. In all the cases, the null hypothesis was accepted as the *P*-value is > 0.05.

phenotyping of 256 F2 progenies was performed and confirmed that the *eIF4E-3*$^{\Delta}$ allele, co-segregates with high level of resistance durability (Table II-4). Using the same F2 progenies, we checked whether the type of mutation at the *eIF4E-1* locus (large deletion *eIF4E-1*^{LD} on chromosome 21 resulting in the complete deletion of the *eIF4E-1* gene as seen in the VAM accession or *eIF4E-1*^{KO} allele corresponding to point mutation seen in the EMS1 mutant) influences the resistance-durability trait. The phenotyping of the 256 F2 progenies showed that homozygous *eIF4E-1*^{LD}/*eIF4E-1*^{LD} and heterozygous *eIF4E-1*^{LD}/*eIF4E-1*^{KO} progenies display infection rates comparable to VAM and F1 hybrids respectively (Table II-5). Interestingly, the homozygous *eIF4E-1*^{KO}/*eIF4E-1*^{KO} F2 progenies display a significantly higher level of resistance durability than the EMS1 parent with infection rates of 47% and 98% respectively. This difference may reflect the influence of *eIF4E-3*$^{\Delta}$ allele at the locus *eIF4E-2-3-4*. However, following the heredity of the locus *eIF4E-3*$^{\Delta}$ in the F2 populations, we observed a segregation distortion (SD) for *eIF4E-3* allele (Table II-S5). This distortion could be due to a negative effect of the non-truncated eIF4E-3 protein onto F2 plant growth or to the counter-effect of another factor linked to *eIF4E-3*.

Inactivation of eIF4E-3 does not induce eIF4E-2 overexpression nor increase va-mediated resistance durability

A tobacco collection of M2 EMS mutants derived from the tobacco line TN90 (that belongs to 'LD' group with a non-truncated *eIF4E-3* gene) was screened to identify segregating lines with mutations in the *eIF4E-3* gene, leading potentially to a truncated protein. The screening of a total of 600 M2 segregating lines allowed the identification of one EMS stop codon mutant, named TN90-4E3*, potentially coding for a C-terminal truncated eIF4E-3 protein of only 147 amino acids over 223 aa (Figure II-S4). The *va*-mediated resistance durability was compared between TN90 and TN90-4E3* when challenged by the PVY-0139 isolate, and we monitored the expression level of *eIF4E-2* in both genotypes. Our results show that there is no significant difference in resistance durability between TN90 and TN90-4E3* (Figure II-S5). Although the level of expression of *eIF4E-2* was higher in TN90 (WT) and TN90-4E3*(EMS mutant) than in the susceptible control BB16, there was no reproducible

difference in the expression level of this copy between the WT and EMS mutant plants. Therefore, the premature Stop point mutation in *eIF4E-3* gene in TN90-4E3* mutant does not affect neither the resistance durability nor the *eIF4E-2* expression level.

Table II-5. The deletion at the locus *eIF4E-1^{LD}* on chromosome 21 co-segregates with the resistance durability character

	Genotype		Phenotype	*P*-value (Chi^2)
	eIF4E-3 locus	***eIF4E-1 locus***		
VAM	*eIF4E-3$^{\Delta}$/eIF4E-3$^{\Delta}$*	*eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{LD}*	6% (2/33)	
EMS1	*eIF4E-3/eIF4E-3*	*eIF4E-1^{KO}/eIF4E-1^{KO}*	98% (32/33)	
F1	*eIF4E-3/ eIF4E-3$^{\Delta *}$*	*eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{KO}*	12% (4/33)	0.67 $^{\$}$
F2	*eIF4E-3$^{\Delta}$/eIF4E-3$^{\Delta}$* *eIF4E-3/eIF4E-3* *eIF4E-3/ eIF4E-3$^{\Delta}$*	*eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{LD}*	10% (7/68)	0,78 †
	eIF4E-3$^{\Delta}$/eIF4E-3$^{\Delta}$ *eIF4E-3/eIF4E-3* *eIF4E-3/ eIF4E-3$^{\Delta}$*	*eIF4E-1^{KO}/eIF4E-1^{KO}*	47% (31/66)	4.6×10^{-6} ‡
	eIF4E-3$^{\Delta}$/eIF4E-3$^{\Delta}$ *eIF4E-3/eIF4E-3* *eIF4E-3/ eIF4E-3$^{\Delta}$*	*eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{KO}*	18% (22/122)	0,63 §

F2 population (256 plants) from the cross (VAM x EMS1) segregating for the deletion *eIF4E-1^{LD}* were inoculated with PVY-O139. The phenotype corresponds to the infection ratio (number of infected plants / number of inoculated plants) estimated by ELISA at 30 dpi. χ2 statistic tests were used to investigate whether the resistance durability phenotype (estimated as the infection rates) differed between ($^{\$}$) F1 plants and the parental VAM; (†) F2 plants homozygous *eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{LD}* and the parental VAM; (‡) F2 plants homozygous *eIF4E-1^{KO}/eIF4E-1^{KO}* and the parental EMS1; (§) F2 plants heterozygous *eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{KO}* and the F1 progeny. The χ2 test was used to test the null hypothesis, stating that there is no significant difference between the expected and observed result. By statistical convention, we used the 0.05 probability level as our critical value.

3. Discussion

The durability of the resistance differs largely among va-tobacco accessions

In this paper, we compared the durability of the resistance in thirteen *va* tobacco accessions differing by their genetic background and the type of mutations affecting the *eIF4E-1* gene (*va* locus) such as genomic deletions smaller than the large 1 Mbp found in VAM, natural frameshift mutations and EMS nonsense mutations. The 13 tobacco genotypes were challenged by a large panel of PVY isolates representative of the virus diversity, and infection rates were monitored for each combination tobacco accession/PVY isolate. It was previously shown that the resistance-breakdown frequency is a key determinant of resistance durability (Quenouille *et al.*, 2014). Here, we showed that the PVY infections observed on the different *va* genotypes correspond to the emergence of resistance-breaking (RB) variants, having mutations at already identified key RB positions in the central region of the VPg. Depending on the challenging PVY isolate, different resistance breakdown frequencies were observed for a given tobacco accession. In particular, we observed a higher level of RB frequency with the PVY-0139 isolate, for all the tobacco accessions challenged with this isolate, and PVY-O139 was therefore chosen for evaluating the durability of the resistance *va* in latter experiments of this study.

Our phenotyping analysis highlighted a decreasing stability of the resistance durability, with the *va*-mediated resistance in the 'Large Deletion' accessions being more stable, followed by the resistance of the 'Small Deletions' and the 'Frameshift' accessions. The resistance in the EMS mutants was the most unstable, with the rapid and frequent emergence of PVY resistance-breaking (RB) variants.

Two genomic regions are involved in the durability of va-mediated resistance in tobacco

Phenotypic, genetic and transcriptomic analyses showed that the type of mutation at the locus *eIF4E-1,* together with the functionality and expression levels of other *eIF4E* copies at the second complex locus *eIF4E-2-3-4*, impact *va*-mediated resistance durability. Interestingly, the three *eIF4E-2-3-4* copies (T021658, T025160, T021287) are derived from the *N. tomentosiformis* genome and

correspond to the closest orthologs of the *N. sylvestris S10760* gene encoding eIF4E-1 (*va* locus) (Figure II-3). The presence of these three closely-related copies on chromosome 14 could result from a triplication of the *eIF4E* gene in the *N. tomentosiformis* genome. Owing to their very close proximity in tobacco genome, and the genetic linkage observed between *eIF4E-2* and *eIF4E-3* genes, it is not possible to genetically discriminate the effects on the durability of *va*-mediated resistance due to the overexpression of *eIF4E-2* or truncation of the *eIF4E-3* gene.

Acosta-Leal and Xiong (2008) compared the resistance durability of the two tobacco cultivars 'VAM' and 'NC745', both carrying the *va* recessive resistance gene, and observed a rapid selection of RB variants in NC745, but not in VAM, for which no RB variants were obtained. These observations obviously parallel the differences in durability reported here between VAM and other *va* accessions. Furthering their analysis, Acosta-Leal and Xiong (2008) suggested that functional components of the resistance were independently controlled by two different segregating recessive genes in the VAM accession: *va* itself (renamed *va1*) responsible for limiting potyvirus cell-to-cell movement and another locus, *va2,* limiting virus accumulation. They also suggested that *va1* and *va2* conditioned the stronger resistance of VAM (i.e., the long resistance durability phenotype) and that the functional gene product of *va1*, *va2*, or both loci, like most host factors interacting with VPg, might be an eIF4E factor. The fact that *va* encodes an eIF4E-1 copy was demonstrated by Julio *et al.* (2014) and the present study strongly suggests that the *eIF4E-2-3-4* complex locus could correspond to the *va2* gene, encoding gene products that may indeed interact with PVY VPg as suggested by Acosta-Leal and Xiong (2008).

The hypothesis that the *va g*ene, encoding an eIF4E factor, confers resistance to potyvirus movement is in good agreement with previous work in tobacco (Masuta *et al.*, 1999; Nicolas *et al.*, 1997) and with more recent work in Arabidopsis where the lack of *eIFiso4E* affects the systemic spread of TEV (Contreras-Paredes *et al.*, 2013). Moreover, our preliminary results show that the resistance durability of the 'NC745' accession and its *eIF4E-2* expression level are comparable to those of Wislica and PBD6, accessions that do not possess the VAM allele at the complex *eIF4E-2-3-4* locus (data not

shown). Whether this complex locus alone is able to reduce PVY single-cell accumulation, as was reported for *va2*, remains to be investigated.

The eIF4E-2 copy could act as a decoy increasing va resistance durability

One hypothesis could be that *eIF4E-3* would be directly involved in PVY resistance-breaking, and in the absence of expression of this full-copy, the resistance would be more durable. Another hypothesis, based on our RNA seq and transcriptomics data, is that the superior durability of the *va*-mediated resistance in the 'Large Deletion' accessions VAM, Sk70 and START as compared to the EMS point mutants, could result from an overexpression of *eIF4E-2* which is genetically linked to *eIF4E-3*, as a consequence of the complete deletion of *eIF4E-1* and the partial deletion of *eIF4E-3*, with these two events having apparently an additive effect on *eIF4E-2* expression. These results support a decoy model where the overexpression of the *eIF4E-2* gene would limit the ability of PVY to evolve towards resistance-breaking, increasing *va*-mediated resistance durability.

A compatible isoform of eIF4E is presumably required by potyviruses for their genome translation, replication, stabilization, intercellular and systemic transport (Contreras-Paredes *et al.*, 2013; Robaglia and Caranta, 2006; Sanfaçon, 2015; Wang and Krishnaswamy, 2012). In the scenario depicted Figure II-6, in the susceptible tobacco accessions, PVY isolates use the available eIF4E-1 protein to complete their infectious cycle. In the resistant *va* accessions, either eIF4E-1 is absent ('LD' and 'SD' genotypes) or a non-functional C-terminally truncated eIF4E-1 protein is expressed (in 'FS' and 'EMS' genotypes). The absence of eIF4E-1 or the failure of its truncated form to bind the viral VPg, a step that appears to be necessary, although not sufficient, to establish viral infection, could represent the key element in the *va*-mediated resistance. Indeed, VPg interaction with eIF4E and correlation with infectivity was demonstrated in the pepper-PVY pathosystem (Charron *et al.,* 2008; Yeam *et al.,* 2007) and in tobacco, the *Tobacco vein mottling virus* (TVMV)-encoded VPg protein was identified as the determinant for overcoming *va*-mediated resistance (Nicolas *et al.*, 1997). However, the resistance is more durable in the 'LD' genotypes compared to EMS mutants. One hypothesis is that PVY VPg is able to interact, but in a non-productive fashion with eIF4E-2. The overexpression of *eIF4E-2* observed in

'LD' accessions and exacerbated in accessions with a partial deletion of *eIF4E-3* could compete other forms of eIF4E and monopolize the translation initiation machinery. A surplus of eIF4E-2 protein would make ribosomal entry unavailable for the other endogenous eIF4E copy that may be used by the PVY RB variants, as hypothesized by Kang *et al.* (2007) or Cavatorta *et al.* (2011) in other pathosystems involving eIF4E-mediated resistance to potyvirus. This surplus of eIF4E-2 could also monopolize the VPg in a nonfunctional interaction, limiting the possibility for the virus to evolve towards resistance-breaking. This would suggest that overexpression of *eIF4E-2* would act in a dominant negative manner (Chandler and Werr, 2003) over the other eIF4E copies available to the virus. Interestingly, some of the mutations distinguishing eIF4E-2 from eIF4E-1 proteins are located in the "loop I "region close to the cap binding pocket (Figure II-S3), which contains amino acid sites known to be crucial for susceptibility to potyviruses (German-Retana *et al.*, 2008; Marcotrigiano *et al.*, 1997; Robaglia and Caranta, 2006).

Homeostatic control may exist in plants to control the levels of eIF4E factors

The analysis of RNA-seq data revealed that *eIF4E-2* copy is differentially expressed between the tested *va*-tobacco accessions. We suggest that the overexpression of *eIF4E-2* observed in the 'LD' accessions is a consequence of the complete deletion of *eIF4E-1*. A second level of upregulation of *eIF4E-2* would result from the partial deletion of *eIF4E-3* gene in the 'LD' accessions VAM, Start and Sk70. Indeed, translation initiation is highly regulated, and feedbacks mechanisms by gene family members to compensate loss of function may occur, as shown for other complexes such as proteasome (Gallois *et al.*, 2009). This was previously reported in Arabidopsis, where eIF4E-1 protein concentration increases to compensate for loss of eIFiso4E in the *KO-eIFiso4E* (Duprat *et al.*, 2002). As the level of the corresponding *eIF4E1* mRNA is not affected, the authors suggested that a lack of eIFiso4E may have a direct effect on post-transcriptional modifications, causing an increased synthesis or stability of the eIF4E-1 protein. In *Nicotiana tabacum* cv *Samsun*, the depletion of *eIFiso4E* copy by an antisense down-regulation strategy resulted in a compensatory increase in eIF4E protein levels (Combe *et al.*, 2005) while in *Brassica rapa*, this is the overexpression of a transgene *eIFiso4E* copy that induces the expression of endogenous *eIF4E* (Kim *et al.*, 2014) revealing another regulation mechanism. In tomato,

it has been suggested that interactions between proteins eIF4E-1 and eIF4E-2 lead to the degradation (not yet explained) of eIF4E-2 (Gauffier *et al.*, 2016). In the present study, we hypothesize that the absence of *eIF4E-1* mRNA or protein, induces an overexpression of the *eIF4E-2* transcripts. It is not yet known if eIF4E-2 protein level is also increased, as specific antibodies against *N. tabacum* eIF4E-2 protein are not available. In the LD genotypes in which 5' truncated *eIF4E-3*-mRNAs are produced, the presence of these unusual transcripts or the expression of an N-terminal truncated eIF4E-3 protein (or the absence of the protein if the transcripts are not translated or the protein unstable) could similarly induce the overexpression of the *eIF4E-2* copy. To test this hypothesis, we isolated an EMS stop mutant in the *eIF4E-3* gene (TN90-4E3*) in the TN90 accession ('LD' group). This mutant is predicted to produce a C-terminally truncated eIF4E-3 protein of only 147 amino acids, but we did not observe upregulation of *eIF4E-2* expression as compared to the TN90 wild type parent. However, compared to the situation in VAM where *eIF4E-3* gene is truncated in 5 prime, in TN90-4E3*, an entire *eIF4E-3* mRNA is produced and a potential C-terminal truncated eIF4E-3 protein translated. This difference might explain the lack of effect on *eIF4E-2* overexpression in TN90-4E3* *vs* TN90. Unfortunately no other EMS stop mutant in the *eIF4E-3* gene could be identified among the TILLING TN90 collection to further test the hypothesis of a contribution of the modified *eIF4E-3* locus in the *eIF4E-2* overexpression. Given that the tight linkage between these genes did not allow a refined genetic analysis, the alternative hypothesis that the overexpression of *eIF4E-2* is driven by other causes in the complex *eIF4E-2-3-4* locus than by the *eIF4E-3* partial deletion cannot however be totally discounted.

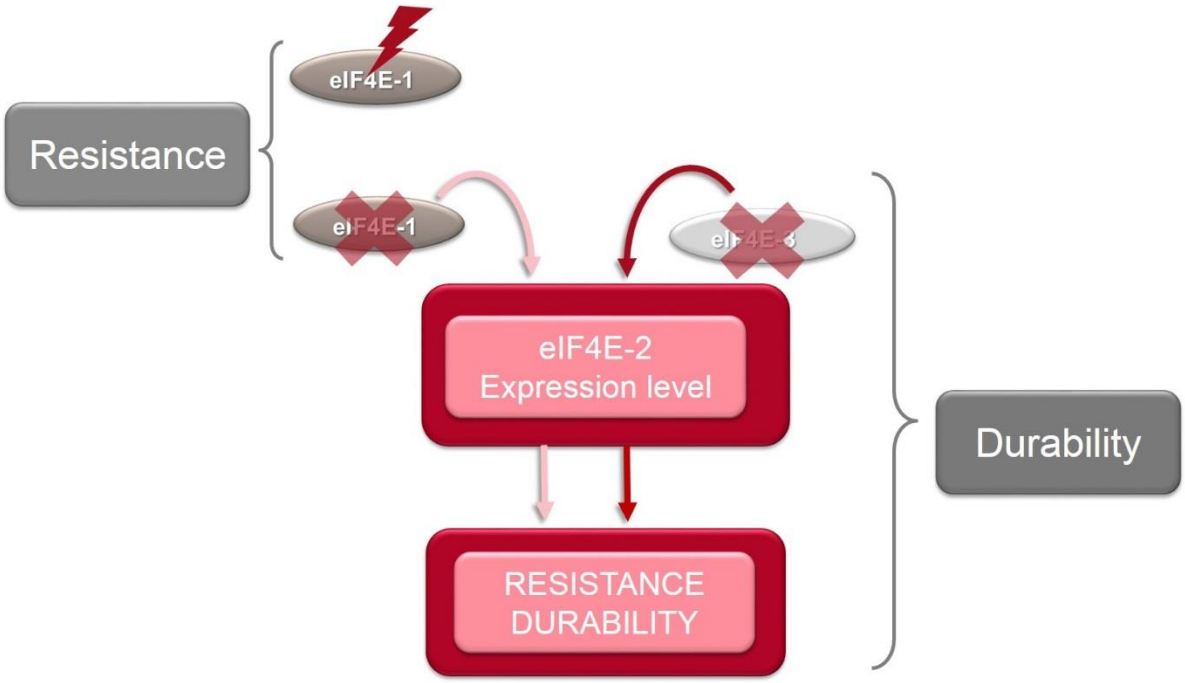


Figure II-6. Model of eIF4E-mediated *va* resistance durability in tobacco.
In tobacco, the main eIF4E copy used by PVY is eIF4E-1. In the resistant *va* accessions, either eIF4E-1 is absent (crossed-out) or a mutant C-terminal truncated eIF4E-1 protein is expressed (flash). The appearance of resistance-breaking variants, carrying mutations in the central region of the VPg, suggests that those RB-variants can recruit another eIF4E factor for their infection cycle in the absence of the main susceptibility factor eIF4E-1 or in the presence of a C-terminal truncated protein. However, the resistance is more durable when eIF4E-1 is absent. This could be explained by the overexpression of *eIF4E-2* copy in the absence of eIF4E-1 (rose arrows), that is even exacerbated in the presence of the truncated *eIF4E-3*$^{\Delta}$ gene (red arrows). The PVY or RB-PVY variants could not use the eIF4E-2 copy, which, when being more abundant than other endogenous eIF4E copies, would monopolize translation initiation machinery. A surplus of eIF4E-2 protein presumably makes ribosomal entry unavailable for the other endogenous eIF4E copy that may be used by the RB virus, or could also monopolize the VPg in a nonfunctional interaction, limiting the possibility for the virus to evolve towards resistance-breaking, leading to higher resistance durability.

Role of other genes from the genetic background in va-resistance durability?

The exact mechanism by which the locus *eIF4E-2-3-4* confers a higher resistance durability is not totally elucidated. As we compared the durability of *va*-resistance between genotypes with different genetic backgrounds, we cannot exclude the role of any other genes from those genetic backgrounds in resistance durability as shown in the pepper-PVY pathosystem (Quenouille, *et al.*, 2013*b*; Quenouille *et al.*, 2014). Indeed, the authors showed that the protective effect of the genetic background on the breakdown frequency of the recessive resistance $pvr2^3$ gene (encoding an eIF4E factor) is mostly a result of the additional level of quantitative resistance, reducing viral accumulation (Quenouille, *et al.*, 2013*b*). Among these loci, *pvr6* (encoding an isoform of eIF4E) was indeed associated with a major effect on virus accumulation and on the breakdown frequency of the *pvr2*-mediated resistance (Quenouille *et al.*, 2016). In our study, in the 'LD' group, the TN86 accession is characterized by a total deletion of *eIF4E-1* gene and the presence of a full non-truncated *eIF4E-3* allele at the locus *eIF4E2-3-4*, similarly to Wislica and PBD6. However, TN86 displays a significantly higher level of *eIF4E-2* expression and higher level of resistance durability than Wislica and PBD6, intermediate to the durability shown by VAM. One hypothesis would be the involvement of the genetic background in TN86 that differs from the genetic backgrounds of Wislica and PBD6, or the presence of a deletion at the *va* locus in TN86, different from the deletion present in other 'LD' accessions. TN86 inherited its resistance to PVY from VAM, which was the primary source used to incorporate resistance to PVY into tobacco breeding lines (Koelle, 1961). The inability to produce leaf surface exudates, components of flavour and taste of tobacco smoke, has been reported in some *va* resistant varieties including VAM (Komari *et al.*, 1986; Nielsen *et al.*, 1982). The trichomes of VAM are non-secreting, and this inability seems to be linked to the deletion present at or around the *va* locus (Noguchi *et al.*, 1999). Contrarily to VAM, TN86 produces trichome exudates secretions normally produced in tobacco. This fits with the assumption that the non-secreting character has not been transmitted to TN86, suggesting the existence of (a) difference(s) in the genetic background near the *va* locus between VAM and TN86. Whether the genetic background near the *va* locus differs between TN86, PDB6 and Wislica is still

unknown; the only available information is that PBD6 inherited its resistance to PVY from the cultivar Paraguay P48, and this resistance was found to be allelic to the resistance found in VAM. Whether this deletion at the locus *va* differs from the one present in TN86 is still unknown.

PVY resistance-breaking variants likely use another eIF4E copy in the absence of a functional eIF4E-1 protein in tobacco

The infection of *va* accessions corresponds to the emergence of resistance-breaking variants accumulating mutations in the central region of the PVY VPg (Lacroix *et al.*, 2011; Masuta *et al.*, 1999). This is also true in the case of TVMV (Nicolas et al. 1997) and amino acid mutations in the central region of the VPg (amino acids 101 to 123) were also shown to be responsible for PVY adaptation to *pvr2* resistance alleles in pepper (Ayme *et al.*, 2006; Ayme *et al.*, 2007; Moury *et al.*, 2004; Moury *et al.*, 2014). This suggests that in the absence of a functional eIF4E-1, PVY RB variants likely may use another eIF4E copy in tobacco similar to the situation with TuMV which overcomes an *eIFiso4E* loss-of-function in Arabidopsis through mutations in the viral VPg coding sequence (Gallois *et al.*, 2010) allowing recruitment of eIF4E1 in the plant (Bastet *et al.,* submitted). This confirms the fact that some potyvirus species can use different eIF4E forms in a given host. Overexpression of *eIF4E* and *eIFiso4E* alleles from susceptible *Brassica rapa* in the resistant Arabidopsis *Knocked-Out (KO)-eIFiso4E*, restores susceptibility to TuMV (Jenner *et al.*, 2010), showing that TuMV can use both isoforms in Arabidopsis. In tomato where *eIF4E-1* copy is the main factor used by PVY and TEV, the involvement of *eIF4E-2* (the close *eIF4E-1* homolog) in broad spectrum resistance was suggested from the results of RNAi induced silencing of *eIF4E-1* and *eIF4E-2* (Mazier *et al.*, 2011) and confirmed by Gauffier *et al.* (2016). Very recently, silencing both *eIF4E* and *eIF(iso)4E* genes in peanut significantly weakened *Peanut stripe virus* (PStV) accumulation, suggesting that both copies play important roles in the PStV infection cycle in this host (Xu *et al.*, 2017). Tobacco (*N. tabacum*) is an allotetraploid derived from the diploids *N. sylvestris* and *N. tomentosiformis*. Due to this amphidiploid property, six sequences were annotated as *eIF4E* copies, one pair of sequences as *eIFiso4E*, and two pairs of sequences as novel cap-binding protein

(*nCBP*) (Julio *et al.*, 2014). Therefore, besides eIF4E-1 which is the main factor used by PVY in tobacco, the involvement of any other eIF4E isoform in PVY susceptibility cannot be excluded.

Despite its wide use, several adverse effects of the *va* gene have been observed. The resistant breeding lines tend to have short and narrow leaves, and lower productivity (Noguchi *et al.*, 1999). This may reflect the presence of important genes in the large deletion containing the *va* gene, while this deletion and its negative effects on recombination during backcrosses, could impose linkage drag and prevent restoration of a normal phenotype during breeding efforts (Yamamoto, 1992). Efforts have been developed to find new markers for background selection in backcross breeding programs (Tajima *et al.*, 2002) but have been incompletely successful in allowing the reduction of the negative effects of *va*. In this context, the second locus *eIF4E-2-3-4* that confers higher *va-eIF4E-1* mediated resistance durability, could be transferred by marker-assisted selection (MAS) in elite lines. A strategy would be to combine in the same plant a total deletion of *eIF4E-1* gene combined to a partial deletion of *eIF4E-3* gene. As new breeding techniques become also available for genome editing (Andersen *et al.*, 2015) in particular, the CRISPR/ Cas9 technology, such approach could be envisioned for introducing sequence-specific deletions in the *eIF4E-1* and *eIF4E-3* genes. The proof of concept of engineering eIF4E-based resistance to potyvirus by CRISPR/Cas9-induced mutation of eIF4E, was recently successful done in Arabidopsis and in cucumber (Chandrasekaran *et al.*, 2016; Pyott *et al.*, 2016). Therefore, the results of the present study open new perspectives to improve our ability to manipulate and deploy durable tobacco resistance against one of its major viral pathogens, *Potato virus Y.*

4. Experimental procedures

Plant material

The PVY-susceptible *N. tabacum* cv. *Xanthi* was used to produce viral inoculum for biological characterization experiments. The 163 accessions used for RNA-seq analysis belong to the Imperial Tobacco collection and were described in Julio *et al.* (2014), as well as the *eIF4E-1* EMS stop codons mutants 'EMS1' and 'EMS2' corresponding to W50* and W53* mutations (with tryptophan amino acid at position 50 or 53 in the sequence replaced by a stop codon). Another *eIF4E-2* mutant (named E3-762) was obtained from the EMS collection described in Julio et al. (2008; 2014). Among the tobacco accessions of known PVY resistance status, previously characterized using *S10760*-linked markers as well as others associated with the deletion affecting the *va* genomic region, the VAM, TN86, Wislica, PBD6, START, SK70 and TN90 accessions display a *va*-resistance allele associated with a large deletion on chromosome 21 (Julio et al. 2006; 2014). In this paper, those accessions belong to the 'LD' (Large Deletion) group. In two dark air-cured (Little C. and Philippin) and two flue-cured tobaccos (Wika and Elka 245), the *S10760* (*eIF4E-1*) gene could not be amplified, which suggests that it is either deleted or mutated in a way that prevents its amplification (Julio et al., 2014). However, the other markers linked to *va* are not deleted in these plants, which suggests that they carry a smaller form of the deletion affecting *va*. Those accessions are therefore classified in this study in the 'SD' group for 'Small deletion'. The last group of accessions concerns resistant plants in which the *S10760 eIF4E-1* gene is present, and which do not appear to have a deletion on chromosome 21. However, a 2-bp deletion in the *S10760* gene has been identified in two dark air-cured varietal types (Semoy and Skro. L56) and in one burley type (Burley DC), which would truncate the encoded protein and explain the observed resistance, as for the two EMS mutants analyzed in Julio *et al.* (2014).In this study, those three accessions are classified into

the 'FS' group for 'Frameshift'. Healthy and infected plants were maintained in separate insect proof greenhouse compartment (18 / 25°C night / day) or in a climate chamber (18 °C / 20 °C, 8 hours night / 16 hours day).

Viral Material

The PVY isolates used to challenge the different tobacco accessions belong to the clade "N" (CSA1, LA7, CSA6, MaSan4, 1108) and the clade "O" (O139, LA4, SN3 and SAV8), depending on their ability to induce (PVYN) or not (PVYO) systemic veinal necrosis symptoms in tobacco (Jakab *et al.,* 1997; Moury, 2010; Singh and Singh, 1996) (Table II-S1). Those isolates were selected according to their pathogenic and biological properties in tobacco after a field survey carried out in tobacco plots in France in 2007 (Janzac et al., 2014; Lacroix et al., 2010). The other PVY isolates listed in Table II-S2, belong to the C clade C, more specifically to the C1 (SON41, Alger1, Marti3, LYE84.2, CAA157, CAA141, CAA16, LYE72-Puc2Pl3) or C2 (Cadgen, LYE90v) groups. Some isolates are PVY recombinants between O and C clades (CAA156, LYE245), others belong to the group PVY^{NTN} (NTN-H) and PVY^{Wi} (WilgaP) (Glais *et al.,* 2002). PVY isolates belonging to the N clade are 'Pologne 6 puc3 pl2' and 'N605', and one isolate comes from Brazil, 'Bresil 1054'. Some of the isolates are referenced in Ben Khalifa *et al.* (2012); Moury *et al.* (2004); Moury, (2010); Moury *et al.* (2011); Sudarsono *et al.* (1993).

Virus inoculation and detection

Each PVY isolate was first propagated into *N. tabacum* cv *Xanthi* plants in order to prepare viral inoculum. Fifteen days after inoculation, the systemically infected apical leaves (~12 g) were ground in liquid nitrogen and the powder stored at -80 °C. Total RNAs were extracted from 1 mg of powder, using the SV Total RNA Isolation System (Promega) extraction kit. The viral RNAs were then quantified by real-time PCR on a light cycler 480 (Roche) using the AgPath-ID Kit ™ following the procedure described in Kogovšek et al (2008). For each PVY

isolate, the viral inoculum was then calibrated at a concentration of 10^8 copies of viral RNA/100 µL in the inoculation buffer (50 mM Na_2HPO_4, 50 mM KH_2PO_4, supplemented with 40 mM sodium diethyldithiocarbamate, pH= 7.2).

Tobacco plants with 2 fully expanded true leaves were inoculated manually approximately 2 weeks after sowing. The two lastly developed leaves were inoculated with 100 µL of the calibrated viral inoculum supplemented with carborundum. Evaluation of PVY infection in non-inoculated leaves was performed by DAS-ELISA (Clark and Adams, 1977; Lacroix *et al.*, 2010) at 15 dpi and 30 dpi. Absorbance values at 405 nm (A_{405}) with the background subtraction of buffer samples were considered for analysis. Samples were considered positive when their A_{405} was higher than three times the mean A_{405} of non-inoculated samples. Polyclonal antibodies detecting all PVY-isolates, monoclonal antibodies specific for PVY^N isolates (kindly provided by Maryse Guillet, INRA-FN3PT, Le Rheu, France) and monoclonal antibodies specific for $PVY^{O/C}$ isolates (Neogen) were used.

Analysis of *VPg* sequence in the viral progenies

The viral progenies present in infected plants were amplified by immune-capture RT-PCR (IC-RT-PCR) as described previously (Glais *et al.*, 1998), using the 3'NTR-reverse primer (5'-GTCTCCTGATTGAAGTTTAC-3') for the production of cDNA and primer pair RJ2-F (5'-GATCTCAAGTTGAAGGGGAC-3, nt 5585-nt 5604) and NIa-R (5'-AYGCAGARTGYTTAGCTTGC-3', nt 7011-nt 7030) to amplify the VPg region. Thermal cycling conditions were as follows: 2 min at 95 °C followed by 40 cycles of 1 min at 94 °C, 1 min at 57 °C and 1 min at 72 °C, followed by an elongation step of 10 min at 72 °C. Each PCR product was sent to Genoscreen (France) for sequencing.

Analysis of *eIF4E-2* gene expression by quantitative RT-PCR

Plant samples were ground with a mixer mill (Retsch) at -80°C and total RNAs were isolated using the NucleoSpin® RNA plant Kit (Macherey Nagel). The RNAs obtained were treated with TURBO DNA-free™ Kit (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific), the concentration and purity were determined by measuring absorbance at 230, 260 and 280 nm in a microplate UV-Vis spectrophotometer (EPOCH™ BioTek instrument). The total RNA was adjusted to 50 mg/mL and was reverse transcribed according to the manufacturer's instructions using the RevertAid H Minus enzyme (Thermo Scientific) and oligo(dT) primers. The cDNA was used to perform the real-time quantitative RT-PCR on the Light Cycler 480 Instrument II (Roche), using the Light Cycler®480 SYBR Green I MASTER Kit (Roche). The PCR mix per well included 10 µL of Master mix, 0.6 µL of each primer (0.3 mM) [*eIF4E-2 Fwd:* 5' GCAAGTTAGTTACGGGAGCA 3' ; *eIF4E-2 Rev.*: 5' AGTTAATGTCCGAGGTAAGG 3'], and 5 µL of cDNA. Thermal cycling conditions were as follows: 15 s at 95 °C followed by 40 cycles of 5 s at 95 °C, 20 s at 57 °C and 30 s at 72 °C. The average values were normalized to the expression of two reference genes: *RL2* (*60S ribosomal protein L2*, GenBank X62500) and *EF1-α* (*elongation factor 1-alpha*, GenBank XM_009784954). The relative expression level (fold induction) compared to BB16 genotype was calculated with the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Schmittgen and Livak, 2008). Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis rank sum test in *R* software v 3.2.5.

Screening for mutation in eIF4E-2 and eIF4E-3 genes

A new EMS mutant collection was developed from seeds of the TN90 resistant variety as described in Julio *et al.* (2008) and used to detect *eIF4E-3* mutants. The same collection of EMS mutants as described in Julio *et al.* (2008 ; 2014) was used to detect *eIF4E-2* mutants. Specific primers for *eIF4E-2* and *eIF4E-3* genes were designed to amplify an exon region in each gene. Primers T025160F6 (forward, 5'-GTTAGTTTCCGGAGCAGACTTGCA-3') and

T025160R6-2 (reverse, 5'-CGGCCAGCACGGACACTAA-3') were used to amplify an amplicon of 324 bp of *eIF4E-3*, the forward primer being designed in the region that is deleted in VAM accessions. Primers T021658E6TF (forward, GCAAGTTAGTTACGGGAGCA) and T021658E3T2R (reverse, CTCCTTACCTCGGACATTAACT) were used to amplify an amplicon of 329 bp of *eIF4E-2*. PCR amplification was carried out with FAM and VIC dye-labeled primer pairs in a 10-µl volume containing 2 µl DNA, 0.05 U AmpliTaq® Polymerase (Applied Biosystems), 1 µl 10× AmpliTaq buffer, 0.5 µl dNTPs (Applied Biosystems, 2.5 mM each), and 7 ng of each primer. PCR was conducted using a thermal cycler (GeneAmp® PCR System 9600, Applied Biosystems) as follows: 28 to 32 cycles of 94 °C for 30 s, 62 °C for 45 s, and 72 °C for 1 min, followed by 7 min at 72 °C for final extension. Both *eIF4E-2 and eIF4E-3* PCR products were analyzed by CE-SSCP (Capillary Electrophoresis-Single Strand Conformation Polymorphism) and sequenced as described in Julio *et al.* (2008).

Mapping of eIF4E-2 and eIF4E-3 genes

An improved genome assembly covering 90% of predicted *N. tabacum* genome size was recently released (Edwards *et al.*, 2017) on the Sol Genomics Network. In order to map the different copies of *eIF4E* genes, we used the Blast function available online (https://www.sgn.cornell.edu/). To confirm the position of both *eIF4E-2* and *eIF4E-3* genes, we used two F2 segregating population and SSR markers available in this region of chromosome 14 (Bindler *et al.*, 2011) with the same protocol as described in Julio *et al.* (2014).

The *eIF4E-3* mapping was confirmed using 190 F2 individuals from the VAM (truncated *eIF4E-3*) x Wika cross. As we couldn't find any polymorphism in *eIF4E-2* in the collection of 163 varieties, we used an EMS mutant in *eIF4E-2* (named E3-762) to create a segregating population: mapping was performed on 90 F2 individuals resulting from the VAM x E3-762 cross. Between 76 cM and 93 cM, markers PT51975, PT50395, PT60091, PT51004, PT60558

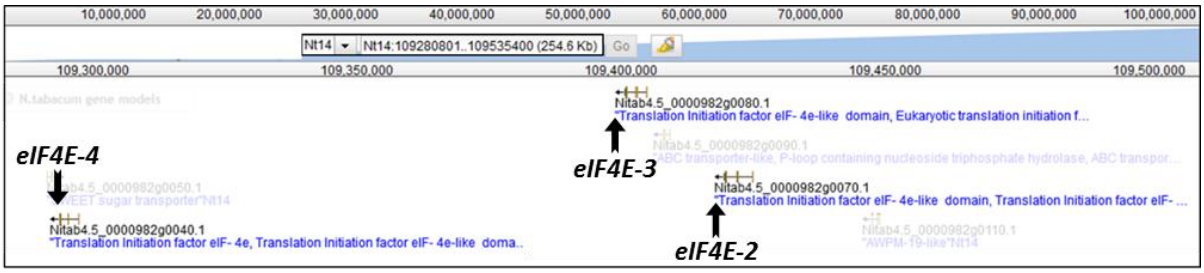
and PT53953 were tested on parents of both crosses. Only two markers were polymorphic on both crosses: PT60091 amplified a 172 bp fragment in VAM, a 157 bp fragment in Wika and a 220 bp fragment in the mutant E3-762 while PT51004 amplified a 170 bp fragment in the mutant E3-762, 170 bp in Wika and nothing in VAM (null allele). SSR band sizes were scored on ABI3130xl Genetic Analyzer with POP- 7™ Polymer (Applied Biosystems) using GeneMapper® v4.0. The *eIF4E-2* and *eIF4E-3* genes were amplified with the same primers as those used for EMS mutant detection. Analysis of PCR products was performed with a CE-SSCP protocol for *eIF4E-2* PCR product and with the POP- 7™ Polymer for *eIF4E-3* PCR products. These gene-specific markers as well as the PT60091 and PT51004 SSR markers were tested on VAM x Wika and VAM x E3-762 F2 progenies. It resulted in complete linkage between *eIF4E* genes, PT60091 and PT51004.

Acknowledgments

This work was performed in the framework of an ARN-INRA project 2014-2017 (Association pour la recherche sur les Nicotianées- Institut National de la Recherche Agronomique). Vincent Michel was supported by an ARN-PhD-fellowship. We thank Coralie Chesseron for taking care of the plants.

5. Supporting information

5.1. Supplemental figure



<u>Figure II-S1.</u> Position of the *eIF4E-2, eIF4E-3, and eIF4E-4* genes on the *N. tabacum* chromosome 14. The figure shows the results of Blast analysis of the *eIF4E-2* (*T021658), eIF4E-3 (T025160)* and *eIF4E-4 (T021287)* genes on the *N. tabacum* reference genome available on the Sol Genomics Network server. These genes are annotated as translation initiation factors and positionned on chromosome 14 between positions 109292645 and 109424002 (132 Kb).

```
                                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                         10         20         30         40
eIF4E-1 (S10760)                 MAEEAEK-LR VDEVEVADDG PEE-GEIVDE SDDTASYLG-
eIF4E-2 (T021658)                MAEESEK-LR VDEVEVADDG PEE-GEIVGE SDDTASYLS-
eIF4E-3*(T025160)                MAEESEK-LR VDEVEVADDG PEE-GEIVGE SDDTASYLS-
eIF4E-4 (T021287)                MAEESEK-LR VDEVEVADDG PEE-GEIVGE SDDTVSHLS-
eIF4E-5 (S05588)                 MVDEVEKPVS LEESKTNTRE VEEEGEIVGE SDDTMSSLGN
eIF4E-6 (T015277)                MVDEVEKPAS LEESKTNTRE VEEGAEEVIE SDDTMSSLGN
                                                         LOOP 1
                                 ....|....| ....|.....| ....|....| ..|....|
                                         50         60         70         80
eIF4E-1 (S10760)                 KEIKPKHPLE NSWTFWFDNP MAKSRQAAWG SSLRELYTFS
eIF4E-2 (T021658)                KEIKAKHLLE NSWTFWYDK- NTKSRQAAWG SFLREVYTFS
eIF4E-3 (T025160)                KEIKAKHPLE NSWTFWFDNP TAKSRQAGWG SSLRDVYTFS
eIF4E-4 (T021287)                KEIKAKHPLE NSWTFWFDNP MAKSRQAAWG SSLRDVYTFS
eIF4E-5 (S05588)                 PSMAMKHALE HSWTFWFDNP SGKSKQAAWG SSIRPIYTFS
eIF4E-6 (T015277)                PCKAMKHPLE HSWTFWFDNP SGKSKQAAWG SSIRPIYTFS

                                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                         90        100        110        120
eIF4E-1 (S10760)                 TVEDFWGVYN NINHPSKLVV GADFHCFKHK IEPKWEDPVC
eIF4E-2 (T021658)                TIEDFWGVYN NINHPSKLVT GADFHCFKHK IEPKWEDPVC
eIF4E-3 (T025160)                TIEDFWGVYN NINHPSKLVS GADLHCFKHK IEPKWEDPVC
eIF4E-4 (T021287)                TVEDFWGAYD NFQHPSKLVA GAGLYCFKHK IEPKWEDPIC
eIF4E-5 (S05588)                 TVEDFWSVYN NIHHPSKLAV GADFHCFKNK IEPKWEDPVC
eIF4E-6 (T015277)                TVEDFYSVYN NIHHPSKLAV GADFHCFKNK IEPKWEDPVC

                                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                        130        140        150        160
eIF4E-1 (S10760)                 ANGGNWTMSF S-KGKSDTSW LYTLLAMIGH QFDHGEEICG
eIF4E-2 (T021658)                ANGGKWTMSF S-KGKSDTSW LYTLLAMIGH QFDHGDEICG
eIF4E-3 (T025160)                ANGGKWTMSF S-KGKSDTSW LYTLLAMIGH QFDHGDEICG
eIF4E-4 (T021287)                ANGGKWTMSF W-KGKSDTSW LYTLLAMIGH QFDHGDEICG
eIF4E-5 (S05588)                 ANGGKWTMSF S-RGKSDTCW LYTVLAMIGE QFDCGDEICG
eIF4E-6 (T015277)                ASGGKWTMSF S-RGKSDTCW LYTVLAMIGE QFDCGDEICG

                                 ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
                                        170        180        190        200
eIF4E-1 (S10760)                 AVVSVRN--- KGDKIALWTK NAANETAQVS IGKQWKEFLD
eIF4E-2 (T021658)                AVVNVRG--- KEDKIALWTK NAANETAQVS IGKQWKEFLD
eIF4E-3 (T025160)                AVVSVRAGRA KGEKIALWTK NAVNETAQVS IGKQWKEFLD
eIF4E-4 (T021287)                AVVSIRH--- KGEKIALWTK NAADETAQVS IGKQWKEFLD
eIF4E-5 (S05588)                 AVINVRV--- RQEKIALWTR NAANETAQVS IGKQWKEFLD
eIF4E-6 (T015277)                AVINVRV--- RQEKIALWTR NAANETAQVC IGKQWKEFLD

                                 ....|....| ....|....| ....|..
                                        210        220
eIF4E-1 (S10760)                 YSNSIGFIFH DDSMRLGRGA KNRYTV.
eIF4E-2 (T021658)                YSDSIDFIFH EDAERHGRGA KNRYTV.
eIF4E-3 (T025160)                YSDSIGFIFH DDAKRLDKGA KNRYTV.
eIF4E-4 (T021287)                YSDSIGFIVH DDAKRLGRGA KYRYTV.
eIF4E-5 (S05588)                 YNDSVGFIFH DDAKKLDRAA KNRYSV.
eIF4E-6 (T015277)                YNDSIGFIFH DDAKKLDRAA KNRYSV.
```

Figure II-S2. Amino acid sequence alignment of the various *eIF4E* proteins of *Nicotiana tabaccum*. GenBank accession numbers: *eIF4E-1* (S10760, KF155696); *eIF4E-2* (T021658, KM202068); *eIF4E-3* (T025160, KM202070); *eIF4E-4* (T021287, KM202069); *eIF4E-5* (S05588, KM202071); *eIF4E-6* (T015277, KM202067). *The *eIF4E-3* sequence corresponds to the protein predicted from Edwards Reference genome (Edwards *et al.*, 2017). The position of the amino acids that differ between eIF4E-2 and eIF4E-1 are highlighted in grey. The "loop I "region contains amino acid sites known to be crucial for susceptibility to potyviruses (German-Retana et al., 2008; Marcotrigiano et al., 1997; Robaglia and Caranta, 2006).

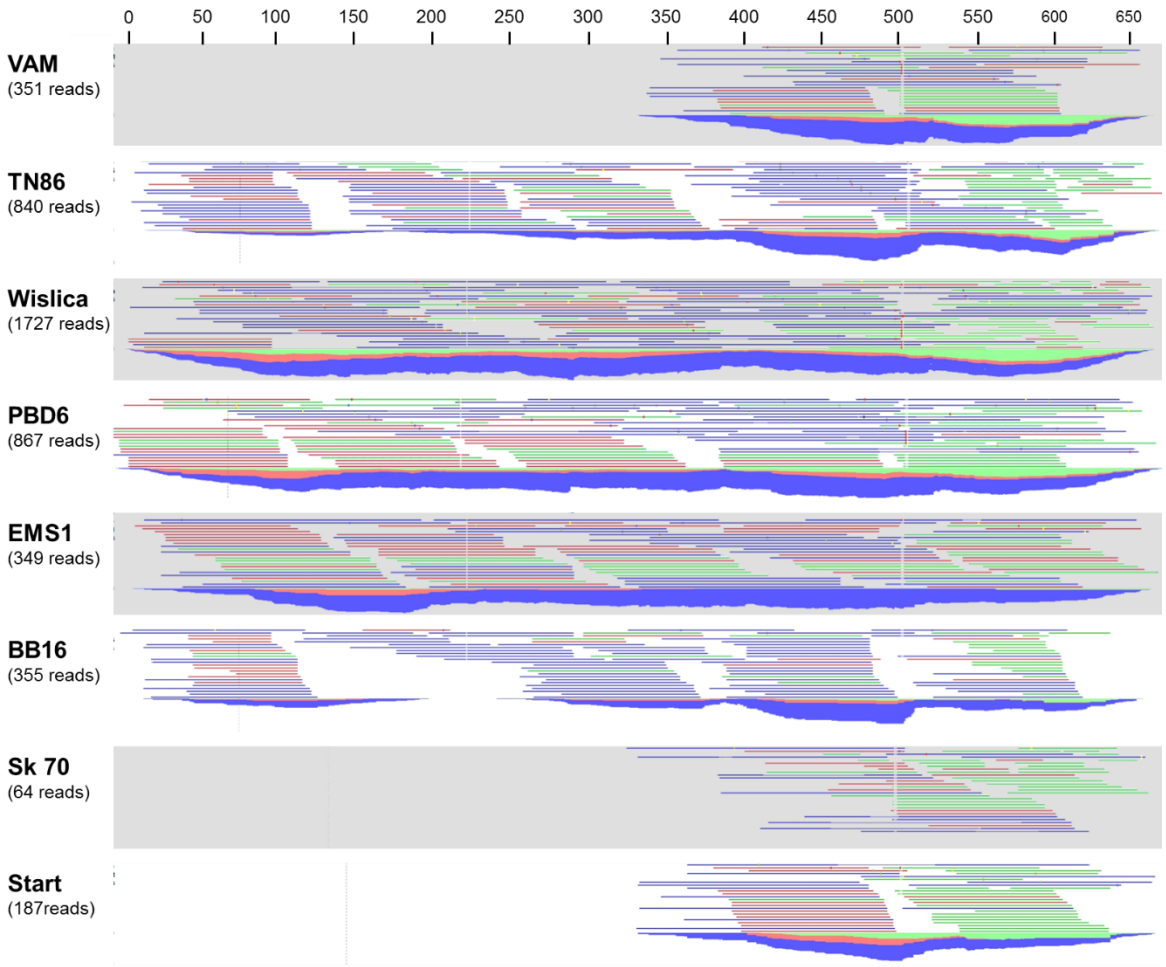


Figure II-S3. Mapping of the RNASeq reads against the *eIF4E-3* consensus sequence for the 'LD' accessions VAM, TN86, Wislica, PBD6, Sk 70 and Start, the EMS1 mutant and the susceptible BB16 accession. CLC-Genomic Workbench tracks are shown. Mapping reads are colored according to the following code: single reads mapping in their forward or reverse direction are respectively green or red. Paired reads are blue.

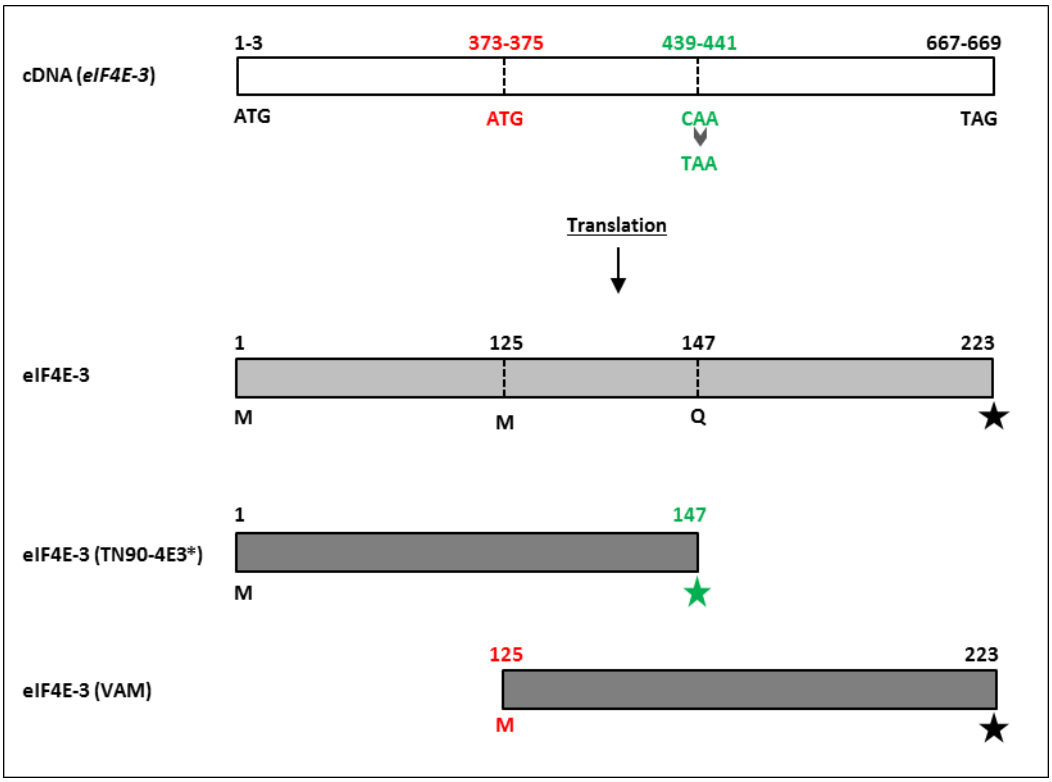
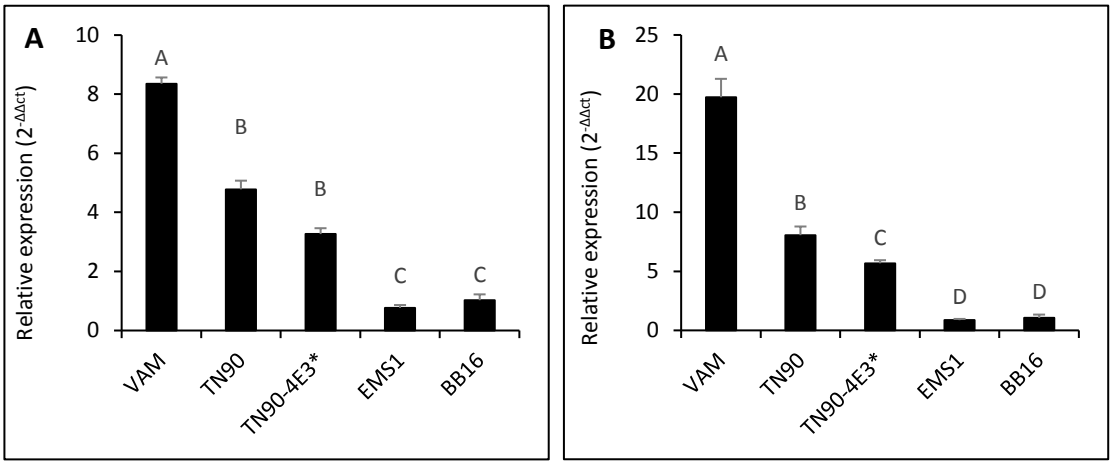


Figure II-S4. Schematic representation of the coding sequence of *eIF4E-3* alleles in different tobacco accessions. TN90-4E3* is the EMS stop mutant where the C to T mutation in codon 147 (CAA) leads to a premature STOP codon (TAA). In the VAM genotype, deletion of the 5' part of the gene leads to a transcript in which translation could potentially be initiated at methionine 125. M= methionine. Stars= stop codons.



C

	Phenotype †		Infection rate
VAM	2/23	0/23	4% (2/46) [A]
TN90	8/23	13/23	46% (21/46) [B]
TN90-4E3*	10/23	15/23	54% (25/46) [B]
EMS1	23/23	23/23	100% (46/46) [C]
BB16	23/23	23/23	100% (46/46) [C]

Figure II-S5. *eIF4E-2* gene expression and *va* resistance durability in TN90 and its derived EMS mutant TN90-4E3*. *EIF4E-2* (*T021658*) transcript levels were normalized to the expression of (**A**) the *RL2* (60S ribosomal protein L2) and (**B**) *EF1-α* (elongation factor 1 alpha) housekeeping genes respectively. Gene expression was quantified from 2 pools of 6 independent plants. The relative expression level (fold induction) derived from the mean of the 2 pools, by comparing the two housekeeping genes to obtain the ΔCt ($Ct_{eIF4E-2} - Ct_{RL2\ or\ EF1-\alpha}$) and BB16 (susceptible reference) value was used as the calibrator to determine the ΔΔCt and then calculated with formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (as described by Schmittgen and Livak, 2008). The standard deviation between the two pools is indicated by vertical lines. Statistical analysis was performed using the Kruskal-Wallis rank sum test in *R* software v 3.2.5. Significantly different values are noted with capital letter (*P*-value ≤ 0.05) when comparing the expression level of *eIF4E-2* gene between each genotype. GenBank accessions numbers: *eIF4E-2* (GenBank KM202068); *RL2* (GenBank X62500); *EF1-α* (GenBank XM_009784954). (**C**) The different tobacco genotypes were challenged with PVY-O139 isolate. **†** Number of infected plants / number of inoculated plants at 30 dpi. Statistical analysis was performed using the multi comparison *Chi square* test in *R* software v 3.2.5. Infection rates labelled with the same letter are statistically identical (*P*-value < 0.05)

5.2. Supplemental table

Table II-S1. Response of *va* tobacco genotypes to PVY isolates.

Tobacco genotypes			PVY isolate (clade)									
			O139 (O)	LA4 (O)	SN3 (O)	SAV8 (O)	LA7 (N)	CSA1 (N)	CSA6 (N)	MaSan4 (N)	11.08 (N)	Infection rate
LD	VAM	15 dpi	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0% [a]
		30 dpi	1/12	0/12	0/12	1/12	0/12	0/12	0/12	0/12	1/12	2% [A]
	TN86	15 dpi	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0/12	0% [a]
		30 dpi	2/12	0/12	0/12	1/12	0/12	0/12	1/12	0/12	1/12	5% [A]
	Wislica	15 dpi	2/12	0/12	0/12	0/12	1/12	3/12	0/12	0/12	3/12	8% [b]
		30 dpi	6/12	2/12	0/12	2/12	5/12	6/12	5/12	0/12	5/12	29% [B]
	PBD6	15 dpi	3/12	0/12	0/12	2/12	3/12	1/12	0/12	0/12	1/12	9% [b]
		30 dpi	11/12	3/12	1/12	4/12	5/12	4/12	1/12	1/12	6/12	33% [B]
SD	Elka 245	15 dpi	5/12	3/12	1/12	6/12	3/12	2/12	0/12	0/12	6/12	24% [cd]
		30 dpi	12/12	7/12	7/12	8/12	9/12	7/12	7/12	2/12	8/12	62% [D]
	Little C.	15 dpi	8/12	10/12	7/12	10/12	5/12	7/12	1/12	4/12	8/12	56% [e]
		30 dpi	11/12	12/12	11/12	12/12	9/12	12/12	10/12	7/12	12/12	89% [EF]
	Philippin	15 dpi	5/12	3/12	4/12	8/12	3/12	3/12	1/12	0/12	0/12	25% [cd]
		30 dpi	11/12	8/12	6/12	8/12	8/12	6/12	5/12	3/12	4/12	55% [D]
	Wika	15 dpi	7/12	1/12	4/12	7/12	1/12	0/12	2/12	0/12	3/12	23% c
		30 dpi	12/12	7/12	11/12	9/12	3/12	6/12	5/12	0/12	6/12	55% [D]
Fs	Burley DC	15 dpi	6/12	2/12	1/12	9/12	2/12	1/12	0/12	1/12	8/12	28% [cd]
		30 dpi	11/12	12/12	9/12	10/12	6/12	6/12	6/12	4/12	12/12	70% [DE]
	Semoy	15 dpi	7/12	9/12	4/12	10/12	3/12	3/12	0/12	1/12	6/12	40% [de]
		30dpi	12/12	10/12	9/12	12/12	6/12	11/12	6/12	6/12	12/12	78% [DEF]
	Skro. L56	15 dpi	8/12	0/12	1/12	9/12	1/12	3/12	2/12	0/12	5/12	27% [cd]
		30dpi	11/12	10/12	8/12	10/12	4/12	7/12	4/12	0/12	11/12	60% [D]
EMS	EMS1	15 dpi	9/12	8/12	8/12	8/12	2/12	3/12	2/12	0/12	0/12	37% [cde]
		30dpi	12/12	11/12	11/12	11/12	9/12	9/12	5/12	0/12	7/12	69% [DE]
	EMS2	15 dpi	11/12	4/12	6/12	8/12	6/12	2/12	1/12	0/12	6/12	41% [de]
		30dpi	12/12	10/12	10/12	12/12	7/12	6/12	9/12	2/12	10/12	72% [DEF]
Sus	BB16	15 dpi	11/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	10/12	9/12	94% [f]
		30dpi	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12	100% [F]

The ratios indicate the number of infected plants over the number of inoculated plants. Viral accumulation was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the upper non-inoculated leaves at 15 and 30 dpi. Values correspond to data obtained in two independent inoculation experiments with 6 inoculated plants per experiment. The 'Infection rate' corresponds to the overall percentage of infected plants for a given tobacco accession, taking into account the results obtained for all PVY isolates. Multiple *Chi-squared* tests for pairwise comparisons were performed using the *R* software v 3.2.5. Infection rates labelled with the same letter (lower cases or upper cases for infection rates observed at 15 dpi or 30 dpi respectively) are statistically identical (P-value < 0.05). 'LD' : Large Deletion ; 'SD' : Small Deletion ; 'Fs' : Frameshift ; 'EMS' : 'EMS mutants' ; Sus': susceptible genotype.

Table II-S2. Response of representative *va* tobacco genotypes to various PVY isolates.

	LD	SD	Fs	EMS	Sus
PVY isolates (clade)	VAM	Elka 245	Skro. L56	EMS1	BB16
O139 (O)	0/10	4/10	5/10	5/10	10/10
N605 (N)	0/10	10/10	10/10	10/10	10/10
N605 (N)*	0/12	6/12	8/12	5/6	2/2
SON41p (C1)	0/10	10/10	10/10	10/10	10/10
Alger1 (C1)	0/10	10/10	10/10	10/10	10/10
Marti3 (C1)	0/10	5/10	3/10	10/10	10/10
LYE84.2 (C1)	0/10	10/10	10/10	10/10	10/10
CAA157 (C1)	0/10	10/10	10/10	10/10	10/10
CAA141 (C1)	0/10	10/10	10/10	10/10	10/10
CAA16 (C1)	0/10	10/10	10/10	10/10	10/10
LYE72-Puc2Pl3 (C1)	2/10	10/10	10/10	8/10	10/10
C Adgen (C2)	0/10	0/10	2/10	0/10	10/10
LYE90v (C2)	0/10	9/10	5/10	8/10	10/10
CAA156 (OxC)	4/10	10/10	10/10	10/10	10/10
LYE245 (OxC)	1/10	10/10	9/10	10/10	10/10
NTN-H (NTN)	0/10	10/10	9/10	10/10	10/10
WilgaP (Wi)	1/10	8/10	10/10	9/10	10/10
Pologne 6 puc3 pl2 (N)	1/10	10/10	10/10	10/10	10/10
Bresil 1054 (Brazilian)*	0/10	9/12	12/12	5/6	2/2
Infection rate	5% (9/192) [A]	83% (161/194) [B]	84% (163/194) [B]	88% (160/182) [B]	100% (174/174) [C]

The ratios indicate the number of infected plants over the number of inoculated plants. Viral accumulation was analyzed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in the upper non-inoculated leaves at 18 dpi or 30 dpi (*). The 'Overall infection rate' indicates the percentage of infected plants for a given tobacco accession, taking into account all PVY isolates used. Multiple *Chi-squared* tests for pairwise comparisons were performed using the R software v 3.2.5. Tobacco genotypes infection rates labelled with the same letter are statistically identical (P-value < 0.05). 'LD': Large Deletion; 'SD' : Small Deletion ; 'Fs': 'Frameshift'; 'EMS' : 'EMS mutants'; Sus': susceptible genotypes. SON41, Alger1, Marti3, LYE84.2, CAA157, CAA141, CAA16 and LYE72-Puc2Pl3 PVY isolates belong to the clade C group C1, and Cadgen and LYE90v to group C2. CAA156 and LYE245 isolates are PVY recombinants between O and C clades, other belong to the group PVYNTN (NTN-H) and PVYWi (WilgaP) (Glais et al., 2002). PVY isolates belonging to the N clade are 'Pologne 6 puc3 pl2' and 'N605', and one isolate comes from Brazil, 'Bresil 1054'. Some of the isolates are referenced in Ben Khalifa et al. (2012); Moury et al. (2004); Moury, (2010); Moury et al. (2011); Sudarsono et al. (1993).

Table II-S3. Amino acid changes in the VPg central region (aa 101-123) of the progenies of five PVY^N isolates, following infection of 13 different *va* tobacco accessions, in comparison with the sequence of the parental isolates.

	Postion in the central part of the VPg of PVY^N						
	101	105	108	109	119		
Accessions	S	K	V	E	G	Viral progeny	Nb of seq
BB16	-	-	-	-	-	All isolates of clade N	20
VAM	-	E	-	-	-	11.08^1	1
TN86						*n.d.*	
Wislica	-	E	-	-	-	11.08^1 ; LA7^2 ; CSA1^1 ; CSA6^1	5
PBD6	-	E	-	-	-	11.08^1 ; CSA1^1 ; CSA6^1	3
Elka 245	-	E	-	-	-	11.08^2 ; CSA1^1 ; LA7^1 ; CSA6^1	5
	-	T	-	-	-	MaSan4^1	1
Little C.	-	E	-	-	-	11.08^3 ; LA7^2 ; CSA1^1 ; CSA6^1	7
	-	T	-	-	-	CSA6^1	1
	G	-	-	-	-	CSA1^1 ; LA7^1 ; CSA6^1	3
Philippin	-	E	-	-	-	11.08^3 ; CSA1^1 ; LA7^1 ; MaSan4^1	6
	-	T	-	-	-	CSA6^1	1
	-	M	-	-	-	LA7^1	1
	G	-	-	-	-	LA7^1 ; CSA6^3 ; CSA1^1 ; MaSan4^1	6
Wika	-	E	-	-	-	CSA1^2 ; LA7^2	4
	-	M	-	-	-	CSA6^1	1
	G	-	-	-	-	11.08^1 ; CSA1^1 ; CSA6^2	4
Burley DC	-	E	-	-	-	11.08^3 ; MaSan4^1 ; LA7^1 ; CSA1^1 ; CSA6^1	7
	-	M	-	-	-	CSA1^1	1
	G	-	-	-	-	LA7^1	1
	G	-	I	-	-	CSA6^1	1
Semoy	-	E	-	-	-	11.08^2 ; LA7^1 ; CSA6^1	4
	G	-	-	-	-	CSA6^1	1
	-	-	I	-	C	CSA1^1	1
Skro. L56	-	E	-	-	-	11.08^2 ; CSA6^1	3
	-	T	-	-	-	CSA1^1	1
	G	-	-	-	-	LA7^2 ; CSA6^1	3
	-	-	-	D	-	CSA1^1	1
EMS1	-	E	-	-	-	11.08^1 ; CSA1^1 ;LA7^1 ; CSA6^2	5
	-	T	-	-	-	11.08^2	2
	G	-	-	-	-	LA7^1	1
EMS2	-	E	-	-	-	CSA1^2 ; LA7^1 ; 11.08^1	4
	-	T	-	-	-	LA7^2	2
	-	Q	-	-	-	11.08^1	1
	G	-	-	-	-	11.08^2 ; CSA6^1	3
Total sequences (RB) *							91

The amino acid positions are numbered according to the VPg sequence of PVY-N605 (GenBank X97895). All five PVY^N isolates (LA7, 11.08, CSA1, CSA6 and MaSan4) display amino acids 101S, 105K, 108V, 109E and 119G before their propagation in the *va* tobaccos. The exponent numbers ($^{1, 2}$ or ^{3}) close to PVY isolates names refer to the numbers of independent progenies sequenced. 'Total sequences (RB)' does not include the 20 progenies sequences obtained in BB16. C = cysteine, D = aspartic acid, E = glutamic acid, G = glycine, I = isoleucine, K = lysine, M = methionine, N = asparagine, Q = glutamine, S = serine, T = threonine, and V = valine. '–' indicates no mutation. "All isolates" indicates that for all PVY^N isolates no mutation in the VPg appeared following propagation in the BB16 susceptible tobacco.

Table II-S4. Amino acid changes in the VPg central region (aa 101-123) of the progenies of four PVY^{O} isolates, following infection of 13 different *va* tobacco accessions, in comparison with sequence of the parental isolates.

Accessions	Postion in the central part of the VPg of PVY^{O}					Viral progeny	Nb of seq
	101	105	119	120	121		
	S	K	G	S	N		
BB16	-	-	-	-	-	**All isolates of clade O**	20
VAM	-	E	-	-	-	SAV8^{1}	1
TN86	-	E	-	-	-	O139^{1}	1
Wislica	-	T	-	-	-	LA4^{1} ; O139^{1} ; SAV8^{2}	4
	-	Q	-	-	-	LA4^{1}	1
PBD6	-	E	-	-	-	SN3^{1}	1
	-	T	-	-	-	O139^{2} ; LA4^{1} ; SAV8^{1}	4
	-	Q	-	-	-	O139^{1} ; SAV8^{1}	2
	-	M	-	-	-	LA4^{1}	1
Elka 245	-	E	-	-	-	SN3^{1}	1
	-	T	-	-	-	O139^{1} ; SAV8^{1}	2
	-	Q	-	-	-	O139^{1} ; SAV8^{1}	2
	-	M	-	-	-	LA4^{1}	1
	-	-	-	-	-	SN3^{1}	1
Little C.	-	T	-	-	-	SAV8^{2} ; LA4^{1} ; O139^{1} ; SN3^{1}	5
	-	Q	-	-	-	O139^{1} ; LA4^{1}	2
	-	M	-	-	-	LA4^{1}	1
	-	-	-	-	-	SN3^{2}	2
Philippin	-	T	-	-	-	LA4^{1} ; O139^{1} ; SAV8^{1}	3
	-	Q	-	-	-	LA4^{1} ; O139^{1}	2
	-	-	-	-	-	SAV8^{2} ; SN3^{1} ; O139^{1}	4
Wika	-	T	-	-	-	SAV8^{1}	1
	-	-	-	-	-	LA4^{1} ; O139^{1} ; SAV8^{1} ; SN3^{1}	4
Burley DC	-	Q	-	-	-	O139^{1} ; SAV8^{1} ; SN3^{1}	3
	-	-	-	R	-	SN3^{1}	1
	-	-	-	-	Y	SN3^{1}	1
	-	-	-	-	-	LA4^{2} ; SAV8^{1} ; SN3^{1}	4
Semoy	-	T	-	-	-	O139^{1} ; SAV8^{1} ; SN3^{1} ; LA4^{1}	4
	-	T	H	-	-	LA4^{1}	1
	-	Q	-	-	-	SN3^{1}	1
	-	-	-	-	-	LA4^{1} ; SN3^{1}	2
Skro. L56	-	T	-	-	-	SAV8^{1} ; LA4^{1} ; SN3^{1}	3
	-	Q	-	-	-	LA4^{1} ; O139^{1}	2
	G	-	-	-	-	SN3^{2}	2
	-	-	-	-	-	O139^{1} ; SAV8^{1} ; SN3^{1}	3
EMS1	-	T	-	-	-	O139^{1} ; SAV8^{1} ; SN3^{2} ; SAV8^{1}	5
	-	M	-	-	-	SN3^{1}	1
	-	-	-	-	-	O139^{1}	1
EMS2	-	T	-	-	-	SAV8^{3} ; LA4^{1}	4
	G	-	-	-	-	SN3^{2}	2
	-	-	-	-	-	LA4^{2} ; SN3^{2}	4
Total sequences (RB) *							90

The amino acid positions are numbered according to the VPg sequence of PVY-O (GenBank U09509). All the four PVY^{O} isolates (O139, SAV8, SN3 and LA4) display amino acids 101S, 105K, 119G, 120S and 121N, before their propagation in the *va* tobaccos. The exponent numbers ($^{1, 2}$ or ^{3}) close to PVY isolates names refer to the numbers of independent progenies sequenced. *Total sequences (RB) does not include the 20 progenies sequences obtained in BB16. E = glutamic acid, G = glycine, H = histidine, K = lysine, M = methionine, N = asparagine, Q = glutamine, R = arginine, S = serine, T = threonine, V = valine, Y=tyrosine.'–' indicates no mutation detected in the progenies. "All isolates" indicates that for all PVY^{O} isolates no mutation appeared in the VPg following propagation in the BB16 susceptible tobacco.

Table II-S5. Heredity of the locus *eIF4E-3*$^{\Delta}$ in F1 and F2 populations of a cross between VAM and EMS1 mutant

	Genotype				
	eIF4E-1	***eIF4E-3***	**Obs.**	**Exp.**	*P*-value (Chi^2)
VAM	*eIF4E-1*^{LD}/*eIF4E-1*^{LD}	*eIF4E-3*$^{\Delta}$/*eIF4E-3*$^{\Delta}$			
EMS1	*eIF4E-1*^{KO}/*eIF4E-1*^{KO}	*eIF4E-3/eIF4E-3*			
F1	*eIF4E-1*^{LD}/*eIF4E-1*^{KO}	*eIF4E-3/eIF4E-3*$^{\Delta}$			
F2	*eIF4E-1*^{LD}/*eIF4E-1*^{LD} *eIF4E-1*^{KO}/*eIF4E-1*^{KO} *eIF4E-1*^{LD}/*eIF4E-1*^{KO}	*eIF4E-3*$^{\Delta}$/*eIF4E-3*$^{\Delta}$	16 (6%) 8 (3%) 35 (14%)	59 (23 %)	64 (25%)	0,6521
	eIF4E-1^{LD}/*eIF4E-1*^{LD} *eIF4E-1*^{KO}/*eIF4E-1*^{KO} *eIF4E-1*^{LD}/*eIF4E-1*^{KO}	*eIF4E-3/eIF4E-3*	1 (0,4%) 9 (4%) 7 (3%)	17 (7%)	64 (25%)	$1.8x10^{-7}$*
	eIF4E-1^{LD}/*eIF4E-1*^{LD} *eIF4E-1*^{KO}/*eIF4E-1*^{KO} *eIF4E-1*^{LD}/*eIF4E-1*^{KO}	*eIF4E-3/ eIF4E-3*$^{\Delta}$	51 (20%) 49 (19%) 80 (31%)	180 (70%)	128 (50%)	0,003047*

The allele *eIF4E-3*$^{\Delta}$ corresponds to the form with a 5' deletion of *eIF4E-3* gene on chromosome 14 as present in the VAM accession. The allele *eIF4E-3* corresponds to the complete *eIF4E-3* gene seen in most tobacco accessions. The allele *eIF4E-1*^{LD} corresponds to the large deletion on chromosome 21 which results in the complete deletion of the *eIF4E-1* gene as seen in the VAM accession. The *eIF4E-1*^{KO} allele corresponds to the point mutation seen in the EMS1 mutant and leading to a C-terminally truncated eIF4E-1 proteins of 50 aa.
The heredity of the *eIF4E-3* allelic forms was analyzed by genotyping the 256 F2 progenies of a cross between VAM and EMS1 (their phenotypes is shown in Table 5). The numbers of plants observed for each genotype are indicated. The $\chi 2$ test was used to test the null hypothesis, stating that there is no significant difference between the expected and observed numbers. *: the *P*-value is <0.05 the null hypothesis is rejected. Therefore the probability values * indicate that segregation of the *eIF4E-3* allele in the observed population was significantly different from the expected ratio showing a distortion in the segregation for *eIF4E-3* allele.

6. Résultats complémentaires

6.1. Analyse de la distribution des génotypes et des isolats en fonction du taux de contournement des différentes formes alléliques du gène de résistance *va*.

La question ici a été d'identifier des groupes d'isolats capables de contourner une forme allélique particulière de *va* plutôt qu'une autre. Ceci présente un intérêt fondamental et préventif dans la compréhension et l'identification de certains isolats capables de contourner préférentiellement un type de résistance donnée. Dans notre cas, il serait intéressant de pouvoir associer un groupe d'isolats capables de s'adapter à un type de mutation affectant le locus *va* (présence d'une délétion complète ou d'une mutation ponctuelle du gène *eIF4E-1*).

Nous avons réalisé une analyse en composante principale (ACP) pour tenter d'identifier une corrélation entre les 9 isolats naturels et leur capacité à contourner un génotype de plante particulier. Pour construire le tableau de données il a été utilisé les valeurs indiquées dans la *Table II-S1* du *chapitre II*. Les variables quantitatives correspondent aux 13 variétés de tabacs inoculées (nombre de plantes infectées à 30 jpi a été assignée à chaque isolat), la variable qualitative correspond au deux groupes de PVY (N ou O). Nous avons également réalisé en parallèle une autre ACP cette fois pour vérifier la distribution des génotypes résistants en fonction de leur taux de contournement. Dans ce cas, le nombre de plantes infectées en fonction des 9 isolats représentaient les variables quantitatives et le type de délétion ou de mutation présent au locus *va* ('LD', 'SD', 'Fs' ou mutant EMS) a été utilisé comme variable qualitative (les valeurs proviennent également de la *Table II-S1*).

Les résultats de l'ACP réalisée sur les 9 isolats de PVY montrent que les deux axes retenus (axes 1 et 2, figure II-S6A), sur les 10 axes proposés, expliquaient à eux seuls près de 80% de la répartition des isolats. Ces axes correspondent à une variable composite calculée à partir des variables qualitatives et quantitatives citées précédemment. Il en ressort une forte dispersion de chaque isolat sur toute la carte factorielle comme le montrent les huit clusters présents. Il est donc difficile d'identifier des groupes d'isolats qui seraient classés en fonction de leur capacité à contourner une forme allélique du gène de résistance conféré par *va*. Toutefois sur les huit clusters, un seul se compose de deux isolats, le groupe 5, formé des isolats SN3 et LA4 ; ce cluster pourrait traduire une spécificité de contournement. Ces deux isolats appartiennent au clade PVY^{O} et d'après la *Table II-S3*, ils sont capables d'infecter la

majorité des accessions de tabac résistantes. La nature de la mutation observée au niveau de l'acide aminé en position 105 est très variable (E, T, Q et M) ce qui pourrait les différencier des autres isolats. Ce sont également les seuls isolats du groupe O à présenter le plus de polymorphisme en termes de positions en acides aminés mutés dans le domaine central de la VPg (positions 101, 119, 120 et 121). Ce groupe-là semblerait être constituer des isolats les plus aptes à contourner la résistance conférer par *va*. Il est toutefois difficile d'aller plus loin dans cette analyse, car nous ne disposons pas de suffisamment de groupes pour pouvoir vérifier cette corrélation entre variabilité du domaine central de la VPg et contournement de la résistance. Ces résultats suggèrent tout de même que chaque isolat est intrinsèquement capable d'évoluer vers du contournement lorsqu'ils sont inoculés dans des plantes résistantes et ce, indépendamment de la forme allélique d'*eIF4E-1*. En revanche, l'ACP réalisée sur les différents génotypes de tabac à partir des fréquences de contournement et de la nature de la mutation au niveau du locus *va* confirme bien les groupes précédemment observés en *figure II-2* (Figure II-S6B). Il y a quatre clusters différents dont le premier comprend 'VAM' et 'TN86' qui sont les plus durables, le second inclut 'Wislica' et 'PBD6' légèrement plus contournés, le troisième : 'SD', 'Fs', et des 2 mutants EMS, et pour finir le quatrième et dernier cluster regroupe une variété résistante (Little C. de type 'SD') et la variété sensible BB16.

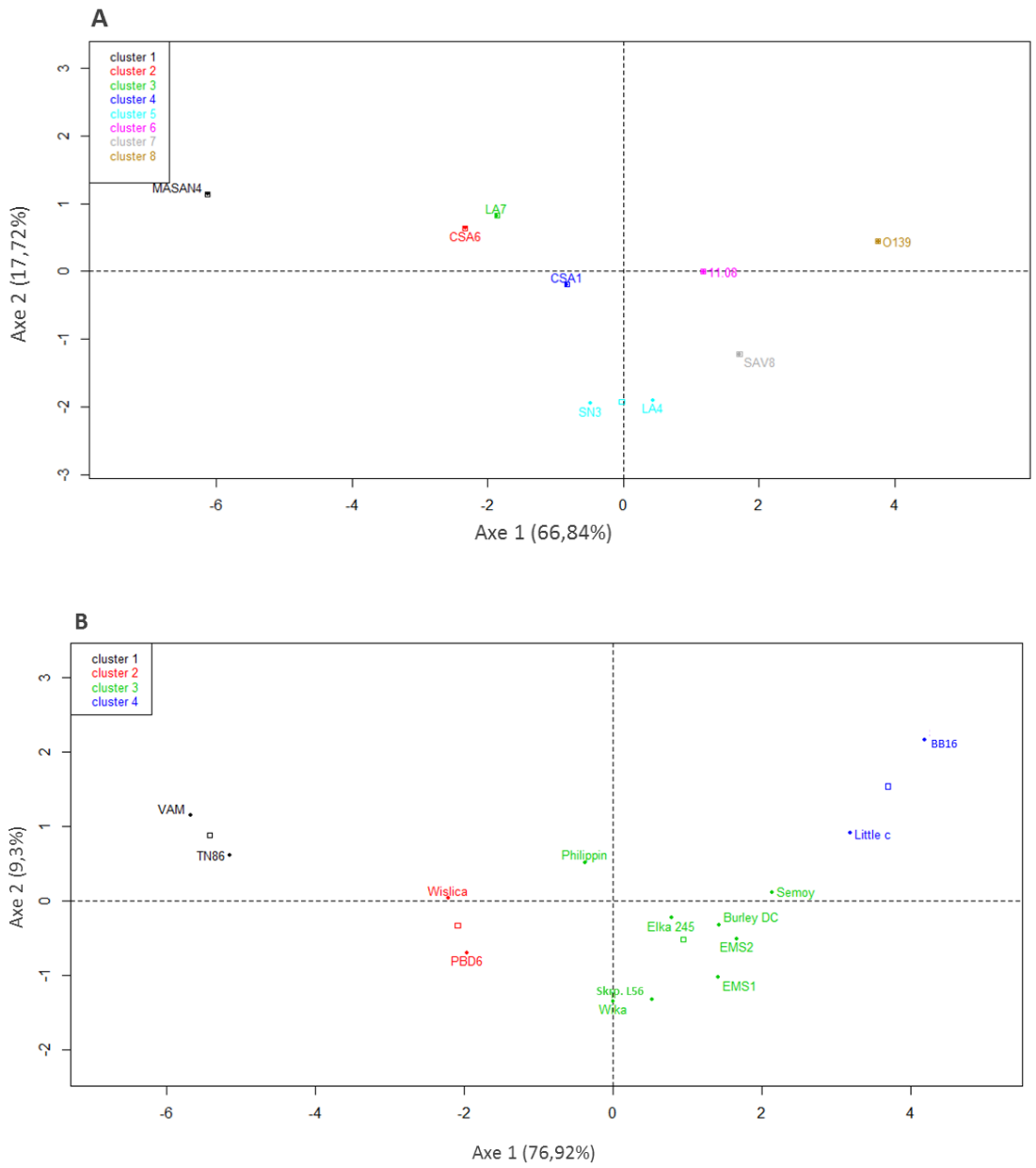


Figure II-S6. Distribution des isolats de PVY et des génotypes portant différents allèles au niveau du locus de résistance *va*. (**A**) l'ACP a été réalisée pour chaque isolat de PVY en fonction du nombre de plante infectées tout génotype de tabac confondu et en tenant compte des clades des isolats. (**B**) l'ACP correspond pour chaque génotype au nombre de plantes infectées / nombre de plantes inoculées, tout isolat confondu et en tenant compte de la nature de l'allèle au locus *va* comme variable qualitative. Le nombre de plantes infectées a été évalué à 30 dpi par ELISA et les valeurs correspondent aux données de la *Table II-S1*. Les ACP ont été réalisés avec le logiciel R version 3.2.5 Les carrés indiquent la valeur moyenne des coordonnées de chaque individu formant un cluster.

6.2. Le locus complexe eIF4E-2-3-4 influence la durabilité de la résistance conférée par le locus *va* quelle que soit la forme allélique présente au locus eIF4E-1 (eIF4E-1^{LD} ou eIF4E-1^{SD}).

L'analyse génétique décrite dans le papier précédent, réalisée sur une population en ségrégation issue d'un croisement entre VAM (*eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{LD}* et *eIF4E-3$^{\Delta}$/eIF4E-3$^{\Delta}$*) et le mutant EMS1 (*eIF4E-1^{KO}/eIF4E-1^{KO}* et *eIF4E-3/eIF4E-3*) a permis de mettre en évidence que l'allèle tronqué *eIF4E-3$^{\Delta}$* au niveau du locus *eIF4E-2-3-4* co-ségrège avec le caractère de durabilité de la résistance. Nous avons voulu vérifier si cet allèle particulier *eIF4E-3$^{\Delta}$* influence le caractère de durabilité lorsqu'il est associé à une délétion plus petite au niveau du locus *eIF4E-1* (portée par les variétés 'SD'). Pour cela nous avons mesuré la durabilité de la résistance de populations F1 et F2 issues d'un croisement entre VAM ('LD', *eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{LD}* et *eIF4E-3$^{\Delta}$/eIF4E-3$^{\Delta}$*) et Wika ('SD', *eIF4E-1^{SD}/eIF4E-1^{SD}* et *eIF4E-3/eIF4E-3*), avec deux isolats différents : PVY O139 et SN3, à 30 jpi (jours post-inoculation).

Quel que soit l'isolat, la descendance F1 issue du croisement entre VAM et Wika présente une résistance plus durable que celle du parent Wika avec un taux d'infection de 0% à 30 jours après inoculation, comparable au niveau de résistance parentale de VAM (Table II-S6A, B). Ainsi, le comportement identique entre les hybrides F1 et le génotype parental VAM montre que le caractère de durabilité de la résistance est dominant. On confirme bien les résultats précédents qui indiquaient une dominance du caractère de durabilité (*Table II-4, chapitre II*). Le phénotypage réalisé sur 81 et 94 descendants F2 avec respectivement les isolats SN3 et O139 a confirmé que l'allèle *eIF4E-3$^{\Delta}$* co-ségrégeait avec le caractère de durabilité de la résistance élevé (Table II-S6A, B). En effet, le taux d'infection des individus F2 homozygotes pour l'allèle *eIF4E-3$^{\Delta}$* (5% et 4% respectivement avec les isolats SN3 et O139) n'est pas significativement différent de celui observé chez le parent VAM (0%) (*P*-value=1). En utilisant les mêmes descendants F2, nous avons également vérifié si le type de délétion au locus *eIF4E-1* influence le caractère de durabilité de la résistance (grande délétion *eIF4E-1^{LD}* ou petite délétion *eIF4E-1^{SD}* présente chez 'VAM' ou 'Wika' respectivement). Le phénotypage des 81 et 94 descendants F2 indique que les individus homozygotes *eIF4E-1^{LD}* / *eIF4E-1^{LD}* et hétérozygotes *eIF4E-1^{LD}* / *eIF4E-1^{SD}* présentent des taux d'infection comparables à ceux de VAM et des parents F1 respectivement (Table II-S7A et B). Cependant, les F2 homozygotes *eIF4E-1^{SD}* / *eIF4E-1^{SD}* montrent un niveau de durabilité de la résistance significativement plus élevé que celui observé chez le parent Wika avec un taux d'infection maximal de 35% contre

100% chez Wika. A ce stade il est difficile de conclure mais cette différence pourrait être probablement liée à l'influence de l'allèle *eIF4E-3*$^{\Delta}$. Cependant, l'analyse de l'hérédité du locus *eIF4E-3* dans les populations F2 indique une distorsion de ségrégation (Table II-S8) comme nous l'avions remarqué précédemment lors de l'étude de ségrégation de ce locus au sein de la population F2 VAM x EMS1 (*Table II-S5*). L'hypothèse serait ici que soit la protéine eIF4E-3 a un effet délétère sur la croissance (ou germination) des plantes F2 ou bien que l'allèle *eIF4E-3* est en déséquilibre de liaison avec un autre gène/locus impactant le devenir des plantes F2 de génotype *eIF4E-3/ eIF4E-3.*

Table II-S6 A. La troncature de l'allèle *eIF4E-3*$^{\Delta}$ au niveau du locus *eIF4E-2-3-4* sur le chromosome 14 co-ségrège avec le caractère de durabilité de la résistance

	Génotype		Phénotype	*P*-value (*Chi*^{2})
	eIF4E-1 locus	***eIF4E-3 locus***		
VAM	*eIF4E-1*^{LD}/*eIF4E-1*^{LD}	*eIF4E-3*$^{\Delta}$/*eIF4E-3*$^{\Delta}$	0% (0/11)	
Wika	*eIF4E-1*^{SD}/*eIF4E-1*^{SD}	*eIF4E-3/eIF4E-3*	100% (11/11)	
F1	*eIF4E-1*^{LD}/*eIF4E-*^{SD}	*eIF4E-3/ eIF4E-3*$^{\Delta}$	0% (11/11)	1$^{\$}$
F2	*eIF4E-1*^{LD}/*eIF4E-1*^{LD} *eIF4E-1*^{SD}/*eIF4E-1*^{SD} *eIF4E-1*^{LD}/*eIF4E-*^{SD}	*eIF4E-3*$^{\Delta}$/*eIF4E-3*$^{\Delta}$	5% (1/19)	1†
	eIF4E-1^{LD}/*eIF4E-1*^{LD} *eIF4E-1*^{SD}/*eIF4E-1*^{SD} *eIF4E-1*^{LD}/*eIF4E-*^{SD}	*eIF4E-3/eIF4E-3*	100% (4/4)	1‡
	eIF4E-1^{LD}/*eIF4E-1*^{LD} *eIF4E-1*^{SD}/*eIF4E-1*^{SD} *eIF4E-1*^{LD}/*eIF4E-*^{SD}	eIF4E-3/ eIF4E-3$^{\Delta}$	16% (9/58)	0.36§

La population F2 (81 plantes) issue du croisement (VAM x Wika) ségrégeant pour la délétion *eIF4E-3*$^{\Delta}$ a été inoculée avec l'isolat PVY-SN3. Le phénotype correspond au taux d'infection (nombre de plantes infectées / nombre de plantes inoculées) estimé par ELISA à 30 jpi. Le test statistique du *Chi*^{2} a été utilisé pour déterminer si le phénotype de durabilité de la résistance (mesuré sous forme de taux de contournement à partir des fréquences d'infection) était différent entre ($) les plantes F1 et le parent VAM ; (†) les plantes F2 homozygotes *eIF4E-3*$^{\Delta}$/ *eIF4E-3*$^{\Delta}$ et le parent VAM; (‡) ; les plantes F2 homozygotes *eIF4E-3* / *eIF4E-3* et le parent Wika; (§) les individus F2 hétérozygote *eIF4E-3*$^{\Delta}$/*eIF4E-3* et la descendance F1. Le test *Chi*^{2} vérifie l'adéquation de nos données avec l'hypothèse nulle. Dans le cas de cette analyse, l'hypothèse nulle est la suivante : il n'y a pas de différence significative entre le phénotype parental (ou F1) et les descendants F2, avec un risque de se tromper de 5% (0,05). Cette hypothèse est acceptée lorsque la *P*-value est > 0,05. *eIF4E-1*^{LD} correspond à la suppression totale du gène *eIF4E-1* au locus *S10760* sur le chromosome 21. *eIF4E-1*^{SD} est caractérisé par une délétion du gène *eIF4E-1* au locus *S10760* mais avec une taille de délétion plus petite que celle caractérisée chez VAM.

Table II-S6 B. La troncature de l'allèle *eIF4E-3$^{\Delta}$* au locus *eIF4E-2-3-4* sur le chromosome 14 co-ségrège avec le caractère de durabilité de la résistance

	Genotype		Phenotype	*P*-value (*Chi*^{2})
	eIF4E-3 locus	***eIF4E-1 locus***		
VAM	*eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{LD}*	*eIF4E-3$^{\Delta}$/eIF4E-3$^{\Delta}$*	0% (0/11)	
Wika	*eIF4E-1^{SD}/eIF4E-1^{SD}*	eIF4E-3/eIF4E-3	100% (11/11)	
F1	*eIF4E-1^{LD}/eIF4E-^{SD}*	eIF4E-3/ eIF4E-3$^{\Delta}$	0% (11/11)	1$^{\$}$
F2	*eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{LD}* *eIF4E-1^{SD}/eIF4E-1^{SD}* *eIF4E-1^{LD}/eIF4E-^{SD}*	*eIF4E-3$^{\Delta}$/eIF4E-3$^{\Delta}$*	4% (1/28)	1†
	eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{LD} *eIF4E-1^{SD}/eIF4E-1^{SD}* *eIF4E-1^{LD}/eIF4E-^{SD}*	eIF4E-3/eIF4E-3	100% (7/7)	1‡
	eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{LD} *eIF4E-1^{SD}/eIF4E-1^{SD}* *eIF4E-1^{LD}/eIF4E-^{SD}*	eIF4E-3/ eIF4E-3$^{\Delta}$	2% (1/59)	1§

La population F2 (94 plantes) issue du croisement (VAM x Wika) ségrégeant pour la délétion *eIF4E-3$^{\Delta}$* a été inoculée avec l'isolat PVY-O139. Le phénotype correspond au taux d'infection (nombre de plantes infectées / nombre de plantes inoculées) estimé par ELISA à 30 jpi. Le test statistique du *Chi*^{2} a été utilisé pour déterminer si le phénotype de durabilité de la résistance (estimé à partir des fréquences d'infection) était différent entre ($) les plantes F1 et le parent VAM ; (†) les plantes F2 homozygotes *eIF4E-3$^{\Delta}$/ eIF4E-3$^{\Delta}$* et le parent VAM; (‡) ; les plantes F2 homozygotes *eIF4E-3 / eIF4E-3* et le parent Wika; (§) les individus F2 hétérozygote *eIF4E-3$^{\Delta}$/eIF4E-3* et la descendance F1. Le test *Chi*^{2} vérifie l'adéquation de nos données avec l'hypothèse nulle, indiquant qu'il n'y a pas de différence significative entre le résultat attendu et observé avec un risque de se tromper de 5% (0,05). Dans tous les cas, l'hypothèse nulle est acceptée car la *P*-value est > 0,05. *eIF4E-1^{LD}* correspond à la suppression totale du gène *eIF4E-1* au locus *S10760* sur le chromosome 21. *eIF4E-1^{SD}* est caractérisé par une délétion du gène *eIF4E-1* au locus *S10760* mais avec une taille de délétion plus petite que celle caractérisée chez VAM.

Table II-S7 A. La délétion *eIF4E-^{LD}* au locus *va* sur le chromosome 21 co-ségrège avec le caractère de durabilité de la résistance

	Genotype		Phenotype	*P*-value (*Chi^2*)
	eIF4E-3 locus	***eIF4E-1 locus***		
VAM	*eIF4E-3$^{\Delta}$/eIF4E-3$^{\Delta}$*	*eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{LD}*	0% (0/11)	
Wika	eIF4E-3/eIF4E-3	*eIF4E-1^{SD}/eIF4E-1^{SD}*	100% (11/11)	
F1	eIF4E-3/ eIF4E-3$^{\Delta}$	*eIF4E-1 ^{LD}/eIF4E-1^{KO}*	0% (11/11)	1 $^{\$}$
	eIF4E-3$^{\Delta}$/eIF4E-3$^{\Delta}$ eIF4E-3/eIF4E-3 eIF4E-3/ eIF4E-3$^{\Delta}$	*eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{LD}*	13% (2/16)	0.64 †
F2	*eIF4E-3$^{\Delta}$/eIF4E-3$^{\Delta}$* eIF4E-3/eIF4E-3 eIF4E-3/ eIF4E-3$^{\Delta}$	*eIF4E-1^{SD}/eIF4E-1^{SD}*	35% (6/17)	0.0025 ‡
	eIF4E-3$^{\Delta}$/eIF4E-3$^{\Delta}$ eIF4E-3/eIF4E-3 eIF4E-3/ eIF4E-3$^{\Delta}$	*eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{SD}*	13% (6/48)	0.49 §

La population F2 (81 plantes) provenant du croisement (VAM x Wika) ségrégeant pour la délétion *eIF4E-1^{LD}* a été inoculée avec l'isolat PVY-SN3. Le phénotype correspond au taux d'infection (nombre de plantes infectées / nombre de plantes inoculées) estimé par ELISA à 30 jpi. Le test statistique du *Chi^2* a été utilisé pour déterminer si le phénotype de durabilité de la résistance (estimé à partir des fréquences d'infection) était différent entre ($) les plantes F1 et le parent VAM ; (†) les plantes F2 homozygotes *eIF4E-1^{LD}/ eIF4E-1^{LD}* et le parent VAM; (‡) ; les plantes F2 homozygotes *eIF4E-1^{SD} / eIF4E-1^{SD}* et le parent Wika; (§) les individus F2 hétérozygotes *eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{SD}* et les descendants F1. Le test *Chi^2* vérifie l'adéquation de nos données avec l'hypothèse nulle, indiquant qu'il n'y a pas de différence significative entre le résultat attendu et observé avec un risque de se tromper de 5% (0,05).L'hypothèse nulle est acceptée quand la *P*-value est > 0,05. *eIF4E-1^{LD}* correspond à la suppression totale du gène *eIF4E-1* au locus *S10760* sur le chromosome 21. *eIF4E-1^{SD}* est également caractérisée par une délétion du gène *eIF4E-1* au locus *S10760* mais avec une délétion plus petite que celle caractérisée chez VAM.

Table II-S7 B. La délétion *eIF4E-1$^{\Delta}$* au locus *va* sur le chromosome 21 co-ségrège avec le caractère de durabilité de la résistance

	Genotype		Phenotype	*P*-value (*Chi*^{2})
	eIF4E-3 locus	***eIF4E-1 locus***		
VAM	*eIF4E-3$^{\Delta}$/eIF4E-3$^{\Delta}$*	*eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{LD}*	0% (0/11)	
Wika	eIF4E-3/eIF4E-3	*eIF4E-1^{SD}/eIF4E-1^{SD}*	100% (11/11)	
F1	eIF4E-3/ eIF4E-3$^{\Delta}$	*eIF4E-1 ^{LD}/eIF4E-1^{KO}*	0% (11/11)	1 $^{\$}$
F2	*eIF4E-3$^{\Delta}$/eIF4E-3$^{\Delta}$* eIF4E-3/eIF4E-3 eIF4E-3/ eIF4E-3$^{\Delta}$	*eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{LD}*	0% (0/18)	1 †
	eIF4E-3$^{\Delta}$/eIF4E-3$^{\Delta}$ eIF4E-3/eIF4E-3 eIF4E-3/ eIF4E-3$^{\Delta}$	*eIF4E-1^{SD}/eIF4E-1^{SD}*	33% (9/27)	7.4×10^{-4} ‡
	eIF4E-3$^{\Delta}$/eIF4E-3$^{\Delta}$ eIF4E-3/eIF4E-3 eIF4E-3/ eIF4E-3$^{\Delta}$	*eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{SD}*	0% (0/49)	1 §

La population F2 (94 plantes) provenant du croisement (VAM x Wika) ségrégeant pour la délétion *eIF4E-1^{LD}* a été inoculée avec l'isolat de PVY-O139. Le phénotype correspond au taux d'infection (nombre de plantes infectées / nombre de plantes inoculées) estimé par ELISA à 30 jpi.

Table II-S8. Hérédité de l'allèle *eIF4E-3$^{\Delta}$* dans une population F2 issue d'un croisement entre les génotypes VAM et Wika

	Génotype				
	eIF4E-1	***eIF4E-3***	**Obs.**	**Exp.**	*P*-value (Chi^2)
VAM	*eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{LD}*	*eIF4E-3$^{\Delta}$/eIF4E-3$^{\Delta}$*			
EMS1	*eIF4E-1^{SD}/eIF4E-1^{SD}*	*eIF4E-3/eIF4E-3*			
F1	*eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{SD}*	*eIF4E-3/eIF4E-3$^{\Delta}$*			
F2 (175)	*eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{LD}*	*eIF4E-3$^{\Delta}$/eIF4E-3$^{\Delta}$*	7 (4%)	44 (25%)	0,7532
	eIF4E-1^{SD}/eIF4E-1^{SD}		16 (9%) 47 (27 %)		
	eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{SD}		24 (14%)		
	eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{LD}	*eIF4E-3/eIF4E-3*	0	44 (25%)	8.6x10^{-6}*
	eIF4E-1^{SD}/eIF4E-1^{SD}		11 (6%) 11 (6%)		
	eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{SD}		0		
	eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{LD}	*eIF4E-3/ eIF4E-3$^{\Delta}$*	27 (15%)	88 (50%)	0,04282*
	eIF4E-1^{SD}/eIF4E-1^{SD}		17 (10%) 117 (67%)		
	eIF4E-1^{LD}/eIF4E-1^{SD}		73 (42%)		

L'allèle *eIF4E-3* correspond à la forme allélique complète du gène complet *eIF4E-3* observée dans la plupart des accessions de tabac. L'allèle *eIF4E-3$^{\Delta}$* correspond à la forme délétée en 5 'du gène *eIF4E-3* sur le chromosome 14 présent notamment dans l'accession VAM. Les allèles *eIF4E-1^{LD}* et *eIF4E-1^{SD}* correspondent respectivement aux formes alléliques ' large' (groupe LD) ou 'small' petite délétion (SD) sur le chromosome 21, qui entraînent la délétion complète du gène *eIF4E-1* chez 'VAM' et 'Wika' respectivement. L'hérédité des formes alléliques *eIF4E-3* a été analysé par génotypage des 175 plantes F2 provenant du croisement entre VAM et Wika (leurs phénotypes sont présentés dans les Table II-S6 A et B). Le nombre de plantes correspondant à chaque génotype est indiqué. Le test du Chi^2 a été utilisé pour vérifier l'adéquation de nos données de ségrégation avec celles attendues (25 :25 :50 soient 25% des plantes F2 présentent un génotype de type eIF4E-3$^{\Delta}$/*eIF4E-3$^{\Delta}$*, 25% seront *eIF4E-3*/*eIF4E-3* et 50% seront hétérozygotes au locus *eIF4E-3*). (*): indique que la *P*-value est <0,05 et donc que l'hypothèse nulle est rejetée. Par conséquent, les valeurs de probabilité (*) indiquent que la ségrégation de l'allèle *eIF4E-3* dans la population observée est significativement différente de celle attendue, montrant ainsi une distorsion dans la ségrégation à ce locus.

References

Abdul-Razzak, A., Guiraud, T., Peypelut, M., Walter, J., Houvenaghel, M.-C., Candresse, T., Le Gall, O. and German-Retana, S. (2009) Involvement of the cylindrical inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against *Lettuce mosaic potyvirus*. *Mol. Plant Pathol.* **10**, 109–113.

Acosta-Leal, R. and Xiong, Z. (2008) Complementary functions of two recessive *R*-genes determine resistance durability of tobacco "Virgin A Mutant" (VAM) to *Potato virus Y*. *Virology* **379**, 275–283.

Andersen, M.M., Landes, X., Xiang, W., et al. (2015) Feasibility of new breeding techniques for organic farming. *Trends Plant Sci.* **20**, 426–434.

Ayme, V., Petit-Pierre, J., Souche, S., Palloix, A. and Moury, B. (2007) Molecular dissection of the *potato virus Y* VPg virulence factor reveals complex adaptations to the *pvr2* resistance allelic series in pepper. *J. Gen. Virol.* **88**, 1594–1601.

Ayme, V., Souche, S., Caranta, C., Jacquemond, M., Chadø euf, J., Palloix, A. and Moury, B. (2006) Different mutations in the genome-linked protein VPg of *Potato virus Y* confer virulence on the *pvr2*^{3} resistance in pepper. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **19**, 557–563.

Bastet, A., Robaglia, C. and Gallois, J.-L. (2017) eIF4E Resistance: Natural Variation Should Guide Gene Editing. *Trends Plant Sci.* **22**, 411–419.

Ben Khalifa, M., Simon, V., Fakhfakh, H. and Moury, B. (2012) Tunisian *Potato virus Y* isolates with unnecessary pathogenicity towards pepper: support for the matching allele model in eIF4E resistance-potyvirus interactions: Unnecessary PVY pathogenicity and matching allele model. *Plant Pathol.* **61**, 441–447.

Bindler, G., Plieske, J., Bakaher, N., Gunduz, I., Ivanov, N., Van der Hoeven, R., Ganal, M. and Donini, P. (2011) A high density genetic map of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) obtained from large scale microsatellite marker development. *Theor. Appl. Genet.* **123**, 219–230.

Browning, K.S. and Bailey-Serres, J. (2015) Mechanism of Cytoplasmic mRNA Translation. *Arab. Book* **13**, e0176.

Cavatorta, J., Perez, K.W., Gray, S.M., Van Eck, J., Yeam, I. and Jahn, M. (2011) Engineering virus resistance using a modified potato gene: Engineering virus resistance using a modified potato gene. *Plant Biotechnol. J.* **9**, 1014–1021.

Chandler, J. and Werr, W. (2003) When negative is positive in functional genomics. *Trends Plant Sci.* **8**, 279–285.

Chandrasekaran, J., Brumin, M., Wolf, D., Leibman, D., Klap, C., Pearlsman, M., Sherman, A., Arazi, T. and Gal-On, A. (2016) Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol. Plant Pathol.* **17**, 1140–1153.

Charron, C., Nicolaï, M., Gallois, J.-L., Robaglia, C., Moury, B., Palloix, A. and Caranta, C. (2008) Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg: Co-evolution between eIF4E and VPg. *Plant J.* **54**, 56–68.

Clark, M.F. and Adams, A.N. (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* **34**, 475–483.

Combe, J.P., Petracek, M.E., Eldik, G. van, Meulewaeter, F. and Twell, D. (2005) Translation initiation factors eIF4E and eIFiso4E are required for polysome formation and regulate plant growth in tobacco. *Plant Mol. Biol.* **57**, 749–760.

Contreras-Paredes, C.A., Silva-Rosales, L., Daròs, J.-A., Alejandri-Ramírez, N.D. and Dinkova, T.D. (2013) The Absence of Eukaryotic Initiation Factor eIF(iso)4E Affects the Systemic Spread of a *Tobacco etch virus* Isolate in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **26**, 461–470.

Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K.S. and Robaglia, C. (2002) The Arabidopsis eukaryotic initiation factor (iso) 4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant J.* **32**, 927–934.

Edwards, K.D., Fernandez-Pozo, N., Drake-Stowe, K., et al. (2017) A reference genome for *Nicotiana tabacum* enables map-based cloning of homeologous loci implicated in nitrogen utilization efficiency. *BMC Genomics* **18,** 448.

Gallois, J.-L., Charron, C., Sanchez, F., et al. (2010) Single amino acid changes in the *turnip mosaic virus* viral genome-linked protein (VPg) confer virulence towards *Arabidopsis thaliana* mutants knocked out for eukaryotic initiation factors eIF(iso)4E and eIF(iso)4G. *J. Gen. Virol.* **91**, 288–293.

Gallois, J.-L., Guyon-Debast, A., Lécureuil, A., Vezon, D., Carpentier, V., Bonhomme, S. and Guerche, P. (2009) The Arabidopsis proteasome RPT5 subunits are essential for gametophyte development and show accession-dependent redundancy. *Plant Cell* **21**, 442–459.

Gao, Z., Johansen, E., Eyers, S., Thomas, C.L., Noel Ellis, T.H. and Maule, A.J. (2004) The potyvirus recessive resistance gene, *sbm1*, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking: Novel role for eIF4E in virus movement. *Plant J.* **40**, 376–385.

Gauffier, C., Lebaron, C., Moretti, A., Constant, C., Moquet, F., Bonnet, G., Caranta, C. and Gallois, J.-L. (2016) A TILLING approach to generate broad-spectrum resistance to potyviruses in tomato is hampered by *eIF4E* gene redundancy. *Plant J.*, 717–729.

German-Retana, S., Walter, J., Doublet, B., et al. (2008) Mutational Analysis of Plant Cap-Binding Protein eIF4E Reveals Key Amino Acids Involved in Biochemical Functions and Potyvirus Infection. *J. Virol.* **82**, 7601–7612.

Glais, L., Tribodet, M., Gauthier, J.-P., Astier-Manifacier, S., Robaglia, C. and Kerlan, C. (1998) RFLP mapping of the whole genome of ten viral isolates representative of different biological groups of *potato virus Y*. *Arch. Virol.* **143**, 2077–2091.

Glais, L., Tribodet, M. and Kerlan, C. (2002) Genomic variability in *Potato potyvirus Y* (PVY): evidence that PVY^{NW} and PVY^{NTN} variants are single to multiple recombinants between PVY^{O} and PVY^{N} isolates. *Arch. Virol.* **147**, 363–378.

Hwang, J., Li, J., Liu, W.-Y., An, S.-J., Cho, H., Her, N.H., Yeam, I., Kim, D. and Kang, B.-C. (2009) Double mutations in eIF4E and eIFiso4E confer recessive resistance to *Chilli veinal mottle virus* in pepper. *Mol. Cells* **27**, 329–336.

Jakab, G., Droz, E., Brigneti, G., Baulcombe, D. and Malno, P. (1997) Infectious in vivo and in vitro transcripts from a full-length cDNA clone of PVY-N605, a Swiss necrotic isolate of *potato virus Y*. *J. Gen. Virol.* **78**, 3141–3145.

Janzac, B., Tribodet, M., Lacroix, C., Moury, B., Verrier, J.L. and Jacquot, E. (2014) Evolutionary Pathways to Break Down the Resistance of Allelic Versions of the PVY Resistance Gene *va*. *Plant Dis.* **98**, 1521–1529.

Jenner, C.E., Nellist, C.F., Barker, G.C. and Walsh, J.A. (2010) *Turnip mosaic virus* (TuMV) is able to use alleles of both eIF4E and eIF (iso) 4E from multiple loci of the diploid *Brassica rapa*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **23**, 1498–1505.

Julio, E., Cotucheau, J., Decorps, C., Volpatti, R., Sentenac, C., Candresse, T. and Dorlhac de Borne, F. (2014) A Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E (eIF4E) is Responsible for the "*va*" Tobacco Recessive Resistance to Potyviruses. *Plant Mol. Biol. Report.*

Julio, E., Laporte, F., Reis, S., Rothan, C. and Dorlhac de Borne, F. (2008) Reducing the content of nornicotine in tobacco via targeted mutation breeding. *Mol. Breed.* **21**, 369–381.

Kang, B.-C., Yeam, I., Li, H., Perez, K.W. and Jahn, M.M. (2007) Ectopic expression of a recessive resistance gene generates dominant potyvirus resistance in plants. *Plant Biotechnol. J.* **5**, 526–536.

Kim, J., Kang, W.-H., Hwang, J., Yang, H.-B., Dosun, K., Oh, C.-S. and Kang, B.-C. (2014) Transgenic *Brassica rapa* plants over-expressing eIF(iso)4E variants show broad-spectrum *Turnip mosaic virus* (TuMV) resistance: *Brassica rapa* transgenic plant resistant to TuMV. *Mol. Plant Pathol.* **15**, 615–626.

Koelle, G. (1961) Genetisce analyse einer Y-virus (rippen braun) resisten mutante der tabactore Virgin A. *Zuechter.* **31**, 71–72.

Lacroix, C., Glais, L., Kerlan, C., Verrier, J.-L. and Jacquot, E. (2010) Biological characterization of French *Potato virus Y* (PVY) isolates collected from PVY-susceptible or -resistant tobacco plants possessing the recessive resistance gene va: Virulence of PVY in French tobacco. *Plant Pathol.* **59**, 1133–1143.

Lacroix, C., Glais, L., Verrier, J.-L. and Jacquot, E. (2011) Effect of passage of a Potato virus Y isolate on a line of tobacco containing the recessive resistance gene va 2 on the development of isolates capable of overcoming alleles 0 and 2. *Eur. J. Plant Pathol.* **130**, 259–269.

Lebaron, C., Rosado, A., Sauvage, C., Gauffier, C., German-Retana, S., Moury, B. and Gallois, J.-L. (2016) A new eIF4E1 allele characterized by RNAseq data mining is associated with resistance to potato virus Y in tomato albeit with a low durability. *J. Gen. Virol.* **97**, 3063–3072.

Leonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M.G. and Laliberte, J.-F. (2000) Complex Formation between *Potyvirus* VPg and Translation Eukaryotic Initiation Factor 4E Correlates with Virus Infectivity. *J. Virol.* **74**, 7730–7737.

Marcotrigiano, J., Gingras, A.-C., Sonenberg, N. and Burley, S.K. (1997) Cocrystal structure of the messenger RNA 5′ cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* **89**, 951–961.

Masuta, C., Nishimura, M., Morishita, H. and Hataya, T. (1999) A single amino acid change in viral genome-associated protein of *potato virus Y* correlates with resistance breaking in ’Virgin A Mutant’ tobacco. *Phytopathology* **89**, 118–123.

Mazier, M., Flamain, F., Nicolaï, M., Sarnette, V. and Caranta, C. (2011) Knock-Down of Both eIF4E1 and eIF4E2 Genes Confers Broad-Spectrum Resistance against Potyviruses in Tomato Bendahmane, M., ed. *PLoS ONE* **6**, e29595.

Moury, B. (2010) A new lineage sheds light on the evolutionary history of *Potato virus Y*. *Mol. Plant Pathol.* **11**, 161–168.

Moury, B., Caromel, B., Johansen, E., Simon, V., Chauvin, L., Jacquot, E., Kerlan, C. and Lefebvre, V. (2011) The helper component proteinase cistron of Potato virus Y induces hypersensitivity and resistance in potato genotypes carrying dominant resistance genes on chromosome IV. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **24**, 787–797.

Moury, B., Charron, C., Janzac, B., Simon, V., Gallois, J.L., Palloix, A. and Caranta, C. (2014) Evolution of plant eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) and potyvirus genome-linked protein (VPg): A game of mirrors impacting resistance spectrum and durability. *Infect. Genet. Evol.* **27**, 472–480.

Moury, B., Morel, C., Johansen, E., Guilbaud, L., Souche, S., Ayme, V., Caranta, C., Palloix, A. and Jacquemond, M. (2004) Mutations in Potato virus Y genome-linked protein determine virulence toward recessive resistances in Capsicum annuum and Lycopersicon hirsutum. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **17**, 322–329.

Nakahara, K.S., Shimada, R., Choi, S.-H., Yamamoto, H., Shao, J. and Uyeda, I. (2010) Involvement of the P1 cistron in overcoming eIF4E-mediated recessive resistance against Clover yellow vein virus in pea. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **23**, 1460–1469.

Nicaise, V., Gallois, J.-L., Chafiai, F., et al. (2007) Coordinated and selective recruitment of eIF4E and eIF4G factors for potyvirus infection in Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett.* **581**, 1041–1046.

Nicaise, V., German-Retana, S., Sanjuan, R., Dubrana, M.P., Mazier, M., Maisonneuve, B., Candresse, T., Caranta, C. and LeGall, O. (2003) The Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Controls Lettuce Susceptibility to the *Potyvirus Lettuce mosaic virus*. *PLANT Physiol.* **132**, 1272–1282.

Nicolas, O., Dunnington, S.W., Gotow, L.F., Pirone, T.P. and Hellmann, G.M. (1997) Variations in the VPg Protein Allow a *Potyvirus* to Overcome *va* Gene Resistance in Tobacco. *Virology* **237**, 452–459.

Noguchi, S., Tajima, T., Yamamoto, Y., Ohno, T. and Kubo, T. (1999) Deletion of a large genomic segment in tobacco varieties that are resistant to *potato virus Y* (PVY). *Mol. Gen. Genet. MGG* **262**, 822–829.

Pyott, D.E., Sheehan, E. and Molnar, A. (2016) Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free Arabidopsis plants. *Mol. Plant Pathol.* **17**, 1276–1288.

Qin, C., Shi, N., Gu, M., et al. (2012) Involvement of RDR6 in short-range intercellular RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Sci. Rep.* **2**.

Quenouille, J., Montarry, J., Palloix, A. and Moury, B. (2013) Farther, slower, stronger: how the plant genetic background protects a major resistance gene from breakdown: Mechanisms of polygenic resistance durability. *Mol. Plant Pathol.* **14**, 109–118.

Quenouille, J., Paulhiac, E., Moury, B. and Palloix, A. (2014) Quantitative trait loci from the host genetic background modulate the durability of a resistance gene: a rational basis for sustainable resistance breeding in plants. *Heredity* **112**.

Quenouille, J., Saint-Felix, L., Moury, B. and Palloix, A. (2016) Diversity of genetic backgrounds modulating the durability of a major resistance gene. Analysis of a core collection of pepper landraces resistant to *Potato virus Y*: Genetic backgrounds shape *R* -gene durability. *Mol. Plant Pathol.* **17**, 296–302.

Quenouille, J., Vassilakos, N. and Moury, B. (2013) A major crop pathogen that has provided major insights into the evolution of viral pathogenicity. *Mol. Plant Pathol.* **14**, 439–452.

Revers, F. and García, J.A. (2015) Molecular Biology of *Potyviruses*. In *Advances in Virus Research*., pp. 101–199. Elsevier.

Robaglia, C. and Caranta, C. (2006) Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends Plant Sci.* **11**, 40–45.

Ruffel, S., Dussault, M.-H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C. and Caranta, C. (2002) A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J.* **32**, 1067–1075.

Ruffel, S., Gallois, J.L., Lesage, M.L. and Caranta, C. (2005) The recessive potyvirus resistance gene pot-1 is the tomato orthologue of the pepper pvr2-eIF4E gene. *Mol. Genet. Genomics* **274**, 346–353.

Ruffel, S., Gallois, J.L., Moury, B., Robaglia, C., Palloix, A. and Caranta, C. (2006) Simultaneous mutations in translation initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E are required to prevent *pepper veinal mottle virus* infection of pepper. *J. Gen. Virol.* **87**, 2089–2098.

Sanfaçon, H. (2015) Plant Translation Factors and Virus Resistance. *Viruses* **7**, 3392–3419.

Schie, C.C.N. van and Takken, F.L.W. (2014) Susceptibility Genes 101: How to Be a Good Host. *Annu. Rev. Phytopathol.* **52**, 551–581.

Schmittgen, T.D. and Livak, K.J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc.* **3**, 1101–1108.

Scholthof, K.-B.G., Adkins, S., Czosnek, H., et al. (2011) Top 10 plant viruses in molecular plant pathology: Top 10 plant viruses. *Mol. Plant Pathol.* **12**, 938–954.

Singh, M. and Singh, P. (1996) Nucleotide sequence and genome organization of a Canadian isolate of the common strain of *potato virus Y* (PVY°). *Can. J. Plant Pathol.* **18**, 209–224.

Singh, R.P., Valkonen, J.P.T., Gray, S.M., Boonham, N., Jones, R.A.C., Kerlan, C. and Schubert, J. (2008) Discussion paper: The naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. *Arch. Virol.* **153**, 1–13.

Sorel, M., Garcia, J.A. and German-Retana, S. (2014) The *Potyviridae* Cylindrical Inclusion Helicase: A Key Multipartner and Multifunctional Protein. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **27**, 215–226.

Sorel, M., Svanella-Dumas, L., Candresse, T., Acelin, G., Pitarch, A., Houvenaghel, M.C. and German-Retana, S. (2014) Key Mutations in the Cylindrical Inclusion Involved in *Lettuce mosaic virus* Adaptation to eIF4E-Mediated Resistance in Lettuce. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **27**, 1014–1024.

Sudarsono, Woloshuk, S.L., Xiong, Z., Hellmann, G.M., Wernsman, E.A., Weissinger, A.K. and Lommel, S.A. (1993) Nucleotide sequence of the capsid protein cistrons from six *potato virus Y* (PVY) isolates infecting tobacco. *Arch. Virol.* **132**, 161–170.

Tajima, T., Noguchi, S., Tanoue, W., Negishi, H., Nakakawaji, T. and Ohno, T. (2002) Background selection using DNA markers in backross breeding program for *Potato Virus Y* resistance of tobacco. *Breed. Sci.* 52:253-257.

Tavert-Roudet, G., Abdul-Razzak, A., Doublet, B., Walter, J., Delaunay, T., German-Retana, S., Michon, T., Le Gall, O. and Candresse, T. (2012) The C terminus of lettuce mosaic potyvirus cylindrical inclusion helicase interacts with the viral VPg and with lettuce translation eukaryotic initiation factor 4E. *J. Gen. Virol.* **93**, 184–193.

Truniger, V. and Aranda, M.A. (2009) Recessive Resistance to Plant Viruses. In Advances in Virus Research., pp. 119–231. Elsevier.

Verrier, J.-L. and Doroszewska, T. (2004) The "*va*" resistance to PVYN in Nicotiana tabacum: an assessment of the frequency of "*va*" breaking PVYN strains based on seven years of field survey on a worldwide basis.

Verrier, J.-L., Marchand, V., Cailleteau, B. and Delon, R. (2001) Chemical change and cigarette smoke mutagenicity increase associated with CMV-DTL and PVY-N infection in burley tobacco. *In Cape Town, South Africa, Paris, France: CORESTA, 29: Proceedings of the CORESTA Meeting*.

Wang, A. and Krishnaswamy, S. (2012) Eukaryotic translation initiation factor 4E-mediated recessive resistance to plant viruses and its utility in crop improvement: eIF4E-mediated resistance to plant viruses. *Mol. Plant Pathol.* **13**, 795–803.

Wylie, S.J., Adams, M., Chalam, C., et al. (2017) ICTV Virus Taxonomy Profile: *Potyviridae*. *J. Gen. Virol.* **98**, 352–354.

Xu, M., Xie, H., Wu, J., Xie, L., Yang, J. and Chi, Y. (2017) Translation Initiation Factor eIF4E and eIFiso4E Are Both Required for *Peanut stripe virus* Infection in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Front. Microbiol.* **8**.

Yamamoto, Y. (1992) Studies on breeding of tobacco varieties resistant to veinal necrosis disease by *Potato virus Y* strain T. *Bull Leaf Tob. Res. Lab.* **2**, 1–85.

Yeam, I., Cavatorta, J.R., Ripoll, D.R., Kang, B.-C. and Jahn, M.M. (2007) Functional Dissection of Naturally Occurring Amino Acid Substitutions in eIF4E That Confers Recessive *Potyvirus* Resistance in Plants. *PLANT CELL ONLINE* **19**, 2913–2928.

Chapitre III :

Identification de facteurs génétiques autres que *va* contrôlant la tolérance aux symptômes de nécrose nervaire induits par certains isolats de PVY chez le tabac.

Chapitre III : Identification de facteurs génétiques autres que *va* contrôlant la tolérance aux symptômes de nécrose nervaire induits par certains isolats de PVY chez le tabac.

Article: *NtTPN1*, a *RPP8-like R* gene, controls Potato virus Y-induced veinal necrosis in tobacco

L'objectif des travaux de recherche exposés dans ce troisième chapitre était d'identifier et de caractériser une nouvelle source de résistance au PVY chez le tabac qui soit indépendante de *va*. Lors de la caractérisation génotypique et phénotypique du germoplasme d'Imperial Tobacco, constitué de 162 variétés de tabacs, 10 variétés exprimant le gène *eIF4E-1* mais ne présentant aucun symptôme en cas d'infection par le PVY ont pu être identifiées. Plus spécifiquement, ces accessions n'expriment pas de symptômes de nécrose nervaire lors de l'infection par des isolats de PVY nécrotiques (groupe N). Il existerait donc dans ces accessions une source de tolérance au virus qui se caractérise par l'absence de symptômes de nécrose nervaire. Cette forme de résistance est potentiellement intéressante, notamment pour résoudre les problèmes posés par l'émergence d'isolats de PVY de type nécrotique capables de contourner la résistance conférée par *va*.

Le phénotypage fin associé à une cartographie fine du (des) déterminant(s) génétique(s) a été réalisé dans une population F2 en ségrégation, issue d'un croisement entre une accession «sensible » et une accession « tolérante » ne présentant pas de nécroses nervaires. Il s'est avéré que le caractère de tolérance est contrôlé par un seul gène de tolérance récessive, et les tests d'allélisme ont montré que huit des dix variétés tolérantes portent le même déterminant génétique.

Une cartographie fine menée à Bergerac sur des populations F2 a permis d'identifier un SNP (Single Nucleotide Polymorphism) lié au caractère de tolérance et positionné sur le chromosome 13 du tabac. L'ancrage de la carte de liaison à la carte physique du génome du tabac a permis d'identifier un gène *R* (NB-LRR) de type *RPP8*, que l'on a appelé *NtTPN1* pour « *Nicotiana tabacum Tolerance to PVY-induced Necrosis1* ». La même mutation non-synomyme (SNP) a été identifiée au niveau du gène *NtTPN1* chez les 8 accessions de tabac tolérantes et ne présentant pas de symptômes de nécrose, dans l'un des motifs LRR. Des tests de validation fonctionnelle ont été réalisés à partir de mutants EMS homozygotes présentant

une mutation non-synonyme dans *NtTPN1*, et ont confirmé son rôle dans le phénotype de tolérance. Le(s) mécanisme(s) impliqué(s) dans la tolérance au virus s'exprimant par l'absence de nécroses nervaires pourrai(en)t donc faire intervenir un gène de type «*R*» qui contrôlerait la réaction nécrotique systémique induite par certains isolats de PVY. Ainsi, l'allèle dominant *NtTPN1* code pour un facteur de type NB-LRR capable de reconnaître un facteur de virulence encore inconnu du PVY et cette reconnaissance entraînerait l'induction de symptômes de nécroses nervaires en systémie, conséquence d'une réponse hypersensible (HR) déclenchée tardivement et qui n'empêcherait pas la propagation du virus. L'allèle récessif *nttpn1* code pour un facteur NB-LRR muté, ayant pour conséquence une non-reconnaissance du facteur d'avirulence viral et donc, l'absence de réponse nécrotique.

Ces résultats ont donc permis d'identifier un nouveau gène chez le tabac qui permettrait de minimiser l'impact de la maladie causée par des isolats nécrotiques de PVY notamment dans le cas de contournement de la résistance conférée par le locus de résistance *va*.

Les résultats présentés sous forme d'article dans ce chapitre font l'objet d'une publication soumise au journal ***The Plant Journal.***

J'ai réalisé ici toutes les expériences de phénotypage fin, le test d'allélisme ainsi que les expressions transitoires de facteurs d'avirulence et la caractérisation moléculaire de la HR. La cartographie fine, le clonage du gène et l'identification des mutants EMS ont été réalisé par nos collègues de Bergerac.

NtTPN1, a _RPP8_-like _R_ gene, controls _Potato virus Y_-induced veinal necrosis in tobacco

Vincent Michel[1†], Emilie Julio[2†], Thierry Candresse[1†], Julien Cotucheau[2], Christophe Decorps[2], Roxane Volpatti[2], Benoît Moury[3], Laurent Glais[4-5], François Dorlhac de Borne[2], Véronique Decroocq[1] and Sylvie German-Retana[1✉]

[1] UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie, INRA, Univ. Bordeaux, 71 Av. E. Bourlaux, CS 20032, 33882 Villenave d'Ornon Cedex, France

[2] Imperial Tobacco Bergerac (ITB), La Tour, 24100 Bergerac, France

[3] Pathologie Végétale, INRA, 84140 Montfavet, France

[4] FN3PT/RD3PT, 75008 Paris, France

[5] IGEPP, Agrocampus Ouest, INRA, Université de Rennes 1, 35650 Le Rheu, France

[†] First-co-authors

✉ Corresponding author: Sylvie GERMAN-RETANA

UMR 1332 Biologie du Fruit et Pathologie, INRA, Univ. Bordeaux, 71 Av. E. Bourlaux, CS 20032, 33882 Villenave d'Ornon Cedex, France; Tel. + 33 5 57 12 23 83; Fax. + 33 5 57 12 23 84;

sylvie.german-retana@inra.fr

Running title: a tobacco *R*-like gene controls PVY-induced vein necrosis

Key Words: *RPP8*-like gene, PVY, *Potyvirus*, resistance, tolerance, veinal necrosis, tobacco, HR; *R* gene

(Submitted to The plant Journal)

Abstract

Potato virus Y is one of the most damaging viruses of tobacco. In particular, aggressive necrotic strains (PVY^N) lead to considerable yield losses. The main source of resistance against PVY is linked to the *va* locus. However, *va*-overcoming PVY isolates inducing necrotic symptoms were observed in several countries. In this context, it is important to find new, *va*-independent protection strategies. The phenotyping of 162 tobacco varieties revealed ten accessions that do not carry the *va* allele but fail to show the typical PVY^N-induced veinal necrosis. Despite the absence of necrotic symptoms, normal viral accumulation in these plants suggests a *va*-independent mechanism of tolerance to PVY^N-induced systemic veinal necrosis. Fine mapping of the genetic determinant(s) was performed in a segregating F2 population. The tolerance trait is inherited as a single recessive gene and allelism tests showed that eight of the ten tolerant varieties carry the same determinant. Anchoring the linkage map to the tobacco genome physical map allowed the identification of a *RPP8-like R* gene, called *NtTPN1* (for *Nicotiana tabacum Tolerance to PVY-induced Necrosis1*), with the same single-nucleotide polymorphism in the 8 tolerant accessions. Functional assays using homozygous *NtTPN1* EMS mutants confirmed its role in the tolerance phenotype. PVY^N-induced systemic veinal necrosis in tobacco likely represents an inefficient defense response with HR-like characteristics. The identification of *NtTPN1* opens novel breeding options to minimize the impact of the emerging and so far uncontrolled *va*-breaking necrotic PVY isolates.

Significance Statement

PVY^N isolates induce systemic veinal necrosis in tobacco leading to considerable yield losses in tobacco crops worldwide. In the current paper, we show that a *RRP8*-like *R* gene is needed for PVY^N-induced systemic veinal necrosis. This is one of the few examples of a disease phenotype due to an active, though inefficient, defense response to viral infection, rather than a passive damage.

1. Introduction

Potato virus Y (PVY) is the type member of the genus *Potyvirus* and belongs to the top 10 list of the most economically or scientifically important plant viruses (Scholthof *et al.*, 2011). Potyviruses have non-enveloped, flexuous rod-shaped particles of 680-900 nm in length and 11-13 nm in diameter. Their genome is a positive single-stranded RNA of 10 kb, polyadenylated at its 3' end and linked to a viral protein VPg (Viral Protein Genome-linked) at its 5' end. The RNA codes for a large polyprotein processed into 10 multifunctional proteins: P1, HcPro (helper component proteinase), P3, 6K1, CI (cylindrical inclusion protein), 6K2, VPg, NIa (nuclear inclusion a), NIb (nuclear inclusion b) and CP (capsid protein) (Revers and García, 2015). In addition, the PIPO or "Pretty Interesting Potyviridae ORF" is embedded in the P3 cistron, and is expressed as an eleventh functional protein fused to the N-terminal region of P3 (P3N-PIPO), via a transcriptional slippage during RNA synthesis (Chung *et al.*, 2008; Rodamilans *et al.*, 2015; Olspert *et al.*, 2015).

PVY is distributed worldwide, primarily infecting hosts in the *Solanaceae* family, including potato, tomato, pepper and tobacco. It is transmitted by aphids and causes one of the most damaging diseases on cultivated tobacco around the world (Verrier and Doroszewska, 2004; Quenouille *et al*., 2013). PVY isolates collected from potato plants have been classified into seven groups according to their pathogenicity on tobacco plants and their capacity to overcome hypersensitive resistance genes on potato (Singh *et al.*, 2008). Taking into account only the phenotype on tobacco, PVY isolates are distributed into two biotypes according to their ability to induce (PVY^N) or not (PVY^O) systemic veinal necrosis symptoms (Singh *et al.*, 2008; Moury, 2010). Although mosaic symptoms have less important impacts on yield and quality of tobacco plants, severe leaf necrosis and necrotic lesions developing on stems and stalks of tobacco induced by PVY^N isolates are a major concern for tobacco producers (Verrier *et al.,* 2004). Indeed, in the 1980's, the PVY-induced necrotic disease on tobacco was named 'necrosis severa' in Chile, due to those severe necrosis symptoms, including leaf deformation and dwarfing observed in highly sensitive tobacco cultivars (Latorre *et al.,* 1984). Necrotic symptoms caused by PVY^N result in high yield loss that can reach 100% and quality reduction by modifying the nicotine content (Latorre *et al.,* 1984; Faurez *et al.*, 2012). The ability of PVY isolates to cause systemic

veinal necrosis in tobacco is thus one of the most important biological factors impacting tobacco crops worldwide and was retained to classify PVY strains (Tribodet *et al*., 2005). Numerous biological, serological and molecular diagnostic tools were developed to describe the diversity of PVY isolates, and it was shown that in Europe and North-America, necrotic isolates are predominant in the natural diversity of PVY (Rolland *et al.*, 2009; Lacroix *et al.*, 2010). For example, the genetic diversity of PVY isolates infecting tobacco in five major tobacco-growing provinces in China showed that veinal necrosis-inducing isolates reached 88% in the recent past (Tian *et al.*, 2011).

A reverse genetics approach has demonstrated the role of the HcPro protein in the induction of tobacco veinal necrosis (Tribodet *et al*., 2005). Additional viral determinants were also found in the viral polyprotein region spanning from the C-terminus of CI to the proteinase domain of the NIa (Faurez *et al.*, 2012). However, the mechanisms underlying veinal necrosis symptoms induction by PVY remain to be elucidated.

Only a few host genes playing a direct role in symptom development have been identified so far for potyviruses. *TuNI* (*TuMV necrosis inducer*) was shown to be involved in the systemic necrosis induced by *Turnip mosaic virus* (TuMV) in *Arabidopsis thaliana* (Kaneko *et al.*, 2004). The authors discussed the possibility that *TuNI* could function as an *R* gene. Later on, Kim *et al.* (2008) showed that the necrotic symptoms induced by *TuNI* and observed along the veins, were a form of defense response accompanying a hypersensitive reaction (HR)-like cell death in the veinal area. Indeed, they showed that the virus was often localized in the necrotic region, and the necrotic response was associated with the production of H_2O_2, accumulation of salicylic acid (SA), emission of ethylene, and subsequent expression of defense-related genes (Kim *et al.*, 2008). For PVY, previous studies analyzing biochemical changes during PVY^N-induced tobacco veinal necrosis showed that enhanced ethylene production and accumulation of Pathogenesis-Related proteins (PR-proteins), characteristic of a HR, occurred in both the inoculated and systemically infected leaves (Roggero and Pennazio, 1988). The authors suggested that this situation might represent a case in which the defenses of the plant are triggered too late to impede multiplication and spread of the virus but are still sufficient to induce HR-mediated necrosis, resulting in a systemically-spreading necrosis. A similar situation, involving *Pepino*

mosaic virus (a *Potexvirus*) has been reported in transgenic tomato plants expressing the *Rx* resistance gene, resulting in a *Rx*-dependent, systemic necrosis infection phenotype (Candresse *et al.*, 2010).

As a species, *Nicotiana tabacum* is an allotetraploid (2*n*=4*x*=48) that evolved through the interspecific hybridization of *Nicotiana sylvestris* (2*n*=24, maternal donor, S genome) and *Nicotiana tomentosiformis* (2*n*=24, paternal donor, T genome) (Lim *et al.*, 2004; Clarkson *et al.*, 2005; Leitch *et al.*, 2008). In *N. tabacum,* the main source of resistance against PVY is linked to the *va* locus. This resistance originates from the Virgin A Mutant (VAM) tobacco line, which was obtained after UV-induced mutagenesis (Koelle, 1961). A large deletion of almost 1 Mb has been characterized in VAM using Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) markers (Noguchi *et al*., 1999). Recently, it was shown that the large deleted region contains one copy of the *eIF4E* (eukaryotic initiation factor 4E)-encoding gene (*S10760*), the deletion of which is responsible for the resistance to PVY conferred by the *va* locus (Julio *et al.*, 2014). The *S10760* gene was mapped on tobacco chromosome 21 and corresponds to an eIF4E isoform derived from the PVY-susceptible *N. sylvestris* parent (Julio *et al.*, 2014).

Despite the efficiency of the *va*-mediated resistance, PVY resistance-breaking isolates have been identified and characterized in the past few years (Masuta *et al.*, 1999; Lacroix *et al.*, 2010; Lacroix *et al.*, 2011). In particular, necrotic symptoms associated with PVY have been reported in *va* varieties in France and in other countries, indicating the spread of PVY^N variants able to overcome the *va*-mediated resistance. Many of these new variants are able to induce severe systemic necrotic symptoms and to inflict severe damages to tobacco crops, representing a major threat for tobacco production.

In this context, it is important to find new, *va*-independent, control strategies. We report here the identification of a *va*-independent tolerance to PVY^N-induced veinal necrosis, which is effective even against *va*-breaking isolates. *NtTPN1* (for *Nicotiana tabacum Tolerance to PVY-induced Necrosis1*), a *RPP8*-like NB-LRR (Nucleotide-Binding site Leucine Rich Repeats)-encoding gene, was identified as the gene involved in this mechanism and validated using EMS (Ethyl methanesulfonate) mutants.

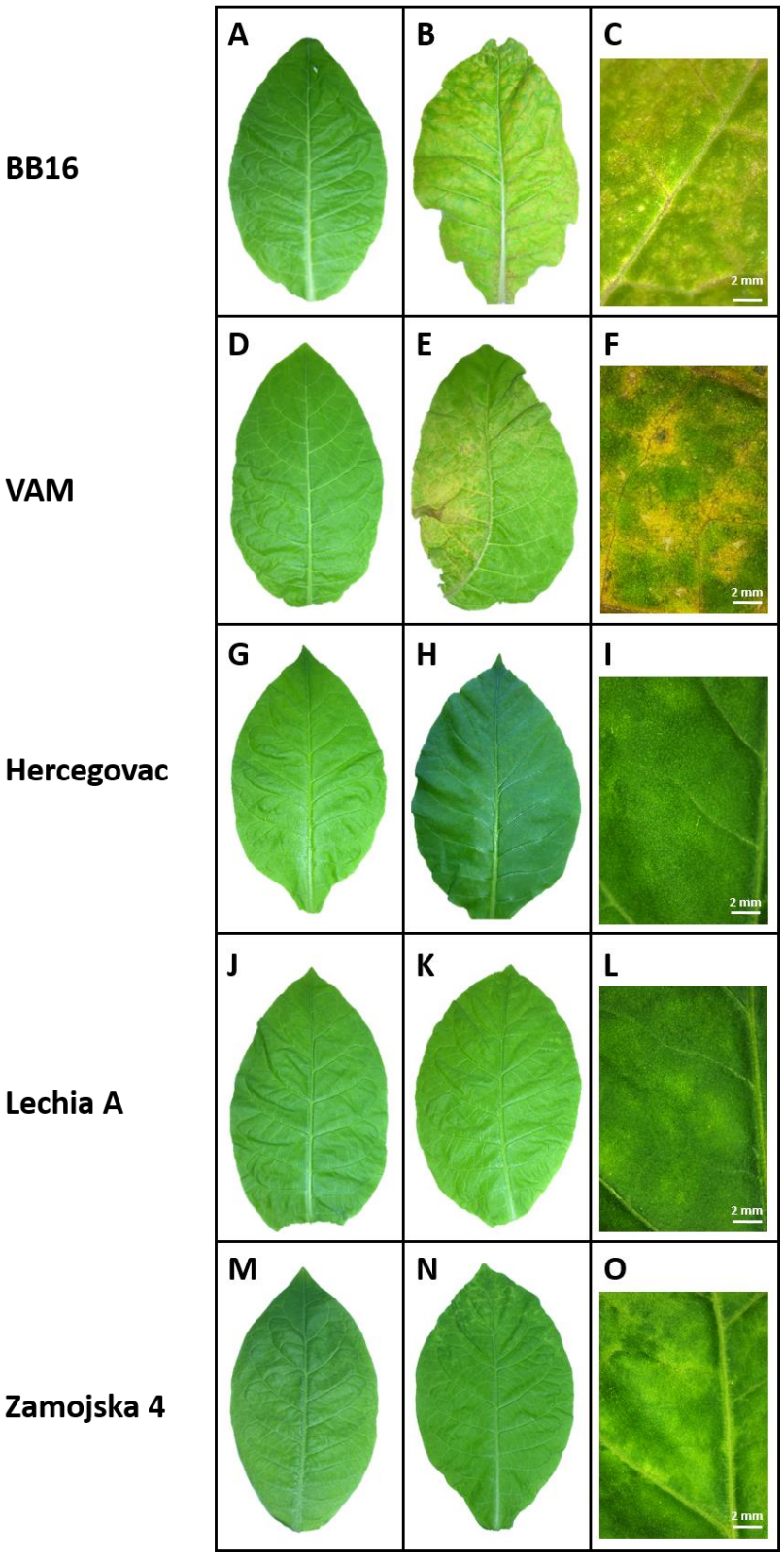


Figure III-1. Symptoms induced by the PVY^N (RB) isolate on the tolerant accessions Hercegovac, Lechia A, Zamojska 4 and on the sensitive controls BB16 and VAM, 21 days post inoculation.
A, D, G, J, M: healthy plants (mock-inoculated). **B, E, H, K, N**: systemically infected leaves. **C, F, I, L, O**: symptoms close-ups obtained using a large field microscope (Axio Zoom.V16 Zeiss).

2. Results

Phenotyping of ten tobacco accessions tolerant to PVY^N-induced veinal necrosis

In a previous study, Julio *et al.* (2014) identified ten tobacco accessions that do not show veinal necrosis symptoms upon inoculation by the PVY^N (10.26) isolate and that do not carry any resistance allele at the *va* locus. Additional phenotyping of the 10 lines failing to develop veinal necrosis symptoms was performed with PVY^N (11.08), (RB) and (N605) isolates. Systemic PVY infection of the inoculated plants was checked by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 30 days post-inoculation (dpi) using non-inoculated leaves. The sensitive genotypes BB16 and *N. tabacum* cv. Xanthi were used as controls displaying veinal necrosis when infected by PVY^N. The PVY^O (O139) isolate was used as a negative control since it does not induce veinal necrosis in tobacco (Singh and Singh, 1996). Table III-1 summarizes the systemic, necrotic or otherwise, infection symptoms observed and the number of symptomatic plants over the total of inoculated plants.

ELISA confirmed that 100% of the inoculated plants were systemically infected by the PVY^N or PVY^O isolates used. Although the four PVY^N isolates induced as expected typical vein necrosis symptoms in *N. tabacum* cv. Xanthi and BB16, none of them induced veinal necrosis in the ten evaluated tobacco accessions. The slight mosaic symptoms induced by the RB isolate (*va*-resistance-breaking isolate) on 'Hercegovac', 'Lechia A' and 'Zamojska 4' shown in Figure III-1, clearly differ from the veinal necrosis symptoms induced in BB16 and VAM (Figure III-1). On those control plants, necrosis was observed along first-order and second-order veins (Figure III-1C and III-1F). For the two accessions Bresil Bahia and Bahia, the symptoms induced by PVY^N (RB), differed from the other accessions, with discoloration leaf spots (DLs) symptoms (Figure III-S1).

Table III-1. Symptoms induced by PVY^O and PVY^N isolates on the 10 tolerant tobacco accessions.

	PVY^O (O139)		PVY^N (11.08)		PVY^N (10.26)		PVY^N (RB)		PVY^N (N605)	
Accessions	Symptoms	†Inf./Inoc.	Symptoms	†Inf./Inoc.	Symptoms	†Inf./Inoc.	Symptoms	†Inf./Inoc.	Symptoms	†Inf./Inoc.
Hercegovac	Mo	33/33	Mo	33/33	Mo	22/22	Mo	16/16	Ø	12/12
	VC	10/10							Mo, VC	‡10/10
Lechia A	Mo	33/33	Mo	33/33	Mo	22/22	Mo	16/16	VC	11/11
	VC	‡10/10							Mo, VC	10/10
Zamojska 4	Mo	33/33	Mo	33/33	Mo	22/22	Mo	16/16	Mo	12/12
	Mo, VC	10/10							Mo, VC, Cr	10/10
Zamoyska	Mo	33/33	Mo	33/33	Mo	22/22	Mo	16/16	VC	11/11
	Mo, VC	‡10/10							Mo, VC	10/10
Bahia	Mo	11/11	Mo	11/11	Mo	11/11	Mo, DLs	16/16	*nd*	
Bresil Bahia	Mo	11/11	Mo	11/11	Mo	11/11	Mo, DLs	16/16	*nd*	
Baragan 102	Mo	11/11	Mo	11/11	Mo	11/11	*nd*		*nd*	
Lechia LB	Mo	11/11	Mo	11/11	Mo	11/11	*nd*		*nd*	
Nyirsegi 1	Mo	11/11	Mo	11/11	Mo	11/11	*nd*		*nd*	
Virginia SP278	Mo	11/11	Mo	11/11	Mo	11/11	*nd*		*nd*	
BB16	Mo	33/33	VN	33/33	VN	22/22	VN	16/16	VN	2/2
	Mo, VC	‡8/8							Mo, VN, Y	‡10/10
Xanthi	Mo	2/2	VN	2/2	VN	2/2	VN, VC	2/2	VN	2/2

Symptoms were observed in the upper non-inoculated leaves at 30 dpi except for (‡) at 18 dpi. BB16 and *N. tabacum* cv. Xanthi were used as controls that display veinal necrosis when infected by several PVY^N isolates. PVY^O (O139) is non-necrotic on tobacco (negative control). Mo: mosaic, VN: veinal necrosis, VC: vein clearing, DLs: discoloration leaf spots, Cr: crinkle, Y: yellowing and Ø: no symptoms.

†: Number of symptomatic plants over number of inoculated plants. *nd* : not determined. Values shown correspond to the data from one to three independent inoculation experiments. Viral accumulation was confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for all the symptomatic plants except for (‡) where only one to five plants were tested. The tobacco accessions belong to the Imperial Tobacco germplasm collection: Hercegovac, Lechia A, Zamojska 4, Zamoyska, Lechia LB, Nyirsegi 1, Virginia SP278 (Flue cured), Bahia, Bresil Bahia (Dark air cured) and Baragan 102 (Semi-oriental).

Additional phenotyping tests were performed with five more PVY necrotic isolates on the tolerant accessions Hercegovac, Lechia A, Zamojska 4 and Zamoyska (Table III-S1). Whatever the PVY necrotic isolate used, veinal necrosis symptoms were never observed on those accessions, while we confirmed this observation on the BB16 sensitive control plants.

The level of accumulation of the PVY^N (RB) isolate in the 10 tolerant accessions was further estimated by quantitative ELISA tests and compared with BB16 and VAM control plants. Despite the absence of necrotic symptoms, the accumulation level of PVY^N (RB) in the Hercegovac, Lechia A and Zamojska 4 accessions, was not significantly different from that measured in the sensitive tobacco genotypes displaying necrotic symptoms (data not shown). These results show that *i*) absence of necrotic symptoms in the three tolerant accessions is not linked to a lower viral accumulation and *ii*) a different mechanism, independent of the *va*-resistance, confers tolerance to the necrosis induced by PVY^N isolates in those accessions.

Hereafter, in this paper, the ten accessions will be referred to as “tolerant” (accumulation of PVY^N without induction of veinal necrosis symptoms) whereas the genotypes that display veinal necrosis symptoms upon infection by PVY^N isolates will be referred to as “sensitive”.

Tolerance to PVY^N-induced veinal necrosis is conferred by a single recessive gene

The heredity of the tolerance trait was analyzed by comparing crosses made between each of the ten tolerant (Tol) accessions and a sensitive (Sen) tobacco genotype as described in Experimental Procedures. Twelve F1 plantlets were tested for each cross by inoculation with the PVY^N (RB) isolate. Necrosis symptoms were observed for all F1 plantlets, suggesting a recessive determinism of the tolerance trait for each of the tested tolerant accessions. F2 progenies were developed and similarly phenotyped. A 3:1 ratio of Sensitive:Tolerant in F2 progenies was obtained for all crosses, except for the one involving the Bahia accession, for which only 11% of tolerant plants were observed (Table III-S2). Bahia and Bresil Bahia are Dark air-cured tobacco accessions originating from Brazil, whereas all other tolerant accessions originate from Eastern Europe (Poland, Yugoslavia, or Hungary) (Delon *et al*.,

1999). Moreover, according to phylogenetic studies performed on the 162 accessions using SSR or SNPs markers, these 8 accessions are closely related. Therefore, the rest of the study was focused on these eight tolerant accessions.

We hypothesized that these eight tolerant accessions could present the same monogenic recessive determinant and tested this hypothesis by performing allelism tests by crossing the tolerant accessions between each other (Table III-S3). All the F1 progenies displayed a phenotype of slight mosaic similar to that of the parents when challenged with the PVY^N (10.26) isolate (Table III-S3 and Figure III-S2), demonstrating that the same recessive gene is involved in the phenotype of tolerance to PVY^N-induced veinal necrosis in these 8 accessions.

Mapping and cloning of the locus conferring tolerance to PVY-induced veinal necrosis

An initial mapping was performed by genotyping 20 SSR markers on 87 F2 individuals issued from a 'Lechia A' (tolerant) by 'Virginia 115' (sensitive) cross. These markers, known to be polymorphic between the two parents (Julio *et al.*, 2014) were chosen so as to represent the 24 different chromosomes of the T genome. In parallel, the F2 plants were also tested for tolerance to PVY^N-induced veinal necrosis as described in the Experimental Procedures. Join map was used to construct a genetic map based on the above SSR markers and an association was detected between the PT30177, PT30028 and PT30364 SSR markers on chromosome 13 and tolerance to PVY^N-induced veinal necrosis in the F2 population. To confirm this co-segregation, 16 additional SSR markers (Bindler *et al.*, 2011) all located on chromosome 13 were added to the previous linkage map. The locus associated to tolerance was thus mapped on linkage group 13 between the PT60530 and PT30028 markers (Figure III-2). This linkage group consists of both *N. tomentosiformis* and *N. sylvestris* genome portions as a consequence of chromosomal rearrangement, and the candidate locus is located in a *N. tomentosiformis*-derived region according to Bindler *et al.* (2011) .

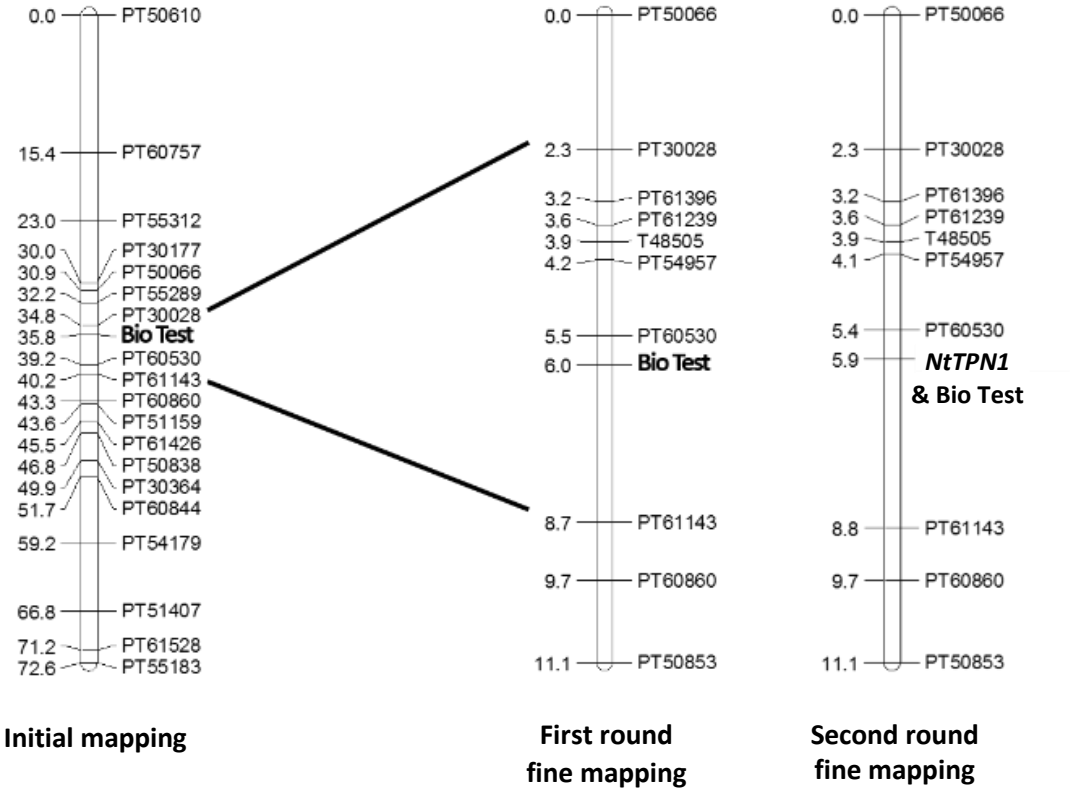


Figure III-2. Mapping of the locus that confers tolerance to PVY^N-induced veinal necrosis (*NtTPN1*) on *N. tabacum* chromosome 13. On the left and right of the linkage group are represented the marker positions (cM) and marker names, respectively. The initial mapping and the first round of fine mapping were achieved using 87 F2 individuals from the Lechia A (tolerant) x Virginia 115 (sensitive) cross. The second round of fine mapping was performed on 264 F2 individuals from the cross Zamojska 4 (tolerant) x Yellow Special (sensitive) and polymorphic markers available between the PT30028 and PT61143 SSR markers, according to the linkage map of Bindler *et al.* (2011). The KASP marker derived from the *NtTPN1* gene colocalized with the tolerance locus (Bio Test).

Table III-2. Tobacco super-scaffolds containing the various SSR markers linked to the tolerance locus.

SSR Markers	Distance (cM)†	Super-scaffold	Size (kb)
PT30028	48.3	Ntab-TN90_AYMY-SS786	259.52
PT61396	50.3	Ntab-TN90_AYMY-SS787	224.19
PT61239	51.4	Ntab-TN90_AYMY-SS788	576.63
PT54957	52.2	Ntab-TN90_AYMY-SS789	1030
PT61606	52.2	Ntab-TN90_AYMY-SS789	1030
PT60530	54.9	Ntab-TN90_AYMY-SS10823	740.4
PT53054	56.0	Ntab-TN90_AYMY-SS16167	78.65
PT61143	58.5	Ntab-TN90_AYMY-SS792	1230

† Genetic distances are given according to Bindler *et al*. (2011).

A second round of mapping, focusing on a 10 cM interval around the tolerance locus, was performed using an F2 population deriving from a cross between 'Zamojska 4' (tolerant) and 'Yellow Special' (sensitive). Ten SSR markers available between the PT30028 and PT61143 SSR markers, according to the linkage map of Bindler *et al.* (2011), and a SNP marker previously identified by RNA-Seq (Julio *et al.*, 2014) were used. A total of 264 F2 individuals were genotyped and scored for the tolerance trait. This confirmed, in this second population, the location of the tolerance locus on chromosome 13, between PT60530 and PT61143, and reduced the distance to 0.5 cM between the locus and the closest SSR marker, PT60530 (Figure III-2, right panel). These results also confirmed the independence between the genetic determinant of tolerance and the resistance to PVY^N conferred by the *va* locus which maps on chromosome 21 (Julio *et al.*, 2014). According to Bindler *et al.* (2011), five SSR markers are mapped in the interval between PT30028 and PT61143: PT61396, PT61239, T48505, PT54957 and PT60530. The TN90 tobacco genome was sequenced and assembled in 245,935 annotated super-scaffolds available on the website of the *Sol Genomics Network* (*https://solgenomics.net/*) (Sierro *et al.*, 2014). Forward and reverse sequences of the seven SSR primers were locally blasted, together with the two flanking markers, on the TN90 physical

map/assembly in order to identify the corresponding candidate super-scaffolds that may bear the tolerance locus. This resulted in the identification of seven super-scaffolds, as depicted in Table III-2.

RNA-Sequencing reads available for 162 tobacco accessions, including the 8 tolerant ones under study (Julio *et al.*, 2014) were mapped onto the above seven scaffolds in an effort to identify polymorphism in coding regions and distinguishing the 8 tolerant varieties from the remaining 154 others. Polymorphism was first examined in a limited panel of eighteen varieties, including the eight tolerant ones and ten sensitive accessions, and then extended to the whole panel for confirmation.

Only one single nucleotide polymorphism (SNP) was detected at position 524,797 of the Ntab-TN90_AYMY-SS10823 super-scaffold, separating the eight tolerant accessions from the sensitive ones. This SNP corresponds to a transition from Guanine (G) to Adenine (A) in the exon 2 of a candidate gene with a total length of 2,534 bp, including an 88 bp long intron (from 524,260 nt to 524,349 nt in the Ntab-TN90_AYMY-SS10823 scaffold). This candidate gene, hereafter named *NtTPN1* gene for *Nicotiana tabacum Tolerance to PVY-induced Necrosis1*, spans positions 523,011 to 525,544 on the plus-strand of the Ntab-TN90_AYMY-SS10823 scaffold.

Primers were designed to amplify a 444 bp (nt1279-nt1722) region of exon 2 in order to confirm the presence of the SNP in the eight tolerant accessions in comparison to three sensitive varieties used as controls ('K326', 'Virginia 115' and 'Yellow Special'). The SNP identified in the RNA-Seq data was verified by cloning and sequencing ten independent *NtTPN1* 444-bp PCR fragments for each variety. This allowed to confirm the presence of the SNP in the 8 tolerant accessions and its absence in the three sensitive control genotypes (data not shown).

A Kompetitive Allele Specific PCR (KASP) type SNP marker was developed to test for co-segregation between the *NtTPN1* polymorphism and variation of the tolerance trait. The KASP *NtTPN1* SNP was tested on the 'Zamojska 4' x 'Yellow Special' F2 population (Table III-S2). KASP data were scored according to the homozygous parental type 'Zamojska 4' (Adenine/Adenine, A/A); heterozygous (Adenine/Guanine, A/G) or homozygous parental type 'Yellow Special' (Guanine/Guanine, G/G).

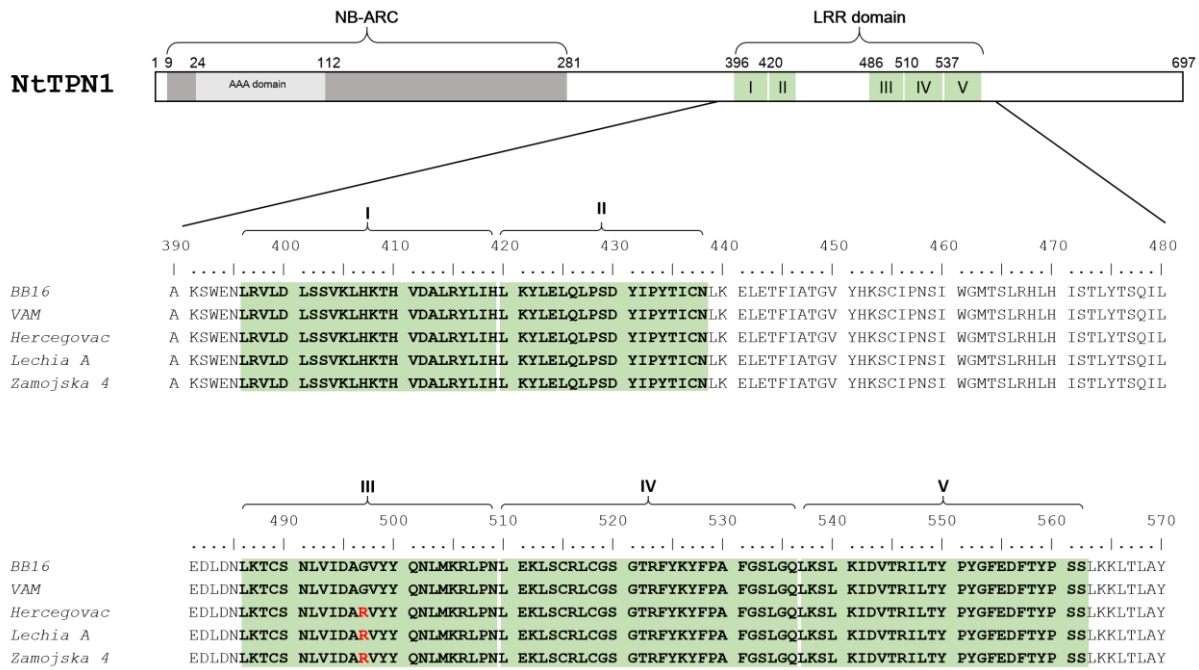


Figure III-3. Schematic representation of the NtTPN1 protein structure. The NB-ARC domain [Nucleotide Binding-APAF-1 (apoptotic protease activating factor-1), R proteins and CED-4 (Caenorhabditis elegans death-4 protein)] is a signaling motif found in bacteria and eukaryotes, shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals. AAA domain: ATPase Associated with diverse cellular Activities domain. The LRR domain of the gene consists of five imperfect repeats units, each 18-25 amino acids long. In the central region of each repeat is a β strand/ β turn structure, which is hypervariable and has the consensus sequence XX(L)X(L)XXXX, where L corresponds to conserved leucines (or other aliphatic amino acids, I, V, L, A, P or M) and X denotes the flanking hypervariable amino acids (Parniske et al., 1997; McDowell et al., 1998). The annotations for the LRR repeats were made using the CDD (Conserved Domain database) from *NCBI https://www. ncbi. nlm.nih.gov/Structure /cdd/cdd.shtml*. The mutation G to R at position 496 in the tolerant accessions is indicated in red.

All the 69 F2 tolerant plants (26%) were genotyped (A/A), similar to the 'Zamojska 4' tolerant parent, while all the sensitive plants were either heterozygous or homozygous for the sensitive parent allele. The KASP marker was also mapped onto the chromosome 13, between the PT60530 and PT61143 SSR markers, and perfectly co-segregated with the locus controlling tolerance to PVY^N (Figure III-2).

NtTPN1 is an ortholog of the *A. thaliana* AT5G35450 Coiled Coil–Nucleotide Binding site-Leucine Rich Repeat (CC-NB-LRR) resistance gene as well as of the *A. thaliana* AT5G43470 gene. This latter gene is well known under the names *HRT* (Hypersensitive response to TCV), (*RCY1* resistant to CMV-Y) or *RPP8* (Recognition of *Peronospora parasitica* 8) (Cooley *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2002;

Mohr *et al.*, 2010). It encodes a protein of 696 amino acid residues with a molecular weight of 80 kDa. The first exon contains a NB-ARC (APAF-1, R proteins and CED-4) domain and the second exon encodes the Leucine-rich repeats (LRR) region (residues 396 to 562) comprising five imperfect copies of the LRR motif (Figure III-3). The mutation identified in the tolerant accessions maps to the second exon and corresponds to an amino-acid change at position 497 in the third LRR motif, where a Glycine (G) (codon GGG) is replaced by an Arginine (R) (codon AGG) (Figure III-3). The mutation is located in the central region of the LRR repeat, within the 9 amino acids consensus sequence XX(L)X(I)XXXX where L corresponds to the conserved Leucine, I to another aliphatic amino acid (Isoleucine) and X denotes hypervariable amino acids (Cooley *et al.*, 2000). The G to R mutation affects the 6th hypervariable amino acid in the consensus sequence SN(L)X(I)DA**G**V (in bold, in the sequence).

Functional validation of the candidate NtTPN1 gene

In order to validate the role of *NtTPN1* in the tolerance to PVY^{N}-induced veinal necrosis, a tobacco collection of M2 EMS mutants derived from the tobacco line TN90 was screened to identify segregating lines with mutations in the LRR region of the *NtTPN1* gene.

The screening of a total of 2,304 M2 segregating lines allowed the identification of eighteen mutations, mostly C/G to T/A transitions, as expected from EMS-induced mutations. This corresponds to a mutation rate of 1/56 kb for a 444 bp fragment, and a mutation frequency of 0.78% in the total M2 population. This is comparable to the rate found in a previous screen of the same M2 population (Julio *et al.*, 2008), where it ranged from 1/83 to 1/30 kb with a mutation frequency from 0.6 to 1.5%.

Among the 18 identified mutations, 6 are silent (33.33 %) and 12 are missense mutations (66.66 %). No nonsense mutation was identified. Surprisingly, among the missense mutations, 3 were identical (Proline457Leucine, P457L), even if they were found on three different 96-wells plates (Table III-3). Some of the missense mutations were predicted to severely affect protein function, as determined by the Sorting Intolerant From Tolerant (SIFT) program (Ng and Henikoff, 2003), with a score <0.05.

Table III-3. Mutations identified and analyzed in the *NtTPN1* gene among the M2 segregating families of the tobacco TILLING population. Eleven M2 families were assessed for mutation segregation and correlation with PVY^N (RB) biological testing**.**

Mutation	SIFT	Nb plants	Genotype				Phenotype						
			WT	Het	Mut	Chi^2 (1:2:1)	WT		Het		Mut		Chi^2 (3:1)
							Tol	Sen	Tol	Sen	Tol	Sen	
N438=	1	48	10	29	9	0.346	0	10	0	29	0	9	$6.3x10^{-5}$
†P457L	0	36	7	17	12	0.472	0	7	0	17	12	0	**0.25**
Y500=	1	44	17	20	7	0.086	0	17	0	20	0	7	$1.3x10^{-4}$
R506K	1	42	11	23	8	0.667	0	11	0	23	0	8	$1.8x10^{-4}$
P508S	0.02	46	16	26	4	0.030	0	16	0	26	0	4	$9x10^{-5}$
L510F	0.01	48	13	23	12	0.939	0	13	0	23	11	1	**0.74**
S520L	0.72	45	9	26	10	0.567	0	9	0	26	0	10	$1.1x10^{-4}$
G521E	0.28	43	7	23	13	0.390	0	7	0	23	13	0	**0.43**
G532R	0.18	40	14	18	8	0.333	0	14	0	18	0	8	$2.6x10^{-4}$
T549I	0.64	42	12	18	12	0.651	0	12	0	18	12	0	**0.86**
S561L	0.02	38	10	20	8	0.854	0	10	0	20	0	8	$3.7x10^{-4}$

The mutations are numbered according to their position in the amino acid sequence of the NtTPN1 protein. '=' silent mutation. N: Asparagine; G: Glycine; E: Glutamic acid; P: Proline; L: Leucine; S: Serine; R: Arginine; K: Lysine; F: Phenylalanine; T: Threonine; I: Isoleucine; Y: Tyrosine.
SIFT scores between 0 and 0.05 correspond to mutation predicted to affect protein function.
Genotype: WT (homozygous wild-type), Het (heterozygous), Mut (homozygous EMS mutant).
Phenotype: Tol or Sen (tolerant or sensitive to PVY^N-induced veinal necrosis respectively). †This mutation (P457L) was found on three different 96-wells.
Chi^2 (1:2:1): Probability values equal or greater than 0.05 indicate that segregation of the mutation in the observed population was not significantly different from the expected ratio (1WT; 2Het; 1Mut) for a M2 EMS family.
Chi^2 (3:1): Probability values equal or greater than 0.05 indicate that segregation of tolerance in the observed population was not significantly different from the expected ratio (3Sen; 1Tol) for a recessive gene (in bold).

SIFT uses sequence homology to estimate the probability that an amino acid substitution will have a negative effect on protein function. The assumption is that evolutionarily conserved regions tend to be less tolerant to mutations, and hence amino acid substitutions or insertions/deletions in these regions are more likely to affect function. The SIFT score is a normalized probability of observing the new amino acid at that position, and ranges from 0 to 1. A SIFT value of between 0 and 0.05 is predicted to affect protein function.

Eleven of the mutant M2 families were assessed for mutation segregation and correlation with phenotype upon PVY^N (RB) inoculation. Two families used as controls are segregating for silent mutations (N438= and Y500=), while the other 9 are segregating for missense mutations with different SIFT scores (Table III-3).

EMS mutagenesis can affect independently each of the cells from the seed embryo generating reproductive tissues (e.g. two to four ''*germinally effective cells*'' in *Arabidopsis thaliana*) (Henikoff and Comai, 2003). As a consequence, several segregation patterns can be expected in M2 families (1:2:1; 5:2:1; 9:2:1). Capillary Electrophoresis Single-Strand Conformation Polymorphism (CE-SSCP) was used to identify wildtype, heterozygous and homozygous M2 plants and segregation patterns were tested for each family against the 1:2:1 ratio. For ten M2 families, segregation ratios were consistent with one germinally effective cell in tobacco seeds (P>0.05). For P508S, the segregation was different from the expected ratio, with only a low number of homozygous mutants (4/46) (Table III-3).

No significant effect of the mutation was observed in seven M2 families (N438=; S561L; R506K; P508S; Y500=; G532R; S520L), for which all tested plants developed veinal necrosis upon PVY^N inoculation. This includes, as expected, the two populations segregating for silent mutations. In the four other segregating M2 families, tolerant plants which failed to develop veinal necrosis despite being infected by PVY^N were observed, with a segregation ratio of 3 sensitive for 1 tolerant, as expected for a recessive mutation. Such tolerant plants were always homozygous for the mutation (Table III-3). This included a mutation between the second and third LRR (P457L), two mutations in the fourth LRR (L510F and G521E) and one mutation in the fifth LRR (T549I) (underlined in Figure III-S3). For all these

M2 segregating populations, the wild type and the heterozygous plants were all sensitive, and the homozygous mutants were all shown to be tolerant to veinal necrosis (Table III-3), with the exception of a single homozygous mutant plant in the L510F M2 progeny which displayed a necrotic reaction despite displaying a clear L510F homozygous mutation.

Fixed M3 progenies were obtained for the P457L and G521E mutations by selfing homozygous M2 mutants. All tested P457L and G521E fixed M3 plants challenged with PVY^N (RB) showed tolerance to veinal necrosis (Figure III-S4) while accumulating PVY to the same level as the control sensitive genotypes which developed the expected necrosis. The control WT line (wild-type parental TN90 genotype used for the construction of the Tilling population) displayed as expected the veinal necrosis symptoms.

Taken together, these results show that several independent mutations in the LRR domain of the *NtTPN1* gene confer tolerance to PVY^N-induced veinal necrosis, reproducing the infection phenotype observed in the 8 tolerant lines and functionally validating the role of *NtTPN1* in this unusual phenotype.

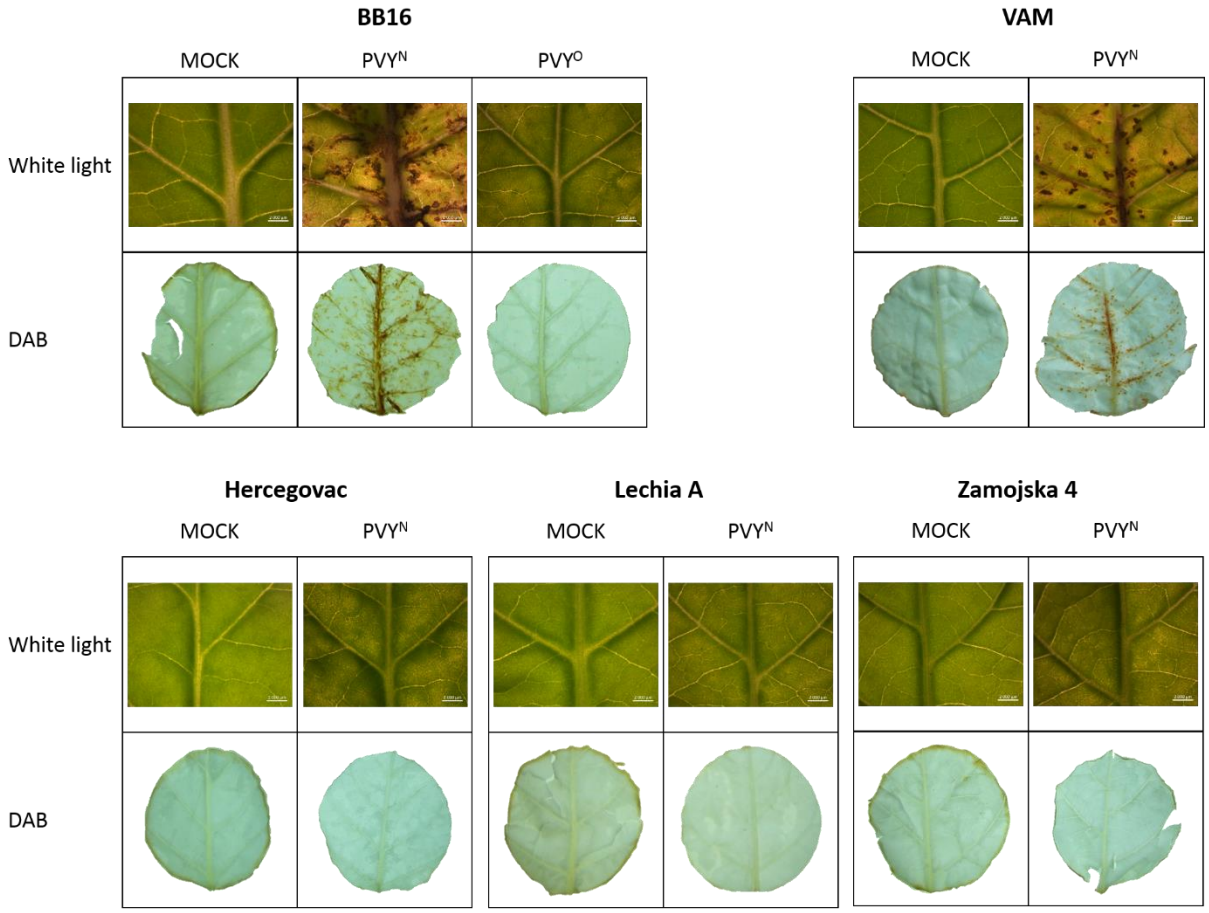
PVY^N-induced veinal necrosis may result from an inefficient defense response with HR-like characteristics

The demonstration that mutations in *NtTPN1*, a gene with all the hallmarks of a resistance gene, abolish the systemic veinal necrosis symptoms induced by PVY^N isolates in tobacco suggests that this necrotic reaction could be molecularly and functionally similar to an *R*-gene-dependent hypersensitive response (HR). In this scenario, veinal necrosis could be considered as a form of HR-like cell death unable, however, to restrict viral infection, therefore resulting in a systemic, run-on necrotic disease phenotype. It would therefore correspond to an active response of tobacco to PVY^N rather than being a passive damage resulting from PVY infection.

To test this hypothesis, we evaluated several parameters frequently associated with plant defense responses and with hypersensitive reaction. We first checked whether fluorescent phytoalexins that accumulate following pathogen attacks in *Nicotiana* species (Chong *et al*., 2002; El Oirdi *et al.*, 2010), are observed in PVY^N-infected leaves. Figure III-S5 shows that under UV illumination a very strong accumulation of autofluorescent compounds is observed in the leaves of the sensitive BB16 and VAM genotypes infected by PVY^N. This accumulation is much stronger in leaf areas displaying veinal necrosis symptoms than in leaf areas displaying slight mosaic symptoms. These autofluorescent compounds accumulate much less when BB16 is infected by a non-necrotic PVY^O (O139) isolate or when the tolerant accessions Lechia A and Zamojska 4 are infected by necrotic PVY^N, while a limited accumulation could be observed in the tolerant Hercegovac accession (Figure III-S5).

The accumulation of reactive oxygene species (ROS), a secondary messenger leading to HR (Lamb and Dixon, 1997), was then monitored using 3,3'-diaminobenzidine (DAB) staining. No brown staining indicative of ROS accumulation occurred in the Hercegovac tolerant accession or in the other two tested tolerant accessions, irrespective of PVY^N infection status (Figure III-4). In contrast, DAB staining was readily detected in the leaves of the sensitive BB16 and VAM genotypes infected by a PVY^N isolate. No brown vein staining occured in healthy leaves or in BB16 leaves infected by a non-necrotic PVY^O isolate (Figure III-4). Similarly, leaves of the P457L and G521E EMS mutants failed to show fluorescent compounds or ROS accumulation during PVY^N infection, demonstrating that the mutants represent a faithful phenocopy of the tolerant accessions in this respect too (Figure III-S4).

Quantitative reverse-transcription PCR was then used to analyze the induction of the *hsr*203J gene, which is a marker gene of HR, correlated to controlled cell death in *Solanaceae* plants (Pontier *et al.*, 1994; Pontier *et al.*, 1998). Our results show that at 15 dpi, an over-expression of *hsr*203J is induced by PVY^N infection in the sensitive tobacco genotypes and in only one of the tolerant accessions (Lechia A).



<u>Figure III-4.</u> DAB staining of tobacco leaves systemically infected with PVY^N (RB) at 30 dpi.
First row: pictures taken under white light. Symptoms close-ups obtained using a large field microscope (Axio Zoom.V16 Zeiss). Second row: leaves treated with DAB. The accumulation of hydrogen peroxide (brown coloration) is present only in the leaves of the sensitive 'BB16' and 'VAM' tobacco infected with PVY^N (RB). PVY^O (O139) is a non-necrotic isolate (negative control). Bars =2 mm.

However, the expression level of *hsr*203J gene was increased by a factor 3.08 to 3.11 as compared to the *RL2* housekeeping gene in the sensitive accessions VAM and BB16, respectively, and only by a factor of 1.58 in Lechia A, whereas there was no over-expression in the two other tolerant accessions, Hercegovac and Zamojska 4 (Figure III-S6A). The same trend was observed using another housekeeping gene (*eF1-alpha*) as reference with respective induction levels factor between mock-inoculated and infected plants of 2.36 to 2.07 (sensitive accessions VAM and BB16) compared to 0.88 to 1.76 in the tolerant ones (Figure III-S6B).

We further evaluated whether the mutation in *NtTPN1* affects the ability of other pathogens to elicit an HR in the tolerant accessions. For this purpose, we used two avirulence factors known to elicit an HR in *N. tabacum*, the capsid protein (CP_{PVX}) of *Potato virus X* (PVX), known to induce a HR dependent on the simultaneous expression of the *Rx* potato NB-LRR resistance gene (Bendahmane *et al.*, 1999), and the AvrA bacterial effector produced by *Ralstonia solanacearum* that is alone sufficient for HR induction in *N. tabacum* (Poueymiro *et al.*, 2009). The three proteins, CP_{PVX}, Rx and AvrA were expressed in leaves of the various tobacco accessions studied here, using an *Agrobacterium*-mediated transient expression assay. Tobacco leaves of the sensitive BB16 and of the tolerant Hercegovac, Lechia A, and Zamojska 4 accessions were infiltrated with *A. tumefaciens* strains containing either pMP25 (2x35S:AvrA construct) or pBIN35S-TK (35S:CP_{PVX} construct) together with pBIN35S-Rx (35S:Rx construct) (Poueymiro *et al.*, 2009; Bendahmane *et al.*, 1999). Within 48h to 120h, the infiltrated areas with both CP_{PVX} and Rx constructs of the four tobacco accessions tested exhibited a typical HR-like response, though weaker in the Hercegovac accession (Figure III-S7). This response was not observed in zones infiltrated with the negative controls (CP_{PVX} alone or Rx alone). Similarly, infiltration with the AvrA expressing construct resulted in a typical HR-like response in all infiltrated tobacco accessions (sensitive and tolerant) (Figure III-S7). These results indicate that the inability to mount a systemic necrosis response upon PVY^N infection possesses at least some degree of specificity and does not reflect a general loss of the ability to develop a HR, whatever the triggering elicitor involved.

3. Discussion

NtTPN1 is an R-like gene that controls PVY^N-induced veinal necrosis in tobacco

PVY^N-induced veinal necrosis in tobacco has been known for many years and forms one of the early and important bases for the identification and categorization of PVY intraspecific diversity (Singh *et al.*, 2008). It is also a symptom with a major agricultural impact, being responsible of much more severe losses than the mosaic symptoms caused by infection with non-necrotic isolates (Latorre *et al*., 1984; Rolland *et al.*, 2009; Faurez *et al.*, 2012). Furthermore, in a recent study aiming at reconstructing the ancestral traits and evolutionary history of PVY, Moury (2010) suggested that the ability to induce veinal necrosis in tobacco is an ancestral PVY state.

In the present study we showed that the absence of PVY^N-induced veinal necrosis in eight tobacco accessions is conferred by a mutation in a single recessive gene, *NtTPN1*. These eight accessions originate from eastern European countries (Poland, Yugoslavia or Hungary) (Delon *et al.,* 1999) and, according to phylogenetic studies performed using SSR or SNPs markers, are closely related (data not shown). On the contrary, two other tolerant accessions, Bahia and Bresil Bahia are Dark air-cured tobacco accessions originating from Brazil, with no evidence of common origin with the other 8 tolerant accessions. Although they also appeared to be tolerant to PVY^N-induced veinal necrosis, these two accessions were not addressed in the present study because *i*) when infected by PVY^N (RB) they displayed symptoms of discoloration leaf spots different from the light mosaic observed in the other eight accessions and *ii)* the heredity of the tolerance in Bahia was apparently more complex or showed a distortion of segregation. Analysis of RNA-Seq data (Julio *et al.*, 2014) shows that neither Bahia nor Bresil Bahia carries any mutations in the coding region of *NtTPN1*.

The mutated gene identified in the other 8 tolerant accessions was named *NtTPN1* for *"Nicotiana tabacum* Tolerance to PVY-induced Necrosis1". This gene is an ortholog of an *Arabidopsis thaliana* gene belonging to the *HRT/RPP8* family of resistance genes. The *HRT* and *RCY1* genes provide resistance to viral pathogens, *Turnip crinckle virus* (genus *Tombusvirus*) and *Cucumber mosaic virus*

(genus *Cucumovirus*) in the Dijon 17 and C24 ecotypes of Arabidopsis, respectively (Cooley *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2002). Another homolog, *RPP8* (resistance to *Peronospora parasitica*) confers resistance to mildew in Arabidopsis (Cooley *et al.*, 2000; Mohr *et al.*, 2010). In the NCBI database, the *NtTPN1* sequence matches with the accession XM_016604757.1, a *Nicotiana tabacum* putative late blight resistance protein homolog named R1B-16 (LOC107783738). The first exon of *NtTPN1* gene contains a NB-ARC domain and the second exon displays the LRR region (residues 396 to 562) comprising five imperfect copies of the LRR motif. The NB-ARC domain is a signaling motif shared by plant resistance gene products and regulators of cell death in animals (Van der Biezen and Jones, 1998). The recessive *NtTPN1* allele carries a mutation in the third predicted LRR repeat and confers tolerance to PVY^N-induced veinal necrosis whereas the dominant allele, without the mutation, confers sensitivity to veinal necrosis. The G to R mutation is located in the 9 amino acids consensus sequence XX(L)X(I)XXXX [SN(L)V(I)DA**G**V] where L corresponds to the conserved Leucine and I to another aliphatic amino acid (Isoleucine) and X denote hypervariable amino acids (Cooley *et al.*, 2000).

From a structural point of view, the replacement at position 497 of a small hydrophobic glycine (G) by a larger basic Arginine (R) has the potential to impact the LRR domain three-dimensional folding. Analysis of the LRR domain of the NtTPN1 protein (residues 396 to 562) with I-TASSER (http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/), predicted this region to consist of intertwined beta strands, with the G497 or R497 amino acids located in a loop, between two adjacent beta strands. However, according to the predictions (Figure III-S8), no drastic 3D structural change is expected from this mutation, and neither G497 nor R497 amino acids are predicted to be exposed at the surface of the molecule so that the mutation could interfere with interaction of the NtTPN1 protein with potential ligands.

Functional assays using EMS mutants in the *NtTPN1* gene confirmed the role of this candidate in tolerance to PVY^N-induced necrosis. Indeed, we showed that 4 independent mutations confer the absence of veinal necrosis phenotype. It is highly unlikely that another mutation present in the four corresponding M2 families could be responsible for the observed phenotype. The only one exception

was that among the 12 homozygous mutant plants in the L510F M2 progeny, only one plant displayed a necrotic reaction despite displaying a clear L510F homozygous mutation.

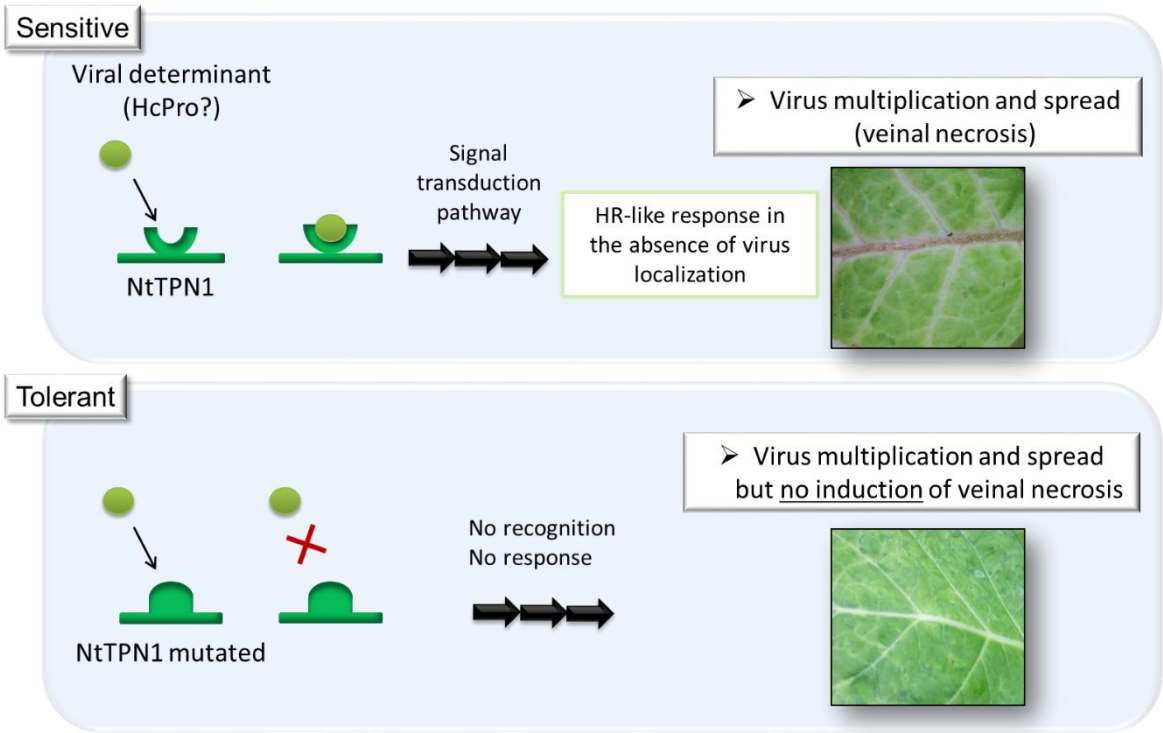


Figure III-5. Potential role of the *NtTPN1* gene in PVY^{N}-induced veinal necrosis in tobacco.

PVY^N-induced veinal necrosis in tobacco: an inefficient defense response with HR-like characteristics?

The demonstration that mutations in *NtTPN1*, a gene with all the hallmarks of a resistance gene, abolish the systemic veinal necrosis symptoms induced by PVY^N in tobacco suggests that this necrotic reaction could be molecularly and functionally similar to *R*-gene-dependent hypersensitive response. In several plant-pathogen pathosystems involving an NB-LRR gene, mutations in the LRR domain have been shown to impact the avirulence factor recognition specificity or efficiency. Following the same logic it is therefore possible to propose a model in which PVY^N-induced veinal necrosis results from an active plant defense reaction triggered by *NtTPN1* upon recognition of a PVY^N-specific elicitor (Figure III-5). In this model, the veinal necrosis symptoms elicited by PVY^N in the majority of tobacco accessions (*NtTPN1* wild-type) would be the consequence of a vascular tissue-specific induction of defense responses associated with the induction of programmed cell death (PCD). The recent review of Künstler *et al.* (2016) summarizes the concept of a "continuum of host responses ranging from resistance lacking cell-death (extreme resistance), through "micro-HR" and HR, "systemic HR" and total susceptibility" (over time, depending on the speed of resistance), a concept developed before by Bendahmane *et al.* (1999) and Cooley *et al.*(2000). In this scenario, veinal necrosis could be considered as a form of HR-like, tissue-specific cell death unable however to restrict viral infection, resulting from an active response of tobacco to PVY^N rather than being a passive damage resulting from PVY infection.

This model is supported by the results obtained when testing whether some characteristics of HR are induced in the sensitive accessions but absent or limited in the tolerant ones. In particular, our results clearly showed an accumulation of reactive oxygen species (ROS) revealed by DAB staining only in the sensitive PVY^N-infected BB16 and VAM tobacco plants. On the contrary, the leaves of the three tolerant accessions remained unstained, similar to PVY^O-infected sensitive control plants. Similarly, accumulation of fluorescent compounds corresponding potentially to phytoalexins was clearly observed in the PVY^N-infected leaves of the sensitive controls BB16 and VAM but a much lower fluorescent signal was observed in the leaves of Lechia A and Zamojska 4 tolerant accessions, similar to the signal background observed in PVY^O-infected sensitive 'BB16'. Although we observed some slight

fluorescent signal in the Hercegovac accession in at least two independent experiments, no brown staining indicative of ROS accumulation occurred in the same leaves. Whether the light fluorescent signal observed in the 'Hercegovac' leaves in the absence of necrotic symptoms is due to a small level of accumulation of phytoalexins is still unclear.

The reverse transcription quantitative PCR analysis of the steady-state levels of *hsr*203J transcripts in PVY^N-infected plants showing the absence of induction or much lower accumulation of the *hsr*203J transcripts in the tolerant accessions compared to the BB16 and VAM also strongly supports the proposed model (Figure III-5).

In our study, the veinal necrosis symptoms induced on the sensitive tobacco accessions correspond to a particular phenotype with tissue specificity. We still do not know whether *NtTPN1* expression is tissue-specific and PVY infection localized to the parenchyma cells neighboring veins, or in the mesophyll cells in the leaves displaying veinal necrosis symptoms. This kind of HR occurring at tissue levels and especially necrosis along the veins was previously described in a lesion mimic *Arabidopsis* mutant *vad1* (Lorrain *et al.*, 2004). Cell death in the *vad1* mutant was induced spontaneously in a light-dependent manner near vascular bundles. Because of the generation of reactive oxygen species (ROS), accumulation of SA, and defense-related gene expression, this cell death along veins was considered to be an HR-like PCD.

The closest parallel to *NtTPN1* could potentially be the TuMV-induced veinal necrosis conditioned by the *TuNI* locus (*TuMV necrosis inducer*) in *Arabidopsis thaliana* (Kim *et al*., 2008). Besides the tissue specificity, other features of the *TuNI*-induced necrosis, such as correlation of both SA and ethylene with activation of cell death and expression of defense-related genes, were shown to be similar to those in the *vad1* mutant (Bouchez *et al.*, 2007; Lorrain *et al*., 2004). Kaneko *et al.* (2004) performed a fine mapping of the *TuNI* locus and discussed the possibility that *TuNI* might function as an *R* gene. Later on, Kim *et al.* (2010) identified the TuMV symptom determinant interacting with *TuNI* as the P3 viral gene.

Other examples of systemic necrosis symptoms induced by viruses that are molecularly and functionally similar to an R-gene-dependent HR

The bibliography on systemic necrosis induced by viral infections in susceptible plants is quite limited, contrarily to the large number of studies on HR induced during incompatible plant–virus interactions (HR-mediated resistance). Unlike HR-associated local lesions, systemic necrosis manifested later in the infection in the upper non-inoculated leaves, usually does not impede virus multiplication nor its systemic movement (Mandadi and Scholthof, 2013). As an example, Király *et al.* (1999) showed that the systemic cell death induced in *Nicotiana clevelandii* by *Cauliflower mosaic virus* (CaMV, genus *Caulimovirus*) results from the interaction between a single recessive host gene (not yet identified, designated *ccd1*, for '*CaMV cell death gene*') and the CaMV gene VI product. In this paper, the authors show that the CaMV isolate inducing systemic necrosis symptoms accumulates to the same level in necrotic and non-necrotic hosts, a situation that parallels the observations reported here for PVY.

There are several other cases in which particular plant-potyvirus interactions result in systemic necrosis, suspected to result from inappropriate or incomplete plant defense reactions. Such is the case for example for the *Clover yellow vein virus* (ClYVV)-induced systemic cell death in pea that may be regulated by a single incompletely dominant gene *Cyn1* (*Clover yellow vein virus-induced necrosis*) (Atsumi *et al.* 2009). Using synteny studies, Ravelo *et al.* (2007) reported that *Cyn1* mapped in the pea chromosome region corresponding to a resistance-gene analog cluster in *Medicago truncatula*, a model legume. Atsumi *et al.* (2009) also showed that ClYVV infection induced HR-related gene expression in cell-death-expressing tissues, suggesting that ClYVV-induced systemic cell death is regulated by an *R*-gene-mediated pathway, and that *Cyn1* may represent a weak resistance gene to ClYVV, or that ClYVV expresses weak elicitor molecules (Ravelo *et al.*, 2007). *R* genes have also been associated with HR and systemic HR (SHR) phenotypes in TuMV-infected Brassica species, including *TuRBJU 01* in *Brassica juncea* (Nyalugwe *et al*., 2016*a*; Nyalugwe *et al*., 2016*b*).

Another dominant gene controlling systemic cell death induced by a potyvirus was described by Hajimorad *et al.* (2005). In soybean, the *Soybean mosaic virus* (SMV) G7 strain systemically infects the PI96983 line and induces an SHR controlled by a single dominant gene *Rsv1*. Interestingly, the *Rsv1* allele of PI 96983 is tightly linked to a cluster of NB-LRR genes, suggesting that SMV-induced SHR is initiated by *R*-mediated recognition (Hajimorad *et al.*, 2005). Recently Chen *et al.* (2017) identified the eukaryotic translation initiation factor 5A as a key element in *Rsv1*-mediated lethal systemic hypersensitive signaling pathway.

Besides plant-potyvirus pathosystems, genes mediating HR in an incompatible interaction that also mediate systemic necrosis in compatible infections, were described for potexviruses (Komatsu *et al.*, 2010). Indeed, necrotic symptoms induced by the *Plantago asiatica mosaic virus* (PlAMV) require host factors involved in HR induction, and have HR-like characteristics which suggests that still unidentified NB-LRR-type R proteins may be involved in PlAMV-induced systemic necrosis (Komatsu *et al.*, 2010).

Could PVY HcPro trigger plant defense mediated by NtTPN1?

Little is known about whether viruses that induce systemic necrosis also encode an elicitor protein in their genome, as do HR-inducing viruses. Our hypothesis is that the systemic veinal necrosis symptoms in tobacco are induced by a direct or indirect interaction between the *NtTPN1* gene product and a viral elicitor, with HcPro being a strong candidate. Indeed, HcPro was shown to be a necrosis determinant in tobacco (Tribodet *et al*., 2005; Faurez *et al.*, 2012) and the SNP mutation in *NtTPN1* conferring tolerance to veinal necrosis is located in a potential elicitor-recognition site of the *R*-gene, *i.e.* in one of the LRR motifs. Experiments performed with the recombinant PVY^{OHCN} (non-necrotic PVY isolate encoding a necrotic HcPro) and PVY^{NHCO} (necrotic PVY isolate encoding a non-necrotic HcPro) constructs described in Moury *et al.* (2011), showed that PVY^{OHCN} induced veinal necrosis in the sensitive accession, but not in the tolerant accessions, whereas PVY^{NHCO} did not induce any necrosis in either the sensitive or the tolerant ones (data not shown). This confirms that PVY HcPro harbors the necrosis determinant on tobacco, and that in the tolerant accession, this necrosis is not induced

anymore, even during PVY^{OHCN} infection. Furthermore, our data also show that a functional HR can still be mounted in the *NtTPN1* mutants, as a mutation in *NtTPN1* locus does not affect the ability of other pathogens to elicit the HR in the tolerant accessions. The mutation in the LRR region of *NtTPN1* probably affects an early step of viral elicitor recognition and not downstream signal transduction steps involved in HR, so that is appears to be specific to the PVY-tobacco pathosystem.

The potyviral HcPro protein was previously shown to act as an elicitor of *R* gene-mediated defense in some host plants. Indeed, in potato cultivars carrying the dominant resistance genes *Nctbr* and *Nytbr,* the PVY-HcPro was shown to induce an HR that restricts PVY to necrotic local lesions (Moury *et al.*, 2011; Tian and Valkonen, 2015). It must be pointed out that the PVY avirulence determinants of *Nytbr* are different from those that are responsible for veinal necrosis induction in tobacco (Tian and Valkonen, 2015). Interestingly, Haikonen *et al.* (2013) showed that a *Potato virus A* (PVA) with mutations in the central part of HcPro induced necrotic symptoms on tobacco, impairing interactions with a microtubule-associated protein (HIP2), which leads to a reduction of viral accumulation and to induction of many defense-related genes at necrosis onset (Haikonen et al., 2013).

Our preliminary data suggest that *Agrobacterium*-mediated transient overexpression of PVY^{N}-HcPro in the sensitive BB16 and VAM tobacco accessions does not elicit any HR reaction (data not shown). This suggests that HcPro alone is not sufficient to elicit an HR and must be expressed in a viral context to induce the veinal necrosis symptoms, as pointed out by García and Pallás (2015) for other viral pathogenesis determinants. On the other hand, it is possible that HcPro needs to be expressed specifically in the vascular tissues or nearby, to induce veinal necrosis symptoms.

For another potyvirus, SMV, both the helper-component proteinase (HcPro) and P3 cistrons can serve as avirulence factors recognized by *Rsv1 i*n soybean, that likely belongs to a NB-LRR class (Hajimorad *et al.*, 2005; Eggenberger *et al.*, 2008; Wen *et al.*, 2013). Interestingly, Hajimorad *et al.* (2005) showed that a SMV isolate overcoming the resistance conferred by *Rsv1* locus, caused a lethal systemic HR probably due to a weak interaction of the viral avirulence factors and the host resistance factor.

4. Concluding remarks

To date, the main strategy used by tobacco growers to limit yield losses induced by PVY^N isolates is the deployment of the recessive resistance gene *va*. However, *va*-overcoming, necrotic PVY isolates are frequently observed worldwide. In this study, we report the identification of a *va*-independent new mechanism conferring tolerance to PVY^N-induced veinal necrosis and effective even against *va*-breaking isolates. The identification of *NtTPN1* opens novel breeding options by pyramiding the mutated allele with the *va* resistance allele, to minimize the impact of the emerging and so far uncontrolled *va*-breaking necrotic PVY isolates.

5. Experimental procedures

Plant material, virus isolates and PVY assays

All the tobacco accessions cited in this paper are part of the Imperial Tobacco germplasm collection (*http://www.imperialtobaccoscience.com/index.asp?pageid=29*). Screening of response to PVY infection was performed on 162 tobacco accessions as described in Julio *et al.* (2014). Tobacco plants were grown in a greenhouse at 22°C (with fluctuations from 18°C to 26°C) with a 14h/10h (light/dark) photoperiod.

The PVY isolates used in this study can be distinguished according to their capacity to elicit necrotic phenotypes in tobacco. The PVY^O O139 isolate belongs to the PVY^O group ("original or ordinary") that gathers isolates that fail to elicit veinal necrosis in tobacco, whereas PVY^N (11.08), PVY^N (N605), PVY^N (10.26) and PVY^N (RB) belong to the PVY^N group and induce vein necrosis symptoms in tobacco. The PVY^N (RB) is a *va*-resistance-breaking (RB) variant of PVY (10.26) that contains an amino acid mutation Lysine to Glutamic acid (K105E) at position 105 in the Viral Genome linked protein (VPg) (Janzac *et al.*, 2014). Other necrotic PVY isolates listed in Table III-S1 belong to other groups (Quenouille *et al.*, 2013), in particular, to the NTN or N-Wi groups gathering recombinants between PVY^O and PVY^N isolates (Kehoe and Jones, 2015). Control tobacco lines used in this study that display vein necrosis symptoms when infected by PVY^N isolates are: *N. tabacum* cv. Xanthi, BB16 (*VA*/*VA*, PVY-susceptible), VAM and TN90 (*va*/*va* PVY-resistant).

The presence of PVY in systemic sampled tobacco leaves was determined 30 days post-inoculation (dpi) using double antibody enzyme-linked immunosorbent assays (DAS-ELISA) (Clark and Adams, 1977). ELISA tests were performed with the Bioreba Complete Kit 480 (*Potato virus Y* polyclonal) according to manufacturer instructions.

Heredity and allelism tests

In order to check whether the lack of PVY^N-induced necrosis is governed by a recessive or dominant locus, crosses were performed between each of the 10 accessions tolerant to PVY^N and a sensitive variety. Depending on available seeds from previous crosses at Imperial Tobacco Bergerac (ITB), the sensitive genotype used in the crosses was either 'Yellow Special', 'Virginia 115', 'Coker 347' or 'NOD'. Twelve F1 plantlets per cross were tested with PVY^N (RB). In order to check whether the lack of PVY-induced necrosis is governed by the same locus in the ten accessions, allelism tests were carried out in seven F1 progenies of 11 or 22 plants each (Table III-S3).

RNA-Sequencing data

RNA-Sequencing data used are the same as described in Julio *et al.* (2014). Briefly, the assembly libraries of 162 tobacco varieties were prepared by mixing equal quantities of total RNAs similarly extracted from leaves, stems and roots of 5 week old plantlets, and from mature plants before and after topping (removal of inflorescence just before tobacco flowering). mRNA libraries were prepared according to the TruSeq RNA Sample Prep Kit v2 (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Libraries were sequenced on an Illumina Hi-Seq 2000 (2 x 100 nt) with barcodes. Four libraries per Illumina lane were sequenced. The reads were mapped onto the candidate TN90 genomic super-scaffolds (Sierro *et al.*, 2014) available on the Sol Genomics Network using the CLC Genomics Workbench v5.5 software with the following parameters: length fraction = 1; similarity fraction = 0.97.

Linkage mapping and cloning of PVY tolerance factor

The first linkage mapping was performed on a F2 population of 87 individuals derived from a cross between two flue-cured tobacco genotypes, 'Lechia A' (tolerant) and 'Virginia 115' (sensitive). A second step of linkage mapping was performed on another F2 population of 264 individuals derived from a cross between two others flue-cured tobacco genotypes, 'Zamojska 4' (tolerant) and 'Yellow Special' (sensitive). For both progenies, plantlets were tested for PVY resistance with PVY^N (RB) as described above.

SSR markers originating from the *N. tabacum* linkage map were used to screen F2 plants (Bindler *et al.*, 2011). Total genomic DNA was isolated with a DNeasy Plant Mini Kit from Qiagen. The Type-it® Microsatellite PCR Kit from Qiagen was used to multiplex SSRs, according to manufacturer instructions. SSR primers were prepared as follows: the sequence-specific forward primer (SSR-Fw) conjugated with tail at its 5' end; the sequence-specific reverse primer (SSR-Rev) conjugated with tail at its 5' end (Table III-S4). The PCR mix contains these primers in addition to the FAM labeled primer or the VIC labeled primer (Table III-S4). Marker amplification was conducted with the following program, with adjustment on melting temperature according to the multiplex: 95 °C for 5 min, 35 to 40 cycles of 95 °C for 30 s, 58-64 °C for 90 s, 72 °C for 1 min, followed by 30 min at 60 °C. Samples were analysed on ABI3130xl Genetic Analyzer with POP-7™ Polymer (Applied Biosystems) using GeneMapper® v4.0. Segregation and grouping of markers were performed with the JoinMap® 3.0 program (Van Ooijen and Voorrips, 2001) with the default parameters, using the Kosambi mapping function.

Identification of candidate scaffold and gene

The sequence of SSR markers surrounding the *NtTPN1* locus was used for blast mapping on the TN90 superscaffolds available on Sol Genomics Network (*ftp://ftp.solgenomics.net/genomes/Nicotianatabacum/assembly/*) according to Sierro *et al.* (2014). Primer sequences were retrieved from the supplementary data of Bindler *et al.* (2011). The SSR used in our study are PT30028, PT61396, PT61239, PT54957, PT61606, PT60530, PT53054 and PT61143. Blast was performed with the Blast function of CLC Genomic Workbench. After identification of the candidate super-scaffolds, RNA-Seq data of the 162 varieties initially used for resistance screening was obtained and used to map reads using the CLC Genomics Workbench v5.5 software with the following parameters: length fraction = 1; similarity fraction =0.97.

PCR amplification and sequencing of the candidate *NtTPN1* gene

The region corresponding to exon 2 in the *NtTPN1* gene was amplified with the following primers: RPP8-Fw and RPP8-Rev (Table III-S4). PCR was carried out in a 20 µl volume containing 50 ng of DNA (tobacco varieties or EMS M2 pooled mutants), 0.1 U AmpliTaq® Polymerase (Applied Biosystems), 1X AmpliTaq buffer, 0.125 mM dNTPs (Applied Biosystems), 100 ng of each primer. The amplification was conducted using a thermal cycler (SimpliAmp®, Applied Biosystems) as follows: 40 cycles of 94 °C for 30 s, 62 °C for 45 s, 72 °C for 1 min, followed by 7 min at 72 °C for final extension. The amplicon of 444 bp was further sequenced to confirm its identity. PCR products were purified with QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) before cloning into pGEM-T (Promega, Madison, USA). Ten clones per tobacco variety and EMS mutant were sequenced, using the BigDye® Terminator Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems) and analysed on ABI3130 (Applied Biosystems).

SNP genotyping in the segregation population by KASP technology

The KASP™ genotyping technology was used to design SNP primers around the SNP (LGCgenomics, UK) targeting the causal *NtTPN1* polymorphism. One PCR reaction is composed of 50 ng of DNA, KASP Assay Mix 0.07 µl, 2x KASP Master Mix 2.5 µl and H_2O qsp 5 µl. PCR was conducted on a MX3000 (Stratagene) with the following program: 95 °C for 15 min, and 10 cycles of 94 °C for 20 s, 61-55 °C for 60 s (dropping 0.6°C/cycle), and 26 cycles 94°C for 20 s, 55°C for 60 s. It is followed by a second step of recycling (1 to 3 cycles): 94°C for 20 s, 57°C for 60 s.

EMS mutant collection

The EMS mutant collection used to detect mutations in the *eIF4E* gene was developed from seeds of a Burley line, cv. TN90 (*va*/*va*) as described in Julio *et al*. (2014). The mutant DNA collection consists in 24 96-well plates, each well containing a pool of 8 M2 segregating plants (one M2 family per well). The same collection was used to identify *de novo* mutation(s) in the *NtTPN1* candidate gene. M2 plants segregating for the identified mutation were either used directly for PVY tests or self-pollinated to generate M3 plants homozygous for the mutation. Since the *va* gene in TN90 conferred

resistance to PVY^N (10.26) but not to PVY^N (RB), the TN90 mutant M3 lines, fixed for the mutation, were later challenged with PVY^N (RB).

PCR amplification for detection and characterization of EMS mutants

The primers used to screen for mutation in the region corresponding to exon 2 in the *NtTPN1* gene (see above) were modified by adding a 5' label FAM or VIC on forward and reverse RPP8 primers respectively (Table III-S4), and used to screen a total of 2,304 M2 segregating lines. Screening of the mutant collection was carried out as described in Julio *et al*. (2014).

Transient expression of avirulence factors to induce HR

Tobacco leaves were infiltrated with *A. tumefaciens* GV3101pMP90RK containing pMP25 (a CaMV 2x35S: avrA construct) (Poueymiro *et al*., 2009) or with *A. tumefaciens* C58C1pM90 containing pBIN35S-TK (CP_{PVX}) and pBIN35S-Rx (Rx) plasmids (Bendahmane *et al.*, 1999). Agrobacteria were grown in LB medium containing appropriate antibiotic at 28°C under agitation (200 rpm) and overnight. Cells were pelleted at 4,000 rpm, resuspended in infiltration medium (10 mM MgCl2, 10 mM 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, and 150 µM acetosyringone), and incubated for 2 h at room temperature in dark condition. Resuspended bacterial cells were infiltrated into leaves of 4-week-old tobacco plants at an OD_{600} = 0.4 with a 1 ml needleless syringe.

Analysis of *hsr*203J gene expression by quantitative RT-PCR

Total RNA extraction was performed from mock (buffer inoculated) and PVY^N (RB) infected plants. Fifteen days post-inoculation, sampling of 1 cm^2 of foliar tissue around the main vein was performed. Twelve independent plants for each condition (mock or infected) were sampled in two independent experiments. Samples from four plants were combined for RNA extraction and cDNA synthesis. Samples were ground with mixer mill (Retsch) in -80°C and total RNA was isolated using the NucloSpin® RNA plant Kit (Macherey Nagel). The RNA obtained was treated once again by Dnase I with TURBO DNA-free™ Kit (Invitrogen, Thermo Fischer Scientific) and concentration (and purity) was

determined by measuring absorbance at 230, 260 and 280 nm in a microplate UV-Vis spectrophotometer (EPOCH™ BioTek instrument). The total RNA was adjusted to 50 mg/mL and was reverse transcribed according to the manufacturer's instructions using the RevertAid H Minus enzyme (Thermo Scientific) and oligo(dT) primers , according to the manufacturer's instructions. cDNA was used to perform the real-time quantitative RT-PCR on the Light Cycler 480 Instrument II (Roche), using the Light Cycler®480 SYBR Green I MASTER Kit (Roche). The PCR mixture included per well 10 µL of Master mix, 0.6 µL of each primer (0.3 mM) (Table III-S4), 3.8 µL of H_2O and 5 µL of cDNA. Thermal cycling conditions were as follows: 15 s at 95 °C followed by 40 cycles of 5 s at 95 °C, 20 s at 57 °C and 30 s at 72 °C. The quantitative RT-PCR assays of *hsr*203J (GenBank AB091430) were performed on cDNA samples. The average values were normalized to the expression of two reference genes: *RL2* (*60S ribosomal protein L2*, GenBank X62500) and *ef1-alpha* (*elongation factor 1-alpha*, GenBank XM_009784954). The relative expression level (fold induction) compared to mock condition for the BB16 genotype was calculated with the formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ as described (Schmittgen and Livak, 2008; Qin et al., 2012). Values statistically different when comparing the expression level of *hsr*203J between mock-inoculated versus infected condition were verified by analysis of summary rank with the Wilcoxon-Mann-Whitney test with the R v 3.2.5 software.

Bioinformatics tools

The expected effects of nucleotide changes on protein functionality in the EMS mutants was estimated using the CODDLE program (Till *et al.*, 2003). SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant) scores were obtained using the SIFT program. SIFT scores < 0.05 are predicted to be deleterious to the protein (Ng and Henikoff, 2003). The I-TASSER (known as 'Zhang-Server') was used to predict the structure of the LRR domains of NtTPN1 (*http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/*) (Yang *et al.*, 2015).

Cell death assays

The production of ROS known as oxidative burst was visualized *in situ* through the polymerization of 3,3-diaminobenzidine (DAB) coming into contact with hydrogen peroxide in the presence of

peroxidases (Thordal-Christensen *et al*., 1997). DAB is oxidized by H_2O_2 in the presence of peroxidases to generate a dark brown precipitate, exploited as a stain to detect the presence and distribution of hydrogen peroxide in plant cells. Staining of tobacco leaf disks with DAB was performed as described in Daudi and O'Brien (2012).

Accession numbers

RPP8-like orthologs in Solanaceae species Sequences were obtained by Blastp in NCBI database: *N. tabacum* = *NtTPN1* candidate gene; *N. sylvestris* = XP_009787580.1; *C. canephora* = CDP_19728.1*; S. tuberosum* = XP_015166619.1; *C. annuum* = XP_016542535.1; *S. pennellii* = XP_015076352.1; *S. lycopersicum* = XP_004233876.2; *hsr*203J = AB_091430; *RL2* = X62500; *ef1-alpha* gene = XM_009784954.

Acknowledgments

This work was performed in the framework of an ARN-INRA project 2014-2017 (Association pour la recherche sur les Nicotianées- Institut National de la Recherche Agronomique). Vincent Michel was supported by an ARN-PhD-fellowship. We thank Nemo Peeters for providing the pMP25 construct. We thank Jean-Luc Gallois for very fruitful discussions and Coralie Chesseron for taking care of the plants.

6. Supporting information

6.1. Supplemental figure

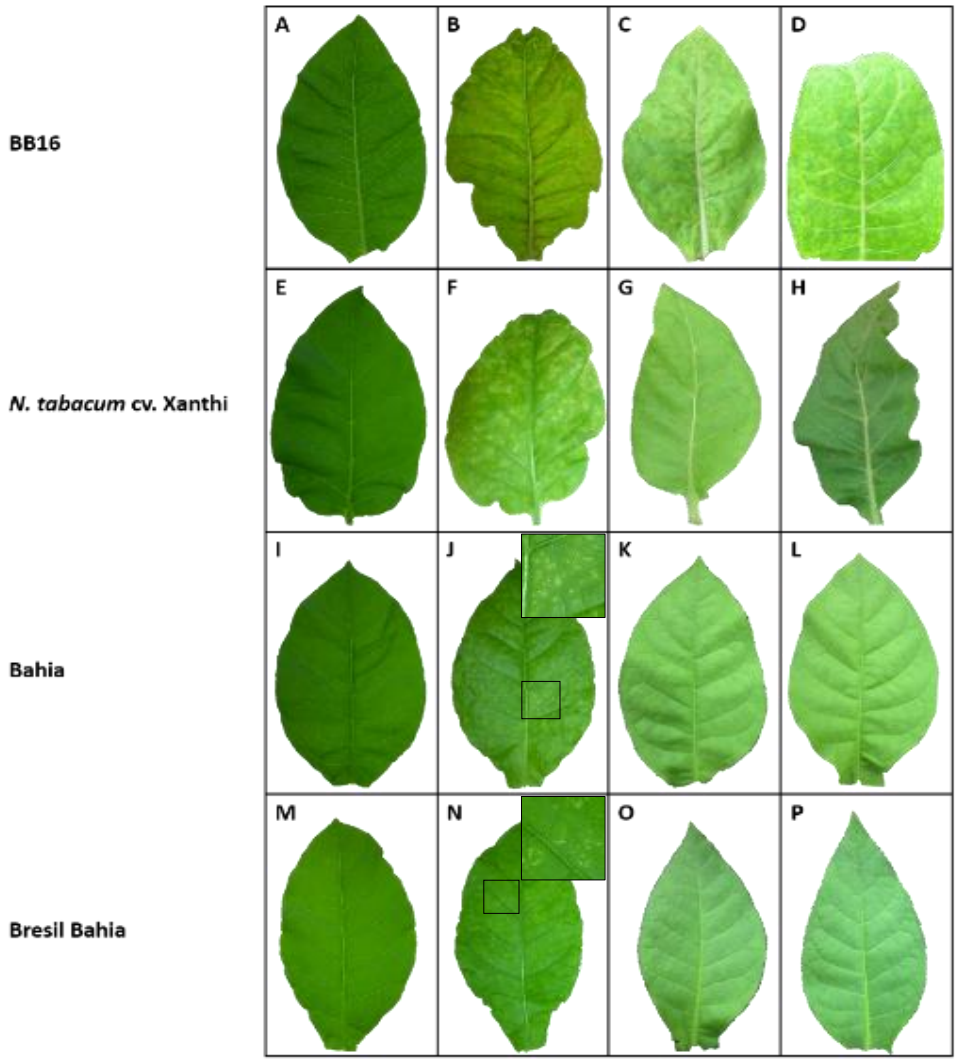


Figure III-S1. Symptoms induced by various PVY^N isolates on the tolerant accessions Bahia and Bresil Bahia and on the sensitive controls *N. tabacum* cv. Xanthi and BB16, 21 dpi. A, E, I, M: healthy plants (mock-inoculated). **B, F, J, N** = PVY^N isolate RB systemically infected leaves. **C, G, K, O** = PVY^N isolate 11.08. **D, H, L, P** = PVY^N isolate 10.26.

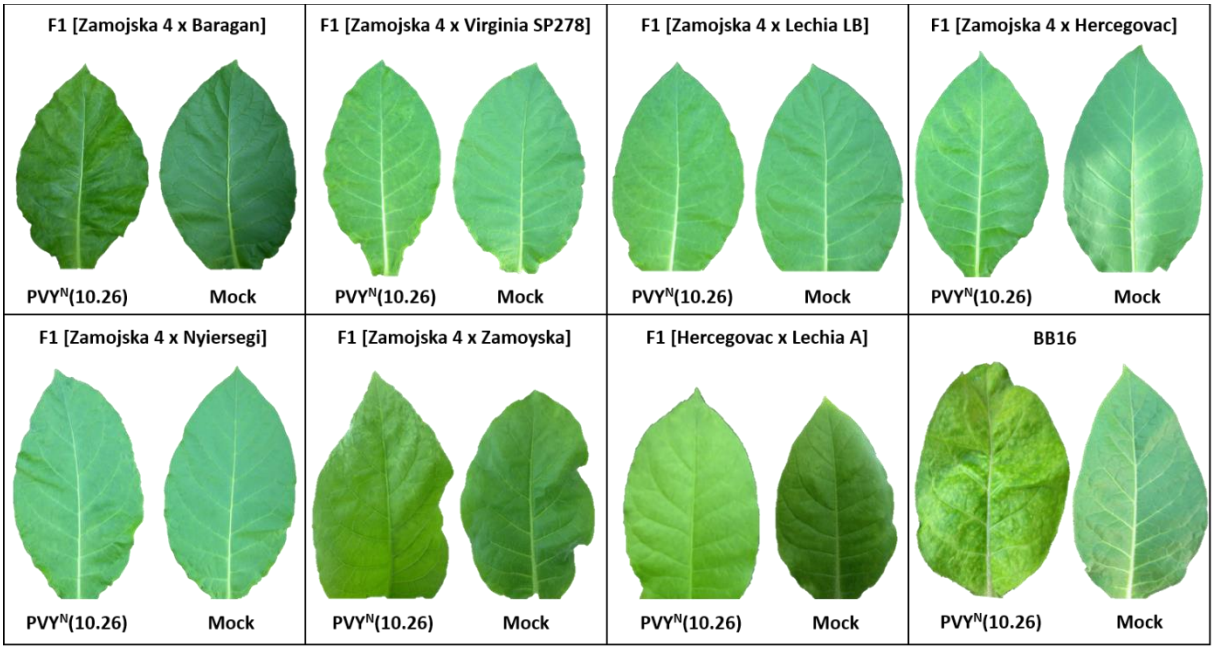


Figure III-S2. Symptoms induced by PVY^N isolate 10.26 on plants of F1 progenies of crosses between various tolerant accessions, 30 dpi.

```
N. tabacum      LDLAKSWEN- LRVLDLSSVK LHKTHVDALR YLIHLKYLEL QLPSDYIPYT
N. sylvestris   LDLAKSWKN- LRVLDLSSVK LHKTHADALR YLIHLKYLEL QLPSDYTSYT
C. canephora    SFIFENFKL- LRVLDLECIN MGYSFPTGVL VLVGLRYLAL CGDIDSIPAS
S. tuberosum    SPICLGFRL- LRVLDLGCIN VGNSFPRDIE LMVLLRYLSL QGNMRSVPST
C. annuum       SFIFDSFKL- VKVLDLESFN IGGTFPSEVE SLIHLRYFAV QTYANSIPSF
S. pennellii    AFTSDLFKLS LTVLDLRNTV IDASALEDIT SLIHLRYLSI FGNFSEIPPA
S. lycopersicum VFSSDLFKLS LTVLDLRNIM IDASALEDIT SLIHLRYLSI FGNFSEIPRA

                N438=                P457L
N. tabacum      ICNLKELETF IATGVYHKSC IPNSIWGMTS LRHLHISTLY T---------
N. sylvestris   ICNLKELETF IATGVYHKSC IPNSIWGMTS LRHLHISTLY T---------
C. canephora    ITHLQNLETL LVKGLKGRIL LPYAIWNMEK LRHLHVKNYA TITLQD--GE
S. tuberosum    IFKLIYLETF LLKAFKGEVC LPYTIWTLSK LRHLHIDARA VFGLDG--YN
C. annuum       IAKLRNLETF VVRGLGGEVI IPSSILKMVK LRHLLVKDRA SFSLQGNMGE
S. pennellii    ISNLTNLETF VARPKSGTLT LPGSIWDMIN LKHVDTSEAM I-FNSTVEVE
S. lycopersicum ISNLTNLETF VARPKSGTLT LPRSIWNMIN LKHVYITEAM IHFNSTVEAG

                                                P508S
                                SNP     Y500=   R506K   L510F
N. tabacum      SQILEDLDNL KTCSNLVIDA G----VYYQN LMKRLPNLEK LSCRLCG---
N. sylvestris   SQILEDLDNL KTCSNLVIDA G----VYYQS FMKRLPNLEK LSCRLCG---
C. canephora    STIFPEVLNL VSLSSPYLLY G----IGIEN IMRRLVKLRK LRCLFSE---
S. tuberosum    GWNLILLENL QTVSTPSLIY EKDRTMDPNE VMRRLANLRK LRCISM----
C. annuum       SFSNSQLDYL ETFSTPRLSY G----QDAEM ILTKMPNLRK LNCIFLETFS
S. pennellii    KEGVFELEKL ESFSKVVIVN G----DDICE MCNKAPNLVQ LELIV-----
S. lycopersicum KEGVFELEKL ESFSKVVIVN G----DDICE MCSKAPNLVQ LELIV-----

                G521E
                S520L       G532R                T549I       S561L
N. tabacum      ---SGTRFYK YFPAFGSLGQ LKSLKIDVTR ILTYPYGFED FTYPSSLKKL
N. sylvestris   ---SGTRFYK YFPAFGSLGQ LKSLKIDVTR LLTYPYGFED FTYPSSLKKL
C. canephora    -LRDDTGKCN QFPIMNFLTE LESLNVLYSG RVGLP---CK FDFPLNLRKL
S. tuberosum    ----DSDDCY YFPSLVSLSQ LESVKILHYG QSSLSS--CR FNLPSNLRRL
C. annuum       YLEKLKGRCV RFPTLEFLSH LESLKLVSNC YPSKLP--HV FNFPSKLREL
S. pennellii    -----EQWDN LFSSLNCLIY LETLSIYHRG DFPMSG--TN MMFPQCLKEL
S. lycopersicum -----EQWDN LFSSLNCLIY LETLSIYHRG DFPMSG--IN MMFPQCLKEL

LRR motif
```

Figure III-S3. Amino acid alignment of the Leucine Rich Repeat domains between *NtTPN1* and its *RPP8-like* orthologs in other *Solanaceae* species.

Sequences were obtained by Blastp in NCBI database: *N. tabacum* = *NtTPN1* candidate gene; *N. sylvestris* = XP 009787580.1; *C. canephora* = CDP19728.1; *S. tuberosum* = XP 015166619.1; *C. annuum* = XP 016542535.1; *S. pennellii* = XP015076352.1; *S. lycopersicum* = XP 004233876.2.)

The position of the natural variation found in the eight tolerant tobacco varieties is indicated as "SNP". The eleven EMS mutations used for functional validation of *NtTPN1* are indicated on the top of the alignment. Mutations that confer tolerance to PVY^{N}-induced veinal necrosis are underlined.

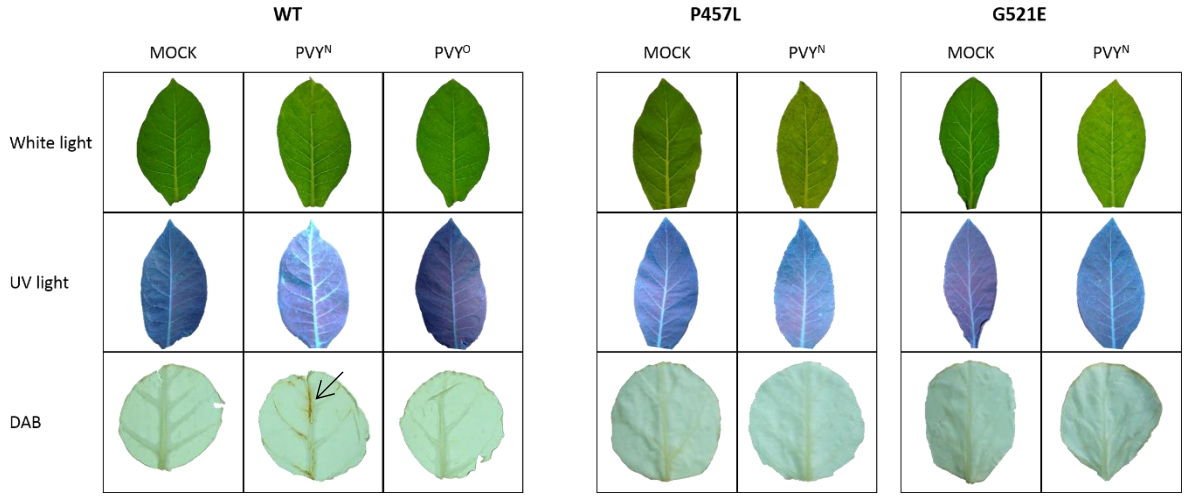


Figure III-S4. Symptoms induced at 30 dpi by the PVY^N (RB) on M3 plants fixed for the P457L and G521E mutations. Upper panels: observation of leaves of the EMS mutants and the sensitive control line WT (wild-type parental TN90 genotype used for the construction of the Tilling population) under white and UV light. Fluorescence was observed under UV illumination in the systemically PVY^N (RB) infected leaves. For the sensitive WT tobacco, both necrotic PVY^N (RB) and non-necrotic PVY^O (O139) isolates were used and Mock correspond to the buffer-inoculated healthy plants. Lower panel: 3,3'-diaminobenzidine (DAB) staining of systemically infected tobacco leaves. The accumulation of hydrogen peroxide (brown coloration, indicated by an arrow) is visible after chlorophyll discoloration only in the leaves of the sensitive WT control plants infected with PVY^N.

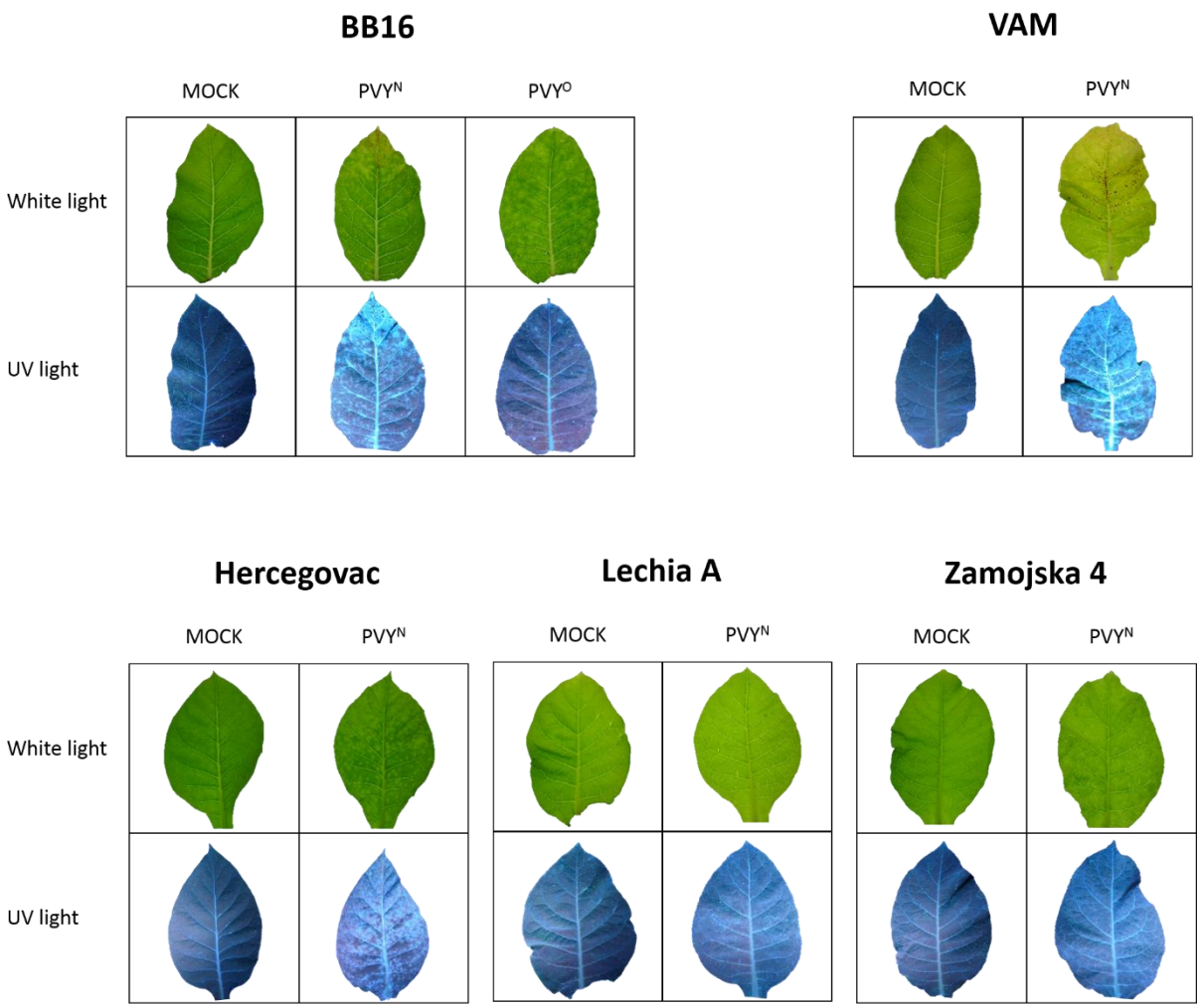
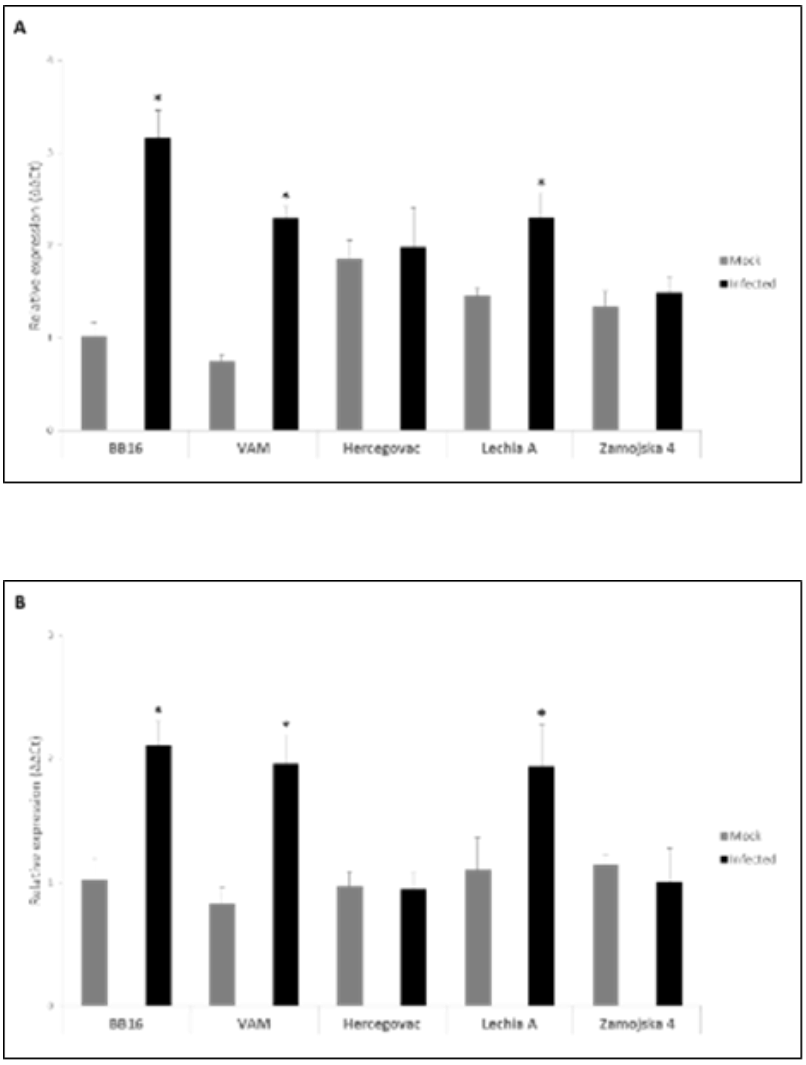
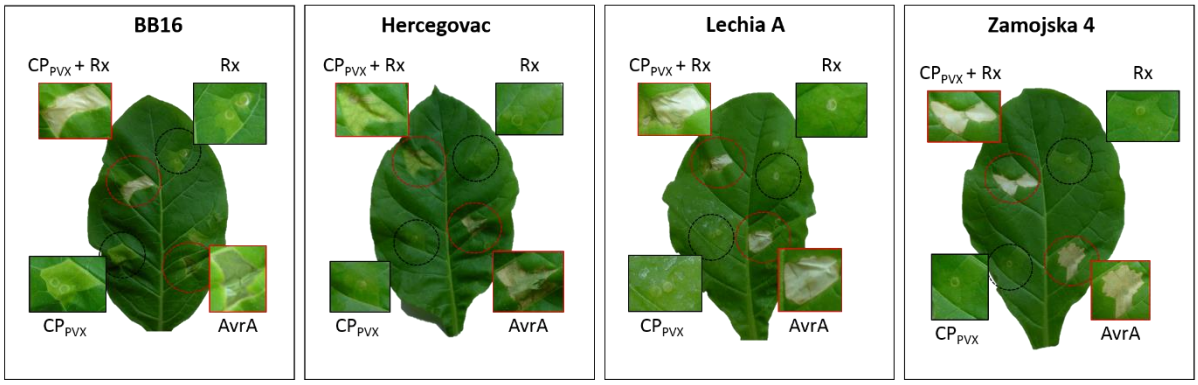


Figure III-S5. Accumulation, visualized under UV illumination, of fluorescent compounds in the leaves of the tolerant accessions, Hercegovac, Lechia A, Zamojska 4 and of the sensitive controls BB16 and VAM during PVY^N (RB) infection. Upper panel: white light. Lower panel: fluorescence observed under UV illumination in systemically infected leaves 30 dpi. Mock: buffer-inoculated plants. For the sensitive BB16 tobacco, both necrotic (PVY^N isolate RB) and non-necrotic (PVY^O isolate O139) were used.

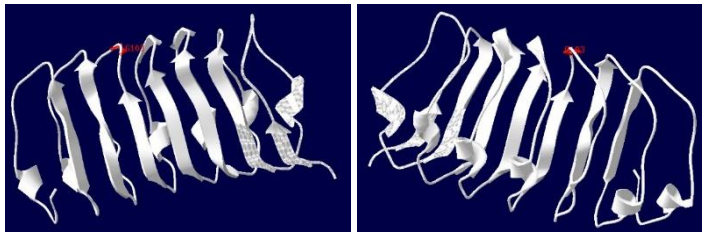


<u>Figure III-S6.</u> Relative quantification of *hsr203J* gene expression by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). A. *hsr203J* transcript levels were normalized to the expression of *the RL2* (60S ribosomal protein L2) gene. **B**. *hsr203J* transcript levels were normalized to the expression of the *ef1-alpha* gene. Gene expression was quantified in systemic leaves corresponding to three pools of four independent plants infected by PVY^N (RB) at 15 dpi. The BB16 Mock (buffer-inoculation) value was used as the calibrator and corresponds three pools of four plants. The standard deviation from three technical replicates is indicated by vertical lines. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon-Mann-Whitney test in R software v 3.2.5. Significantly different values are noted with * ($P \leq 0.05$) when comparing the expression level of *hsr*203J gene between "Mock" and "Infected" conditions. Values shown correspond to the data from two independent inoculation experiments. GenBank accessions numbers: *hsr203J* (GenBank AB091430); *RL2* (GenBank X62500); *ef1-alpha* gene (elongation factor 1-alpha, GenBank XM_009784954).



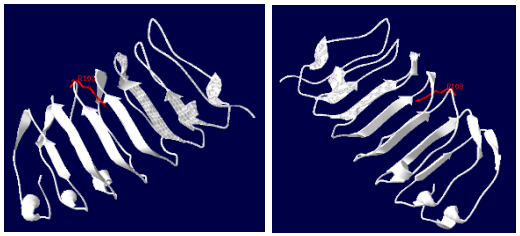
<u>Figure III-S7.</u> HR elicitation by the transient expression of AvrA, CP_{PVX} and *Rx* on the tolerant accessions Hercegovac, Lechia A, and Zamojska 4 and on the sensitive control BB16. Leaves were infiltrated with *Agrobacterium tumefaciens* strains carrying either the pMP25 (AvrA), pBIN35S-TK (CP_{PVX}) and pBIN35S-Rx (Rx) plasmids. Pictures were taken 5 days after infiltration. The black circles indicate the areas agro-infiltrated with the negative controls (CP_{PVX} alone, or Rx alone). The areas infiltrated with the avirulence factors known to elicit HR on *N. tabacum* (CP_{PVX} together with Rx; AvrA) are indicated by a red circle. The colored boxes correspond to enlargements of the agro-infiltrated areas.

A



(C-score=0.54)

B



(C-score =0.49)

<u>Figure III-S8.</u> 3D prediction structure of the LRR domain of NtTPN1 protein. A: sensitive accessions (G at position 103 in the LRR domain). **B**: Tolerant accessions (R at position 103 in the LRR domain). Primary amino acid sequence of the LRR used for the prediction: "NLRVLDLSSVKLHKTHVDALRYLIHLKYLELQLPSDYIPYTICNLKELETFIATGVYHKSCIPNSIWGMTSLRHLHISTLYTSQILEDLDNLKTCSNLVIDARVYYQNLMKRLPNLEKLSCRLC GSGTRFYKYFPAFGSLGQLKSLKIDVTRILTYPYGFEDFTYPSS" (in red, position of the R mutation). The C-score is a confidence score for estimating the quality of predicted models by I-TASSER. It is calculated based on the significance of threading template alignments and the convergence parameters of the structure assembly simulations. C-score is typically in the range of [-5, 2], where a C-score of higher value signifies a model with a high confidence and vice-versa.

6.2. Supplemental table

Table III-S1. Details of the symptoms induced by other necrotic PVY isolates on four tolerant tobacco accessions.

	PVY^{NTN} (NTN-H)		PVY^{N-Wi} (WilgaP)		PVY^{Brazil} (Br1044)		$PVY^{O:C}$ (LYE245)		PVY^{C} (CAA14)	
Accessions	Symptoms	† Inf./Inoc.	Symptoms	† Inf./Inoc.	Symptoms	† Inf./Inoc.	Symptoms	† Inf./Inoc.	Symptoms	† Inf./Inoc.
Hercegovac	Mo, VC	10/10	Mo, VC, RS	10/10	Mo	12/12	Mo, VC, Cr	10/10	VC	10/10
Lechia A	Mo, VC, Et	10/10	Mo, VC, RS	10/10	Mo	12/12	Mo, VC, Cr	10/10	VC	10/10
Zamojska 4	Mo	10/10	Mo, VC	10/10	Mo	11/12	Mo, VC, Cr	10/10	Mo, VC	10/10
Zamoyska	Mo, VC, Et	10/10	Mo	10/10	VC	12/12	Mo, VC	10/10	Mo	10/10
BB16	VN, Mo, VC, Y	10/10	VN, Mo, VC	10/10	VN, Mo	2/2	VN, Mo, VC	8/8	VN, Mo, VC, Cr	10/10

Symptoms were observed in the upper non-inoculated leaves at 18 dpi. BB16 was used as a control that displays veinal necrosis when infected by PVY necrotic isolates.
Mo: mosaic. VN: veinal necrosis. VC: vein clearing. Et: etching. Cr: crinkle. Y : yellowing. RS: ring spot.
†: number of symptomatic plants over number of inoculated plants. Viral accumulation was confirmed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for all the symptomatic plants tested.

Table III-S2. Phenotype displayed upon infection by PVY^N (RB) isolate by plants of F2 progenies from crosses between each tolerant tobacco accession and a sensitive parent.

F2 lines	Phenotype (30 dpi)		Nb plants	% T	% S	*Chi²*	*P value*
	Tol	Sen					
F_2 [Virginia 115 x Lechia LB]	30	84	114	26%	74%	0.105	0.746
F_2 [NOD x Virginia SP278]	28	77	105	27%	73%	0.156	0.693
F_2 [Zamojska 4 x Yellow Special]	69	192	261	26%	74%	0.287	0.592
F_2 [Lechia A x Virginia 115]	29	76	105	28%	72%	0.384	0.535
F_2 [Zamoyska x Coker 347]	31	77	108	29%	71%	0.790	0.374
F_2 [Coker 347 x Hercegovac]	21	83	104	20%	80%	1.282	0.258
F_2 [Virginia 115 x Nyirsegi 1]	34	75	109	31%	69%	2.229	0.135
F_2 [Virginia 115 x Baragan 102]	35	76	111	32%	68%	2.526	0.112
F_2 [Virginia 115 x Bahia]	12	95	107	11%	89%	10.844	0.0009
F_2 [Virginia 115 x Bresil Bahia]	23	94	117	20%	80%	1.7806	0.1821

The sensitive genotype used in the crosses was either 'Yellow Special', 'Virginia 115', 'Coker 347' or 'NOD'. A probability value equal to, or greater than 0.05 indicates that segregation in the observed population does not differ significantly from the expected ratio (3Sen: 1Tol) for a recessive gene.

Table III-S3. Symptoms induced by PVY^N and PVY^O isolates on the F1 progenies plants derived from crosses between the 10 tolerant tobacco accessions (allelism test).

	PVY^O (O139)		PVY^N (11.08)		PVY^N (10.26)	
	Symptoms	† Inf./Inoc.	Symptoms	† Inf./Inoc.	Symptoms	† Inf./Inoc.
F1 [Hercegovac x Lechia A]	Mo	22/22	Mo	22/22	Mo	22/22
F1 [Zamojska 4 x Zamoyska]	Mo	22/22	Mo	22/22	Mo	22/22
F1 [Hercegovac x Zamojska 4]	*nd*		*nd*		Mo	11/11
F1 [Baragan 102 x Zamojska 4]	*nd*		*nd*		Mo	11/11
F1 [Zamojska 4 x Lechia LB]	*nd*		*nd*		Mo	11/11
F1 [Nyirsegi 1 x Zamojska 4]	*nd*		*nd*		Mo	11/11
F1 [Virginia SP278 x Zamojska 4]	*nd*		*nd*		Mo	11/11

Symptoms were observed on the upper non-inoculated leaves at 30 dpi. Mo: mosaic, *nd* : not determined.

†: Number of symptomatic plants over number of inoculated plants. Viral accumulation was confirmed by ELISA for all the symptomatic plants.

Table III-S4. Details of all primers used in this study

Primer name	Sequence (5'-3')
SSR-Fw	TGA CCG GCA GCA AAA TTG
SSR-Rev	TGT AAA ACG ACG GCC AGT
FAM	TGA CCG GCA GCA AAA TTG
VIC	TGT AAA ACG ACG GCC AGT
RPP8-Fw	TTG CCT TCT GAT TAC ATT CC
RPP8-Rev	GGC ATA TCT TGA GCT CCC T
Hsr203J-Fw	TAG AAC AAG AGC AAA CCC G
Hsr203J-Rev	TAA GGC GGC AAT TTG AGC TC
RL2-Fw	GGC GAA ATG GGT CGT TTG ATC
RL2-Rev	CGT TCC GTT CGC CGA AGT CG
ef1-alpha-Fw	ATT GGA AAT GGA TAT GCT CCA
ef1-alpha-Rev	TCC TTA CCA GAA CGC CTG TC

7. Résultats complémentaires

7.1. Estimation du niveau d'accumulation du PVY^N-RB dans trois des accessions tolérantes aux symptômes de nécrose nervaire.

Afin d'écarter l'hypothèse que l'absence de symptômes nécrotiques soit liée à une accumulation virale plus faible dans les plantes tolérantes que sensibles, des tests ELISA semi-quantitatifs ont été réalisés. Ils ont permis de comparer le niveau d'accumulation d'un isolat nécrotique de type RB (Resistance Breaking) dans des accessions tolérantes et sensibles (Figure III-S9). L'analyse du niveau d'accumulation du PVY^N (RB) dans trois pools indépendants constitués de 8 plantes chacun indique qu'il n'y a aucune différence significative du niveau d'accumulation du virus entre toutes les accessions testées à 30 jpi. Par conséquent, l'absence de symptômes nervaires nécrotiques dans les trois accessions tolérantes 'Hercegovac', 'Lechia A' et 'Zamojska 4' n'est pas liée à une accumulation virale plus faible.

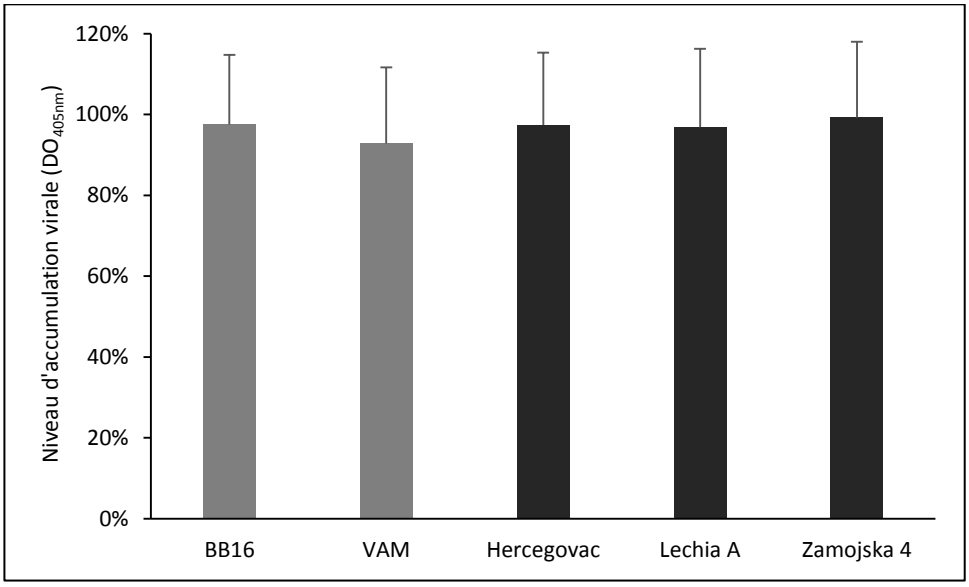
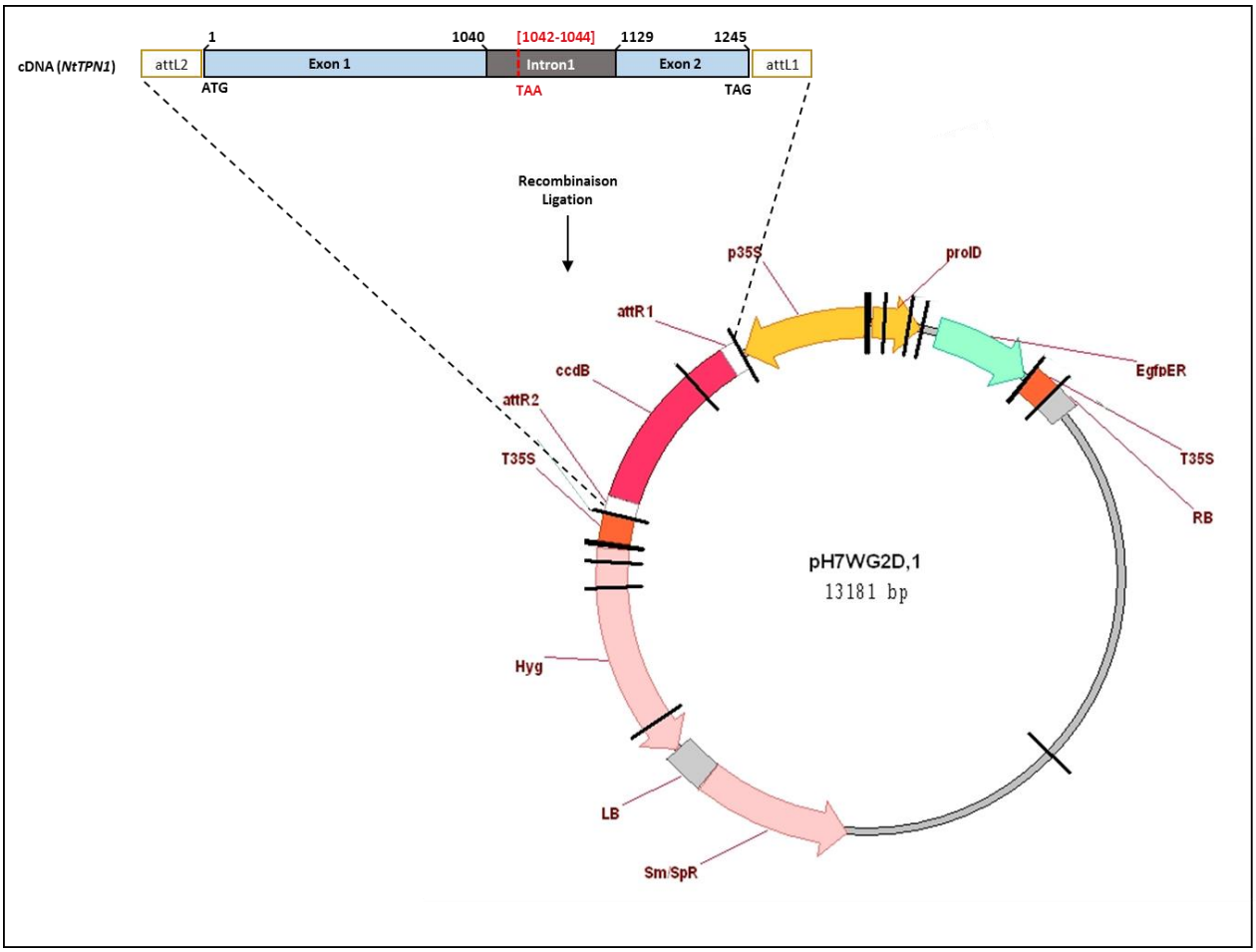


Figure III-S9. Dosage de l'accumulation en systémie de l'isolat PVY^N-RB dans les accessions tolérantes Hercegovac, Lechia A, Zamojska 4 et dans les témoins sensibles aux symptômes de nécrose nervaire, BB16 et VAM. Les niveaux d'accumulation sont exprimés en pourcentage de la valeur moyenne mesurée pour PVY^N-RB sur la variété sensible *N. tabacum* cv. Xanthi. Les niveaux d'accumulation du PVY^N-RB ont été déterminés par DAS-ELISA semi-quantitatif à 30 jpi, à partir de feuilles infectées en systémie et au même stade de développement. Chaque valeur représente la moyenne obtenue de trois expériences indépendantes, pour24 plantes au total. . Les barres d'erreur indiquent les écarts-types observés entre les 24 plantes d'un même génotype (*T*-test *P*-value > 0,05).

7.2. Validation fonctionnelle du gène *NtTPN1* par expression transitoire du gène *NtTPN1* non muté, chez des plantes tolérantes

Afin de confirmer le rôle de *NtTPN1* dans l'induction de nécrose nervaire en systémie, nous avons tenté de complémenter l'allèle muté de *NtTPN1* présent chez les variétés tolérantes par la forme non mutée*, via* l'expression transitoire du gène sauvage en utilisant *Agrobacterium tumefaciens.* Le clonage de l'ADNc du gène *NtTPN1* a été effectué dans un vecteur d'expression binaire (*pH7WG2D*) en aval du promoteur de transcription 35S et en amont du terminateur de transcription T35S. Ce clonage a été réalisé en tandem dans le T-DNA avec l'ADNc codant pour la protéine rapporteur GFP (green fluorescent protein). L''ARN de *N. tomentosiformis* a servi de matrice pour l'amplification, puisque celui-ci correspond au parent portant la version du gène sauvage non muté de *NtTPN1*. Après plusieurs tentatives, seul l'ADNc du gène *NtTPN1* possédant encore un intron avec un codon STOP a pu être cloné dans le vecteur d'expression (figure III-S10). Aucun ADNc correspondant à la forme totalement épissée du transcrit *NtTPN1* a pu être cloné. Nous avons cependant supposé que l'épissage se ferait *in planta* à partir de l'expression du transgène cloné dans le vecteur binaire.

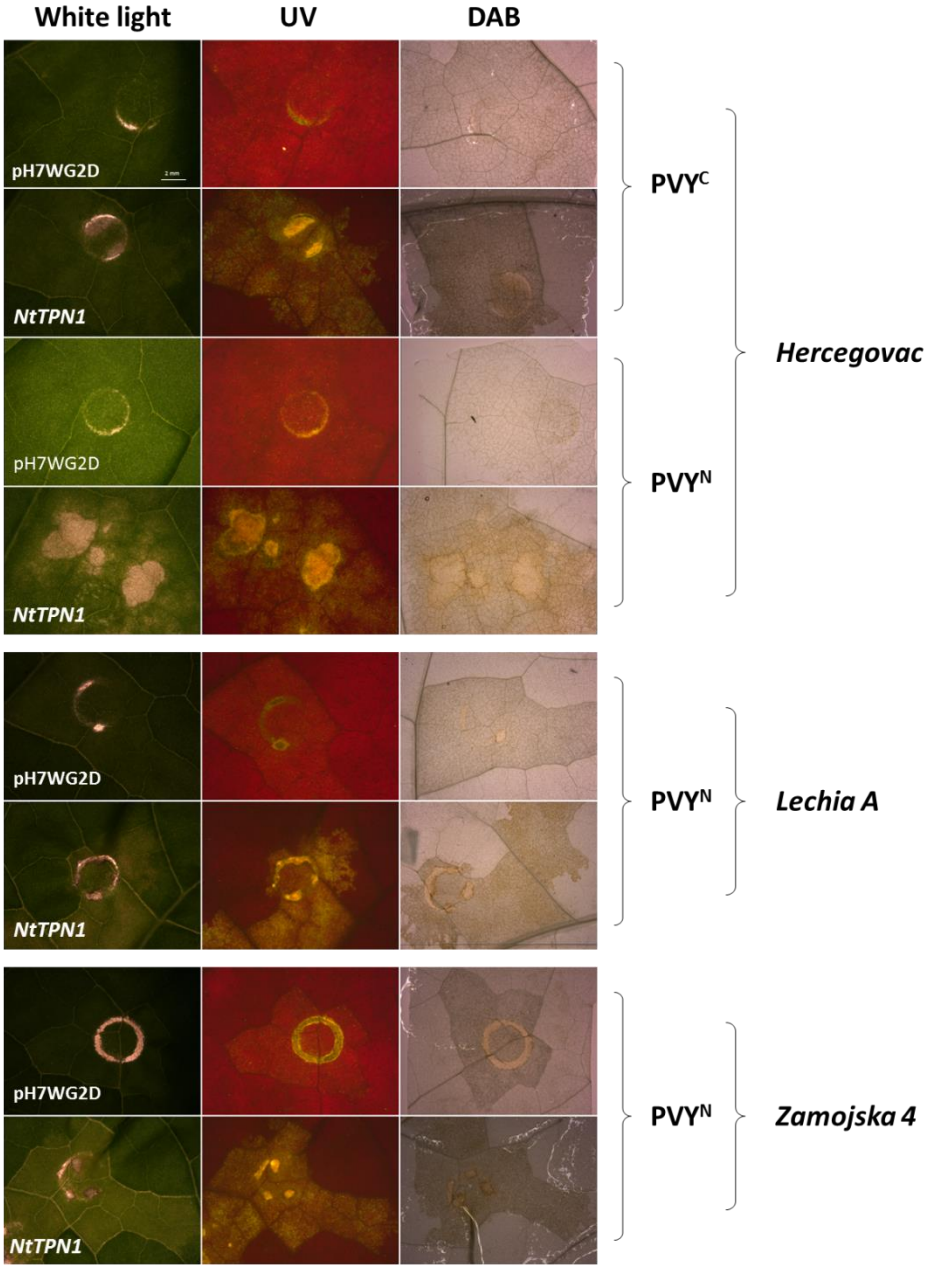


<u>Figure III-S10</u>. Vecteur d'expression utilisé pour l'expression transitoire du gène *NtTPN1* dans les plantes tolérantes infectées par le PVY^{N}-N605

Les plantes tolérantes Hercegovac, LechiaA et Zamojska 4 ainsi que des plantes sensibles présentant des symptômes de nécrose nervaire (BB16) ont été infectées par l'isolat nécrotique PVY^{N}-N605 et l'isolat non-nécrotique PVY^{C}-Son41. Quinze jours après inoculation (après apparition des premiers symptômes de nécrose nervaire sur la variété sensible), les feuilles infectées en systémie des variétés tolérantes ont été agro-infiltrées avec la construction pH7WG2D :p35S-NtTPN1intron. Les tissus infiltrés ont été observés au microscope Axiozoom avant et après coloration au DAB (3,3'-diaminobenzidine) des tissus infiltrés (Figure III-S11). La présence d'un signal de fluorescence verte observé sous UV (bien que très faible, Figure III-S11) suggère que la protéine NtTPN1 dont l'ADNc est cloné en tandem avec celui codant pour la GFP, serait exprimée elle aussi, sous réserve que l'épissage de l'intron présent dans la séquence de *NtTPN1* fonctionne *in planta*.

Cependant, ces expériences n'ont pas permis de visualiser clairement la présence de nécroses qui seraient restaurées chez les variétés tolérantes, par l'expression transitoire de *NtTPN1* et en situation d'infection par le PVY^{N}-N605 (Figure III-S11).

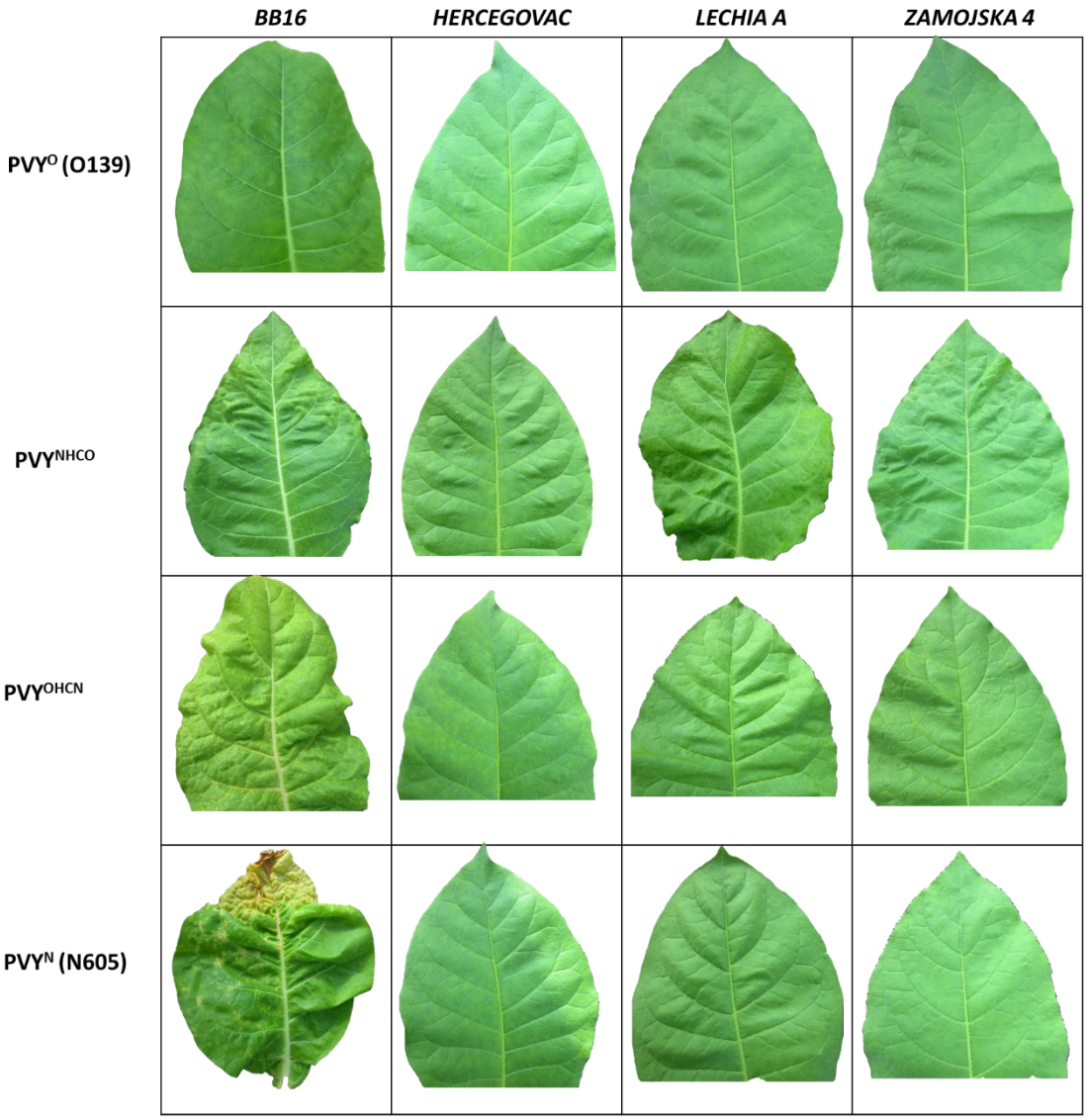
Il s'agit là d'expériences très préliminaires que nous n'avons pas eu le temps de reproduire.



<u>Figure III-S11.</u> Expression transitoire de *NtTPN1* dans les variétés tolérantes infectées par l'isolat de N605 du PVY^{N}. La culture d'*Agrobacterium tumefaciens* transformée soit par le plasmide vide (pH7WG2D) soit par le plasmide contenant *NtTPN1 avec intron* (*NtTPN1*) a été infiltrée sur plante infectée 15 jours auparavant. La lecture en lumière blanche (white light), avant ou après coloration au DAB et sous lumière UV (UV) a été réalisée 5 jours après agroinfiltration avec un microscope à fluorescence (Axio Zoom.V16 Zeiss). La barre blanche indique l'échelle (2mm).

7.3. Implication de HcPro dans l'induction des symptômes de nécrose nervaire.

On sait peu de choses sur les déterminants moléculaires viraux capables d'induire des nécroses chez la plante hôte. Notre hypothèse est que les symptômes de nécrose nervaire systémique sont induits par une interaction directe ou indirecte entre le produit du gène *NtTPN1* et un éliciteur viral. Dans ce schéma, HcPro est un candidat fort en tant qu'éliciteur viral. En effet, dans des études précédentes, HcPro s'est révélé être un déterminant de la nécrose nervaire chez le tabac (Faurez *et al.*, 2012; Tribodet *et al.*, 2005). De plus, la mutation dans *NtTPN1* conférant le phénotype de tolérance est localisée dans le site potentiel de reconnaissance de l'éliciteur, dans l'un des motifs LRR. Afin de tester cette hypothèse, nous avons réalisé des inoculations avec des clones infectieux de PVY recombinants, fournis par Benoît Moury : PVY^{OHCN} (isolat de PVY non nécrotique codant pour un HcPro nécrotique) et PVY^{NHCO} (isolat de PVY nécrotique codant pour un HcPro non nécrotique) (Figure III-S12). Le PVY^{OHCN} induit une nécrose nervaire chez l'accession sensible, mais pas chez les accessions tolérantes, alors que PVY^{NHCO} n'induit aucune nécrose nervaire, aussi bien sur plantes sensibles que tolérantes. Ceci confirme que le HcPro du PVY est le déterminant de la nécrose sur tabac, et que dans l'accession tolérante, cette nécrose n'est plus induite, même lors d'infection par PVY^{OHCN}.



<u>Figure III-S12.</u> Symptômes induits par des isolats de PVY recombinants sur les variétés tolérantes. La sévérité et le type de symptômes induits ainsi que le niveau d'accumulation virale estimée par DAS-ELISA ont été notés à 30 jpi. Le PVY^{OHCN} correspond au PVY^{O}-O139 (isolat non nécrotique) codant pour un HcPro du PVY^{N}-N605 (nécrotique) et le PVY^{NHCO} correspond à l'isolat PVY^{N}-N605 codant pour un HcPro du PVY^{O}-O139 (non nécrotique) (Moury *et al.,* 2011).

References

Atsumi, G., Kagaya, U., Kitazawa, H., Nakahara, K.S. and Uyeda, I. (2009) Activation of the salicylic acid signaling pathway enhances *Clover yellow vein virus* virulence in susceptible pea cultivars. *Mol. Plant. Microbe Interact*., **22**, 166–175.

Bendahmane, A., Kanyuka, K. and Baulcombe, D.C. (1999) The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell*, **11**, 781–791.

Bindler, G., Plieske, J., Bakaher, N., Gunduz, I., Ivanov, N., Van der Hoeven, R., Ganal, M. and Donini, P. (2011) A high density genetic map of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) obtained from large scale microsatellite marker development. *Theor. Appl. Genet*., **123**, 219–230.

Bouchez, O., Huard, C., Lorrain, S., Roby, D. and Balague, C. (2007) Ethylene is one of the key elements for cell death and defense response control in the *Arabidopsis* lesion mimic Mutant *vad1*. *Plant Physiol*., **145**, 465–477.

Candresse, T., Marais, A., Faure, C., Dubrana, M.P., Gombert, J. and Bendahmane, A. (2010) Multiple coat protein mutations abolish recognition of *Pepino mosaic potexvirus* (PepMV) by the potato *Rx* resistance gene in transgenic tomatoes. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **23**, 376–383.

Chen, S., Li, F., Liu, D., Jiang, C., Cui, L., Shen, L., Liu, G. and Yang, A. (2017) Dynamic expression analysis of early response genes induced by *Potato virus Y* in PVY-resistant *Nicotiana tabacum*. *Plant Cell Rep.*, **36**, 297–311.

Chong, J., Baltz, R., Schmitt, C., Beffa, R., Fritig, B. and Saindrenan, P. (2002) Downregulation of a pathogen-responsive tobacco UDP-Glc: Phenylpropanoid Glucosyltransferase reduces scopoletin glucoside accumulation, enhances oxidative stress, and weakens virus resistance. *Plant Cell*, **14**, 1093–1107.

Chung, B.Y.-W., Miller, W.A., Atkins, J.F. and Firth, A.E. (2008) An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. *Proc. Natl. Acad. Sci*., **105**, 5897–5902.

Clark, M.F. and Adams, A.N. (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, **34**, 475–483.

Clarkson, J.J., Lim, K.Y., Kovarik, A., Chase, M.W., Knapp, S. and Leitch, A.R. (2005) Long-term genome diploidization in allopolyploid *Nicotiana* section *Repandae* (*Solanaceae*). *New Phytol.*, **168**, 241–252.

Cooley, M.B., Pathirana, S., Wu, H.J., Kachroo, P. and Klessig, D.F. (2000) Members of the *Arabidopsis HRT/RPP8* family of resistance genes confer resistance to both viral and oomycete pathogens. *Plant Cell*, **12**, 663–676.

Daudi, A. and O'Brien, J.A. (2012) Detection of hydrogen peroxide by DAB staining in *Arabidopsis* leaves. *Bio-Protoc*., **2**, e263.

Delon, R., Poisson, C., Bardon, J.C. and Taillurat, P. (1999) Les *Nicotianées* en collection à l'Institut du Tabac, 3rd ed. *Ann. du Tabac*, Seita, Paris

Eggenberger, A.L., Hajimorad, M.R. and Hill, J.H. (2008) Gain of virulence on *Rsv1*-genotype soybean by an avirulent *Soybean mosaic virus* requires concurrent mutations in both P3 and HC-Pro. *Mol. Plant. Microbe Interact.,* **21**, 931–936.

El Oirdi, M., Trapani, A. and Bouarab, K. (2010) The nature of tobacco resistance against *Botrytis cinerea* depends on the infection structures of the pathogen. *Environ. Microbiol.*, **12**, 239–253.

Faurez, F., Baldwin, T., Tribodet, M. and Jacquot, E. (2012) Identification of new *Potato virus Y* (PVY) molecular determinants for the induction of vein necrosis in tobacco. *Mol. Plant Pathol*., **13**, 948–959.

García, J.A. and Pallás, V. (2015) Viral factors involved in plant pathogenesis. *Curr. Opin. Virol*., **11**, 21–30.

Haikonen, T., Rajamäki, M.L., Tian, Y.P. and Valkonen, J.P.T. (2013) Mutation of a short variable region in HCpro protein of *Potato virus A* affects interactions with a microtubule-associated protein and induces necrotic responses in tobacco. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **26**, 721–733.

Hajimorad, M.R., Eggenberger, A.L. and Hill, J.H. (2005) Loss and gain of elicitor function of *Soybean Mosaic Virus* G7 provoking *Rsv1*-Mediated lethal systemic Hypersensitive Response maps to P3. *J. Virol.*, **79**, 1215–1222.

Henikoff, S. and Comai, L. (2003) Single nucleotide mutations for plant functional genomics. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **54**, 375–401.

Janzac, B., Tribodet, M., Lacroix, C., Moury, B., Verrier, J.L. and Jacquot, E. (2014) Evolutionary pathways to break down the resistance of allelic versions of the PVY resistance gene *va*. *Plant Dis.*, **98**, 1521–1529.

Julio, E., Cotucheau, J., Decorps, C., Volpatti, R., Sentenac, C., Candresse, T. and Dorlhac de Borne, F. (2014) A eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) is responsible for the "*va*" tobacco recessive resistance to potyviruses. *Plant Mol. Biol. Rep.*, **33**, 609–623.

Julio, E., Laporte, F., Reis, S., Rothan, C. and Dorlhac de Borne, F. (2008) Reducing the content of nornicotine in tobacco via targeted mutation breeding. *Mol. Breed.*, **21**, 369–381.

Kaneko, Y., Inukai, T., Suehiro, N., Natsuaki, T. and Masuta, C. (2004) Fine genetic mapping of the *TuNI* locus causing systemic veinal necrosis by *Turnip mosaic virus* infection in *Arabidopsis thaliana*. *Theor. Appl. Genet.*, **110**, 33–40.

Kehoe, M.A. and Jones, R.A.C. (2015) Improving *Potato virus Y* strain nomenclature: lessons from comparing isolates obtained over a 73 year period. *Plant Pathol.*, **65**, 322–333.

Kim, B., Masuta, C., Matsuura, H., Takahashi, H. and Inukai, T. (2008) Veinal necrosis induced by *Turnip mosaic virus* infection in *Arabidopsis* is a form of defense response accompanying HR-like cell death. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **21**, 260–268.

Kim, B.M., Suehiro, N., Natsuaki, T., Inukai, T. and Masuta, C. (2010) The P3 protein of *Turnip mosaic virus* can alone induce hypersensitive response-like cell death in *Arabidopsis thaliana* carrying *TuNI*. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **23**, 144–152.

Király, L., Cole, A.B., Bourque, J.E. and Schoelz, J.E. (1999) Systemic cell death is elicited by the interaction of a single gene in *Nicotiana clevelandi*i and gene VI of *Cauliflower mosaic virus*. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **12**, 919–925.

Koelle, G. (1961) Genetische analyse einer Y-virus (Rippen-braun) resistenten mutante der abaksorte Virgin A. Zuchter **31,** 71–72

Komatsu, K., Hashimoto, M., Ozeki, J., Yamaji, Y., Maejima, K., Senshu, H., Himeno, M., Okano, Y., Kagiwada, S. and Namba, S. (2010) Viral-induced systemic necrosis in plants involves both programmed cell death and the inhibition of viral multiplication, which are regulated by independent pathways. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **23**, 283–293.

Künstler, A., Bacsó, R., Gullner, G., Hafez, Y.M. and Király, L. (2016) Staying alive – is cell death dispensable for plant disease resistance during the hypersensitive response? *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **93**, 75–84.

Lacroix, C., Glais, L., Kerlan, C., Verrier, J.-L. and Jacquot, E. (2010) Biological characterization of French *Potato virus Y* (PVY) isolates collected from PVY-susceptible or -resistant tobacco plants possessing the recessive resistance gene *va*. *Plant Pathol.*, **59**, 1133–1143.

Lacroix, C., Glais, L., Verrier, J.L. and Jacquot, E. (2011) Effect of passage of a *Potato virus Y* isolate on a line of tobacco containing the recessive resistance gene va^2 on the development of isolates capable of overcoming alleles 0 and 2. *Eur. J. Plant Pathol.*, **130**, 259–269.

Lamb, C. and Dixon, R.A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **48**, 251–275.

Latorre, B. A., Flores, V. and Marholz, G. (1984) Effect of *Potato virus Y* on growth, yield, and chemical composition of flue-cured tobacco in Chile. *Plant Disease*, **68**, 884–886

Leitch, I.J., Hanson, L., Lim, K.Y., Kovarik, A., Chase, M.W., Clarkson, J.J. and Leitch, A.R. (2008) The ups and downs of genome size evolution in polyploid species of *Nicotiana* (Solanaceae). *Ann. Bot.*, **101**, 805–814.

Lim, K.Y., Skalicka, K., Koukalova, B., Volkov, R.A., Matyasek, R., Hemleben, V., Leitch, A.R. and Kovarik, A. (2004) Dynamic changes in the distribution of a satellite homologous to intergenic 26-18S rDNA spacer in the evolution of *Nicotiana*. *Genetics*, **166**, 1935–1946.

Lorrain, S., Lin, B., Auriac, M.C., Kroj, T., Saindrenan, P., Nicole, M., Balague, C. and Roby, D. (2004) VASCULAR ASSOCIATED DEATH1, a novel GRAM domain-containing protein, is a regulator of cell death and defense responses in vascular tissues. *Plant Cell*, **16**, 2217–2232.

Mandadi, K.K. and Scholthof, K.B.G. (2013) Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? *Plant Cell*, **25**, 1489–1505.

Masuta, C., Nishimura, M., Morishita, H. and Hataya, T. (1999) A single amino acid change in viral genome-associated protein of *Potato virus Y* correlates with resistance breaking in 'Virgin A Mutant' tobacco. *Phytopathology*, **89**, 118–123.

Mohr, T.J., Mammarella, N.D., Hoff, T., Woffenden, B.J., Jelesko, J.G. and McDowell, J.M. (2010) The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene *RPP8* is induced by pathogens and salicylic acid and is regulated by W box *cis* elements. *Mol. Plant. Microbe Interact*., **23**, 1303–1315.

Moury, B. (2010) A new lineage sheds light on the evolutionary history of *Potato virus Y*. *Mol. Plant Pathol*., **11**, 161–168.

Moury, B., Caromel, B., Johansen, E., Simon, V., Chauvin, L., Jacquot, E., Kerlan, C. and Lefebvre, V. (2011) The helper component proteinase cistron of *Potato virus Y* induces hypersensitivity and resistance in potato genotypes carrying dominant resistance genes on chromosome IV. *Mol. Plant. Microbe Interact*., **24**, 787–797.

Ng, P.C. and Henikoff, C. (2003) SIFT: predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*., **31**, 3812–3814.

Noguchi, S., Tajima, T., Yamamoto, Y., Ohno, T. and Kubo, T. (1999) Deletion of a large genomic segment in tobacco varieties that are resistant to *Potato virus Y* (PVY). *Mol. Gen. Genet*., **262**, 822–829

Nyalugwe, E.P., Barbetti, M.J. and Jones, R.A.C. (2016a) Strain specificity of *Turnip mosaic virus* resistance gene *TuRBJU 01* in *Brassica juncea*. *Eur. J. Plant Pathol*., **145**, 209–213.

Nyalugwe, E.P., Barbetti, M.J., Clode, P.L. and Jones, R.A.C. (2016b) Systemic Hypersensitive Resistance to *Turnip mosaic virus* in *Brassica juncea* is associated with multiple defense responses, especially phloem necrosis and xylem occlusion. *Plant Disease*, **7**, 1261–1270

Olspert, A., Chung, B.Y.-W., Atkins, J.F., Carr, J.P. and Firth, A.E. (2015) Transcriptional slippage in the positive-sense RNA virus family *Potyviridae*. *EMBO Rep*., **16**, 995–1004.

Pontier, D., Godiard, L., Marco, Y. and Roby, D. (1994) *hsr*203J, a tobacco gene whose activation is rapid, highly localized and specific for incompatible plant/pathogen interactions. *Plant J*., **5**, 507–521.

Pontier, D., Tronchet, M., Rogowsky, P., Lam, E. and Roby, D. (1998) Activation of *hsr*203, a plant gene expressed during incompatible plant-pathogen interactions, is correlated with programmed cell death. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **11**, 544–554.

Poueymiro, M., Cunnac, S., Barberis, P., Deslandes, L., Peeters, N., Cazale-Noel, A.C., Boucher, C. and Genin, S. (2009) Two type III secretion system effectors from *Ralstonia solanacearum* GMI1000 determine host-range specificity on tobacco. *Mol. Plant. Microbe Interact*., **22**, 538–550.

Qin, C., Shi, N., Gu, M., Zhang, H., Li, B., Shen, J., Mohammed, A., Ryabov, E., Li, C., Wang, H., Liu, Y., Osman, T., Vatish, M. and Hong Y. (2012) Involvement of RDR6 in short-range intercellular RNA silencing in *Nicotiana benthamiana*. *Sci. Rep*., **2**, 467

Quenouille, J., Vassilakos, N. and Moury, B. (2013) *Potato virus Y* : a major crop pathogen that has provided major insights into the evolution of viral pathogenicity. *Mol. Plant Pathol*., **14**, 439–452.

Ravelo, G., Kagaya, U., Inukai, T., Sato, M. and Uyeda, I. (2007) Genetic analysis of lethal tip necrosis induced by *Clover yellow vein virus* infection in pea. *J. Gen. Plant Pathol*., **73**, 59–65.

Revers, F. and García, J.A. (2015) Molecular Biology of potyviruses. *Adv. Virus Res.*, **92**, 101–199.

Rodamilans, B., Valli, A., Mingot, A., San León, D., Baulcombe, D., López-Moya, J.J. and García, J.A. (2015) RNA polymerase slippage as a mechanism for the production of frameshift gene products in plant viruses of the *Potyviridae* family. *J. Virol*., **89**, 6965–6967.

Roggero, P. and Pennazio, S. (1988) Biochemical changes during the necrotic systemic infection of tobacco plants by *Potato virus Y*, necrotic strain. *Physiol. Mol. Plant Pathol*., **32**, 105–113.

Rolland, M., Kerlan, C. and Jacquot, E. (2009) The acquisition of molecular determinants involved in *Potato virus Y* necrosis capacity leads to fitness reduction in tobacco plants. *J. Gen. Virol*., **90**, 244–252.

Schmittgen, T.D. and Livak, K.J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat. Protoc*., **3**, 1101–1108.

Scholthof, K.B.G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saundners, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C. and Foster, G.D. (2011) Top 10 plant viruses in molecular plant pathology: Top 10 plant viruses. *Mol. Plant Pathol*., **12**, 938–954.

Sierro, N., Battey, J.N.D., Ouadi, S., Bakaher, N., Bovet, L., Willig, A., Goepfert, S., Peitsch, M.C. and Ivanov, N.V. (2014) The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. *Nat. Commun*., **5**, 3833.

Singh, M. and Singh, P. (1996) Nucleotide sequence and genome organization of a Canadian isolate of the common strain of *Potato virus Y* (PVY^O). *Can. J. Plant Pathol*., **18**, 209–224.

Singh, R.P., Valkonen, J.P.T., Gray, S.M., Boonham, N., Jones, R.A.C., Kerlan, C. and Schubert, J. (2008) Discussion paper: The naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. *Arch. Virol*., **153**, 1–13.

Takahashi, H., Miller, J., Nozaki, Y., Takeda, M., Shah, J., Hase, S., Ikegami, M., Ehara, Y. and Dinesh-Kumar, S.P. (2002) *RCY1*, an *Arabidopsis thaliana RPP8/HRT* family resistance gene, conferring resistance to *Cucumber mosaic virus* requires salicylic acid, ethylene and a novel signal transduction mechanism. *Plant J*., **32**, 655–667.

Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. and Collinge, D.B. (1997). Subcellular localization of H_2O_2 in plants. H_2O_2 accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J*., **11 (6)**, 1187–94.

Tian, Y.P., Liu, J.L., Zhang, C.L., Liu, Y.Y., Wang, B., Li, X.-D., Guo, Z.K. and Valkonen, J.P.T. (2011) Genetic diversity of *Potato virus Y* infecting tobacco crops in China. *Phytopathology*, **101**, 377–387.

Tian, Y.P. and Valkonen, J.P.T. (2015) Recombination of strain O segments to HCpro-encoding sequence of strain N of *Potato virus Y* modulates necrosis induced in tobacco and in potatoes carrying resistance genes *Ny* or *Nc*. *Mol. Plant Pathol.,* **16**, 735–747.

Till, B.J., Reynolds, S.H., Greene, E.A., Codomo, C.A., Enns, L.C., Johnson, J.E., Burtner, C., Odden, A.R., Young, K., Taylor, N.E., Henikoff, J.G., Comai, L. and Henikoff, S. (2003) Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome Res*., **13**, 524–530.

Tribodet, M., Glais, L., Kerlan, C. and Jacquot, E. (2005) Characterization of *Potato virus Y* (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVY^N isolates in infected *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. *J. Gen. Virol*., **86**, 2101–2105.

Van Der Biezen, E.A. and Jones, J.D. (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem Sci.*, **12**, 454–6

Verrier, J.L. and Doroszewska, T. (2004) The "*va*" resistance to PVY^N in *Nicotiana tabacum*: an assessment of the frequency of "*va*" breaking PVY^N strains based on seven years of field survey on a worldwide basis. *12th European Association for Potato Research Virology Section Meeting*. Rennes, France.

Verrier, J.L., Achard, S. and Cailleteau, B. (2004) Impact of PVY^N infection on burley cigarette smoke condensate properties: an assessment of the protection conferred by the "*va*" gene. *CORESTA Congress, Kyoto, Agro-Phyto Groups, abstr. P4*

Van Ooijen, J.W. and Voorrips, R.E. (2001) JoinMap 3.0 Software for the Calculation of Genetic Linkage maps. *Plant Research International*, Wageningen, The Netherlands.

Wen, R.H., Khatabi, B., Ashfield, T., Maroof, M.S. and Hajimorad, M.R. (2013) The HC-Pro and P3 cistrons of an avirulent *Soybean mosaic virus* are recognized by different resistance genes at the complex *Rsv1* locus. *Mol. Plant. Microbe Interact*., **26**, 203–215.

Yang, J., Yan, R., Roy, A., Xu, D., Poisson, J. and Zhang, Y. (2015) The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods*, **12**, 7–8

Chapitre IV :

Conclusion et perspectives

Chapitre IV : Conclusion et perspectives

I. Synthèse des résultats et discussion

Mon travail de thèse présentait un double objectif qui était *i*) de caractériser les mécanismes génétiques puis d'identifier des facteurs influençant la durabilité de la résistance conférée par le locus *va*, *ii*) d'identifier d'autres facteurs génétiques indépendants de *va et* contrôlant les symptômes de nécrose nervaire induits par les isolats nécrotiques de PVY. Ces travaux s'inscrivent dans un objectif plus global d'amélioration et de déploiement de variétés de tabac durablement résistantes/tolérantes à l'un de ses principaux pathogènes, le virus Y de la pomme de terre.

Dans les différentes parties de cette thèse j'ai pu montrer le rôle majeur du locus *eIF4E-1* dans la durabilité de la résistance récessive au PVY. J'ai également identifié un second facteur intervenant dans la modulation de cette durabilité, correspondant à un locus complexe sur le chromosome 14 impliquant trois autres copies *eIF4E*. Ce locus est constitué des copies *eIF4E-2*, *eIF4E-3* et *eIF4E-4*, dont l'une (*eIF4E-3*) est tronquée chez les génotypes les plus durables, tandis que le niveau d'expression d'une autre (*eIF4E-2*) est corrélé à la durabilité de la résistance chez les variétés testées. Ceci a permis de mettre en évidence l'importance de la redondance multigénique de la famille *eIF4E* dans la durabilité de la résistance au PVY conférée par *va* chez le tabac. Nous proposons également une alternative à cette résistance majeure avec l'identification du gène *NtTPN1* pour « *Nicotiana tabacum Tolerance to PVY-induced Necrosis1* », qui est capable de contrôler l'un des phénotypes les plus dommageables induits par certains isolats de PVY, la nécrose nervaire.

Dans un souci de clarté, j'ai divisé en deux grandes parties la discussion afin de pouvoir traiter et analyser séparément ces deux résultats importants. En effet, il sera plus aisé de discuter tour à tour du déterminisme de la durabilité de la résistance et de la tolérance à l'infection par le PVY chez le tabac, puisque ceux-ci font appel à des mécanismes indépendants et distincts.

A. Analyse génétique de la durabilité de la résistance conférée par va chez le tabac

1. La fréquence de contournement : un bon estimateur de la durabilité

Dans le chapitre II, j'ai comparé la durabilité de la résistance dans 13 accessions de tabac ayant une origine génétique et un type de mutation différents affectant le gène *eIF4E-1* (locus *va*). Il avait déjà été montré que la fréquence de contournement d'une résistance était un indicateur clé de la durabilité de la résistance (Quenouille *et al.*, 2014). Ainsi, pour estimer la durabilité de la résistance il fallait montrer que l'infection observée chez les plantes résistantes résultait bien de l'émergence de variants contournants. Pour cela, j'ai réalisé le séquençage du déterminant moléculaire du PVY impliqué dans le contournement de la résistance conférée par *va* qui correspond à la partie centrale de la VPg (Janzac *et al.*, 2014; Lacroix *et al.*, 2011; Masuta *et al.*, 1999).

Pour tester l'hypothèse que l'émergence de variants contournants était due à la pression de sélection induite par le gène de résistance dans les différents génotypes, il fallait s'assurer en premier lieu que de tels mutants virulents n'étaient pas présents dans l'inoculum de départ. J'ai donc séquencé la VPg de chacun des différents isolats propagés sur hôte sensible. Les neuf isolats de PVY ne présentaient aucune mutation dans leur VPg indiquant l'absence probable de variants de PVY en mélange.

Le séquençage de la région centrale de la VPg des isolats de PVY qui s'accumulent en systémie dans les variétés résistantes après un premier passage montre que plus des 3/4 des séquences analysées (86%) présentent, comme attendu, des mutations dans la partie centrale de la VPg. Toutes les positions identifiées étaient déjà connues pour être impliquées dans le contournement de *va* chez le tabac (Janzac *et al.*, 2014; Lacroix *et al.*, 2011) ou bien associées au contournement d'autres résistances au PVY et contrôlées également par *eIF4E* (Ayme *et al.*, 2006). Cependant, au-delà de ce résultat attendu, 14% des séquences de VPg analysées ne présentaient aucune mutation. Ces contournants provenaient tous d'isolats de PVY du groupe O. Les résultats de rétro inoculation de ces mêmes contournants suggèrent néanmoins que le variant viral était déjà présent après un premier passage sur plantes résistantes, mais sans doute en trop faible quantité pour que cette mutation puisse être détectée par séquençage de type Sanger.

Sachant que la forme mutée était indétectable dans l'inoculum de départ, on peut faire l'hypothèse que le virus est capable de se multiplier suffisamment dans la plante pour acquérir les mutations indispensables à la virulence. Il a été montré par Montarry *et al.* (2011), grâce à des analyses de séquençage à haut débit, que dans la majorité des cas de contournement, les mutants virulents sélectionnés chez des piments porteurs du gène *pvr2*^{3} de résistance au PVY n'étaient pas présents dans l'inoculum de départ. Une partie de la capacité d'un virus à contourner une résistance (récessive ou non) pourrait ainsi résider dans sa capacité à se multiplier, même à un niveau très faible dans les plantes résistantes, permettant ainsi l'apparition de variants contournants suite aux erreurs de réplication faites par la polymérase virale.

2. Deux régions génomiques sont impliquées dans la durabilité de la résistance conférée par *va* chez le tabac

Comme détaillé dans le Chapitre II, un deuxième locus appelé *eIF4E-2-3-4* serait impliqué dans la durabilité de la résistance conférée par *eIF4E-1*. Les trois copies *eIF4E-2-3-4* ont été cartographiées sur le génome du tabac et se situent dans un intervalle de 132 Kpb sur le chromosome 14, ce qui indique qu'elles sont probablement génétiquement liées. Ainsi, l'une ou l'autre de ces trois copies pourrait moduler la durabilité de la résistance liée à *va*.

La résistance *va* chez VAM est significativement plus durable que celle observée chez les autres accessions de tabac appartenant au groupe 'LD' (Large Deletion). Acosta-Leal et Xiong (2008) avaient suggéré que les composantes fonctionnelles de la résistance *va* présentes dans la lignée VAM seraient contrôlées par deux gènes de résistance récessive *i*) *va1* (*va* lui-même) qui limiterait le mouvement de cellule à cellule du PVY et ii) un deuxième locus *va2* qui serait impliqué dans le contrôle de l'accumulation virale (Acosta-Leal et Xiong, 2008). Cela expliquerait les différences de durabilité de la résistance observées entre VAM et d'autres accessions de tabacs porteuses de *va*. Les résultats présentés dans le Chapitre II me permettent de proposer que le locus *va* (*eIF4E-1*) correspond à *va1* et le locus complexe *eIF4E-2-3-4* à *va2*.

2.1. Quelle est l'implication de la copie eIF4E-3$^{\Delta}$ dans la durabilité de la résistance conférée par va chez VAM ?

Les données de co-ségrégation entre *eIF4E-3$^{\Delta}$* et la durabilité de la résistance semblent indiquer un rôle majeur de cet allèle tronqué. Par contre, pour le moment, nous n'avons pas pu cartographier précisément l'étendue de cette troncature au niveau de l'extrémité 5' du gène *eIF4E-3* chez VAM et son impact sur le produit de cette copie d'eIF4E. Des résultats préliminaires suggèrent que, chez VAM, une protéine tronquée en N-terminal de 98 acides aminés au lieu de 223 serait produite à partir de transcrits tronqués. Si nous posons l'hypothèse que la protéine eIF4E-3 serait utilisée par le virus lorsque la protéine eIF4E-1 est absente, ceci n'est pas le cas chez VAM où elle est tronquée (eIF4E-3$^{\Delta}$). Cette diminution du nombre de copies d'eIF4E utilisables par le PVY aurait donc un effet positif sur la durabilité de la résistance. Néanmoins, nous ne pouvons pas encore exclure à ce stade le rôle joué par la surexpression de la copie *d'eIF4E-2* qui est liée génétiquement à *eIF4E-3*.

2.2. La copie eIF4E-2 serait-elle un leurre pour le virus ?

La copie *eIF4E-2* (issue du parent *N. tomentosiformis*, résistant au PVY) serait, en plus *d'eIF4E-3 et -4*, l'une des copies résultant d'une triplication de l'orthologue d'*eIF4E-1* (issue du parent *N. sylvestris*) (*chapitre II figure II-S3*).

Dans le cadre de cette étude, j'ai confirmé la surexpression du gène *eIF4E-2* dans toutes les accessions 'LD' et particulièrement chez les trois accessions VAM, SK70 et START, qui présentent toutes l'allèle *eIF4E-3$^{\Delta}$* au locus *eIF4E-2-3-4.* Chez les mutants EMS, cette surexpression *d'eIF4E-2* n'est pas observée et son niveau d'expression est similaire à celui observé chez la variété sensible (BB16). Ceci suggère que l'augmentation significative de la durabilité de la résistance chez les accessions 'LD' par rapport aux mutants EMS serait liée au niveau d'expression d'*eIF4E-2*. Je n'ai pas encore analysé les niveaux d'expression de cette copie chez les mutants 'SD' (Small Deletion) et 'Fs' (Frameshift). Dans l'hypothèse où cette surexpression conduit à une augmentation du niveau de protéine eIF4E-2, l'hypothèse de leurre peut être émise. La protéine codée par *eIF4E*-2 présente en effet plusieurs mutations dans le domaine associé à la sensibilité aux potyvirus, et pourrait être non-fonctionnelle pour le virus (German-Retana *et al.*, 2008; Marcotrigiano *et al.*, 1997; Robaglia et Caranta, 2006). Le modèle présenté dans la figure IV-1 propose que le PVY utilise préférentiellement la copie eIF4E-1 pour assurer son cycle viral (figure IV-A). Chez les accessions de tabac 'Fs' et les

mutants EMS, la copie eIF4E-1 est tronquée et n'est plus exploitable par le virus. Cependant des variants viraux présentant une VPg mutée seraient capables d'utiliser une autre copie (eIF4E-3 ?) ce qui leur permet de se multiplier (figure IV-B). Chez les accessions 'LD', la délétion complète du gène *eIF4E-1* entraîne la surexpression de la copie *eIF4E-2*. Cette copie agit comme un leurre et interfère avec l'interaction eIF4E-3/VPg, limitant l'émergence des variants contournants (figure IV-C). Enfin, chez les accessions de type VAM, la délétion complète d'*eIF4E-1* s'accompagne de la délétion partielle d'*eIF4E-3* ce qui entrainerait une surexpression accrue d'*eIF4E-2*, amplifiant cet effet de leurre (figure IV-D). Dans ce modèle, l'excès de protéine eIF4E-2 pourrait monopoliser la VPg du PVY dans une interaction non fonctionnelle pour le virus, limitant sa capacité à se multiplier et réduisant ainsi la capacité du virus à évoluer vers du contournement. La surexpression d'*eIF4E-2* agirait de manière « négative dominante » par rapport aux autres copies *eIF4E* encore disponibles pour le virus (Chandler et Werr, 2003).

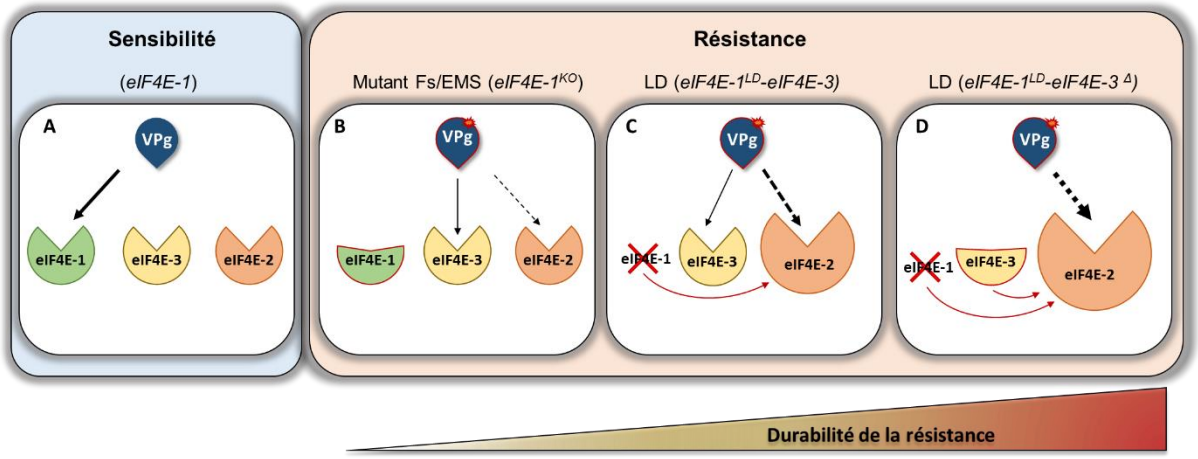
Pour valider ce modèle, il faudrait tester les interactions entre les VPg (de type WT ou d'un variant contournant) et les différentes copies d'eIF4E, en système double hybride chez la levure et *in planta*. De plus, des expériences de complémentation chez la levure ('Yeast-Rescue') permettraient de tester si la copie protéique eIF4E-2 et la forme eIF4E-1 tronquée potentiellement exprimée chez les accessions 'Fs' sont fonctionnelles ou pas pour l'initiation de la traduction (German-Retana *et al.*, 2008).

Chez les mutants 'Fs' et 'EMS', les mutations au niveau du locus *eIF4E-1* entraînent l'apparition de codons STOP. Ces différentes formes mutées coderaient pour une protéine eIF4E-1 tronquée en partie C-terminale. Les protéines de 50 et 53 acides aminés potentiellement produites chez les mutants EMS1 et EMS2 respectivement n'interagissent probablement plus avec la VPg des potyvirus. Elles ne sont donc plus fonctionnelles pour l'initiation de la traduction car tous les domaines conservés de fixation à la coiffe et à eIF4G sont absents de la protéine finale. Chez le mutant 'Fs', c'est une protéine de 163 acides aminés qui serait produite, perdant ainsi l'un des tryptophanes (W170) très conservés chez les protéines eIF4E. Il a été montré que cet acide aminé est crucial pour la fixation à la coiffe et la fonctionnalité d'eIF4E dans un système de complémentation chez la levure ('Yeast-Rescue') (German-Retana *et al.*, 2008). Il est donc probable que la forme mutée d'eIF4E-1 chez les accessions 'Fs' ne soit également plus fonctionnelle pour l'initiation de la traduction.

Globalement, l'ensemble de ces formes mutées d'*eIF4E1* au locus *va* conduisent toutes à une protéine eIF4E non-fonctionnelle. Cependant, la différence entre toutes ces accessions, en lien avec la durabilité de la résistance, repose sur les allèles présents au locus *eIF4E 2-3-4*. Ceci amène à retenir l'hypothèse d'une compétition entre les différentes copies eIF4E pour les autres facteurs d'initiation de la traduction (eIF4G en particulier) comme l'ont supposé Cavatorta *et al.* (2011) ou Kang *et al.* (2007). Ainsi, dans notre modèle, la surproduction de protéine eIF4E-2 pourrait saturer le complexe d'initiation de la traduction en mobilisant les autres facteurs impliqués dans la traduction (dont eIF4G) au détriment des autres copies eIF4E potentiellement utilisées par les variants contournants.

2.3. Comment expliquer la régulation du niveau d'expression d'eIF4E-2 ?

On peut supposer que la surexpression d'*eIF4E-2* observée dans les accessions 'LD' soit une conséquence *i*) de la délétion du gène *eIF4E-1*, *ii*) de la délétion partielle du gène *eIF4E-3* chez VAM *iii)* ou les deux en même temps. Par exemple, chez *A. thaliana*, la perte d'expression du gène *eIFiso4E* chez un mutant KO, conduisant à l'absence de protéine eIFiso4E, est compensée par une augmentation de la concentration en protéines eIF4E-1 (Duprat *et al.*, 2002). En revanche, le niveau d'ARNm d'*eIF4E1* n'est pas affecté. Les auteurs ont suggéré que l'absence de protéines eIFiso4E aurait un effet direct sur l'augmentation de la traduction ou de la stabilité de la protéine eIF4E-1. Chez *Nicotiana tabacum* cv Samsun (sensible au PVY), la diminution de l'expression de la copie *eIFiso4E* par une stratégie de RNAi entraîne une augmentation compensatoire des niveaux protéiques d'eIF4E (Combe et al., 2005). Dans la tomate, il a été proposé que les interactions entre les protéines eIF4E-1 et eIF4E-2 conduisent à la dégradation (non expliquée) d'eIF4E-2 (Gauffier *et al.*, 2016). Dans notre cas, la présence de multiples copies *eIF4E* pourrait également, par des phénomènes de rétrocontrôle, compenser le niveau d'expression de la perte de gènes de la même famille. Il est donc possible que l'absence d'ARNm (ou de protéine) d'*eIF4E-1* et probablement l'absence d'ARNm entier (ou présence d'une protéine tronquée) *eIF4E-3* induisent une surexpression du gène *eIF4E-2* chez VAM. Il serait intéressant de vérifier si ce niveau de transcrits entraîne une augmentation du niveau de protéines eIF4E-2 produite par Western-blot, ce qui nécessiterait de développer des anticorps spécifiques dirigés contre la protéine eIF4E-2.



<u>Figure IV-1.</u> Modèle fonctionnel expliquant le rôle des copies protéiques eIF4E-1, eIF4E-2 et eIF4E-3 dans la durabilité de la résistance *va* chez le tabac. (**A**) Dans une variété sensible, le PVY utilise préférentiellement la copie eIF4E-1. (**B**) Chez les accessions de tabac 'Fs' et mutants EMS, la copie eIF4E-1 est tronquée et n'est plus exploitable par le virus. Les variants contournants (présentant une VPg mutée) sont capables d'utiliser une autre copie (eIF4E3) plus efficacement que les virus non-contournants (**C**) Chez les accessions 'LD', la délétion complète du gène *eIF4E-1* (*eIF4E-1^{LD}*) entraîne la surexpression de la copie eIF4E2. Cette copie agit comme un leurre et interfère dans l'interaction eIF4E-3/VPg (**D**) chez les accessions 'LD' la délétion complète d'*eIF4E-1* (*eIF4E-1^{LD}*) et la délétion partielle d'*eIF4E-3* (*eIF4E-3 $^{\Delta}$*) entraînent une surexpression encore plus importante d'*eIF4E-2*, amplifiant cet effet de leurre. Les flèches noires pleines indiquent les interactions VPg/eIF4E fonctionnelles pour le virus et les flèches noires en pointillés, des interactions VPg/eIF4E non-fonctionnelles pour le virus, les flèches rouges décrivent l'augmentation du niveau d'expression *d'eIF4E-2* induit par la délétion du gène *eIF4E-1* et la troncature du gène *eIF4E-3*.

3. Influence du fonds génétique ?

Les accessions 'LD' présentent une résistance plus durable que les accessions 'SD', alors que ces deux groupes se caractérisent par une délétion génomique du gène *eIF4E-1*. Outre le rôle de la copie tronquée *eIF4E-3$^{\Delta}$* chez VAM, une autre hypothèse liée à la taille de la délétion autour du gène *eIF4E-1* n'est pas exclue. Ainsi, la grande délétion chez les accessions 'LD' entraînerait la perte d'autres facteurs génétiques nécessaires au cycle viral. Les données de RNA seq et d'annotation de gènes dans cet intervalle *va* ne nous permettent malheureusement pas de caractériser les gènes qui sont conservés dans les accessions 'SD' et délétés chez les 'LD'.

Le modèle présenté sur la figure IV-1 ne permet pas cependant d'expliquer le fait qu'au sein du groupe des accessions 'LD', l'accession TN86 présente une résistance plus durable que les accessions Wislica et PBD6, alors qu'elles présentent toutes les trois une large délétion au locus *eIF4E-1* et le même haplotype au locus *eIF4E-2-3-4*. Cette différence de durabilité de la

résistance pourrait donc être liée au fonds génétique, comme cela a été montré dans le pathosystème PVY/Piment (Palloix *et al.*, 2009; Quenouille *et al.*, 2014).

4. Comment expliquer le contournement de la résistance *va* ?

Lors des tests d'infection de l'accession VAM, réalisés à partir d'une large diversité d'isolats de PVY naturels, un très faible nombre de plantes infectées a été observé. Comme je l'ai souligné en début de cette discussion, l'infection des variétés résistantes correspondait à l'émergence de variants accumulant des mutations dans la région centrale de la VPg (Lacroix *et al.*, 2011; Masuta *et al.*, 1999). Ceci suggère qu'en l'absence d'un eIF4E-1 fonctionnel, les variants contournants sont capables de s'adapter à une autre copie protéique d'eIF4E. Dans la figure IV-1, nous avons fait l'hypothèse que les variants utiliseraient eIF4E-3. La capacité d'utilisation de différentes formes d'eIF4E semble être partagée par certaines espèces de potyvirus. Par exemple, la complémentation du mutant *ko-eifiso4E* d*'Arabidopsis thaliana* par l'allèle de sensibilité *eIF4E ou eIFiso4E* de *Brassica rapa* restaure dans les deux cas un phénotype de sensibilité au TuMV (Jenner *et al.*, 2010). Ces résultats démontrent que le TuMV peut utiliser les deux isoformes, eIF4E et eIFiso4E, de *B. rapa* pour assurer son cycle de réplication. Très récemment, l'extinction des gènes *eIF4E* et *eIFiso4E* chez l'arachide (*Arachis hypogaea L.*) résulte en une diminution significative du niveau d'accumulation du *Peanut stripe virus* (PStV, *Poyvirus*), suggérant que les deux isoformes jouent un rôle important dans le cycle viral (Xu *et al.*, 2014). Chez le tabac, six séquences ont été annotées en tant qu'orthologues des gènes codant pour les facteurs d'initiation de la traduction *4E*, deux autres séquences proche d'*eIFiso4E*, et finalement deux paires de séquences codant pour de nouvelles protéines de liaison à la cap (nCBP) (Julio *et al.*, 2014). Par conséquent, en absence *d'eIF4E-1*, toutes ces copies sont potentiellement utilisables par le PVY. Même chez VAM qui présente la résistance la plus durable, on observe des cas de contournement, ce qui montre que le modèle proposé figure IV-1 où seulement trois formes d'eIF4E sont prises en compte dans l'interaction PVY/Tabac demeure incomplet.

Toutefois, d'après les mutations observées dans la VPg des variants contournants, la position 105 est majoritairement présente quelle que soit la forme allélique de *va et* quel que soit l'isolat. Ceci pourrait suggérer que tous les variants suivent le même chemin mutationnel pour restaurer une interaction avec un facteur de sensibilité. Il serait intéressant de réaliser une co-immunoprécipitation à l'aide d'anticorps dirigés contre la VPg d'un virus contournant

en utilisant un pool protéique purifié sur tabac résistant infecté par un PVY contournant. On pourrait ainsi identifier le partenaire eIF4E qui interagit préférentiellement avec la VPg mutée.

5. Perspectives

Il sera intéressant de pouvoir caractériser un peu plus finement le rôle de chaque copie au locus *eIF4E-2-3-4.* Il pourra être réalisé un assemblage *de novo* du locus *eIF4E-2-3-4* chez VAM en utilisant la technique de Capture-Seq (Rapid Genomics *http://www.rapid-genomics.com/technology*). Ainsi nous pourrons caractériser précisément l'étendue de la délétion touchant *eIF4E-3* présente chez VAM et son impact sur *eIF4E-2*.

Selon l'hypothèse de leurre, la transformation stable d'un tabac EMS par une construction génique surexprimant la copie *eIF4E-2* permettrait de vérifier si ceci est suffisant pour obtenir un gain de durabilité de la résistance. Cependant, en l'absence de l'allèle *eIF4E-3*$^{\Delta}$, il est possible que cette surexpression *d'eIF4E-2* ne soit pas suffisante. A l'inverse, inhiber l'expression *d'eIF4E-2* chez VAM par RNAi permettrait de tester l'hypothèse que ceci provoquerait une baisse de durabilité de la résistance.

Il serait intéressant de pouvoir combiner une délétion *d'eIF4E-1* avec une délétion partielle du gène *eIF4E-3* dans des lignées élites. Ceci semble prometteur avec l'arrivée de nouvelles technologie de sélection comme l'édition du génome (Andersen *et al.*, 2015) et en particulier, la technologie CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9). Cette méthode du CRISPR/Cas9 a récemment fait ses preuves en permettant d'induire des mutations ciblées dans un *eIF4E* chez Arabidopsis et chez le concombre, conférant une résistance aux potyvirus (Chandrasekaran *et al.*, 2016; Pyott *et al.*, 2016). Par conséquent, nos résultats ouvrent de nouvelles perspectives pour améliorer nos capacités à manipuler et à déployer une résistance durable chez le tabac contre le virus Y de la pomme de terre.

B. Mécanisme de tolérance au PVY chez le tabac

Initialement, l'objectif de la deuxième partie de ma thèse était de caractériser une/de nouvelle(s) source(s) de résistance, récessive(s), et indépendante(s) de la résistance contrôlée par le locus *va*. En effet, des données préliminaires obtenues par nos collègues de Bergerac avaient montré que parmi le germoplasme d'Imperial Tobacco, dix accessions portant un allèle de sensibilité au locus *VA* ne développaient quand même pas, après infection par le PVY^N, de lésions nécrotiques caractéristiques (Julio *et al.*, 2014). Il faut préciser que le niveau d'accumulation virale en systémie était identique aux plantes contrôles sensibles ; nous sommes donc bien ici dans le cas d'une tolérance au PVY, comme défini par Bos et Parlevliet (1995). Une cartographie par liaison génétique du déterminant de cette tolérance a été réalisée à Bergerac. Il en résulte que le locus contrôlant ce phénotype est situé sur le chromosome 13 du tabac. Son déterminisme est récessif et monogénique ; le polymorphisme génétique associé à la variation du caractère de tolérance a permis de placer le gène candidat dans un intervalle de 4,4 cM. Une approche de cartographie fine a ensuite conduit à identifier un polymorphisme nucléotidique (SNP) au sein d'un gène *R* de type NB LRR (Nucleotide-Binding site Leucine Rich Repeats) qui permet de distinguer les variétés tolérantes des variétés sensibles. Ce SNP correspond à une substitution non-synonyme entrainant un changement d'une Glycine (G) (codon GGG) en une Arginine (R) (codon AGG). En raison du phénotype observé (absence de symptômes de nécrose nervaire), ce gène a été nommé *NtTPN1* pour "*Nicotiana tabacum Tolerance to PVY-induced Necrosis*1". Il s'agit de l'orthologue d'un gène déjà décrit chez *Arabidopsis thaliana* et appartenant à la famille multigénique des *HRT*/*RPP8*. Il a été montré précédemment qu'*HRT* et *RCY1,* deux allèles connus d'un même gène, *HRT*, confèrent, chez *Arabidopsis thaliana*, une résistance au TCV dans l'écotype Dijon17 et au CMV chez C24, respectivement (Cooley *et al.*, 2000; Takahashi *et al.*, 2002). Ces études menées sur *HRT* et *RCY1* indiquent également que la spécificité de reconnaissance des pathogène (à la fois TCV et CMV) est liée à des variations en acides aminés du domaine LRR (Takahashi *et al.*, 2002). Ce domaine riche en leucine semble donc impliqué dans la reconnaissance spécifique du facteur d'avirulence qui, dans les deux cas, correspond à la protéine de capside du virus.

L'importance de ces domaines LRR de protéines similaires à HRT dans la reconnaissance de virus phytopathogènes a été démontrée dans d'autres pathosystèmes. Ainsi, des expériences de mutagenèse aléatoire de le domaine LRR de la protéine Rx de la

pomme de terre, ont permis d'obtenir des variants capables de déclencher une résistance contre la seule souche virulente connue de PVX (PVX_{HB}) mais également contre un virus d'un genre viral plus distant, le *Poplar mosaic virus* (PoMV, *Carlavirus*) (Farnham et Baulcombe, 2006). Il est donc possible que la substitution résultant en un changement d'une Glycine (G) par une Arginine (R) au sein du domaine LRR de NtTPN1 provoque des modifications dans la spécificité ou l'efficacité de reconnaissance du PVY, chez les accessions tolérantes. Cette hypothèse a été testée par TILLING, c'est-à-dire par la recherche d'autres lignées de tabac mutées au sein du domaine LRR de NtTPN1. Le criblage d'une collection de tabacs mutagénéisés a permis de sélectionner 11 mutants dont 4 d'entre eux ne présentaient pas de nécroses nervaires après infection par le PVY^N. Ces 4 mutants présentent une mutation au niveau des acides aminés P457L, L510F, G521E et T549I, tous situés dans le domaine LRR de la protéine NtTPN1.

Chez d'autres pathosystèmes impliquant des virus, champignons ou bactéries, il a été montré que les réponses de défenses induites par l'activation du produit de gènes *R* en présence du facteur Avr conduisent le plus souvent à une réponse de type hypersensible (HR), entrainant la mort cellulaire programmée (PCD) de la cellule infectée (Jones et Dangl, 2006; de Ronde *et al.*, 2014). Cette réponse peut toutefois être plus ou moins efficace dans le confinement du pathogène au site d'inoculation. Elle peut aller de l'Extrême Résistance (ER) confinant le pathogène au niveau de la cellule infectée, à la HR induisant une mort cellulaire autour de la cellule infectée ; elle peut également aller jusqu'à une HR généralisée que l'on appelle « HR systémique » (SHR) (Künstler *et al.*, 2016). Ainsi, comme l'explique le concept de « continuum of host response » énoncé par Künstler *et al.* (2016), l'efficacité d'une résistance conférée par un gène de type *R* dépend du timing et de l'efficacité de la reconnaissance du pathogène après inoculation. Nous pouvons donc imaginer que les différents types de HR (cellulaire, tissulaire ou en systémie) seraient le reflet de réactions de défense déclenchées de plus en plus tardivement ou avec de moins en moins d'efficacité après infection virale. Au regard de ces données, nous posons l'hypothèse que l'apparition des nécroses nervaires induites par le PVY^N sur plante sensible résulterait de la mise en place d'une SHR conduisant à une mort cellulaire programmée des vaisseaux vasculaires du tabac. Ceci traduirait la mise en place d'un mécanisme de défense actif mais inefficace car incapable de limiter l'infection virale (*figure III-5*).

Nos résultats ont été très récemment corroborés par ceux d'une équipe allemande qui a identifié chez le tabac un déterminant cellulaire impliqué dans le développement des symptômes de nécrose nervaire induits par le PVY^N (Lamm *et al.*, 2017). Il s'agit de la protéine co-chaperonne Hop/Sti1 (pour stress-induced protein 1), qui régule l'interaction entre Hsp70/Hsp90 au sein d'un complexe ternaire. La diminution de l'expression de *Hop/Sti1* par RNAi dans des plantes transgéniques de *Nicotiana tabacum* bloque l'induction de symptômes de nécrose nervaire en cas d'infection par le PVY^N, alors que le virus s'accumule à un niveau équivalent à celui observé dans les plantes sauvages (Lamm *et al.*, 2017). Ce phénotype d'infection des plantes transgéniques silencées pour l'expression de *Hop/Sti1* est donc tout à fait comparable à celui observé chez les tabacs tolérants porteurs du gène muté *NtTPN1*. De façon très intéressante, les niveaux des protéines PR et d'acide salicylique induits par l'infection par le PVY^N sont inferieurs dans les tabacs silencés pour *Hop/Sti1* par rapport aux tabacs sauvages, suggérant un lien entre l'absence d'induction de symptômes et l'absence de réaction de défense au PVY. De plus, la protéine Hop/Sti1 est impliquée dans la maturation de PRR (Patterns Recognition Receptor) tel que RLK, un récepteur membranaire impliqué dans la reconnaissance de la chitine dans la voie de l'immunité basale. Les auteurs suggèrent que la co-chaperonne Hop/Sti1 serait impliquée dans la maturation (« folding » correct) d'un récepteur intracellulaire de type R qui reconnaîtrait la présence du PVY et induirait une réaction de défense de type HR cependant inefficace et conduisant à l'apparition de nécroses nervaires systémiques. Il est donc très excitant d'imaginer que ce fameux « récepteur » soit le produit du gène *NtTPN1*.

1. La nécrose nervaire induite par le PVY^N peut-elle être assimilée à une HR systémique ?

La HR est avant tout caractérisée par une mort cellulaire programmée. Pour vérifier si la présence du PVY^N induisait une mort cellulaire, j'ai d'abord mesuré le niveau d'expression du gène *hsr203J* qui a été décrit comme marqueur moléculaire de HR corrélé à la PCD chez plusieurs *Solanaceae* dont le tabac (Pontier *et al.*, 1994; 1998). Nos résultats confirment une surexpression de ce gène dans les accessions sensibles au PVY^N et présentant des symptômes de nécrose. Toutefois, nous observons cette même tendance dans l'une des accessions tolérantes (Lechia A). H*sr203J* étant activé à un temps très précoce de la HR, mesurer son niveau d'accumulation à 15 jours semble être trop tardif. Il faudrait, dans ce cas, se positionner

à un stade d'infection plus précoce entre 5 et 10 jpi (Martin *et al.*, 2017; Pontier *et al.*, 1994; Pontier *et al.*, 1998).

Il est également connu que lors d'une HR, la formation d'un « burst oxydatif » perçu par les cellules adjacentes au site d'infection se caractérise par la production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) tel que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) (Dangl et Jones, 2001; Künstler *et al.*, 2016; Lamb et Dixon, 1997; de Ronde *et al.*, 2014). Ceci est mis en évidence par coloration au DAB qui permet de visualiser la production de H_2O_2 *in planta* (Thordal-Christensen et al., 1997). Après coloration au DAB des feuilles infectées en systémie de chaque lignée sensible et tolérante, j'observe nettement une corrélation entre nécroses nervaires et production de H_2O_2. De même, la production de phytoalexines a été associée à une réponse de type HR (Chong, 2002; El Oirdi *et al.*, 2010; Martin *et al.*, 2017). J'ai donc mesuré sous lampe UV l'accumulation de ces composés et confirme à nouveau une corrélation entre La production de phytoalexines et nécrose nervaire. Enfin, un dernier marqueur moléculaire de réaction de type HR a été utilisé : l'expression différentielle des gènes *PR* (pour Pathogenesis-Related). Les premières observations indiquaient qu'il y avait bien surexpression de *PR1a-b-c* chez BB16 à 15 jpi par rapport aux variétés tolérantes. Cependant, aucune différence significative entre VAM (sensible à la nécrose induite par l'isolat contournant PVY^N-RB et les variétés tolérantes n'a pu être mise en évidence. Ces résultats préliminaires demandent à être confirmés par répétition avec d'autres isolats nécrotiques (PVY^N) et non nécrotiques (PVY^O).

En parallèle, nous avons testé l'hypothèse que ce phénomène de tolérance serait dû à une perte générale de la réponse hypersensible à l'infection par le PVY ou tout autre pathogène. Pour ce faire, j'ai utilisé deux facteurs d'avirulence associés à une réaction de type HR chez *N. tabacum* : (1) la protéine de capside du PVX (CP-PVX), connue pour induire une HR en présence de l'expression du gène de résistance *Rx* (NB-LRR) de la pomme de terre (Bendahmane et al., 1999) ; (2) l'effecteur bactérien AvrA produit par *Ralstonia solanacearum*, qui, à lui seul, permet l'induction d'une HR (Poueymiro *et al.*, 2009). L'expression transitoire de ces trois protéines, CP-PVX, Rx et AvrA, dans les feuilles des différentes accessions de tabac tolérantes a conduit à une réponse de type HR. L'ensemble de ces résultats nous a donc permis de confirmer que les accessions tolérantes étaient encore capables d'induire une HR en présence d'éliciteurs d'origine différente. La cascade de signalisation conduisant à la HR est

donc toujours efficace, traduisant un problème en amont de la voie de signalisation, probablement lors de la reconnaissance du PVY^N.

En résumé, les travaux menés sur les marqueurs de HR indiquent que la nécrose nervaire induite par le PVY^N chez les variétés sensibles correspond à une HR systémique. Dans le cas des variétés tolérantes, l'hypothèse serait que la mutation présente, à l'état homozygote, dans le domaine LRR de la protéine NtTPN1 ne permet plus l'interaction avec l'effecteur viral du PVY^N et ne conduit donc pas à une réponse de type HR.

2. HcPro comme déterminant moléculaire du PVY^N induisant une réaction de HR après reconnaissance par la protéine NtTPN1 ?

Des études antérieures réalisées par génétique inverse ont démontré le rôle central de la protéine HcPro dans l'induction de la nécrose nervaire chez le tabac (Faurez *et al.*, 2012; Tribodet *et al.,* 2005). J'ai confirmé ces résultats grâce à des clones infectieux de PVY chimères.

En parallèle, J'ai réalisé une expérience d'expression transitoire de HcPro nécrotique sur tabac non-tolérant (BB16 et VAM) qui n'a pas entraîné de réaction de HR caractérisée par le développement de nécrose nervaire. N'ayant pas pu démontrer avec certitude l'expression du transgène *HcPro in planta*, il est difficile à ce stade de conclure. Cependant, il est possible également qu'une absence de HR signifie que *HcPro* seul n'est pas suffisant pour déclencher une HR et doit être exprimé dans un contexte viral pour induire les symptômes de nécrose nervaire, comme l'ont souligné Pallas et García (2011) pour d'autres déterminants viraux. Une alternative est que HcPro nécessite d'être exprimé spécifiquement dans les tissus vasculaires ou à proximité, afin d'induire des symptômes de nécrose nervaire.

3. La validation fonctionnelle de *NtTPN1* par complémentation

Afin de complémenter la mutation portée par le gène *nttpn1* dans les variétés tolérantes, je voulais exprimer transitoirement l'allèle *NtTPN1* non muté dans des plantes tolérantes inoculées au préalable par le PVY^N. Après plusieurs tentatives, seul l'ADNc du gène *NtTPN1* possédant encore un intron a pu être cloné dans le vecteur d'expression.

Il a été montré que la fonction des protéines codées par des gènes *R* peut être régulée par la production d'isoformes tronquées générées lors d'un épissage alternatif (Yang *et al.*, 2014). C'est en particulier le cas du gène *N* chez le tabac, pour lequel deux types de transcrits sont observés : un transcrit codant pour la protéine entière et un transcrit résultant d'un

épissage alternatif codant pour une protéine tronquée en C-ter. La présence des deux types de transcrits est nécessaire à la mise en place de la HR contrôlée par *N* en cas d'infection par le TMV (Yang *et al.*, 2014).

De même, dans le cadre du pathosystème CMV/*Arabidopsis thaliana*, la régulation du niveau d'accumulation de la protéine codée par le gène *RCY1* est liée à la présence d'un intron dans l'ADNc codant pour RCY1 mais n'est pas corrélée au polymorphisme présent dans les séquences régulatrices 5' et 3' non codantes (Sato *et al.*, 2014). Sachant que *NtTPN1* fait partie de la même famille de gènes que *RCY1*, il est donc probable qu'un épissage alternatif vienne moduler son activité et/ou accumulation.

II. Conclusion générale

Les travaux réalisés durant ma thèse ont permis (1) de préciser le déterminisme génétique d'une résistance durable, (2) d'identifier, en parallèle, un tout nouveau mécanisme de tolérance à l'infection par le PVY du tabac. Le déploiement de variétés durablement résistantes ou même simplement tolérantes vise, dans les deux cas, à limiter l'impact économique de cet agent pathogène majeur pour la filière tabac. En cela, les deux aboutissements de ma thèse seront intéressants en premier lieu pour les sélectionneurs, leur permettant de proposer des stratégies de déploiement de ces mécanismes de résistance/tolérance (par exemple, en alternant dans une même zone de production ou lors d'une rotation, des variétés VAM et nt-tpn1) ou de cumul dans des variétés élites à la fois de la résistance contrôlée par *va* et de la tolérance liée à *nttpn1*. Dans le cas de la résistance contrôlée par *va*, il conviendra d'associer à la fois la forme allélique résistante de *va*, à l'état homozygote, et un haplotype favorable à sa durabilité au locus *eIF4E-2-3-4*. Au niveau appliqué, ma thèse a mis en évidence des mécanismes de réponse à l'infection virale distincts qu'il sera intéressant de tester en champs, dans différents écosystèmes agricoles, afin de définir la meilleure stratégie de déploiement à long terme.

Références bibliographiques

Abdul-Razzak, A., Guiraud, T., Peypelut, M., Walter, J., Houvenaghel, M.-C., Candresse, T., Le Gall, O. and German-Retana, S. (2009) Involvement of the cylindrical inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against *Lettuce mosaic potyvirus*. *Mol. Plant Pathol.*, **10**, 109–113.

Acosta-Leal, R. and Xiong, Z. (2008) Complementary functions of two recessive R-genes determine resistance durability of tobacco "Virgin A Mutant" (VAM) to *Potato virus Y*. *Virology*, **379**, 275–283.

Agbeci, M., Grangeon, R., Nelson, R.S., Zheng, H. and Laliberté, J.-F. (2013) Contribution of Host Intracellular Transport Machineries to Intercellular Movement of Turnip Mosaic Virus C. Ritzenthaler, ed. *PLoS Pathog.*, **9**, e1003683.

Ala-Poikela, M., Goytia, E., Haikonen, T., Rajamaki, M.-L. and Valkonen, J.P.T. (2011) Helper Component Proteinase of the Genus *Potyvirus* Is an Interaction Partner of Translation Initiation Factors eIF(iso)4E and eIF4E and Contains a 4E Binding Motif. *J. Virol.*, **85**, 6784–6794.

Albar, L., Bangratz-Reyser, M., Hébrard, E., Ndjiondjop, M.-N., Jones, M. and Ghesquière, A. (2006) Mutations in the eIF(iso)4G translation initiation factor confer high resistance of rice to *Rice yellow mottle virus*. *Plant J.*, **47**, 417–426.

Albar, L., Ndjiondjop, M.-N., Esshak, Z., Berger, A., Pinel, A., Jones, M., Fargette, D. and Ghesquière, A. (2003) Fine genetic mapping of a gene required for *Rice yellow mottle virus* cell-to-cell movement. *Theor. Appl. Genet.*, **107**, 371–378.

Albrecht, M. and Takken, F.L.W. (2006) Update on the domain architectures of NLRs and R proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **339**, 459–462.

Andersen, M.M., Landes, X., Xiang, W., et al. (2015) Feasibility of new breeding techniques for organic farming. *Trends Plant Sci.* **20**, 426–434.

Anderson, P.K., Cunningham, A.A., Patel, N.G., Morales, F.J., Epstein, P.R. and Daszak, P. (2004) Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends Ecol. Evol.*, **19**, 535–544.

Andrade, M., Sato, M. and Uyeda, I. (2007) Two resistance modes to *Clover yellow vein virus* in pea characterized by a green fluorescent protein-tagged virus. *Phytopathology*, **97**, 544–550.

Andrade, M., Abe, Y., Nakahara, K.S. and Uyeda, I. (2009) The *cyv-2* resistance to *Clover yellow vein virus* in pea is controlled by the eukaryotic initiation factor 4E. *J. Gen. Plant Pathol.*, **75**, 241–249.

Anindya, R. and Savithri, H.S. (2004) Potyviral NIa Proteinase, a Proteinase with Novel Deoxyribonuclease Activity. *J. Biol. Chem.*, **279**, 32159–32169.

Ano, G., Blancard, D. and Cailleteau, B. (1995) Mise au point sur la résistance récessive aux souches nécrotiques du virus Y de la pomme de terre (PVY) présente chez Nicotiana tabacum. *Annales du Tabac* **27**, 35–42.

Arroyo, R., Soto, M.., Martinez-Zapater, J.M. and Ponz, F. (1996) Impaired cell-to-cell movement of *Potato Virus Y* in Pepper plants carrying the y^a ($pr2^1$) resistance gene. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **9**, 314–318.

Arumuganathan, K. and Earle, E.D. (1991) Nuclear DNA content of some important plant species. *Plant Mol. Biol. Report.*, **9**, 208–218.

Ayme, V., Souche, S., Caranta, C., Jacquemond, M., Chadø euf, J., Palloix, A. and Moury, B. (2006) Different mutations in the genome-linked protein VPg of *Potato virus Y* confer virulence on the $pvr2^3$ resistance in pepper. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **19**, 557–563.

Ayme, V., Petit-Pierre, J., Souche, S., Palloix, A. and Moury, B. (2007) Molecular dissection of the *Potato virus Y* VPg virulence factor reveals complex adaptations to the *pvr2* resistance allelic series in pepper. *J. Gen. Virol.*, **88**, 1594–1601.

Bak, A., Cheung, A.L., Yang, C., Whitham, S.A. and Casteel, C.L. (2017) A viral protease relocalizes in the presence of the vector to promote vector performance. *Nat. Commun.*, **8**, 14493.

Baurès, I., Candresse, T., Leveau, A., Bendahmane, A. and Sturbois, B. (2008) The *Rx* gene confers resistance to a range of potexviruses in transgenic *Nicotiana* plants. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **21**, 1154–1164.

Bebber, D.P., Ramotowski, M.A.T. and Gurr, S.J. (2013) Crop pests and pathogens move polewards in a warming world. *Nat. Clim. Change*, **3**, 985–988.

Bendahmane, A., Kanyuka, K. and Baulcombe, D.C. (1999) The *Rx* gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell*, **11**, 781–791.

Bent, A.F. and Mackey, D. (2007) Elicitors, Effectors, and *R* Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **45**, 399–436.

Bindler, G., Plieske, J., Bakaher, N., Gunduz, I., Ivanov, N., Van der Hoeven, R., Ganal, M. and Donini, P. (2011) A high density genetic map of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) obtained from large scale microsatellite marker development. *Theor. Appl. Genet.*, **123**, 219–230.

Blanc, S., Ammar, E.D., Garcia-Lampasona, S., Dolja, V.V., Llave, C., Baker, J. and Pirone, T.P. (1998) Mutations in the potyvirus helper component protein: effects on interactions with virions and aphid stylets. *J. Gen. Virol.*, **79**, 3119–3122.

Blancard, D. (1998) *Maladies du tabac. Observer, identifier, lutter.* Paris, France: INRA Editions.

Blancard, D., Ano, G. and Cailleteau, B. (1995) Etude du pouvoir pathogène d'isolats de PVY sur tabac : proposition d'une classification intégrant la résistance à la nécrose. In *Annales du Tabac*. p. 27, 43–50.

Blanco-Urgoiti, B., Dopazo, J., Ponz, F. and others (1998) *Potato virus Y* group C isolates are a homogeneous pathotype but two different genetic strains. *J. Gen. Virol.*, **79**, 2037–2042.

Bokros, C.L., Hugdahl, J.D., Kim, H.-H., Hanesworth, V.R., Van Heerden, A., Browning, K.S. and Morejohn, L.C. (1995) Function of the p86 subunit of eukaryotic initiation factor (iso) 4F as a microtubule-associated protein in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**, 7120–7124.

Bommarco, R., Kleijn, D. and Potts, S.G. (2013) Ecological intensification: harnessing ecosystem services for food security. *Trends Ecol. Evol.*, **28**, 230–238.

Bos, L. and Parlevliet, J.E. (1995) Concepts and terminology on plant/pest relationships: toward consensus in plant pathology and crop protection. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **33**, 69–102.

Boualem, A., Dogimont, C. and Bendahmane, A. (2016) The battle for survival between viruses and their host plants. *Curr. Opin. Virol.*, **17**, 32–38.

Brown, J.K. and Hovmøller, M.S. (2002) Aerial dispersal of pathogens on the global and continental scales and its impact on plant disease. *Science*, **297**, 537–541.

Browning, K.S. and Bailey-Serres, J. (2015) Mechanism of Cytoplasmic mRNA Translation. *Arab. Book*, **13**, e0176.

Butterbach, P., Verlaan, M.G., Dullemans, A., Lohuis, D., Visser, R.G.F., Bai, Y. and Kormelink, R. (2014) *Tomato yellow leaf curl virus* resistance by *Ty-1* involves increased cytosine methylation of viral genomes and is compromised by *cucumber mosaic virus* infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **111**, 12942–12947.

Cambra, M., Capote, N., Myrta, A. and Llácer, G. (2006) *Plum pox virus* and the estimated costs associated with sharka disease. *EPPO Bull.*, **36**, 202–204.

Caplan, J.L., Kumar, A.S., Park, E., Padmanabhan, M.S., Hoban, K., Modla, S., Czymmek, K. and Dinesh-Kumar, S.P. (2015) Chloroplast Stromules Function during Innate Immunity. *Dev. Cell*, **34**, 45–57.

Caplan, J.L., Mamillapalli, P., Burch-Smith, T.M., Czymmek, K. and Dinesh-Kumar, S.P. (2008) Chloroplastic Protein NRIP1 Mediates Innate Immune Receptor Recognition of a Viral Effector. *Cell*, **132**, 449–462.

Caplan, J.L., Zhu, X., Mamillapalli, P., Marathe, R., Anandalakshmi, R. and Dinesh-Kumar, S.P. (2009) Induced ER Chaperones Regulate a Receptor-like Kinase to Mediate Antiviral Innate Immune Response in Plants. *Cell Host Microbe*, **6**, 457–469.

Caranta, C., Pflieger, S., Lefebvre, V., Daubeze, A.M., Thabuis, A. and Palloix, A. (2002) QTLs involved in the restriction of *cucumber mosaic virus* (CMV) long-distance movement in pepper. *Theor. Appl. Genet.*, **104**, 586–591.

Carvalho, C.M., Santos, A.A., Pires, S.R., Rocha, C.S., Saraiva, D.I., Machado, J.P.B., Mattos, E.C., Fietto, L.G. and Fontes, E.P.B. (2008) Regulated Nuclear Trafficking of rpL10A Mediated by NIK1 Represents a Defense Strategy of Plant Cells against Virus T. Hohn, ed. *PLoS Pathog.*, **4**, e1000247.

Cavatorta, J., Perez, K.W., Gray, S.M., Van Eck, J., Yeam, I. and Jahn, M. (2011) Engineering virus resistance using a modified potato gene: Engineering virus resistance using a modified potato gene. *Plant Biotechnol. J.* **9**, 1014–1021.

Cawley, A. and Warwicker, J. (2012) eIF4E-binding protein regulation of mRNAs with differential 5'-UTR secondary structure: a polyelectrostatic model for a component of protein-mRNA interactions. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 7666–7675.

Cesari, S., Bernoux, M., Moncuquet, P., Kroj, T. and Dodds, P.N. (2014) A novel conserved mechanism for plant NLR protein pairs: the “integrated decoy” hypothesis. *Front. Plant Sci.*, **5**.

Chandler, J. and Werr, W. (2003) When negative is positive in functional genomics. *Trends Plant Sci.* **8**, 279–285.

Chandrasekaran, J., Brumin, M., Wolf, D., Leibman, D., Klap, C., Pearlsman, M., Sherman, A., Arazi, T. and Gal-On, A. (2016) Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol. Plant Pathol.* **17**, 1140–1153.

Charon, J., Barra, A., Walter, J., Millot, P., Hébrard, E., Moury, B. and Michon, T. (2017) First experimental assessment of protein intrinsic disorder involvement in an RNA virus natural adaptive process. *Mol. Biol. Evol.* msx249.

Charron, C., Nicolaï, M., Gallois, J.-L., Robaglia, C., Moury, B., Palloix, A. and Caranta, C. (2008) Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg: Co-evolution between eIF4E and VPg. *Plant J.*, **54**, 56–68.

Chellappan, P., Vanitharani, R. and Fauquet, C.M. (2004) Short Interfering RNA Accumulation Correlates with Host Recovery in DNA Virus-Infected Hosts, and Gene Silencing Targets Specific Viral Sequences. *J. Virol.*, **78**, 7465–7477.

Cheng, X. and Wang, A. (2017) The Potyvirus Silencing Suppressor Protein VPg Mediates Degradation of SGS3 via Ubiquitination and Autophagy Pathways A. E. Simon, ed. *J. Virol.*, **91**, e01478-16.

Chisholm, S.T., Coaker, G., Day, B. and Staskawicz, B.J. (2006) Host-Microbe Interactions: Shaping the Evolution of the Plant Immune Response. *Cell*, **124**, 803–814.

Chisholm, S.T., Mahajan, S.K., Whitham, S.A., Yamamoto, M.L. and Carrington, J.C. (2000) Cloning of the Arabidopsis *RTM1* gene, which controls restriction of long-distance movement of tobacco etch virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **97**, 489–494.

Choi, D.S., Hwang, I.S. and Hwang, B.K. (2012) Requirement of the Cytosolic Interaction between Pathogenesis-Related protein 10 and Leucine-Rich Repeat protein 1for Cell Death and Defense Signaling in Pepper. *Plant Cell*, **24**, 1675–1690.

Chong, J. (2002) Downregulation of a Pathogen-Responsive Tobacco UDP-Glc:Phenylpropanoid Glucosyltransferase Reduces Scopoletin Glucoside Accumulation, Enhances Oxidative Stress, and Weakens Virus Resistance. *PLANT CELL ONLINE* **14**, 1093–1107.

Chung, B.Y.-W., Miller, W.A., Atkins, J.F. and Firth, A.E. (2008) An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **105**, 5897–5902.

Clark, R.M., Schweikert, G., Toomajian, C., et al. (2007) Common Sequence Polymorphisms Shaping Genetic Diversity in Arabidopsis thaliana. *Science*, **317**, 338–342.

Clarkson, J.J., Lim, K.Y., Kovarik, A., Chase, M.W., Knapp, S. and Leitch, A.R. (2005) Long-term genome diploidization in allopolyploid *Nicotiana* section *Repandae* (*Solanaceae*). *New Phytol.*, **168**, 241–252.

Colborn, T., Saal, F.S. vom and Soto, A.M. (1993) Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.*, **101**, 378.

Collier, S.M. and Moffett, P. (2009) NB-LRRs work a “bait and switch” on pathogens. *Trends Plant Sci.*, **14**, 521–529.

Cooley, M.B., Pathirana, S., Wu, H.-J., Kachroo, P. and Klessig, D.F. (2000) Members of the Arabidopsis *HRT*/*RPP8* family of resistance genes confer resistance to both viral and oomycete pathogens. *Plant Cell*, **12**, 663–676.

Cooper, J.I. and Jones, A.T. (1983) Responses of plants to viruses: proposals for the use of terms. *Phytopathology*, **73**, 127–128.

Cosson, P., Sofer, L., Hien Le, Q., et al. (2010) *RTM3*, Which Controls Long-Distance Movement of *Potyviruses*, Is a Member of a New Plant Gene Family Encoding a Meprin and TRAF Homology Domain-Containing Protein. *PLANT Physiol.*, **154**, 222–232.

Cronin, S., Verchot, J., Haldeman-Cahill, R., Schaad, M.C. and Carrington, J.C. (1995) Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell Online*, **7**, 549–559.

Csorba, T., Kontra, L. and Burgyán, J. (2015) viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology*, **479**–**480**, 85–103.

Cui, H. and Wang, A. (2016) *Plum Pox Virus* 6K1 Protein Is Required for Viral Replication and Targets the Viral Replication Complex at the Early Stage of Infection A. Simon, ed. *J. Virol.*, **90**, 5119–5131.

Cui, X., Yaghmaiean, H., Wu, G., Wu, X., Chen, X., Thorn, G. and Wang, A. (2017) The C-terminal region of the *Turnip mosaic virus* P3 protein is essential for viral infection via targeting P3 to the viral replication complex. *Virology*, **510**, 147–155.

Dangl, J.L. and Jones, J.D. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *nature*, **411**, 826.

Decroocq, V., Salvador, B., Sicard, O., Glasa, M., Cosson, P., Svanella-Dumas, L., Revers, F., García, J.A. and Candresse, T. (2009) The determinant of potyvirus ability to overcome the *RTM* resistance of *Arabidopsis thaliana* maps to the N-terminal region of the coat protein. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **22**, 1302–1311.

Decroocq, V., Sicard, O., Alamillo, J.M., Lansac, M., Eyquard, J.P., Garcia, J.A., Candresse, T., Le Gall, O. and Revers, F. (2006) Multiple resistance traits control *Plum pox virus* infection in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **19**, 541–549.

Dempsey, D.A. and Klessig, D.F. (2012) SOS – too many signals for systemic acquired resistance? *Trends Plant Sci.*, **17**, 538–545.

Deom, C.M., Murphy, J.F. and Paguio, O.R. (1997) Resistance to *tobacco etch virus* in *Capsicum annuum*: inhibition of virus RNA accumulation. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **10**, 917–921.

De Ronde, D., Butterbach, P. and Kormelink, R. (2014) Dominant resistance against plant viruses. *Front. Plant Sci.*, **5**:307.

Diaz-Pendon, J.A., Li, F., Li, W.-X. and Ding, S.-W. (2007) Suppression of Antiviral Silencing by *Cucumber Mosaic Virus* 2b Protein in *Arabidopsis* Is Associated with Drastically Reduced Accumulation of Three Classes of Viral Small Interfering RNAs. *Plant Cell*, **19**, 2053–2063.

Diaz-Pendon, J.A., Truniger, V., Nieto, C., Garcia-Mas, J., Bendahmane, A. and Aranda, M.A. (2004) Advances in understanding recessive resistance to plant viruses. *Mol. Plant Pathol.*, **5**, 223–233.

Diaz-Vivancos, P., Clemente-Moreno, M.J., Rubio, M., Olmos, E., Garcia, J.A., Martinez-Gomez, P. and Hernandez, J.A. (2008) Alteration in the chloroplastic metabolism leads to ROS accumulation in pea plants in response to *plum pox virus*. *J. Exp. Bot.*, **59**, 2147–2160.

Ding, S.-W. (2010) RNA-based antiviral immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, **10**, 632–644.

Dodds, P.N., Lawrence, G.J., Catanzariti, A.-M., Teh, T., Wang, C.-I., Ayliffe, M.A., Kobe, B. and Ellis, J.G. (2006) Direct protein interaction underlies gene-for-gene specificity and coevolution of the flax resistance genes and flax rust avirulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **103**, 8888–8893.

Dolja, V.V., Haldeman, R., Robertson, N.L., Dougherty, W.G. and Carrington, J.C. (1994) Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of *tobacco etch potyvirus* in plants. *EMBO J.*, **13**, 1482.

Dunoyer, P. (2009) La bataille du silence: Mécanisme et inhibition du *RNA silencing* au cours des interactions plante/virus. *médecine/sciences*, **25**, 505–512.

Dunoyer, P., Melnyk, C., Molnar, A. and Slotkin, R.K. (2013) Plant Mobile Small RNAs. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **5**, a017897–a017897.

Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K.S. and Robaglia, C. (2002) The Arabidopsis eukaryotic initiation factor (iso) 4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant J.*, **32**, 927–934.

Edwards, K.D., Fernandez-Pozo, N., Drake-Stowe, K., et al. (2017) A reference genome for *Nicotiana tabacum* enables map-based cloning of homeologous loci implicated in nitrogen utilization efficiency. *BMC Genomics*, **18**, 448.

El Oirdi, M., Trapani, A. and Bouarab, K. (2010) The nature of tobacco resistance against *Botrytis cinerea* depends on the infection structures of the pathogen. *Environ. Microbiol.* **12**, 239–253.

Eskelin, K., Hafren, A., Rantalainen, K.I. and Makinen, K. (2011) Potyviral VPg Enhances Viral RNA Translation and inhibits reporter mRNA translation in planta. *J. Virol.*, **85**, 9210–9221.

Fabre, F., Bruchou, C., Palloix, A. and Moury, B. (2009) Key determinants of resistance durability to plant viruses: Insights from a model linking within- and between-host dynamics. *Virus Res.*, **141**, 140–149.

Farnham, G. and Baulcombe, D.C. (2006) Artificial evolution extends the spectrum of viruses that are targeted by a disease-resistance gene from potato. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **103**, 18828–18833.

Faurez, F., Baldwin, T., Tribodet, M. and Jacquot, E. (2012) Identification of new *Potato virus Y* (PVY) molecular determinants for the induction of vein necrosis in tobacco: PVY determinants of tobacco vein necrosis. *Mol. Plant Pathol.*, **13**, 948–959.

Feki, S. and Bouslama, L. (2008) Molecular phylogeny and genetic variability of the *Potato virus Y* (PVY) strains on the CP-encoding region. *Ann. Microbiol.*, **58**, 433–438.

Fellers, J., Wan, J., Hong, Y., Collins, G.B. and Hunt, A.G. (1998) In vitro interactions between a potyvirus-encoded, genome-linked protein and RNA-dependent RNA polymerase. *J. Gen. Virol.*, **79**, 2043–2049.

Fernández, A. and García, J.A. (1996) The RNA helicase CI from *plum pox potyvirus* has two regions involved in binding to RNA. *FEBS Lett.*, **388**, 206–210.

Flor, H.H. (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **9**, 275–296.

Flor, H.H. (1955) Host-parasite interactions in flax rust_it's genetics aand other implications. *Phytopathology*, **45**, 680–685.

Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO) (2009) Declaration of the world summit on food security,Rome, November 2009. Available at: www.fao.org [Accessed October 11, 2017].

Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO) (2004) L'économie mondiale du tabac : un choix d'études de cas. Available at: www.fao.org/docrep/007/y4997f/y4997f00.htm.

Fournet, S., Kerlan, M.C., Renault, L., Dantec, J.P., Rouaux, C. and Montarry, J. (2013) Selection of nematodes by resistant plants has implications for local adaptation and cross-virulence. *Plant Pathol.*, **62**, 184–193.

Fraser, R.S.S. (1990) The genetics of resistance to plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **28**, 179–200.

Fu, Z.Q. and Dong, X. (2013) Systemic Acquired Resistance: turning local infection into global defense. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **64**, 839–863.

Gadani, F., Hayes, A., Opperman, C.H., et al. (2003) Large scale genome sequencing and analysis of *Nicotiana tabacum*: the tobacco genome initiative *5th Bergerac Tobacco Scientific, Meeting., Bergerac*. *pp* 117–130

Gago, S., Elena, S.F., Flores, R. and Sanjuan, R. (2009) Extremely High Mutation Rate of a Hammerhead Viroid. *Science*, **323**, 1308–1308.

Gao, Z., Johansen, E., Eyers, S., Thomas, C.L., Noel Ellis, T.H. and Maule, A.J. (2004) The potyvirus recessive resistance gene, *sbm1*, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking: Novel role for eIF4E in virus movement. *Plant J.*, **40**, 376–385.

García-Arenal, F. and McDonald, B.A. (2003) An analysis of the durability of resistance to plant viruses. *Phytopathology*, **93**, 941–952.

Garcia-Ruiz, H., Carbonell, A., Hoyer, J.S., et al. (2015) Roles and programming of Arabidopsis ARGONAUTE proteins during *Turnip mosaic virus* infection. *PLoS Pathog.*, **11**, e1004755.

Garcia-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Fahlgren, N., Brempelis, K.J. and Carrington, J.C. (2010) Arabidopsis RNA-Dependent RNA Polymerases and Dicer-Like Proteins in Antiviral Defense and Small Interfering RNA Biogenesis during *Turnip Mosaic Virus* Infection. *Plant Cell*, **22**, 481–496.

Garnett, T., Appleby, M.C., Balmford, A., et al. (2013) Sustainable intensification in agriculture: premises and policies. *Science*, **341**, 33–34.

Garrett, K.A., Forbes, G.A., Savary, S., et al. (2011) Complexity in climate-change impacts: an analytical framework for effects mediated by plant disease: Complexity in climate-change impacts. *Plant Pathol.*, **60**, 15–30.

Gauffier, C., Lebaron, C., Moretti, A., Constant, C., Moquet, F., Bonnet, G., Caranta, C. and Gallois, J.-L. (2016) A TILLING approach to generate broad-spectrum resistance to potyviruses in tomato is hampered by *eIF4E* gene redundancy. *Plant J.*, **85**, 717–729.

German-Retana, S., Walter, J., Doublet, B., et al. (2008) Mutational analysis of plant Cap-Binding Protein eIF4E reveals key amino acids involved in biochemical functions and potyvirus infection. *J. Virol.*, **82**, 7601–7612.

Gisquet, P. and Hitier, H. (1961) *La production du tabac, principes et méthodes* 2ème éd. Edition Baillière et fils.

Glais, L., Tribodet, M. and Kerlan, C. (2002) Genomic variability in *Potato potyvirus Y* (PVY): evidence that PVY^{NW} and PVY^{NTN} variants are single to multiple recombinants between PVY^{O} and PVY^{N} isolates. *Arch. Virol.*, **147**, 363–378.

Goodspeed, T.H. (1954) The genus *Nicotiana. Eds Waltham, Mass*, USA, 310 pp

Gouveia, B.C., Calil, I.P., Machado, J.P.B., Santos, A.A. and Fontes, E.P.B. (2017) Immune Receptors and Co-receptors in Antiviral Innate Immunity in Plants. *Front. Microbiol.*, **7**, 2139.

Grzela, R., Szolajska, E., Ebel, C., Madern, D., Favier, A., Wojtal, I., Zagorski, W. and Chroboczek, J. (2008) Virulence Factor of *Potato Virus Y*, Genome-attached Terminal Protein VPg, Is a Highly Disordered Protein. *J. Biol. Chem.*, **283**, 213–221.

Guo, D., Rajamäki, M.-L., Saarma, M. and Valkonen, J.P. (2001) Towards a protein interaction map of potyviruses: protein interaction matrixes of two potyviruses based on the yeast two-hybrid system. *J. Gen. Virol.*, **82**, 935–939.

Gutiérrez, S., Pirolles, E., Yvon, M., Baecker, V., Michalakis, Y. and Blanc, S. (2015) The Multiplicity of Cellular Infection Changes Depending on the Route of Cell Infection in a *Plant Virus A*. Simon, ed. *J. Virol.*, **89**, 9665–9675.

Hämäläinen, J.H., Kekarainen, T., Gebhardt, C., Watanabe, K.N. and Valkonen, J.P. (2000) Recessive and dominant genes interfere with the vascular transport of *Potato virus A* in diploid potatoes. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **13**, 402–412.

Harrison, B.D. (2002) Virus variation in relation to resistance-breaking in plants. *Euphytica*, **124**, 181–192.

Hébrard, E., Bessin, Y., Michon, T., Longhi, S., N Uversky, V., Delalande, F., Van Dorsselaer, A., Romero, P., Walter, J., Declerck, N. and Fargette D. (2009) Intrinsic disorder in Viral Proteins Genome-Linked: experimental and predictive analyses. *Virol. J.*, **6**, 23.

Hébrard, E., Pinel-Galzi, A., Bersoult, A., Siré, C. and Fargette, D. (2006) Emergence of a resistance-breaking isolate of *Rice yellow mottle virus* during serial inoculations is due to a single substitution in the genome-linked viral protein VPg. *J. Gen. Virol.*, **87**, 1369–1373.

Holmes, F.O. (1938) Inheritance of resistance to tobacco mosaic disease in tobacco. *Phytopathology*. **28**, 553–561.

Hong, Y. and Hunt, A.G. (1996) RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. *Virology*, **226**, 146–151.

Hoorn, R.A.L. van der and Kamoun, S. (2008) From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *PLANT CELL ONLINE*, **20**, 2009–2017.

Horrigan, L., Lawrence, R.S. and Walker, P. (2002) How sustainable agriculture can address the environmental and human health harms of industrial agriculture. *Environ. Health Perspect.*, **110**, 445.

Hull, R. (2013) *PlantVirology*, 5th Edn. NewYork: Academic Press.

Hwang, D.C., Kim, D.-H., Kang, B.H., Song, B.D. and Choi, K.Y. (2000) Molecular cloning, expression, and purification of nuclear inclusion A protease from *tobacco vein mottling virus*. *Mol. Cells*, **10**, 148–155.

Hyodo, K. and Okuno, T. (2016) Pathogenesis mediated by proviral host factors involved in translation and replication of plant positive-strand RNA viruses. *Curr. Opin. Virol.*, **17**, 11–18.

Incarbone, M. and Dunoyer, P. (2013) RNA silencing and its suppression: novel insights from in planta analyses. *Trends Plant Sci.*, **18**, 382–392.

Ishibashi, K., Kezuka, Y., Kobayashi, C., Kato, M., Inoue, T., Nonaka, T., Ishikawa, M., Matsumura, H. and Katoh, E. (2014) Structural basis for the recognition-evasion arms race between *Tomato mosaic virus* and the resistance gene *Tm-1*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **111**, E3486–E3495.

Ivanov, K.I., Eskelin, K., Lohmus, A. and Makinen, K. (2014) Molecular and cellular mechanisms underlying potyvirus infection. *J. Gen. Virol.*, **95**, 1415–1429.

Jackson, R.J., Hellen, C.U.T. and Pestova, T.V. (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **11**, 113–127.

Janzac, B., Fabre, F., Palloix, A. and Moury, B. (2009) Constraints on evolution of virus avirulence factors predict the durability of corresponding plant resistances. *Mol. Plant Pathol.*, **10**, 599–610.

Janzac, B., Tribodet, M., Lacroix, C., Moury, B., Verrier, J.L. and Jacquot, E. (2014) Evolutionary Pathways to Break Down the Resistance of Allelic Versions of the PVY Resistance Gene *va*. *Plant Dis.*, **98**, 1521–1529.

Jenner, C.E., Wang, X., Ponz, F. and Walsh, J.A. (2002) A fitness cost for *Turnip mosaic virus* to overcome host resistance. *Virus Res.*, **86**, 1–6.

Jenner, C.E., Nellist, C.F., Barker, G.C. and Walsh, J.A. (2010) *Turnip mosaic virus* (TuMV) is able to use alleles of both eIF4E and eIF (iso) 4E from multiple loci of the diploid *Brassica rapa*. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **23**, 1498–1505.

Jiang, J. and Laliberté, J.-F. (2011) The genome-linked protein VPg of plant viruses—a protein with many partners. *Curr. Opin. Virol.*, **1**, 347–354.

Jiang, J., Patarroyo, C., Garcia Cabanillas, D., Zheng, H. and Laliberté, J.-F. (2015) The Vesicle-Forming 6K $_2$ Protein of *Turnip Mosaic Virus* Interacts with the COPII Coatomer Sec24a for Viral Systemic Infection A. Simon, ed. *J. Virol.*, **89**, 6695–6710.

Johnson, R. (1981) Durable resistance: definition of, genetic control, and attainment in plant breeding.

Johnson, R. (1979) Letter to the editor: The concept of durable resistance. *Phytopathology*, **69**, 198–199.

Johnson, R. and Law, C.N. (1975) Genetic control of durable resistance to yellow rust (*Puccinia striiformis*) in the wheat cultivar Hybride de Bersee. *Ann. Appl. Biol.*, **81**, 385–391.

Jones, J.D.G. and Dangl, J.L. (2006) The plant immune system. *Nature*, **444**, 323–329.

Julio, E. (2005) *Développement d'une carte génétique de Nicotiana tabacum et détection de QTLs liés à des caractères agronomiques et à la composition de la fumée*. Available at: http://oatao.univ-toulouse.fr/7438/ [Accessed March 19, 2015]. Thèse: Université de Toulouse

Julio, E., Verrier, J.-L. and Dorlhac de Borne, F. (2006) Development of SCAR markers linked to three disease resistances based on AFLP within Nicotiana tabacum L. *Theor. Appl. Genet.*, **112**, 335–346.

Julio, E., Laporte, F., Reis, S., Rothan, C. and Dorlhac de Borne, F. (2008) Reducing the content of nornicotine in tobacco via targeted mutation breeding. *Mol. Breed.*, **21**, 369–381.

Julio, E., Cotucheau, J., Decorps, C., Volpatti, R., Sentenac, C., Candresse, T. and Dorlhac de Borne, F. (2014) A Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E (eIF4E) is Responsible for the "*va*" Tobacco Recessive Resistance to Potyviruses. *Plant Mol. Biol. Report.,* **33**, 609–623.

Kang, B.-C., Yeam, I. and Jahn, M.M. (2005*a*) Genetics of Plant Virus Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **43**, 581–621.

Kang, B.-C., Yeam, I., Frantz, J.D., Murphy, J.F. and Jahn, M.M. (2005*b*) The *pvr1* locus in Capsicum encodes a translation initiation factor eIF4E that interacts with *Tobacco etch virus* VPg. *Plant J.*, **42**, 392–405.

Kang, B.-C., Yeam, I., Li, H., Perez, K.W. and Jahn, M.M. (2007) Ectopic expression of a recessive resistance gene generates dominant potyvirus resistance in plants. *Plant Biotechnol. J.* **5**, 526–536.

Kanyuka, K., Druka, A., Caldwell, D.G., Tymon, A., Mccallum, N., Waugh, R. and Adams, M.J. (2005) Evidence that the recessive bymovirus resistance locus rym4 in barley corresponds to the eukaryotic translation initiation factor 4E gene. *Mol. Plant Pathol.*, **6**, 449–458.

Kasschau, K.D. and Carrington, J.C. (1998) A counter defensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell*, **95**, 461–470.

Kasschau, K.D., Cronin, S. and Carrington, J.C. (1997) Genome amplification and long-distance movement functions associated with the central domain of tobacco etch potyvirus helper component-proteinase. *Virology*, **228**, 251–262.

Kasschau, K.D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E.J., Krizan, K.A. and Carrington, J.C. (2003) P1/HC-Pro, a viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev. Cell*, **4**, 205–217.

Keller, K.E., Johansen, E., Martin, R.R. and Hampton, R.O. (1998) Potyvirus genome-linked protein (VPg) determines *pea seed-borne mosaic virus* pathotype-specific virulence in *Pisum sativum*. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **11**, 124–130.

Kerlan, C. (2006) *Potato virus Y*. *AAB/CMI Description of Plant Viruses*, 414. Available at http://www dpvweb.net/dpv/showdpv.php?dpvno=414.

Klein, P., Klein, R. and Rodriguez-Cerezo, E. (1994) Mutational analysis of the *tobacco vein mottling virus* genome. *Virology*, **204**, 759– 769.

Koelle G (1961) Genetic analyse *einer Y-virus* (Rippenbraune) resistenten mutante der tabaksorte Virgin A. *Zuchter* **31**:71-72.

Knapp, S., Chase, M.W. and Clarkson, J.J. (2004) Nomenclatural Changes and a New Sectional Classification in *Nicotiana* (*Solanaceae*). *Taxon*, **53**, 73-82.

Kobe, B. and Kajava, A.V. (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**, 725–732.

Kohm, B.A., Goulden, M.G., Gilbert, J.E., Kavanagh, T.A. and Baulcombe, D.C. (1993) A *Potato virus X* resistance gene mediates an induced, nonspecific resistance in protoplasts. *Plant Cell*, **5**, 913–920.

Komari, T., Kubo, T. and Sato, M. (1986) Inheritance of the low-duvatriendiol trait in *Nicotiana tabacum* L. 30:159±162. *Tob. Sci*., **30**, 159-162.

Kørner, C.J., Klauser, D., Niehl, A., Domínguez-Ferreras, A., Chinchilla, D., Boller, T., Heinlein, M. and Hann, D.R. (2013) The Immunity Regulator *BAK1* Contributes to Resistance Against Diverse RNA Viruses. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **26**, 1271–1280.

Künstler, A., Bacsó, R., Gullner, G., Hafez, Y.M. and Király, L. (2016) Staying alive – is cell death dispensable for plant disease resistance during the hypersensitive response? *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **93**, 75–84.

Lacomme, C. and Santa Cruz, S. (1999) Bax-induced cell death in tobacco is similar to the hypersensitive response. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 7956–7961.

Lacroix, C., Glais, L., Kerlan, C., Verrier, J.-L. and Jacquot, E. (2010) Biological characterization of French *Potato virus Y* (PVY) isolates collected from PVY-susceptible or -resistant tobacco plants possessing the recessive resistance gene *va*. *Plant Pathol.*, **59**, 1133–1143.

Lacroix, C., Glais, L., Verrier, J.-L., Charlier, C., Lorencetti, C. and Jacquot, E. (2011*a*) Impact of tobacco recessive resistance gene *va* on biological properties of Brazilian *Potato virus Y* (PVY) isolates. *Plant Pathol.*, **60**, 1048–1054.

Lacroix, C., Glais, L., Verrier, J.-L. and Jacquot, E. (2011*b*) Effect of passage of a *Potato virus Y* isolate on a line of tobacco containing the recessive resistance gene *va 2* on the development of isolates capable of overcoming alleles 0 and 2. *Eur. J. Plant Pathol.*, **130**, 259–269.

Lamb, C. and Dixon, R.A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Biol.* **48**, 251–275.

Lamm, C.E., Kraner, M.E., Hofmann, J., Börnke, F., Mock, H.-P. and Sonnewald, U. (2017) Hop/Sti1 – A Two-Faced Cochaperone Involved in Pattern Recognition Receptor Maturation and Viral Infection. *Front. Plant Sci.* **8**, 1754.

Lecoq, H. (2001) Découverte du premier virus, le virus de la mosaïque du tabac: 1892 ou 1898? *Comptes Rendus Académie Sci.-Ser. III-Sci. Vie*, **324**, 929–933.

Lecoq, H., Moury, B., Desbiez, C., Palloix, A. and Pitrat, M. (2004) Durable virus resistance in plants through conventional approaches: a challenge. *Virus Res.*, **100**, 31–39.

Lee, J.-H., Muhsin, M., Atienza, G.A., et al. (2010) Single nucleotide polymorphisms in a gene for translation initiation factor (eIF4G) of rice (Oryza sativa) associated with resistance to *Rice tungro spherical virus*. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **23**, 29–38.

Legg, J.P. and Fauquet, C.M. (2004) *Cassava mosaic geminiviruses* in Africa. *Plant Mol. Biol.*, **56**, 585–599.

Lellis, A.D., Kasschau, K.D., Whitham, S.A. and Carrington, J.C. (2002) Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF (iso) 4E during potyvirus infection. *Curr. Biol.*, **12**, 1046–1051.

Le Roux, C., Huet, G., Jauneau, A., et al. (2015) A Receptor Pair with an Integrated Decoy Converts Pathogen Disabling of Transcription Factors to Immunity. *Cell*, **161**, 1074–1088.

Lewis, R.S. (2007) Evaluation of Genotypes Possessing -derived Genetic Tolerance to. *Crop Sci.*, **47**, 1975.

Lewis, R.S. (2005) Transfer of resistance to *potato virus Y* (PVY) from *Nicotiana africana* to *Nicotiana tabacum*: possible influence of tissue culture on the rate of introgression. *Theor. Appl. Genet.*, **110**, 678–687.

Li, N., Wang, X., Zhou, G. and Dong, J. (2006) Molecular variability of the coat protein gene of P*otato virus Y* from tobacco in China. *Acta Virol.*, **50**, 107-13.

Li, X.H. and Carrington, J.C. (1995) Complementation of tobacco etch potyvirus mutants by active RNA polymerase expressed in transgenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**, 457–461.

Li, Y., Qin, L., Zhao, J., Muhammad, T., Cao, H., Li, H., Zhang, Y. and Liang, Y. (2017) SlMAPK3 enhances tolerance to tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) by regulating salicylic acid and jasmonic acid signaling in tomato (*Solanum lycopersicum*) V. Citovsky, ed. *PLOS ONE*, **12**, *e*0172466.

Lin, J.-W., Ding, M.-P., Hsu, Y.-H. and Tsai, C.-H. (2007) Chloroplast phosphoglycerate kinase, a gluconeogenetic enzyme, is required for efficient accumulation of *Bamboo mosaic virus. Nucleic Acids Res.*, **35**, 424–432.

Lindhout, P. (2002) The perspectives of polygenic resistance in breeding for durable disease resistance. *Euphytica*, **124**, 217–226.

Ling, K.-S., Harris, K.R., Meyer, J.D.F., Levi, A., Guner, N., Wehner, T.C., Bendahmane, A. and Havey, M.J. (2009) Non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the watermelon eIF4E gene are closely associated with resistance to *Zucchini yellow mosaic virus*. *Theor. Appl. Genet.*, **120**, 191–200.

Lõhmus, A., Hafrén, A. and Mäkinen, K. (2017) Coat Protein Regulation by CK2, CPIP, HSP70, and CHIP Is Required for *Potato Virus A* Replication and Coat Protein Accumulation A. E. Simon, ed. *J. Virol.*, **91**, e01316-16.

Lorrain, S. (2004) VASCULAR ASSOCIATED DEATH1, a Novel GRAM Domain-Containing Protein, Is a Regulator of Cell Death and Defense Responses in Vascular Tissues. *PLANT CELL ONLINE*, **16**, 2217–2232.

Lukasik, E. and Takken, F.L. (2009) STANDing strong, resistance proteins instigators of plant defence. *Curr. Opin. Plant Biol.*, **12**, 427–436.

Ma, J.K.-C., Drossard, J., Lewis, D., et al. (2015) Regulatory approval and a first-in-human phase I clinical trial of a monoclonal antibody produced in transgenic tobacco plants. *Plant Biotechnol. J.*, **13**, 1106–1120.

Mahajan, S.K., Chisholm, S.T., Whitham, S.A. and Carrington, J.C. (1998) Identification and characterization of a locus (RTM1) that restricts long-distance movement of tobacco etch virus in Arabidopsis thaliana. *Plant J.*, **14**, 177–186.

Mallory, A.C., Ely, L., Smith, T.H., et al. (2001) HC-Pro suppression of transgene silencing eliminates the small RNAs but not transgene methylation or the mobile signal. *Plant Cell*, **13**, 571–583.

Malpica, J.M., Fraile, A., Moreno, I., Obies, C.I., Drake, J.W. and García-Arenal, F. (2002) The rate and character of spontaneous mutation in an RNA virus. *Genetics*, **162**, 1505–1511.

Mandadi, K.K. and Scholthof, K.-B.G. (2013) Plant Immune Responses Against Viruses: How Does a Virus Cause Disease? *Plant Cell*, **25**, 1489–1505.

Marandel, G., Pascal, T., Candresse, T. and Decroocq, V. (2009) Quantitative resistance to *Plum pox virus* in *Prunus davidiana* P1908 linked to components of the eukaryotic translation initiation complex. *Plant Pathol.*, **58**, 425–435.

Marathe, R., Anandalakshmi, R., Liu, Y. and Dinesh-Kumar, S.P. (2002) The *tobacco mosaic virus* resistance gene, *N*. *Mol. Plant Pathol.*, **3**, 167–172.

Marcotrigiano, J., Gingras, A.-C., Sonenberg, N. and Burley, S.K. (1997) Cocrystal structure of the messenger RNA 5' cap-binding protein (eIF4E) bound to 7-methyl-GDP. *Cell* **89**, 951–961.

Martin, I.R., Vigne, E., Berthold, F., Komar, V., Lemaire, O., Fuchs, M. and Schmitt-Keichinger, C. (2017) The 50 distal amino acids of the 2AHP homing protein of *Grapevine fanleaf virus* elicit a hypersensitive reaction on *Nicotiana occidentalis*. *Mol. Plant Pathol. e*12558.

Martínez-Turiño, S., Pérez, J. de J., Hervás, M., Navajas, R., Ciordia, S., Udeshi, N.D., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and García, J.A. (2017) Phosphorylation coexists with *O* -GlcNAcylation in a plant virus protein and influences viral infection: Phospho and *O* -GlcNAcylation in plant-made protein. *Mol. Plant Pathol. e*12626.

Masuta, C., Nishimura, M., Morishita, H. and Hataya, T. (1999) A single amino acid change in viral genome-associated protein of *potato virus Y* correlates with resistance breaking in 'Virgin A Mutant' tobacco. *Phytopathology*, **89**, 118–123.

Maule, A.J., Caranta, C. and Boulton, M.I. (2007) Sources of natural resistance to plant viruses: status and prospects. *Mol. Plant Pathol.*, **8**, 223–231.

Mayberry, L.K., Allen, M.L., Nitka, K.R., Campbell, L., Murphy, P.A. and Browning, K.S. (2011) Plant Cap-binding Complexes Eukaryotic Initiation Factors eIF4F and eIFISO4F: MOLECULAR SPECIFICITY OF SUBUNIT BINDING. *J. Biol. Chem.*, **286**, 42566–42574.

Mayers, C.N., Lee, K.-C., Moore, C.A., Wong, S.-M. and Carr, J.P. (2005) Salicylic acid-induced resistance to *Cucumber mosaic virus* in squash and *Arabidopsis thaliana*: contrasting mechanisms of induction and antiviral action. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **18**, 428–434.

McDonald, B.A. (2014) Using dynamic diversity to achieve durable disease resistance in agricultural ecosystems. *Trop. Plant Pathol.*, **39**, 191–196.

McDonald, B.A. and Linde, C. (2002*a*) Pathogen Population Genetics, Evolutionary Potential, and Durable Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **40**, 349–379.

McDonald, B.A. and Linde, C. (2002*b*) The population genetics of plant pathogens and breeding strategies for durable resistance. *Euphytica*, **124**, 163–180.

McHale, L., Tan, X., Koehl, P. and Michelmore, R.W. (2006) Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biol.*, **7**, 212.

Merits, A., Guo, D., Järveklülg, L. and Saarma, M. (1999) Biochemical and Genetic Evidence for Interactions between *Potato A Potyvirus*-Encoded Proteins P1 and P3 and Proteins of the Putative Replication Complex. *Virology*, 15–22.

Michon, T., Estevez, Y., Walter, J., German-Retana, S. and Gall, O. (2006) The potyviral virus genome-linked protein VPg forms a ternary complex with the eukaryotic initiation factors eIF4E and eIF4G and reduces eIF4E affinity for a mRNA cap analogue. *FEBS J.*, **273**, 1312–1322.

Mingot, A., Valli, A., Rodamilans, B., San León, D., Baulcombe, D.C., García, J.A. and López-Moya, J.J. (2016) The P1N-PISPO *trans* -Frame Gene of Sweet Potato Feathery Mottle Potyvirus Is Produced during Virus Infection and Functions as an RNA Silencing Suppressor A. Simon, ed. *J. Virol.*, **90**, 3543–3557.

Miyashita, S. and Kishino, H. (2010) Estimation of the Size of Genetic Bottlenecks in Cell-to-Cell Movement of *Soil-Borne Wheat Mosaic Virus* and the Possible Role of the Bottlenecks in Speeding Up Selection of Variations in trans-Acting Genes or Elements. *J. Virol.*, **84**, 1828–1837.

Miyoshi, H., Suehiro, N., Tomoo, K., Muto, S., Takahashi, T., Tsukamoto, T., Ohmori, T. and Natsuaki, T. (2006) Binding analyses for the interaction between plant virus genome-linked protein (VPg) and plant translational initiation factors. *Biochimie*, **88**, 329–340.

Moffett, P. (2009) Mechanisms of Recognition in Dominant R Gene Mediated Resistance. In *Advances in Virus Research*. Elsevier, **75**, 1–33.

Molnar, A., Melnyk, C.W., Bassett, A., Hardcastle, T.J., Dunn, R. and Baulcombe, D.C. (2010) Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *science*, **328**, 872–875.

Monsion, B., Froissart, R., Michalakis, Y. and Blanc, S. (2008) Large Bottleneck Size in Cauliflower Mosaic Virus Populations during Host Plant Colonization R. S. Baric, ed. *PLoS Pathog.*, **4**, e1000174.

Montarry, J., Doumayrou, J., Simon, V. and Moury, B. (2011) Genetic background matters: a plant-virus gene-for-gene interaction is strongly influenced by genetic contexts: Viral genetic background matters. *Mol. Plant Pathol.* **12**, 911–920.

Morales, M., Orjeda, G., Nieto, C., et al. (2005) A physical map covering the nsv locus that confers resistance to Melon necrotic spot virus in melon (Cucumis melo L.). *Theor. Appl. Genet.*, **111**, 914–922.

Morino, S., Hazama, H., Ozaki, M., Teraoka, Y., Shibata, S., Ueda, H., Ishida, T. and Uesugi, S. (1996) Analysis of the mRNA cap-binding ability of human eukaryotic initiation factor-4E by use of recombinant wild-type and mutant forms. *FEBS J.*, **239**, 597–601.

Moury, B., Morel, C., Johansen, E. and Jacquemond, M. (2002) Evidence for diversifying selection in Potato virus Y and in the coat protein of other potyviruses. *J. Gen. Virol.*, **83**, 2563–2573.

Moury, B., Morel, C., Johansen, E., Guilbaud, L., Souche, S., Ayme, V., Caranta, C., Palloix, A. and Jacquemond, M. (2004) Mutations in Potato virus Y genome-linked protein determine virulence toward recessive resistances in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **17**, 322–329.

Moury, B., Fabre, F. and Senoussi, R. (2007) Estimation of the number of virus particles transmitted by an insect vector. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **104**, 17891–17896.

Moury, B., Montarry, J., Janzac, B., Ayme, V. and Palloix, A. (2010*a*) L'adaptation des virus de plantes aux résistances variétales. *Virologie*, **14**, 227–239.

Moury, B. (2010*b*) A new lineage sheds light on the evolutionary history of *Potato virus Y*. *Mol. Plant Pathol.*, **11**, 161–168.

Moury, B., Caromel, B., Johansen, E., Simon, V., Chauvin, L., Jacquot, E., Kerlan, C. and Lefebvre, V. (2011) The helper component proteinase cistron of *Potato virus Y* induces hypersensitivity and resistance in potato genotypes carrying dominant resistance genes on chromosome IV. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **24**, 787–797.

Moury, B. and Simon, V. (2011) dN/dS-Based Methods Detect Positive Selection Linked to Trade-Offs between Different Fitness Traits in the Coat Protein of *Potato virus Y. Mol. Biol. Evol.*, **28**, 2707–2717.

Moury, B., Charron, C., Janzac, B., Simon, V., Gallois, J.L., Palloix, A. and Caranta, C. (2014) Evolution of plant eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) and potyvirus genome-linked protein (VPg): A game of mirrors impacting resistance spectrum and durability. *Infect. Genet. Evol.*, **27**, 472–480.

Murphy, J.F., Klein, P.G., Hunt, A.G. and Shaw, J.G. (1996) Replacement of the tyrosine residue that links a potyviral VPg to the viral RNA is lethal. *Virology*, **220**, 535–538.

Naderpour, M., Lund, O.S., Larsen, R. and Johansen, E. (2010) Potyviral resistance derived from cultivars of *Phaseolus vulgaris* carrying *bc-3* is associated with the homozygotic presence of a mutated *eIF4E* allele. *Mol. Plant Pathol.*, **11**, 255–263.

Nakahara, K.S., Shimada, R., Choi, S.-H., Yamamoto, H., Shao, J. and Uyeda, I. (2010) Involvement of the P1 cistron in overcoming eIF4E-mediated recessive resistance against *Clover yellow vein virus* in pea. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **23**, 1460–1469.

Naylor, M., Murphy, A.M., Berry, J.O. and Carr, J.P. (1998) Salicylic acid can induce resistance to plant virus movement. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **11**, 860–868.

Nicaise, V. (2017) Boosting innate immunity to sustainably control diseases in crops. *Curr. Opin. Virol.*, **26**, 112–119.

Nicaise, V. (2014) Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges. *Front. Plant Sci.*, **5**, 660.

Nicaise, V. and Candresse, T. (2017) Plum pox virus capsid protein suppresses plant pathogen-associated molecular pattern (PAMP)-triggered immunity. *Mol. Plant Pathol.*, **18**, 878–886.

Nicaise, V., Gallois, J.-L., Chafiai, F., et al. (2007) Coordinated and selective recruitment of eIF4E and eIF4G factors for potyvirus infection in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.*, **581**, 1041–1046.

Nicaise, V., German-Retana, S., Sanjuan, R., Dubrana, M.P., Mazier, M., Maisonneuve, B., Candresse, T., Caranta, C. and LeGall, O. (2003) The Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Controls Lettuce Susceptibility to the Potyvirus Lettuce mosaic virus. *PLANT Physiol.*, **132**, 1272–1282.

Niehl, A., Wyrsch, I., Boller, T. and Heinlein, M. (2016) Double-stranded RNAs induce a pattern-triggered immune signaling pathway in plants. *New Phytol.*, **211**, 1008–1019.

Nielsen, M.T., Jones, G.A. and Collins, G.B. (1982) Inheritance pattern for secreting and nonsecreting glandular trichomes in tobacco. *Crop Sci.*, **22**, 1051–1053.

Nieto, C., Morales, M., Orjeda, G., et al. (2006) An *eIF4E* allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon. *Plant J.*, **48**, 452–462.

Nieto, C., Rodríguez-Moreno, L., Rodríguez-Hernández, A.M., Aranda, M.A. and Truniger, V. (2011) *Nicotiana benthamiana* resistance to non-adapted *Melon necrotic spot virus* results from an incompatible interaction between virus RNA and translation initiation factor 4E. *Plant J.*, **66**, 492–501.

Noguchi, S., Tajima, T., Yamamoto, Y., Ohno, T. and Kubo, T. (1999) Deletion of a large genomic segment in tobacco varieties that are resistant to *potato virus Y* (PVY). *Mol. Gen. Genet. MGG*, **262**, 822–829.

Nürnberger, T. and Kemmerling, B. (2006) Receptor protein kinases–pattern recognition receptors in plant immunity. *Trends Plant Sci.*, **11**, 519–522.

Ohta, T. (1992) The nearly neutral theory of molecular evolution. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, **23**, 263–286.

Oka, K., Kobayashi, M., Mitsuhara, I. and Seo, S. (2013) Jasmonic acid negatively regulates resistance to *Tobacco mosaic virus* in tobacco. *Plant Cell Physiol.*, **54**, 1999–2010.

Olspert, A., Chung, B.Y.-W., Atkins, J.F., Carr, J.P. and Firth, A.E. (2015) Transcriptional slippage in the positive-sense RNA virus family Potyviridae. *EMBO Rep.*, **16**, 995–1004.

Ouibrahim, L., Mazier, M., Estevan, J., Pagny, G., Decroocq, V., Desbiez, C., Moretti, A., Gallois, J.-L. and Caranta, C. (2014) Cloning of the Arabidopsis *rwm1* gene for resistance to *Watermelon mosaic virus* points to a new function for natural virus resistance genes. *Plant J.*, **79**, 705–716.

Padmanabhan, M., Cournoyer, P. and Dinesh-Kumar, S.P. (2009) The leucine-rich repeat domain in plant innate immunity: a wealth of possibilities. *Cell. Microbiol.*, **11**, 191–198.

Pallas, V. and Garcia, J.A. (2011) How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. *J. Gen. Virol.*, **92**, 2691–2705.

Palloix, A., Ayme, V. and Moury, B. (2009) Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytol.*, **183**, 190–199.

Palloix, A. and Ordon, F. (2011) Advanced breeding for virus resistance in plants. In *Recent Advances in Plant Virology*. eds Caranta C., Aranda M. A., Tepfer M., Lopez-Moya J. J. (Norwich: Caister Academic Press), pp. 195–218.

Pariaud, B., Ravigné, V., Halkett, F., Goyeau, H., Carlier, J. and Lannou, C. (2009) Aggressiveness and its role in the adaptation of plant pathogens. *Plant Pathol.*, **58**, 409–424.

Parlevliet, J.E. (1979) Components of resistance that reduce the rate of epidemic development. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **17**, 203–222.

Parlevliet, J.E. (2002) Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica*, **124**, 147–156.

Pasin, F., Simón-Mateo, C. and García, J.A. (2014) The Hypervariable Amino-Terminus of P1 Protease Modulates Potyviral Replication and Host Defense Responses A. Wang, ed. *PLoS Pathog.*, **10**, e1003985.

Patrick, R.M., Mayberry, L.K., Choy, G., et al. (2014) Two Arabidopsis Loci Encode Novel Eukaryotic Initiation Factor 4E Isoforms that are functionally distinct from the conserved plant Eukaryotic Initiation Factor 4E. *PLANT Physiol.*, **164**, 1820–1830.

Pieterse, C.M., Van Wees, S.C., Hoffland, E., Van Pelt, J.A. and Van Loon, L.C. (1996) Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *Plant Cell*, **8**, 1225–1237.

Pink, D.A. (2002) Strategies using genes for non-durable disease resistance. *Euphytica*, **124**, 227–236.

Pontier, D., Godiard, L., Marco, Y. and Roby, D. (1994) *hsr203J*, a tobacco gene whose activation is rapid, highly localized and specific for incompatible plant/pathogen interactions. *Plant J.* **5**, 507–521.

Pontier, D., Tronchet, M., Rogowsky, P., Lam, E. and Roby, D. (1998) Activation of *hsr 203*, a plant gene expressed during incompatible plant-pathogen interactions, is correlated with programmed cell death. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **11**, 544–554.

Pooggin, M., Shivaprasad, P.V., Veluthambi, K. and Hohn, T. (2003) RNAi targeting of DNA virus in plants. *Nat. Biotechnol.*, **21**, 131–132.

Poque, S., Pagny, G., Ouibrahim, L., et al. (2015) Allelic variation at the rpv1 locus controls partial resistance to Plum pox virus infection in Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biol.*, **15**, 159.

Potts, S.G., Biesmeijer, J.C., Kremen, C., Neumann, P., Schweiger, O. and Kunin, W.E. (2010) Global pollinator declines: trends, impacts and drivers. *Trends Ecol. Evol.*, **25**, 345–353.

Poueymiro, M., Cunnac, S., Barberis, P., Deslandes, L., Peeters, N., Cazale-Noel, A.-C., Boucher, C. and Genin, S. (2009) Two type III secretion system effectors from *Ralstonia solanacearum*

GMI1000 determine host-range specificity on tobacco. *Mol. Plant. Microbe Interact.* **22**, 538–550.

Prasanth, K.R., Chuang, C. and Nagy, P.D. (2017) Co-opting ATP-generating glycolytic enzyme PGK1 phosphoglycerate kinase facilitates the assembly of viral replicase complexes. *PLoS Pathog.*, **13**, e1006689.

Pretty, J. and Bharucha, Z.P. (2014) Sustainable intensification in agricultural systems. *Ann. Bot.*, **114**, 1571–1596.

Pyott, D.E., Sheehan, E. and Molnar, A. (2016) Engineering of CRISPR/Cas9-mediated potyvirus resistance in transgene-free Arabidopsis plants. *Mol. Plant Pathol.* **17**, 1276–1288.

Qi, D. and Innes, R.W. (2013) Recent Advances in Plant NLR Structure, Function, Localization, and Signaling. *Front. Immunol.*, **4**, 348.

Quenouille, J., Montarry, J., Palloix, A. and Moury, B. (2013*a*) Farther, slower, stronger: how the plant genetic background protects a major resistance gene from breakdown: Mechanisms of polygenic resistance durability. *Mol. Plant Pathol.*, **14**, 109–118.

Quenouille, J., Vassilakos, N. and Moury, B. (2013*b*) A major crop pathogen that has provided major insights into the evolution of viral pathogenicity. *Mol. Plant Pathol.*, **14**, 439–452.

Quenouille, J., Paulhiac, E., Moury, B. and Palloix, A. (2014) Quantitative trait loci from the host genetic background modulate the durability of a resistance gene: a rational basis for sustainable resistance breeding in plants. *Heredity*, **112**, 579–587.

Rairdan, G.J., Collier, S.M., Sacco, M.A., Baldwin, T.T., Boettrich, T. and Moffett, P. (2008) The Coiled-Coil and Nucleotide Binding Domains of the Potato Rx Disease Resistance Protein Function in Pathogen Recognition and Signaling. *PLANT CELL ONLINE*, **20**, 739–751.

Rajamäki, M.-L., Kelloniemi, J., Alminaite, A., Kekarainen, T., Rabenstein, F. and Valkonen, J.P.T. (2005) A novel insertion site inside the potyvirus P1 cistron allows expression of heterologous proteins and suggests some P1 functions. *Virology*, **342**, 88–101.

Rantalainen, K.I., Eskelin, K., Tompa, P. and Makinen, K. (2011) Structural Flexibility Allows the Functional Diversity of Potyvirus Genome-Linked Protein VPg. *J. Virol.*, **85**, 2449–2457.

Renny-Byfield, S., Chester, M., Kovarik, A., et al. (2011) Next Generation Sequencing Reveals Genome Downsizing in Allotetraploid Nicotiana tabacum, Predominantly through the Elimination of Paternally Derived Repetitive DNAs. *Mol. Biol. Evol.*, **28**, 2843–2854.

Restrepo-Hartwig, M.A. and Carrington, J.C. (1994) The *tobacco etch potyvirus* 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. *J. Virol.*, **68**, 2388–2397.

Revers, F. and García, J.A. (2015) Molecular Biology of Potyviruses. In *Advances in Virus Research*. Elsevier, pp. 101–199.

Robaglia, C. and Caranta, C. (2006) Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends Plant Sci.*, **11**, 40–45.

Rodamilans, B., Valli, A., Mingot, A., San León, D., Baulcombe, D., López-Moya, J.J. and García, J.A. (2015) RNA Polymerase Slippage as a Mechanism for the Production of Frameshift Gene Products in Plant Viruses of the Potyviridae Family: FIG 1 A. Simon, ed. *J. Virol.*, **89**, 6965–6967.

Rodriguez-Cerezo, E., Ammar, E.D., Pirone, T.P. and Shaw, J.G. (1993) Association of the non-structural P3 viral protein with cylindrical inclusions in potyvirus-infected cells. *J. Gen. Virol.*, **74**, 1945–1949.

Rojas, M.R., Zerbini, F.M., Allison, R.F., Gilbertson, R.L. and Lucas, W.J. (1997) Capsid Protein and Helper Component-Proteinase Function as Potyvirus Cell-to-Cell Movement Proteins. *Virology*, 283–295.

Rolland, M., Kerlan, C. and Jacquot, E. (2009) The acquisition of molecular determinants involved in potato virus Y necrosis capacity leads to fitness reduction in tobacco plants. *J. Gen. Virol.*, **90**, 244–252.

Rosa-Téllez, S., Anoman, A.D., Flores-Tornero, M., et al. (2017) Phosphoglycerate kinases are co-regulated to adjust metabolism and to optimize growth. *Plant Physiol.*, pp.01227.2017.

Ross, A.F. (1961) Localized acquired resistance to plant virus infection in hypersensitive hosts. *Virology*, **14**, 329–339.

Ruffel, S., Dussault, M.-H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C. and Caranta, C. (2002) A natural recessive resistance gene against *potato virus Y* in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *Plant J.*, **32**, 1067–1075.

Ruffel, S., Gallois, J.-L., Moury, B., Robaglia, C., Palloix, A. and Caranta, C. (2006) Simultaneous mutations in translation initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E are required to prevent pepper veinal mottle virus infection of pepper. *J. Gen. Virol.*, **87**, 2089–2098.

Rusholme, R.L., Higgins, E.E., Walsh, J.A. and Lydiate, D.J. (2007) Genetic control of broad-spectrum resistance to *turnip mosaic virus* in *Brassica rapa* (Chinese cabbage). *J. Gen. Virol.*, **88**, 3177–3186.

Ruud, K.A., Kuhlow, C., Goss, D.J. and Browning, K.S. (1998) Identification and characterization of a novel cap-binding protein from Arabidopsis thaliana. *J. Biol. Chem.*, **273**, 10325–10330.

Sacristán, S. and García-Arenal, F. (2008) The evolution of virulence and pathogenicity in plant pathogen populations. *Mol. Plant Pathol.*, **9**, 369–384.

Saenz, P., Salvador, B., Simon-Mateo, C., Kasschau, K.D., Carrington, J.C. and Garcia, J.A. (2002) Host-Specific Involvement of the HC Protein in the Long-Distance Movement of *Potyviruses*. *J. Virol.*, **76**, 1922–1931.

Sanfaçon, H. (2015) Plant Translation Factors and Virus Resistance. *Viruses*, **7**, 3392–3419.

Sastry, S.K. and Zitter, T.A. (2014).“Management of virus and viroid diseases of crops in the tropics,”in Plant Virus and Viroid Diseases in the Tropics, Vol. 2, *Epidemiology and Management* (Dordrecht: Springer), 149–480.

Sato, M., Nakahara, K., Yoshii, M., Ishikawa, M. and Uyeda, I. (2005) Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by potyviruses. *FEBS Lett.*, **579**, 1167–1171.

Sato, Y., Ando, S. and Takahashi, H. (2014) Role of Intron-Mediated Enhancement on Accumulation of an Arabidopsis NB-LRR Class R-protein that Confers Resistance to *Cucumber mosaic virus* Ding, B., ed. *PLoS ONE* **9**, e99041.

Schaad, M.C., Lellis, A.D. and Carrington, J.C. (1997) VPg of *tobacco etch potyvirus* is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *J. Virol.*, **71**, 8624–8631.

Scherer, N.M., Thompson, C.E., Freitas, L.B., Bonatto, S.L. and Salzano, F.M. (2005) Patterns of molecular evolution in pathogenesis-related proteins. *Genet. Mol. Biol.*, **28**, 645–653.

Schie, C.C.N. van and Takken, F.L.W. (2014) Susceptibility Genes 101: How to Be a Good Host. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **52**, 551–581.

Schiltz, P. (1967) Création de *N. tabacum* Résistants à *Peronospora tabacina*. Analyse Histologique et Biologique de la Résistance. Thèse: Université de Bordeaux.

Scholthof, K.-B.G., Adkins, S., Czosnek, H., et al. (2011) Top 10 plant viruses in molecular plant pathology: Top 10 plant viruses. *Mol. Plant Pathol.*, **12**, 938–954.

Sicard, O., Loudet, O., Keurentjes, J.J., Candresse, T., Le Gall, O., Revers, F. and Decroocq, V. (2008) Identification of quantitative trait loci controlling symptom development during viral infection in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **21**, 198–207.

Sierro, N., Battey, J.N., Ouadi, S., Bovet, L., Goepfert, S., Bakaher, N., Peitsch, M.C. and Ivanov, N.V. (2013*a*) Reference genomes and transcriptomes of Nicotiana sylvestris and Nicotiana tomentosiformis. *Genome Biol.*, **14**, R60.

Sierro, N., Oeveren, J. van, Eijk, M.J.T. van, Martin, F., Stormo, K.E., Peitsch, M.C. and Ivanov, N.V. (2013*b*) Whole genome profiling physical map and ancestral annotation of tobacco Hicks Broadleaf. *Plant J.*, **75**, 880–889.

Sierro, N., Battey, J.N.D., Ouadi, S., Bakaher, N., Bovet, L., Willig, A., Goepfert, S., Peitsch, M.C. and Ivanov, N.V. (2014) The tobacco genome sequence and its comparison with those of tomato and potato. *Nat. Commun.*, **5**. 3833

Silhavy, D., Molnar, A., Lucioli, A., Szittya, G., Hornyik, C., Tavazza, M. and Burgyán, J. (2002) A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J*, **21**, 3070–3080.

Singh, R.P., Valkonen, J.P.T., Gray, S.M., Boonham, N., Jones, R.A.C., Kerlan, C. and Schubert, J. (2008) Discussion paper: The naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. *Arch. Virol.*, **153**, 1–13.

Sorel, M. (2013) *La protéine d'inclusion cylindrique (CI) : un facteur viral clé dans l'adaptation du LMV à la résistance conférée par eIF4E chez la laitue*. Thèse: Université de Bordeaux 2.

Sorel, M., Garcia, J.A. and German-Retana, S. (2014) The *Potyviridae* Cylindrical Inclusion Helicase: A Key Multipartner and Multifunctional Protein. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **27**, 215–226.

Sorho, F., Pinel, A., Traoré, O., Bersoult, A., Ghesquière, A., Hébrard, E., Konaté, G., Séré, Y. and Fargette, D. (2005) Durability of natural and transgenic resistances in rice to *Rice yellow mottle virus*. *Eur. J. Plant Pathol.*, **112**, 349–359.

Stare, T., Stare, K., Weckwerth, W., Wienkoop, S. and Gruden, K. (2017) Comparison between Proteome and Transcriptome Response in Potato (Solanum tuberosum L.) Leaves Following *Potato Virus Y* (PVY) Infection. *Proteomes*, **5**, 14.

Sudarsono, Woloshuk, S.L., Xiong, Z., Hellmann, G.M., Wernsman, E.A., Weissinger, A.K. and Lommel, S.A. (1993) Nucleotide sequence of the capsid protein cistrons from six *potato virus Y* (PVY) isolates infecting tobacco. *Arch. Virol.*, **132**, 161–170.

Suehiro, N. (2004) An important determinant of the ability of *Turnip mosaic virus* to infect Brassica spp. and/or Raphanus sativus is in its P3 protein. *J. Gen. Virol.*, **85**, 2087–2098.

Syller, J. (2005) The roles and mechanisms of helper component proteins encoded by potyviruses and caulimoviruses. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, **67**, 119–130.

Szittya, G. (2002) Short Defective Interfering RNAs of Tombusviruses Are Not Targeted but Trigger Post-Transcriptional Gene Silencing against Their Helper Virus. *PLANT CELL ONLINE*, **14**, 359–372.

Tajima, T., Noguchi, S., Tanoue, W., Negishi, H., Nakakawaji, T. and Ohno, T. (2002) Background selection using DNA markers in backross breeding program for Potato Virus Y resistance of tobacco. *Breed. Sci.* **52**:253-257

Takahashi, H., Miller, J., Nozaki, Y., Takeda, M., Shah, J., Hase, S., Ikegami, M., Ehara, Y. and Dinesh-Kumar, S.P. (2002) *RCY1*, an *Arabidopsis thaliana RPP8/HRT* family resistance gene, conferring resistance to cucumber mosaic virus requires salicylic acid, ethylene and a novel signal transduction mechanism. *Plant J.* **32**, 655–667.

Tameling, W.I.L., Elzinga, S.D.J., Darmin, P.S., Vossen, J.H., Takken, F.L.W., Haring, M.A. and Cornelissen, B.J.C. (2002) The Tomato *R* Gene Products I-2 and Mi-1 Are Functional ATP Binding Proteins with ATPase Activity. *Plant Cell*, **14**, 2929–2939.

Tavert-Roudet, G., Anne, A., Barra, A., Chovin, A., Demaille, C. and Michon, T. (2017) The potyvirus particle recruits the plant translation initiation factor eIF4E by means of the VPg covalently linked to the viral RNA. *Mol. Plant. Microbe Interact.* Available at: http://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/MPMI-04-17-0091-R [Accessed July 20, 2017].

Tena Fernández, F., González, I., Doblas, P., Rodríguez, C., Sahana, N., Kaur, H., Tenllado, F., Praveen, S. and Canto, T. (2013) The influence of *cis* -acting P1 protein and translational elements on the expression of *Potato virus Y* helper-component proteinase (HCPro) in heterologous systems and its suppression of silencing activity: Context of expression and HCPro activity. *Mol. Plant Pathol.*, **14**, 530–541.

Tester, M. and Langridge, P. (2010) Breeding Technologies to Increase Crop Production in a Changing World. *Science*, **327**, 818–822.

Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. and Collinge, D.B. (1997) Subcellular localization of H2O2 in plants. H_2O_2 accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley—powdery mildew interaction. *Plant J*. **11**, 1187–1194.

Thrall, P.H. and Burdon, J. (1999) The spatial scale of pathogen dispersal : Consequences for disease dynamics and persistence. *Evol. Ecol. Res.*, **1**, 681–701.

Tian, Y.P., Liu, J.L., Zhang, C.L., Liu, Y.Y., Wang, B., Li, X.-D., Guo, Z.K. and Valkonen, J.P.T. (2011) Genetic diversity of Potato virus Y infecting tobacco crops in China. *Phytopathology*, **101**, 377–387.

Tilman, D. (1999) Global environmental impacts of agricultural expansion: the need for sustainable and efficient practices. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 5995–6000.

Tribodet, M., Glais, L., Kerlan, C. and Jacquot, E.(2005) Characterization of Potato virus Y (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVYN isolates in infected Nicotiana tabacum cv. Xanthi. *J. Gen. Virol.*, **86**, 2101–2105.

Truniger, V. and Aranda, M.A. (2009) Recessive resistance to plant viruses. *Adv. Virus Res*. **75**, 119–159.

Ueda, H., Yamaguchi, Y. and Sano, H. (2006) Direct Interaction between the Tobacco Mosaic Virus Helicase Domain and the ATP-bound Resistance Protein, N Factor during the Hypersensitive Response in Tobacco Plants. *Plant Mol. Biol.*, **61**, 31–45.

Untiveros, M., Olspert, A., Artola, K., Firth, A.E., Kreuze, J.F. and Valkonen, J. (2016) A novel sweet potato potyvirus open reading frame (ORF) is expressed via polymerase slippage and suppresses RNA silencing. *Mol. Plant Pathol.*, **17**, 1111–1123.

Valli, A., Gallo, A., Calvo, M., Perez, J. d. J. and Garcia, J.A. (2014) A Novel Role of the Potyviral Helper Component Proteinase Contributes To Enhance the Yield of Viral Particles. *J. Virol.*, **88**, 9808–9818.

Valli, A.A., Gallo, A., Rodamilans, B., López-Moya, J.J. and García, J.A. (2017) The HCPro from the *Potyviridae* family: an enviable multitasking Helper Component that every virus would like to have: The HCPro from the *Potyviridae* family. *Mol. Plant Pathol.* Available at: http://doi.wiley.com/10.1111/mpp.12553 [Accessed October 14, 2017].

Van Der Biezen, E.A. and Jones, J.D. (1998) Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept. *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 454–456.

VAN DER PLANK, J.E. (1968) Disease Resistance in Plants. *Acad. Press N. Y. 210 Pp*.

Van Loon, L.C. (1997) Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *Eur. J. Plant Pathol.*, **103**, 753–765.

Vanhercke, T., El Tahchy, A., Liu, Q., et al. (2014) Metabolic engineering of biomass for high energy density: oilseed-like triacylglycerol yields from plant leaves. *Plant Biotechnol. J.*, **12**, 231–239.

Verchot, J. and Carrington, J.C. (1995) Debilitation of plant potyvirus infectivity by P1 proteinase-inactivating mutations and restoration by second-site modifications. *J. Virol.*, **69**, 1582–1590.

Verlaan, M.G., Hutton, S.F., Ibrahem, R.M., Kormelink, R., Visser, R.G.F., Scott, J.W., Edwards, J.D. and Bai, Y. (2013) The Tomato Yellow Leaf Curl Virus Resistance Genes Ty-1 and Ty-3 Are Allelic and Code for DFDGD-Class RNA–Dependent RNA Polymerases J. M. McDowell, ed. *PLoS Genet.*, **9**, e1003399.

Verrier, J.-L. and Doroszewska, T. (2004) The “va” resistance to PVYN in Nicotiana tabacum: an assessment of the frequency of “va” breaking PVYN strains based on seven years of field survey on a worldwide basis.

Verrier, J.-L., Marchand, V., Cailleteau, B. and Delon, R. (2001) Chemical change and cigarette smoke mutagenicity increase associated with CMV-DTL and PVY-N infection in burley tobacco. *In .Cape Town, South Africa, Paris, France: CORESTA, 29: Proceedings of the CORESTA Meeting*.

Vijayapalani, P., Maeshima, M., Nagasaki-Takekuchi, N. and Miller, W.A. (2012) Interaction of the Trans-Frame Potyvirus Protein P3N-PIPO with Host Protein PCaP1 Facilitates *Potyvirus* Movement P. D. Nagy, ed. *PLoS Pathog.*, **8**, e1002639.

Wan, J., Basu, K., Mui, J., Vali, H., Zheng, H. and Laliberté, J.-F. (2015) Ultrastructural Characterization of *Turnip Mosaic Virus*-Induced Cellular Rearrangements Reveals Membrane-Bound Viral Particles Accumulating in Vacuoles A. Simon, ed. *J. Virol.*, **89**, 12441–12456.

Wei, T. and Wang, A. (2008) Biogenesis of Cytoplasmic Membranous Vesicles for Plant Potyvirus Replication Occurs at Endoplasmic Reticulum Exit Sites in a COPI- and COPII-Dependent Manner. *J. Virol.*, **82**, 12252–12264.

Wei, T., Zhang, C., Hong, J., Xiong, R., Kasschau, K.D., Zhou, X., Carrington, J.C. and Wang, A. (2010) Formation of Complexes at Plasmodesmata for Potyvirus Intercellular Movement Is Mediated by the Viral Protein P3N-PIPO M. Manchester, ed. *PLoS Pathog.*, **6**, e1000962.

White, K.A. (2015) The polymerase slips and PIPO exists. *EMBO Rep.*, **16**, 885–886.

Whitham, S., McCormick, S. and Baker, B. (1996) The N gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 8776–8781.

Whitham, S.A., Anderberg, R.J., Chisholm, S.T. and Carrington, J.C. (2000) Arabidopsis *RTM2* gene is necessary for specific restriction of tobacco etch virus and encodes an unusual small heat shock–like protein. *Plant Cell*, **12**, 569–582.

Whitham, S.A., Yamamoto, M.L. and Carrington, J.C. (1999) Selectable viruses and altered susceptibility mutants in Arabidopsis thaliana. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 772–777.

Wylie, S.J., Adams, M., Chalam, C., et al. (2017) ICTV Virus Taxonomy Profile: Potyviridae. *J. Gen. Virol.*, **98**, 352–354.

Xu, F., Kapos, P., Cheng, Y.T., Li, M., Zhang, Y. and Li, X. (2014) NLR-Associating Transcription Factor bHLH84 and Its Paralogs Function Redundantly in Plant Immunity Thomma, B., ed. *PLoS Pathog.* **10**, e1004312.

Yamaji, Y., Maejima, K., Komatsu, K., et al. (2012) Lectin-Mediated Resistance Impairs Plant Virus Infection at the Cellular Level. *PLANT CELL ONLINE*, **24**, 778–793.

Yang, P., Lüpken, T., Habekuss, A., et al. (2014) PROTEIN DISULFIDE ISOMERASE LIKE 5-1 is a susceptibility factor to plant viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **111**, 2104–2109.

Yoshii, M., Nishikiori, M., Tomita, K., Yoshioka, N., Kozuka, R., Naito, S. and Ishikawa, M. (2004) The Arabidopsis Cucumovirus Multiplication 1 and 2 Loci Encode Translation Initiation Factors 4E and 4G. *J. Virol.*, **78**, 6102–6111.

Yoshii, M., Yoshioka, N., Ishikawa, M. and Naito, S. (1998) Isolation of an *Arabidopsis thaliana* Mutant in Which the Multiplication of both *Cucumber Mosaic Virus* and *Turnip Crinkle Virus* Is Affected. *J. Virol.*, **72**, 8731–8737.

Zamir, D., Ekstein-Michelson, I., Zakay, Y., et al. (1994) Mapping and introgression of a *tomato yellow leaf curl virus* tolerance gene, Ty-1. *Theor. Appl. Genet.*, **88**, 141–146.

Zavaliev, R., Levy, A., Gera, A. and Epel, B.L. (2013) Subcellular Dynamics and Role of *Arabidopsis* β-1,3-Glucanases in Cell-to-Cell Movement of Tobamoviruses. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **26**, 1016–1030.

Zhu, F., Xi, D.-H., Yuan, S., Xu, F., Zhang, D.-W. and Lin, H.-H. (2014) Salicylic Acid and Jasmonic Acid Are Essential for Systemic Resistance Against *Tobacco mosaic virus* in *Nicotiana benthamiana*. *Mol. Plant. Microbe Interact.*, **27**, 567–577.

Zhu, M., Jiang, L., Bai, B., et al. (2017) The Intracellular Immune Receptor Sw-5b Confers Broad-Spectrum Resistance to Tospoviruses through Recognition of a Conserved 21-Amino Acid Viral Effector Epitope. *Plant Cell*, **29**, 2214–2232.

Durabilité de la résistance et mécanisme de tolérance au virus Y de la pomme de terre (PVY) chez *Nicotiana tabacum*

Le virus Y de la pomme de terre (PVY) est l'un des virus les plus dommageables sur tabac. Pour contrôler les épidémies de PVY, différents allèles du gène de résistance récessive *va* ont été introgressés dans des variétés de tabac. Ce gène récemment cloné code pour une copie du facteur d'initiation de la traduction (*eIF4E-1*). Toutefois, l'émergence de variants de PVY contournant *va*, dont des isolats nécrotiques particulièrement sévères, montre que cette résistance n'est pas toujours durable. L'objectif du travail de thèse était *i*) de comprendre les mécanismes génétiques modulant la durabilité de la résistance *va ii*) d'identifier des facteurs génétiques différents de *va*, contrôlant une tolérance aux symptômes de nécrose nervaire induits par certains isolats de PVY.

Le phénotypage, le génotypage et l'analyse du transcriptome de 13 variétés résistantes portant *va* montrent que le type de mutation affectant le locus *eIF4E-1* ainsi que la fonctionnalité et le niveau d'expression d'autres copies d'*eIF4E* impactent la durabilité de *va*. Nos données permettent de proposer un modèle de leurre où la surexpression de la copie *eIF4E-2*, sous l'effet de la délétion complète du gène *eIF4E-1* et partielle du gène *eIF4E-3*, limiterait l'apparition de variants contournants, augmentant ainsi la durabilité de la résistance contrôlée par *va*.

En parallèle, un gène R de type NB-LRR nommé NtTPN1 (pour Nicotiana tabacum Tolerance to PVY-induced Necrosis1) a été identifié comme étant directement impliqué dans l'absence de développement de la nécrose nervaire induite par les isolats nécrotiques de PVY. Le phénotype de tolérance au PVY conféré par NtTPN1 ouvre de nouvelles perspectives de contrôle du PVY et en particulier des isolats nécrotiques capables de contourner la résistance liée à *va*.

Mots clés : Tabac, *Potyvirus*, résistance récessive, durabilité, gène *va*, eIF4E, tolérance, gène *R*

Resistance durability and tolerance mechanism of *Potato virus Y* (PVY) in *Nicotiana tabacum*

Potato virus Y (PVY) is one of the most damaging viruses on tobacco crops. To control PVY, allelic forms of the recessive resistance gene *va* were introgressed into many tobacco cultivars. This gene was recently identified and encodes a copy of eukaryotic initiation translation factor (eIF4E-1). However, the *va*-mediated resistance is sometimes overcome by resistance-breaking variants including particularly severe necrotic isolates. The present PhD project had two objectives i) to further our understanding of the mechanism(s) modulating *va*-mediated resistance durability ii) to identify new, *va*-independent genetic factors confering tolerance to veinal necrosis symptoms induced by necrotic PVY isolates.

Phenotypic, genetic and transcriptomic analyses of 13 resistant tobacco accessions showed that the type of mutation at the locus *eIF4E-1,* together with the functionality and expression levels of other *eIF4E* copies, impact *va*-mediated resistance durability. The results obtained support a decoy model where the overexpression of the *eIF4E-2* gene*,* as a consequence of the complete deletion of *eIF4E-1* and of the partial deletion of *eIF4E-3*, would limit the ability of PVY to evolve towards resistance-breaking, increasing *va*-mediated resistance durability.

In parallel, a *NB-LRR R* gene, called *NtTPN1* (for *Nicotiana tabacum* Tolerance to PVY-induced Necrosis1) directly involved in the tolerance to PVY-induced systemic veinal necrosis symptoms in tobacco was identified. The phenotype of tolerance to PVY conferred by *NtTPN1* opens novel breeding options to minimize the impact of the emerging and so far uncontrolled *va*-mediated resistance breaking necrotic PVY isolates.

Keywords : Tobacco, Potyvirus, recessive resistance, durability, va gene, eIF4E, tolerance, R gene

---

Unité de recherche Biologie du Fruit et Pathologie, n° 1332, INRA Bordeaux-Aquitaine, 71, av. Edouard Bourlaux, 33882 Villenave d'Ornon Cedex – France