



**HAL**  
open science

# Étude du déterminisme moléculaire des Interactions compatibles et incompatibles *Vitis vinifera*-Nepovirus-*Nicotiana occidentalis* (InViNNo)

Isabelle Martin

► **To cite this version:**

Isabelle Martin. Étude du déterminisme moléculaire des Interactions compatibles et incompatibles *Vitis vinifera*-Nepovirus-*Nicotiana occidentalis* (InViNNo). Virologie. Université de Strasbourg, 2018. Français. NNT : 2018STRAJ102 . tel-03270797

**HAL Id: tel-03270797**

**<https://theses.hal.science/tel-03270797>**

Submitted on 25 Jun 2021

**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.

# UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

ÉCOLE DOCTORALE 414 : DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ

UMR 1131\_A SVQV Santé de la Vigne et Qualité du Vin -  
Institut National de la Recherche Agronomique - Université de Strasbourg

**THÈSE** présentée par :

**Isabelle R. MARTIN**

Soutenue le : **30 Novembre 2018**

Pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université de Strasbourg**

Discipline / Spécialité : Sciences de la Vie et de la Santé / Biologie Moléculaire et Cellulaire, et  
Virologie

**Étude du déterminisme moléculaire des Interactions compatibles et  
incompatibles *Vitis vinifera* / *Nepovirus* / *Nicotiana occidentalis*  
(InViNNo)**

**THÈSE dirigée par :**

**Dr. LEMAIRE Olivier** Directeur de Recherche, INRA (Colmar)

**Dr. SCHMITT-KEICHINGER Corinne** Maître de Conférence, Université de Strasbourg (Colmar)

**RAPPORTEURS :**

**Dr. GERMAN-RETANA Sylvie** Directrice de Recherche, INRA (Villenave-d'Ornon)

**Dr. JACQUOT Emmanuel** Directeur de Recherche, INRA (Montpellier)

---

**EXAMINATEURS :**

**Dr. FUCHS Marc** *Professor*, Cornell University (NY, USA)

**Dr. HEITZ Thierry** Directeur de Recherche, CNRS (Strasbourg)

**Dr. MAURO Marie-Claude** Moët-Hennessy Champagne & Service (Épernay)

**Mme VIGNE Emmanuelle** Ingénieur d'Étude, INRA (Colmar)







*À mon père, F-J M.*



## REMERCIEMENTS

En tout premier lieu je remercie mes encadrants pour leur temps, leur énergie et leur savoir. Merci pour cette aventure. Merci de m'avoir épaulée quand la thèse et la vie se sont chargées de devenir plus difficiles.

Je remercie Corinne qui m'a initiée à la virologie et m'a fait découvrir la petite niche du GFLV. Merci pour ta précision et ta justesse qui m'ont aidée à y voir plus clair. Merci pour tes mots lors de nos échanges scientifiques et privés qui résonnent encore dans ma tête et qui m'ont soutenue. Merci de déplacer des montagnes quand il s'agit de sauver les étudiants égarés.

Je remercie Manue de m'avoir léguée son projet de cœur, je te le rends, je pense qu'il a bien grandi. Merci de m'avoir écoutée, secouée, secourue, et fait progresser sans relâche depuis mes débuts et pendant presque quatre ans. Merci de défendre la motivation et l'excitation comme des moteurs intarissables de la recherche.

Je remercie Olivier de m'avoir accueillie au sein de son équipe. Merci pour ton enthousiasme et ton attitude systématiquement positive, toujours appréciables en cas de tempêtes. Merci d'avoir ponctué ces trois années avec de nombreux souvenirs d'ici et d'ailleurs et d'avoir fait de ma thèse une épopée !

Je remercie Sylvie German-Retana, Emmanuel Jacquot, Marie-Claude Mauro, Thierry Heitz et Marc Fuchs d'avoir accepté d'évaluer mon travail et d'avoir fait preuve de patience. Je remercie également l'entreprise Moët & Chandon, et les interprofessions d'Alsace (CIVA), de Bourgogne (BIVB) et de Champagne (CIVC) d'avoir financé mon travail et d'avoir rendu tout possible.

Je remercie l'ensemble de mes collègues à l'INRA dont l'équipe Vive, et tous les autres d'ici ou d'ailleurs. Vous avez chacun contribué à mon projet de thèse, certains même avec une fervente régularité, par votre aide, vos encouragements ou vos conseils au détour d'une discussion, d'une blague, d'une pause-café, d'un apéro ou d'une partie de tarot. Merci à mes colocataires du bureau (et assimilés) David, Mickaël, Lise, Antoine, Thuy Thanh, Myriam et Maud d'avoir été solidaires et de m'avoir supportée. Merci à Sandrine et Malek de l'IBMP pour leur accueil, leur aide, leurs rires et nos échanges. Merci à mes compagnons de voyage, Jean-François et Éric pour avoir partagé ce sas de décompression avec moi. Merci à Amandine d'avoir fait preuve d'une infinie patience et compréhension lors de mes débuts en analyse RNA-Seq. Merci à Élo de s'être creusée la tête tant de fois autour d'un bon repas. Merci à Léa d'avoir partagé son apprentissage sur la difficulté de la thèse avec moi. Merci à Molly, Shah et Jim d'être eux-mêmes, d'avoir été si souvent là et de m'avoir beaucoup appris.

Je remercie Nico et Kaïli d'avoir écouté mes doutes et difficultés, d'avoir décelé les passages les plus difficiles et de m'avoir aidée à les contourner en faisant preuve de bienveillance. Merci d'avoir accepté de passer souvent au second plan durant ces dernières années.

Pour terminer je remercie mes parents qui m'ont transmis leur soif de connaissances et leur curiosité de la nature et de sa rigueur, et particulièrement mon père qui a planté il y a bien longtemps dans ma tête de gamine la petite graine de la science et à qui je dois mes premières années de biologie. Merci d'avoir été les premiers à croire en moi et de me soutenir dans tous mes choix.

## ABRÉVIATIONS

\$ : US Dollar

% : pourcent

€ : Euros

°C : Celsius

μ : micro

3' et 5' : extrémités 3' et 5'

Å : Angström

aa : acide aminé(s)

AGO : argonaute

AILV : Artichoke Italian latent virus

ADN ou DNA : acide désoxyribonucléique

ArMV : Arabis mosaic virus

ARN ou RNA : acide ribonucléique

BCA : Biological Control Agents

BLMoV : Blueberry leaf mottle virus

BRV : Blackcurrant reversion virus

CaMV : Cauliflower mosaic virus

CB : *corky bark disease* ou maladie du corky bark

cDNA ou ADNc : ADN complémentaire

Ch : chardonnay

CITE : *Cap-Independent Translational Enhancer*

CLRV : Cherry leaf roll virus

CMV : Cucumber mosaic virus

CP : *capside protein* ou protéine de capsid

CPMV : Cowpea mosaic virus

cv. : cultivar

DAB : 3,3'-diaminobenzidine

DAS-ELISA : double antibody sandwich ELISA

dNTP : désoxyribonucléoside triphosphate

dpa : *day post agroinfiltration* ou jour après agroinfiltration

dpi : *day post inoculation* ou jour après inoculation

EGFP : *enhanced Green Fluorescent Protein*

ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay*

ER ou RE : réticulum endoplasmique

F : Farad

F1 et F2 : ARN-1 et 2 de la souche F13 du GFLV

FI : feuilles inoculées

**FS** : feuilles apicales  
**g** : gramme  
**G** : greffon  
**G1 et G2** : ARN-1 et -2 de la souche GHu du GFLV  
**GAMaV** : Grapevine asteroid mosaïc-associated virus  
**GARSV** : Grapevine Anatolian ringspot virus  
**GBLV** : Grapevine Bulgarian latent virus  
**GCGV** : Grapevine vein clearing virus  
**GDeV** : Grapevine deformation virus  
**GFkV** : Grapevine fleck virus  
**GFLV** : Grapevine fanleaf virus  
**GLMD** : *grapevine leaf mottling and deformation disease*  
**GLRaV** : Grapevine leafroll-associated virus  
**GPGV** : Grapevine pinot gris virus  
**GRBV** : Grapevine red blotch virus  
**GRGV** : Grapevine red globe virus  
**GRSPaV** : Grapevine rupestris stem pitting-associated virus  
**GRVfV** : Grapevine rupestris vein feathering virus  
**GSyV-1** : Grapevine Syrah virus 1  
**GTRSV** : Grapevine Tunisian ringspot virus  
**GVA** : Grapevine vitivirus A  
**GVCV** : Grapevine vein clearing virus  
**Gw** : gewurztraminer  
**GYSVd-1** : Grapevine yellow speckle viroid-1  
**Ha** : hectare  
**Hel** : *helicase* ou hélicase  
**HR** : *hypersensitive reaction* ou réaction d'hypersensibilité  
**Hsr203J** : *hypersensitive response 203J*  
**HSVd** : Hop stunt virus viroid  
**HTS** : *High Throughput Sequencing* ou séquençage à haut débit  
**IC-RT-PCR** : *Immuno Capture-Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*  
**ICTV** : *International Committee on Taxonomy of Viruses*  
**ICVG** : *International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine*  
**INRA** : Institut National de la Recherche Agronomique  
**IRES** : *Internal Ribosome Entry Site*  
**Kb** : kilobase  
**KDa** : kilo Dalton  
**KSG** : *kober stem grooving*  
**L** : litre  
**LNSG** : *LN-33 stem grooving*  
**M** : mole par litre

## ABREVIATIONS

**m** : milli

**Mha** : Million d'hectares

**miRNA** : microRNA

**mol** : mole

**MP** : *movement protein* ou protéine de mouvement

**n** : nano

**nm** : nanomètre

**nt** : nucléotide(s)

**NTB** : *nucleotide triphosphate-binding*

**N-ter ou C-ter** : extrémités NH<sub>2</sub> et COOH terminales

**OIV** : Organisation mondiale de la Vigne et du Vin

**ORF** : *Open Reading Frame* ou cadre ouvert de lecture

**p** : pico

**P1 et P2** : polyprotéine 1 et 2

**pb** : paire de base

**PCD** : *programmed cell death* ou mort cellulaire programmée

**PCR** : *Polymerase Chain Reaction*

**PDLP** : *plasmodesmata located protein*

**PG** : porte-greffe

**PM** : poids moléculaire

**Pol** : RNA-polymérase RNA-dépendante

**Poly(A)** : séquence polyadénylée

**PR** : *pathogenesis protein*

**PRMV** : Peach rosette mottle virus

**Pro** : *protease* ou protéase

**PVX** : Potato virus X

**RNA-Seq** : *RNA-Sequencing*

**PRR** : *proline-rich region* ou motif riche en prolines

**RdRp ou RDR** : *RNA-dependent RNA polymerase* ou ARN polymérase ARN-dépendante

**RFP** : *Red fluorescent protein*

**RISC** : *RNA-induced silencing complex*

**RNAi** : interference par l'ARN ou *RNA silencing*

**RNase** : ribonuclease

**RNasin** : inhibiteur de ribonuclease

**ROS** : *reactive oxygen species* ou espèces réactives de l'oxygène

**RSP** : *rupestris stem pitting*

**RT** : *Reverse Transcription* ou transcription inverse

**RT-PCR** : *Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction*

**RFLP** : *Restriction Fragment Length Polymorphism* ou Polymorphisme de longueur des fragments de restriction

**satRNA** : ARN satellite

**scFv** : *single-chain variable fragment*

**siRNA** : *small interference RNA* ou petits ARN interférents

**SLRSV** : Strawberry latent ringspot virus

**spp.** : *species pluralis*

**subsp.** : sous-espèce

**TagRFP** : Tag Red Fluorescent Protein

**TBRV** : Tomato black ring virus

**T-DNA ou ADN-T** : ADN de transfert

**TMV** : Tobacco mosaic virus

**ToRSV** : Tomato ringspot virus

**TRSV** : Tobacco ringspot virus

**USA** : United states of America ou États-unis d'Amérique

**UTR** : *Untranslated Region* ou région non-traduite

**UV** : Ultraviolets

**V.** : genre *Vitis*

**V** : Volt

**VPg** : *Viral genome-linked protein*

**VLP** : *Virus-like particle*

**VRC** : *Viral Replication Complex* ou complexe de réplication

**vsRNA** : *viral small interfering RNA*

**VSR** : *Viral Suppressor of RNA silencing*

**Ω** : Ohm

## TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

### Chapitre I : Introduction générale

Figure 1 : Symptômes du court-noué de la vigne

Figure 2 : Arbre reprenant la classification des *Picornavirales*

Figure 3 : Génome du GFLV et protéines de la P2

Figure 4 : Immunité innée antivirale similaire aux bactéries et champignons

Figure 5 : Aspects de parcelles et de plantes atteintes par le court-noué de la vigne

Figure 6 : Symptômes des népovirus (et assimilé) et du GFLV sur hôtes herbacés

Tableau 1 : Membres des genres *Nepovirus* et *Sadwavirus* impliqués dans la maladie du court-noué, et certaines de leurs propriétés

### Chapitre II : Le GFLV-F13 induit une réaction de HR sur *N. occidentalis*

Figure 7 : Résumé des résultats publiés sur la réaction de GFLV-F13 sur *N. occidentalis*

Figure 8 : Phénotypes induits par les protéines 2A<sup>HP</sup> recombinantes ou mutées en expression transitoire

Figure 9 : Phénotype de récupération de *N. occidentalis* 6 mois après inoculation avec le virus F1F2

Figure 10 : Phénotypes de nécrose et accumulation de phytoalexines induits par l'expression de différentes protéines 2A<sup>HP</sup> fusionnées à la EGFP

Figure 11 : Symptômes et production de phytoalexines en contexte viral

Figure 12 : Régions C-ter des différentes protéines 2A<sup>HP</sup> de GFLV et ArMV

Tableau 2 : Symptômes des sept souches de GFLV sur différents hôtes herbacés

Tableau 3 : Symptômes, production de phytoalexines et titre viral des souches de GFLV synthétiques, ré-assortantes et chimères sur les feuilles inoculées et apicales

Tableau 4 : Récapitulatif des propriétés des protéines 2A<sup>HP</sup> en expression transitoire et en contexte viral

Tableau supplémentaire 1 : Origine des souches virales utilisées

Tableau supplémentaire 2 : détails des clonages, PCR et *primers* utilisés

Tableau supplémentaire 3 : Séquences des *primers* utilisés pour le clonage

### **Chapitre III : Le GFLV-F13 induit une réaction de HR sur *N. occidentalis***

Figure 13 : Obtention du matériel végétal infecté par greffage hétérologue et greffage bouture herbacée

Figure 14 : Symptômes induits par le GFLV (a) et plus particulièrement B844 (b) sur chardonnay (Ch) et gewurztraminer (Gw)

Figure 15 : Principe du RNA-Seq par Illumina et ses étapes majeures

Figure 16 : Détection du GFLV par *northern blot* et qRT-PCR dans le bois du porte-greffe et du greffon et dans les feuilles du greffon de Gw 643 inoculées par le GFLV

Figure 17 : Expérience préliminaire de transfection de protoplastes de Gw par le GFLV

Tableau 5 : Symptômes induits sur gewurztraminer (Gw) et chardonnay (Ch) par 5 souches de GFLV

Tableau 6 : Echantillons et détails des prélèvements des plantes analysées par LC-MS

Tableau 7 : Détection du GFLV dans le bois du porte-greffe et dans les feuilles du greffon



## TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION GÉNÉRALE .....	5
I. LA VIGNE ET LA VITICULTURE .....	5
1. LA VIGNE, D’HIER A AUJOURD’HUI.....	5
2. LA VITICULTURE .....	5
3. LES MALADIES BIOTIQUES DE LA VIGNE.....	6
II. LES VIRUS ET VIROSES DE LA VIGNE .....	7
1. VIRUS UBIQUISTES DE LA VIGNE .....	9
2. VIRUS EMERGENTS DE LA VIGNE .....	10
2.1 Le grapevine pinot gris virus .....	10
2.2 Le grapevine red blotch virus.....	11
3. LES QUATRE PRINCIPALES MALADIES VIRALES SUR VIGNES.....	11
3.1 L’enroulement de la vigne (leafroll) .....	12
3.2 Le complexe du bois strié (rugose wood disease) .....	13
3.3 La marbrure de la vigne (fleck disease) .....	13
3.4 La maladie du court-noué (fanleaf) .....	14
4. LES VIRUS DE LA VIGNE ET L’ETUDE DES SYMPTOMES.....	17
III. LES NEPOVIRUS INFECTANT LA VIGNE .....	20
1. BIOLOGIE DES NEPOVIRUS .....	20
1.1 Taxonomie et dénomination.....	20
1.2 Organisation génomique et expression du génome.....	20
1.3 Structure, encapsidation et mouvement .....	24
1.4 Transmission et propagation .....	25
1.5 Contrôle.....	26
1.6 Diversité et évolution .....	27
2. LE VIEUX ET LE NOUVEAU MONDE .....	28
2.1 Particularités des népovirus du Nouveau Monde.....	28
2.2 Particularités des népovirus du Vieux Monde .....	29
3. LE GRAPEVINE FANLEAF VIRUS .....	29
3.1 Historique.....	29
3.2 Organisation génomique.....	31
3.3 Réplication et expression du génome .....	31

## TABLE DES MATIERES

3.4 Diversité .....	32
3.5 Structure .....	33
3.6 Encapsidation et mouvement.....	33
3.7 Transmission .....	34
3.8 Contrôle.....	35
IV. SYMPTOMATOLOGIE DES NEPOVIRUS .....	37
1. LES MECANISMES A L'ORIGINE DES SYMPTOMES VIRAUX SUR PLANTES.....	37
2. LES SYMPTOMES DU COURT-NOUE SUR VIGNE.....	39
2.1 Le court-noué de la vigne.....	39
2.2 Perturbations physiologiques des vignes infectées par des népovirus .....	43
3. LES SYMPTOMES INDUITS PAR LES NEPOVIRUS SUR HOTES HERBACES .....	44
3.1 Description des symptômes.....	44
3.2 Déterminisme moléculaire des symptômes.....	46
OBJECTIF ET PRÉSENTATION DE LA THÈSE .....	48
CHAPITRE II : LE GFLV-F13 INDUIT UNE RÉACTION DE HR SUR <i>N. OCCIDENTALIS</i> .52	
I. INTRODUCTION - DIVERSITE DES SYMPTOMES DU GFLV SUR HOTES HERBACES.....	52
II. LES 50 DERNIERS ACIDES AMINES DE LA 2A <sup>HP</sup> DU GFLV-F13 DETERMINENT UNE REACTION DE HR SUR <i>N. OCCIDENTALIS</i> ACCOMPAGNEE D'UNE RESTRICTION PARTIELLE.....	54
1. RESUME DE LA PUBLICATION N°1 .....	54
2. PUBLICATION N°1 .....	55
III. CARTOGRAPHIE FINE DU FACTEUR D'AVIRULENCE 2A <sup>HP</sup> DU GFLV-F13.....	70
1. LA ZONE DES RESIDUS 220 A 231 DE LA PROTEINE 2A <sub>F13</sub> DETERMINE LA REACTION NECROTIQUE .....	70
2. LES RESIDUS 222-234 SONT IMPLIQUES DANS LA NECROSE INDUITE PAR LA PROTEINE 2A <sub>F</sub> .....	70
3. CONCLUSION .....	72
IV. EFFET DE LA VARIABILITE DES PROTEINES 2A <sup>HP</sup> DU GFLV ET DE L'ARMV SUR LA HR.....	73
1. SOUCHES DE GFLV ET D'ARMV .....	74
2. PHENOTYPES INDUITS PAR LES DIFFERENTES PROTEINES 2A <sup>HP</sup> EXPRIMEES TRANSITOIREMENT.....	76
3. PHENOTYPES INDUITS PAR LES DIFFERENTES PROTEINES 2A <sup>HP</sup> EN CONTEXTE VIRAL .....	76
4. CONCLUSIONS.....	80
V. CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	82
1. LA CARTOGRAPHIE .....	85
2. LA COLLECTION DES PROTEINES 2A <sup>HP</sup> .....	85

## CHAPITRE III : SYMPTOMATOLOGIE INDUITE PAR LE GFLV SUR *VITIS VINIFERA* ..... 89

I. OUTILS ET APPROCHE.....	89
1. COMMENT ETUDIER LES SYMPTOMES DE DIFFERENTES SOUCHES DU GFLV SUR VIGNE ?.....	89
2. PHENOTYPES INDUITS PAR LES SOUCHES B844 ET F13 DU GFLV SUR LES CEPAGES CH ET GW.....	91
II. L'ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE REVELE QU'UNE REACTION DE TYPE HR SERAIT INDUITE SPECIFIQUEMENT PAR LE GFLV-B844 SUR GW.....	93
1. RESUME DE LA PUBLICATION N°2 .....	93
2. PUBLICATION N°2 .....	96
III. CARACTERISATION DE LA REACTION INDUITE PAR LA SOUCHE B844 CHEZ GW.....	127
1. LES METABOLITES SECONDAIRES DANS LES FEUILLES DE GW INFECTES PAR LA SOUCHE B844.....	127
2. LA RESTRICTION DU GFLV-B844.....	129
IV. CONCLUSION .....	131

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES ..... 133

I. L'ETUDE DE LA SYMPTOMATOLOGIE DU GFLV CHEZ <i>N. OCCIDENTALIS</i> .....	133
II. L'ETUDE DE LA SYMPTOMATOLOGIE DU GFLV SUR VIGNE .....	135
III. REMARQUES FINALES.....	136

## RÉFÉRENCES..... 137

## ANNEXE-I PROTOCOLES ADDITIONNELS..... 148

1. DIAGNOSTIC DES PORTE-GREFFES ET DES GREFFONS.....	148
1.1 Mesure de l'accumulation virale par DAS-ELISA.....	148
1.2 Détection des vsiRNA par <i>northern blot</i> .....	148
1.3 Détection du virus par qRT-PCR.....	149
2. DOSAGE DE METABOLITES SECONDAIRES PAR LC-MS .....	149
3. OBTENTION ET TRANSFECTION DE PROTOPLASTES DE CELLULES DE VIGNE .....	149

## ANNEXE-II TABLEAUX SUPPLÉMENTAIRES ..... 151



## INTRODUCTION GÉNÉRALE

### I. LA VIGNE ET LA VITICULTURE

#### 1. La vigne, d'hier à aujourd'hui

La Vigne (*Vitis spp.*) fait partie de la famille des *Vitaceae* qui comporte douze genres différents et plus de 700 espèces, allant des vignes grimpantes d'ornement aux vignes cultivées pour leurs raisins (Galet 2000). La vigne ancestrale était présente avant la séparation des continents ; on distingue les espèces natives du Gondwana (au Sud) à 11 ou 12 chromosomes, des espèces natives de Laurasia (au Nord) à 19 ou 20 chromosomes, et dont le genre *Vitis* fait partie (Galet 2000). Les populations de vignes auraient ensuite été fragmentées tout au long des périodes glaciaires et auraient évoluées autour du monde. Cela explique que des membres ancestraux putatifs aient été retrouvés sous forme de fossiles datant du crétacé au Portugal et dans le Nebraska, il y a 140 millions d'années, et de l'éocène en Champagne il y a 65 millions d'années (*Vitis sezannensis*), puis des membres ancestraux avérés jusqu'à l'Âge de Bronze en Italie et en Grèce, par exemple (Reynolds 2017).

La forme moderne de la vigne représentée par le genre *Vitis* (et l'espèce majoritaire *V. vinifera vinifera*) est le fruit d'un croisement entre deux sous-espèces *Vitis vinifera* subsp. *sylvestris* et *V. vinifera* subsp. *sativa*. La terminologie « vigne » se réfère aujourd'hui à une soixantaine d'espèces du genre *Vitis*, produisant des raisins de cuve et de table. Elles appartiennent à deux sous-genres majeurs capables de s'entrecroiser, *Euvtis* (pour les vrais *Vitis* à  $2n = 38$ ) et *Muscadinia* ( $2n = 40$ ) (Terral *et al.*, 2010 ; Reynolds 2017). Plus de 10 000 cultivars sont regroupés sous une classification simplifiée : les vignes américaines dont les espèces Muscadines (*V. rotundifolia*) et certaines espèces du genre *Vitis* comme *V. labrusca* ou *V. rupestris*, les vignes asiatiques dont *V. amurensis*, et enfin les vignes européennes et moyen-orientales composées d'un unique membre *V. vinifera* (Robinson 1997). Les 50 cépages les plus cultivés représentent à eux seuls 53 % de la superficie mondiale des cépages cultivés, les cinq premiers étant l'airen blanc, la sultanine *Thompson seedless*, le cabernet Sauvignon, le merlot et le chardonnay (Gallet 2015).

#### 2. La viticulture

La vigne est l'une des plus anciennes espèces végétales domestiquées par l'homme, dont on retrouve les premières occurrences dès 6 000 av. J.-C. en Géorgie, au Cachemire et en Anatolie. La culture de la vigne a largement été associée au croissant fertile, plus précisément à l'Iran dès 3 500 av. J.-C., et à tout le bassin méditerranéen dès 1 500 av. J.-C. (Galet 2000 ; Terral *et al.*, 2010). Comme le prouvent de nombreux vestiges archéologiques (jarres, fresques murales, lexique spécialisé, écrits cunéiformes...), elle s'est ensuite étendue

## INTRODUCTION

par l'expansion puis le commerce de certaines civilisations comme les Hittites, les Egyptiens et les Phéniciens autour du bassin méditerranéen puis par les Romains dans toute l'Europe, l'Afrique du Nord et le Proche-Orient. La viticulture et le vin s'imposèrent donc sur tous les continents habités entre les isothermes 10°C des deux hémisphères, au climat tempéré, s'intégrant à de multiples cultures (Galet 2000 ; Terral *et al.*, 2010).

Depuis lors, la vigne est l'une des plantes les plus cultivées avec une surface mondiale de 7,5 millions d'hectares (Mha) de vignoble pour une production de 75,8 millions de tonnes de raisins et 246 millions d'hectolitres de vin (Aurand, 2017). Les raisins bien qu'ils soient aussi vendus en qualité de fruits frais, raisins secs, jus et autres produits dérivés, sont majoritairement destinés à l'élaboration de vin dont les cinq pays producteurs majoritaires sont la France, l'Italie, l'Espagne, les USA et l'Argentine. Le vignoble français qui occupe quasiment 800 000 ha est consacré essentiellement à la production de vin (Aurand, 2017). La filière viti-vinicole représente un secteur majeur de l'agriculture française qui emploie plus de 550 000 personnes (vignerons, viticulteurs, cavistes, sommeliers, tonneliers, négociants, interprofessionnels, Beaumard & Gerbod 2018). La valeur de l'excédent commercial généré par la filière des vins et spiritueux français est estimée à 11,4 milliards d'€, représentant ainsi le deuxième poste excédentaire de la balance commerciale française derrière l'aéronautique (FranceAgriMer 2017). Enfin, le vignoble, en tant que territoire, et le vin partie intégrante de la gastronomie française (consommation moyenne 40,4 litres / habitant / an, FranceAgriMer 2017) participent activement au patrimoine français. L'Unesco a ainsi inscrit en juillet 2015, sur sa liste du "Patrimoine mondial de l'Humanité" les "coteaux, maisons et caves de Champagne", ainsi que des "climats" du vignoble de Bourgogne.

### 3. Les maladies biotiques de la vigne

La vigne est une espèce pérenne à multiplication végétative depuis les débuts de sa domestication, particularités qui ont été favorables à l'émergence et la propagation de maladies, en particulier transmises par les pratiques culturales, comme le bouturage et le greffage. Comme toutes les plantes cultivées, la vigne est ainsi le foyer de diverses infections. Elle est la cible de pathogènes et ravageurs dont les principaux sont des mycètes (comme les agents des maladies du bois dont l'eutypiose, l'esca et la botryosphaeriose), des oomycètes (mildiou), des ascomycètes (oïdium, botrytis), des bactéries (maladie de Pierce) et des phytoplasmes (flavescence dorée, bois noir), des nématodes (galles des racines), des acariens (érisose) ou encore des insectes (phylloxéra, Reynolds 2017). Les cochenilles et les nématodes induisent aussi des dégâts indirects puisqu'ils sont les vecteurs de beaucoup de phytovirus (enroulement de la vigne, court-noué de la vigne, Martelli 2014 ; Martelli 2017). Les maladies induites par ces pathogènes altèrent la qualité des raisins et du vin, mais aussi la vigueur de la vigne ainsi que la longévité des ceps. La diffusion de ces maladies s'est accentuée par les méthodes de propagation du matériel végétal et les échanges à travers le monde (Mudge *et al.*, 2009). Bien que certains genres ou espèces de vignes soient connus

pour présenter des résistances naturelles à certains pathogènes, ils ne sont pas toujours dotés de qualités gustatives intéressantes ou présentent des conduites de cultures non-adaptées. Ainsi, *M. rotundifolia* est résistante à l'oïdium mais présente un goût foxé (Walter & Martelli, 1996).

En dehors des effets symptomatiques évidents, des pertes de rendement et de qualité, ces maladies ont aussi pour effet de modeler les itinéraires techniques de la culture de la vigne et de la production des plants. Un des exemples les plus célèbres est le phylloxéra dont l'épidémie à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle en Europe a stoppé la culture de *Vitis vinifera* en franc-de-pied (plantation directe) et introduit l'utilisation d'un nouvel itinéraire technique en viticulture ; le porte-greffe. En France, au début du XX<sup>e</sup> siècle, l'épidémie de phylloxéra ainsi que la sur-infestation d'oïdium et de mildiou ont largement contribué à la réduction drastique du vignoble passant de 2,5 Mha à la fin du XIX<sup>e</sup> siècle à environ 800 000 ha aujourd'hui. L'ensemble des maladies, notamment celles transmises par la greffe, a motivé la création de la pratique de sélection sanitaire dans les années 60, ainsi que la mise en place dans de nombreux pays de la certification des plants vis-à-vis des virus et autres pathogènes (bactéries, phytoplasmes) fortement préjudiciables (Golino *et al.*, 2017). Ces schémas de sélection sanitaire et certification permettent de contrôler la multiplication du matériel végétal et les échanges commerciaux, en particulier entre les pays producteurs de plants. Certains de ces pathogènes sont aujourd'hui des microorganismes de quarantaine, et l'importation de matériel végétal, en particulier des USA n'est pas possible sauf en suivant la procédure très lourde de la quarantaine phytosanitaire. Les népovirus américains font en particulier partie des virus de quarantaine pour l'Europe.

Les pathologies biotiques de la vigne, passées, installées et émergentes, toujours plus en expansion et causant de multiples symptômes, couplées à l'absence de méthodes de lutte efficaces dans beaucoup de cas, participent au dépérissement du vignoble. L'ensemble de la filière viti-vinicole française a opéré à la fin des années 2010 une prise de conscience globale, et a mis en place un dispositif appelé "Plan National Dépérissement du Vignoble" pour agir à tous les niveaux (suivi des pépinières et de la certification des plants, mise en place d'itinéraires techniques, financements de sujets de recherche contre les dépérissements), de manière concertée afin de lutter contre les nombreuses sources de dépérissement de la vigne en France.

## II. LES VIRUS ET VIROSES DE LA VIGNE

Les premières descriptions de dégénérescences infectieuses, de diffusion en foyer, de transmission par bouturage et de méthodes curatives par autoclavage du sol, datent de la fin du XIX<sup>e</sup> siècle, début du XX<sup>e</sup>. En 1929, Petri confirmait une cause virale à cette dégénérescence infectieuse (Petri 1929). Comme pour les autres phytovirus, la transmission des virus de la vigne se fait par des vecteurs de nature très variée (nématodes, cochenilles,

## INTRODUCTION

membracides, pucerons, acariens ...). La propagation des virus peut aussi être due à l'homme, que ce soit lors de la multiplication de matériel végétal infecté et d'échanges commerciaux, ou simplement lors de certaines étapes de culture de la vigne (travail du sol, matériel viticole comportant des résidus de terre, transport de terre infestée...). En 1962, sous l'impulsion de quelques chercheurs américains et européens a été créé l'ICVG (*International Council for the Study of Virus and Virus-like Diseases of the Grapevine*), ce qui a permis de faire progresser très significativement les recherches en virologie de la vigne en favorisant les échanges scientifiques et les collaborations, et le partage des techniques les plus appropriées pour l'étude des virus de la vigne (Schmitt-Keichinger *et al.*, 2017).

Avec l'avènement du séquençage à haut débit ou HTS (*High Throughput Sequencing*), plus de 80 virus et sept viroïdes infectant la vigne ont été décrits à ce jour. La vigne est ainsi la plante cultivée hébergeant le plus de virus et recensant plus d'une vingtaine de viroses et pseudo-viroses (Martelli 2014). Les virus les plus fréquemment détectés sur vigne possèdent un génome à ARN simple brin de polarité positive, protégé par une capsidie icosaédrique (comme les virus de la famille des *Secoviridae* et des *Tymoviridae*) ou filamenteuse (notamment les virus de la famille des *Closteroviridae* et des *Betaflexiviridae*, Martelli 2017). De rares virus détectés sur vigne ont un génome à ARN double-brin comme par exemple certains virus de la famille des *Endornaviridae* (Espach *et al.*, 2012). Enfin plus récemment, des virus à ADN, à l'origine de dégâts importants, ont été décrits : le *Grapevine red blotch virus* ou GRBV, de la famille des *Geminiviridae* (Al Rwahnih *et al.*, 2013) et le *Grapevine vein clearing virus*, GVCV, de la famille des *Caulimoviridae* (Zhang *et al.*, 2011).

Ainsi la vigne, héberge un nombre important de virus et de familles virales. C'est pourquoi on pourrait utiliser le terme de virobiote, par analogie avec le microbiote, pour désigner l'ensemble des virus (pathogènes et / ou commensaux) présents dans un pied de vigne. Ce virobiote semble complexe puisqu'une enquête récente, menée sur des vignobles commerciaux au Canada, a montré qu'environ 67 % des 3 000 vignes testées présentaient une infection mixte avec deux à quatre virus détectés (Xiao *et al.*, 2018). Il est donc fréquent de constater la présence simultanée de différents virus au sein d'un pied de vigne. Le HTS représente un formidable outil de caractérisation du virobiote de la vigne sans *a priori* (Seguin *et al.*, 2014). Mais bien que le HTS ait permis un bond dans la description du virobiote et la corrélation entre virus (ou populations virales) et symptômes ; il n'est pas suffisant pour identifier l'agent causal d'une maladie. Par ailleurs il est important de remarquer qu'un virus détecté sur des tissus de vigne grâce au HTS peut aussi bien être un virus de champignon ou d'insecte, ou présent dans l'environnement, et prélevé en même temps que le tissu de vigne. Comme cela a été récemment publié, avant d'assigner un virus à la vigne, il est indispensable de faire des études biologiques complémentaires au HTS (Hily *et al.*, 2018a).

Il est important de noter que la majorité des travaux portant sur l'étiologie des maladies virales, réalisés au vignoble avant l'avènement du HTS, reposaient sur la description de symptômes et l'identification éventuelle d'un virus associé mais sans connaissance

exhaustive du virobiote des plants malades. Or ceci pourrait s'avérer primordial du fait de la forte présence d'infections mixtes chez la vigne. Pour la majorité des virus de la vigne, les postulats de Koch n'ont pas été vérifiés clairement avec inoculation de l'agent reproduisant la maladie. Ainsi les descriptions de virus de vigne datant des années 80-90 et leur association à des maladies pourraient être incomplètes ou biaisées. Comme pour toutes les cultures, certains virus de vigne sont certainement non pathogènes dans des conditions environnementales données tandis que d'autres virus provoquent de forts symptômes liés à des anomalies du développement à l'origine de dégâts importants (Legin 1972 ; Maliogka *et al.*, 2015). L'état des connaissances actuelles sur certains virus de vigne ne permet pas de savoir s'ils sont à considérer comme des virus pathogènes, latents ou commensaux. Afin de décrire plus en détails les principaux virus de vigne dans les paragraphes suivants, ils ont été classés dans trois catégories : les virus ubiquistes de la vigne, les virus émergents et les virus appartenant aux quatre principales maladies virales de la vigne. Ces trois catégories basées sur les connaissances actuelles possèdent encore des contours flous : certains virus peuvent être classés dans deux catégories différentes et *a priori* opposées. Par exemple le grapevine rupestris stem pitting-associated virus (GRSPaV) est décrit comme un virus ubiquiste (Hily *et al.*, 2018b) dans les récentes études utilisant des approches de HTS mais a été associé dans les années 80 au complexe du bois strié.

### 1. Virus ubiquistes de la vigne

Les études récentes réalisées par HTS ont permis de mettre en évidence la présence quasi systématique dans les vignes cultivées du GRSPaV, du genre *Foveavirus* dans la famille des *Betaflexiviridae* et de deux viroïdes (le *Hop stunt viroid* ou HSVd, et le *Grapevine yellow speckle viroid-1* ou GYSVd-1) qui pourraient être donc considérés comme des virus et viroïdes ubiquistes de la vigne. Dans une moindre mesure on retrouve également très largement des espèces virales des genres *Maculavirus* et *Marafivirus*, de la famille des *Tymoviridae* (Saldarelli *et al.*, 2017a). La coexistence de ces virus et viroïdes avec une forte prévalence, met en lumière l'existence de virus communs (ou *background virome*) chez une majorité de vignes et porte-greffes. Ce virobiote semble pouvoir être composé de multiples variants viraux comme cela a récemment été décrit pour le GRSPaV (Hily *et al.*, 2018b). Bien que leur impact soit difficile à évaluer, ces virus communs à beaucoup de vigne ne sont généralement pas associés à des maladies, et pourraient se comporter comme des virus commensaux dont l'équilibre pourrait être perturbé lors d'une surinfection par un virus pathogène pour la vigne (Saldarelli *et al.*, 2017a). Dans ce cas un effet synergique du virobiote dans l'extériorisation de symptômes plus graves que ceux initialement associés au virus pathogène, ne serait pas à écarter. Le microbiote des plantes n'inclut pour l'instant aucun virus. Pourtant des études indiquent qu'il existerait chez les plantes au même titre que les bactéries commensales (fournisseuses d'azote, activatrices de défense), des virus bénéfiques (Roossinck 2015) conférant une tolérance à la sécheresse (Xu *et al.*, 2008), diminuant l'attractivité pour les

herbivores (van Molken *et al.*, 2012) ou protégeant les plantes d'une flétrissure bactérienne (Shapiro *et al.*, 2013).

On notera qu'avant même l'utilisation de ces technologies de HTS, la prévalence du GRSPaV avait déjà été décrite chez beaucoup d'espèces de *Vitis* y compris les porte-greffes, sans forcément que l'on comprenne son étiologie. Le GRSPaV est par ailleurs décrit sensible au traitement par thérapie suivie du micro-greffage d'apex (Komar *et al.*, 2010). Plus récemment, grâce au HTS, il a été remarqué que le GRSPaV, et le GYSVd-1 sont absents d'un clone ENTAV-INRA® assaini par thérapie alors que le HSVd reste présent (Vigne *et al.*, 2018). Il semble que seule la régénération de vigne après embryogénèse somatique permette d'éliminer le GRSPaV, le GYSVd-1 et le HSVd (Hily *et al.*, 2018c).

## 2. Virus émergents de la vigne

De nouveaux syndromes associés potentiellement à des virus apparaissent régulièrement au vignoble. De plus les progrès récents des techniques de HTS (Barba *et al.*, 2014) ont favorisé la découverte chez la vigne de nouveaux virus, et ont permis une avancée notable dans l'étiologie de plusieurs maladies de la vigne (Chiumenti *et al.*, 2012), même si les postulats de Koch restent compliqués à vérifier (Roossinck 2017). Récemment, deux découvertes majeures dans le monde de la virologie de la vigne ont été attribuées à l'utilisation du HTS, et à ses avancées technologiques.

### 2.1 Le grapevine pinot gris virus

La maladie du *grapevine leaf mottling and deformation* (ou GLMD) était, jusqu'à récemment, observée sur plusieurs cépages (pinot gris, friulano (Tocai), and glera (Prosecco), Bianchi *et al.*, 2015) dans plusieurs régions du monde, (et depuis 2003 dans des vignobles commerciaux en Italie) sans qu'aucun pathogène connu n'ait pu y être associé (aucune détection moléculaire ou sérologique ; (Martelli 2014). Les vignes symptomatiques sont souvent rabougries et présentent des chloroses et des déformations typiques (Saldarelli *et al.*, 2017b). Grâce au HTS, le génome d'un nouveau virus le grapevine pinot gris virus (GPGV) a été assemblé à partir de séquences obtenues sur des vignes porteuses de GLMD (Giampetruzzi *et al.*, 2012). Ce virus est un nouveau membre du genre *Trichovirus*, dans la famille des *Betaflexiviridae* et sa caractérisation moléculaire ainsi que l'étude de ses propriétés biologiques sont en court. Récemment, l'acarien *Colomerus vitis* a été proposé comme vecteur (Malagnini *et al.*, 2016). Néanmoins si l'étiologie de la maladie est maintenant établie, l'étude de ce virus demeure compliquée car certains variants ont aussi été détectés dans des vignes ne montrant pas de symptômes (Saldarelli *et al.*, 2015). Il est à noter que le GPGV semble infecter des plantes adventices (réservoir). Même si ce virus a été détecté en Italie, en Slovénie, en France, aux USA, et au Canada, l'estimation de sa propagation au sein d'un vignoble et des dégâts directement liés à ce virus restent difficiles à évaluer. Le GPGV

n'est pour l'instant lié à un programme de régulation de matériel végétal qu'au Canada, bien que sa détection soit recommandée (Saldarelli *et al.*, 2017a).

## 2.2 Le *Grapevine red blotch virus*

L'étude de l'étiologie de certaines maladies peut être complexifiée par des convergences de symptômes : en effet des symptômes courants peuvent être associés à tort à certains virus, ce qui est compréhensible dans le cas de la vigne qui héberge souvent des cas d'infection mixte (Xiao *et al.*, 2018). Des dégâts de ravageurs (acariens dans le cadre du « court-noué parasitaire » par exemple), désordres physiologiques (carences, stress hydrique, traitements...) peuvent également être confondus avec des symptômes induits par des infections virales (Jeong *et al.*, 2014). C'est pourquoi il est essentiel pour associer un virus à une maladie de vérifier les postulats de Koch. Dans le cas de la maladie du *red blotch*, récemment décrite aux USA (Calvi 2011), les symptômes visuels ont d'abord été associés à des stress abiotiques, et la forme retrouvée sur les cépages rouges confondue avec la maladie de l'enroulement, retardant considérablement la reconnaissance de cette nouvelle maladie virale (Cieniewicz *et al.*, 2017a). Le lien entre l'agent causal et la maladie sera rapidement démontré d'une part par l'élimination du virus par culture de méristèmes et d'autre part grâce à l'obtention d'un clone infectieux (Yepes *et al.*, 2018), permettant alors d'identifier un nouveau virus à ADN, le GRBV, appartenant à la famille des *Geminiviridae* (Krenz *et al.*, 2012 ; Al Rwahnih *et al.*, 2013). Des recherches sont actuellement menées sur la propagation et la transmission du virus au vignoble. Les données actuelles semblent indiquer que le membracide *Spissistilus festinus* en serait le vecteur (Cieniewicz *et al.*, 2018). Les dégâts et pertes associés à cette maladie paraissent être du même ordre que ceux attribués à l'enroulement aux USA (Cieniewicz *et al.*, 2017b), ce qui ferait du *red blotch* un problème phytosanitaire très sérieux sachant qu'aucun moyen de contrôle n'existe pour l'instant (Sudarshana *et al.*, 2015).

## 3. Les quatre principales maladies virales sur vignes

Sur les 80 virus identifiés chez *Vitis* et *Muscadinia spp.* environ la moitié (31 virus) est associée à l'un des quatre syndromes majeurs décrits sur la vigne : l'enroulement de la vigne (ou *leafroll disease*), la marbrure de la vigne (*fleck disease*), le complexe du bois strié (*rugose wood disease*) et la maladie du court-noué (ou *infectious degeneration*, Martelli 2014 ; Martelli 2017). Au vignoble, la claire association de ces syndromes à une souche virale précise reste compliquée du fait de la présence simultanée de plusieurs virus dans un pied de vigne (Cf. II.). Il est encore plus compliqué de démontrer le caractère pathogène ou commensal pour l'autre moitié des virus hébergés par la vigne. Ils peuvent induire des désordres mineurs ou difficilement quantifiables.

### 3.1 L'enroulement de la vigne (*leafroll*)

Bien que cette maladie soit présente dans le monde entier, il semble qu'elle ait débuté sur le « vieux continent ». Dès le début des années 1900 un désordre physiologique caractérisé par un rougissement prématuré des feuilles, accompagné d'un enroulement du limbe, appelé rougeau en France, ou *rossore* en Italie est décrit sur vigne (sur les cépages à baies rouges plus que les cépages à baies blanches qui montrent des symptômes plus discrets, Martelli 2017). Le même type de symptômes a été mis en évidence en Californie dans les années 40 : la maladie du cépage *emperor* (ou white emperor disease, Harmon & Snyder 1946) ; des travaux en 1958 démontreront qu'il s'agit de la même affection nommée alors maladie de l'enroulement ou *leafroll disease* en anglais. L'implication de cochenilles appartenant à plusieurs genres des familles *Pseudococcidae* et *Coccidae*, dans la transmission est démontrée dès les années 80 (Martelli 2017). L'origine virale de la maladie, suggérée par la transmission par greffage, sera confirmée avec l'identification de particules virales flexueuses de type *Closterovirus* dans des pieds symptomatiques (Namba *et al.*, 1979).

Aujourd'hui, les espèces virales *grapevine leafroll-associated virus (GRLaV)* -1, -3, -4 et -13 (Ito & Nakaune 2016), du genre *Ampelovirus* et le GLRaV-2 du genre *Closterovirus* sont associées à l'enroulement de la vigne ; le GLRaV-3 est le plus fréquemment retrouvé dans les vignobles et est considéré comme l'agent principal de l'enroulement viral (Burger *et al.*, 2017). De récentes études montrent que le GRLaV-7 (genre *Velarivirus*) ne serait finalement pas un agent causal de l'enroulement, du moins pas seul (Al Rwahnih *et al.*, 2012 ; Reynard *et al.*, 2015). Le GRLaV-2 est associé à certains déclin de la vigne (ou *decline*) (Golino *et al.*, 2000) ainsi qu'à certaines incompatibilités de greffage (Greif *et al.*, 1995). Enfin les virus de l'enroulement sont strictement inféodés à la vigne, et très souvent associés aux *Vitivirus* (GVA, GVB..., Alliaume *et al.*, 2018).

Dans les pays où l'enroulement est un enjeu majeur (en Californie et en Afrique du Sud), les pertes sont sévères (entre 10 000 et 40 000 \$ / ha selon les modèles d'estimation et la sévérité de la maladie, Mannini & Digiario 2017). Aujourd'hui aucune résistance naturelle n'est décrite, et les méthodes de lutte se concentrent sur le contrôle de la propagation de la maladie par la certification des plants (essentiellement à l'encontre du GLRaV-3) : la réglementation impose l'absence des virus de l'enroulement (et notamment des GLRaV-1 et GLRaV-3) dans tout plant de vigne commercialisé. Il existe néanmoins des méthodes prophylactiques pour : (i) empêcher l'introduction de matériel végétal contaminé au vignoble (en testant les plants mères et en éliminant les virus par la culture de méristèmes), (ii) contrôler les infections secondaires (en testant les plants au vignoble pour les éliminer), (iii) contrôler les populations de vecteurs par des méthodes chimiques ou alternatives (en utilisant des phéromones ou des insectes parasitoïdes), et (iv) limiter la propagation des vecteurs entre parcelles (en traitant le matériel et les équipements ou en commençant les travaux par les parcelles non contaminées, Naidu *et al.*, 2014). L'ensemble de ces mesures, appliqué après l'arrachage des plants atteints et une période de jachère, a permis la

réimplantation d'un vignoble, dans une région d'Afrique du Sud touchée à 100 % par la maladie (Pietersen *et al.*, 2013).

### 3.2 Le complexe du bois strié (*rugose wood disease*)

Bien que des symptômes d'altération des rameaux et de l'écorce semblables à ceux des maladies du complexe du bois strié aient été décrits dans la littérature française dès le début du XIX<sup>e</sup> siècle, la description à proprement parler de la maladie a été réalisée / établie en Italie au début des années 60 (Graniti & Martelli 1965). Cette dénomination reprend quatre types de syndromes : le *rupestris stem pitting* (RSP), le *kober stem grooving* (KSG), le *corky bark* (CB) et le *LN-33 stem grooving* (LNSG ; (Martelli 2014). Les quatre syndromes du complexe du bois strié sont différenciables sur les espèces indicatrices *V. rupestris*, et kober 5BB (Savino *et al.*, 1987). Le CB est caractérisé sur vignes LN-33 par des entre-nœuds suintants et des jeunes rameaux fissurés qui sont accompagnés d'un rabougrissement ; le KSG est caractérisé sur vignes kober 5BB par une cannelure importante des bois ; et le LNSG sur vignes LN-33 par une cannelure du tronc sans atteinte du phloème (Martelli 2017). Le RSP caractérisé par des bandes de dépressions sur la surface du bois de *V. Rupestris* pourrait être associé au GRSPaV (un membre des *Betaflexiviridae*), un virus commun de la vigne dont l'infection paraît bénigne sur la majorité des cultivars (cv. ; Cf. II. 1).

L'étiologie de ces maladies se précise dans les années 80, avec l'identification sur des vignes symptomatiques de particules virales flexueuses, nommées alors *grapevine virus A* (GVA, Milne *et al.*, 1984). Par la suite, les grapevine virus B,-D, -E et -F seront identifiés et regroupés avec le GVA dans le genre *Vitivirus* ; et associés pour la majorité d'entre eux au complexe du bois strié (Martelli *et al.*, 1997). Grâce au HTS, l'identification de nouveaux vitivirus continue, avec récemment les GVL et GVT (Debat *et al.*, 2018 ; Nourinejhad Zarghani *et al.*, 2018). Rapidement des cochenilles sont identifiées comme vecteur du GVA. Les vitivirus, également inféodés au phloème, partagent leurs nombreux vecteurs avec les ampelovirus, sauf le GVD qui n'a aucun vecteur naturel décrit (Martelli 2014). Bien que certains variants n'induisent pas de symptômes chez la plupart des cultivars et des porte-greffes, les vitivirus sont dépistés dans les vignes-mères, ou bien dans les nouvelles variétés à inscrire au catalogue. Les GVA et GVB ne sont pas inscrits dans le schéma de la certification française ; cependant la propagation de matériel végétal infecté par un vitivirus est interdite dans la plupart des pays qui contrôlent l'état sanitaire des plants de vigne importés et qui certifient leur matériel (Golino *et al.*, 2017).

### 3.3 La marbrure de la vigne (*fleck disease*)

La découverte de la maladie de la marbrure (ou *fleck disease*) en Californie date des années 60 (Hewitt *et al.*, 1962). Suite au greffage de *V. rupestris* sur des *V. vinifera* apparemment sains, des symptômes alors inconnus d'éclaircissement des nervures associés à d'importantes marbrures apparaissent sur *V. rupestris* suggérant l'existence d'un agent pathogène transmissible par greffage. Ce n'est qu'en 1983 que son origine virale est

confirmée suite à l'identification de nouvelles particules virales icosaédriques restreintes au phloème. Le lien avec la maladie de la marbrure interviendra dans les années 90 (Boscia *et al.*, 1991), en retrouvant ces particules de l'espèce virale alors nommée grapevine fleck virus (GFkV) dans des vignes présentant ces symptômes caractéristiques (Martelli *et al.*, 2002). En plus des symptômes de marbrure, et de l'éclaircissement des nervures, de nombreux désordres cellulaires ont été dénombrés, comme la modification du phloème et des cellules compagnes ou l'accumulation de membranes.

Le GFkV appartient à la famille des *Tymoviridae* et au genre *Maculavirus*. Il partage un certain nombre de propriétés (dont la particularité d'être restreint à l'hôte *Vitis*) avec un autre *Maculavirus* : le *Grapevine red globe virus* (GRGV) et trois *Marafivirus* : le grapevine asteroid mosaic-associated virus (GAMaV), le grapevine ruspestris vein feathering virus (GRVfV) et le grapevine Syrah virus 1 (GSyV-1). Ces virus sont retrouvés chez de nombreux porte-greffes américains et cépages européens, ce qui pourrait sous-entendre qu'ils ne sont pas récents (Martelli *et al.*, 2015). Ces virus pour lesquels aucun vecteur naturel ni mécanisme de transmission n'ont pu être identifiés, se sont par la suite étendus à tous les vignobles du monde par la propagation et l'échange de matériel végétal infecté (Martelli 2017 ; Sabanadzovic *et al.*, 2017). Dans les analyses par HTS actuelles ces virus peuvent être retrouvés sur des vignes paradoxalement non symptomatiques ; au point de questionner leur appartenance aux virus ubiquistes de la vigne (Cf. II. 1). Aucun traitement curatif n'est rapporté pour les vignobles infectés, mais l'assainissement de plants infectés par le GFkV est possible par thérapie associée à la culture de méristèmes apicaux et au micro-greffage *in vitro* notamment pour implanter des porte-greffes indemnes de ces virus en pépinières (Sabanadzovic *et al.*, 2017).

### 3.4 La maladie du court-noué (*fanleaf*)

Le court-noué, syndrome dit dégénératif, touche tous les organes du cep infecté, impactant sa santé, sa productivité mais aussi sa longévité. Il est décrit dès le XIX<sup>e</sup> siècle dans certains pays d'Europe. Sa distribution au vignoble en patch, et la transmission par greffage suggèrent rapidement une origine virale à la maladie (Martelli 2014). La confirmation arrivera dans les années 1960, avec l'association de la maladie à deux autres partenaires : des nématodes du genre *Xiphinema* et un putatif népovirus (Hewitt *et al.*, 1958). Aujourd'hui, le court-noué est présent partout où la vigne l'est, ou presque.

Le court-noué est considéré comme l'une des maladies virales les plus dommageables à la viticulture du monde entier (Mannini & Digiario 2017 ; Schmitt-Keichinger *et al.*, 2017). Les pertes engendrées, variant en fonction des conditions pédoclimatiques et des géotypes des virus et des vignes, peuvent représenter 10 à 80 %. Les symptômes foliaires (Fig. 1) incluent des jaunissements et des déformations des pétioles et des limbes, visibles tout au long de la période végétative et qui peuvent s'atténuer ou disparaître aux périodes de forte chaleur. Les sarments peuvent présenter un raccourcissement des entre-nœuds, une forme

Figure 1 : Symptômes du court-noué de la vigne



Fasciation



Zig-zag

Les malformations des ramifications sont nombreuses

et peuvent conduire au développement de vignes à l'aspect buissonnant.



Sain

Court-noué

Le fort raccourcissement des entre-nœuds, symptôme caractéristique a donné le nom français à la maladie.



Les symptômes foliaires sont très variés. La déformation du sinus pétiolaire et le rapprochement des nervures primaires donnant un aspect d'éventail à la feuille ont donné le terme de *fanleaf* en anglais.



Fanleaf



Mosaïque



Jaunissement



Panachure

Les défauts de fécondation et de maturation des baies, sont connus sous les noms de coulure et millerandage, et sont directement responsables des pertes de production. En plus d'être clairsemées, les grappes peuvent aussi être de plus petite taille.



Sain



Coulure

de zigzag voire des fasciations. Les grappes et les baies présentent des anomalies de développement (cou lure et millerandage) conduisant à une baisse de rendement et une modification de la teneur en sucre des jus. Un déclin progressif et une vigueur réduite des pieds ont également été décrits, conduisant à la mort des ceps (Andret-Link *et al.*, 2004a ; Schmitt-Keichinger *et al.*, 2017).

Sur les 16 virus associés à la maladie du court-noué de la vigne, 15 sont des népovirus et le dernier (le strawberry latent ringspot virus ou SLRSV) fait partie de la famille des *Secoviridae* mais n'est attribué à aucun genre. Le grapevine fanleaf virus (GFLV) et l'arabis mosaic virus (ArMV) sont en Europe les principales espèces virales, agents causals de cette maladie. Le court-noué s'est depuis étendu à la quasi-totalité des vignobles du monde pour devenir un problème sanitaire important, du fait de l'absence de moyens de lutte et de gène de résistance naturelle clairement identifié chez *Vitis vinifera*. Des méthodes de prévention ont néanmoins été mises en place telles que l'arrachage systématique des pieds touchés, le repos de la terre, et la mise en place d'une certification des plants de vigne indemnes du GFLV et de l'ArMV. En France, on estime que 60 % du vignoble est touché et que les pertes engendrées approchent le milliard d'€ / an (Fuchs 2008).

#### 4. Les virus de la vigne et l'étude des symptômes

Les infections virales de la vigne sont accompagnées d'un large panel de symptômes comme des défauts de forme et de couleur sur les feuilles ou les rameaux, des altérations des baies et des grappes mais aussi de la vigueur en général ce qui peut se traduire par un rabougrissement de la vigne, voire par la mort du cep. La durée de productivité d'un vignoble infecté peut chuter de façon importante, comme chutent la quantité et la qualité des fruits (Mannini & Digiaro 2017). Sur un hôte comme la vigne, l'étude des symptômes reste très difficile, et cela pour deux raisons majeures : l'hôte est pérenne et peut être infecté par de multiples virus (voire différents variants du mêmes virus) ce qui empêche l'association certaine d'un virus avec un symptôme, et d'autre part l'inoculation mécanique de la vigne est restée infructueuse. Inoculer la vigne requiert des greffages successifs ce qui est long et laborieux. Si l'on utilise des vignes naturellement infectées, il est nécessaire de dresser le virobiote complet d'un cep (par HTS) puis idéalement d'en isoler les agents infectieux pour les étudier individuellement afin de comprendre leur implication dans les symptômes. Enfin ce qui est vrai dans une région viticole peut ne pas l'être dans une autre (conditions pédoclimatiques et cépages différents). Au regard de la qualité du raisin et du vin, des observations très diverses ont été rapportées : elle semble affectée par certaines infections virales (comme les vitivirus, Mannini *et al.*, 2015), elle est similaire pour d'autres virus (Legin *et al.*, 1993 ; Vigne *et al.*, 2015), voire améliorée selon certains producteurs (bien que la quantité en soit diminuée). Bien qu'il soit difficile d'évaluer précisément et correctement les conséquences des maladies virales aux symptômes les plus problématiques, les pertes essuyées sont importantes (Fuchs 2008 ; Atallah *et al.*, 2011 ; Basso *et al.*, 2017).



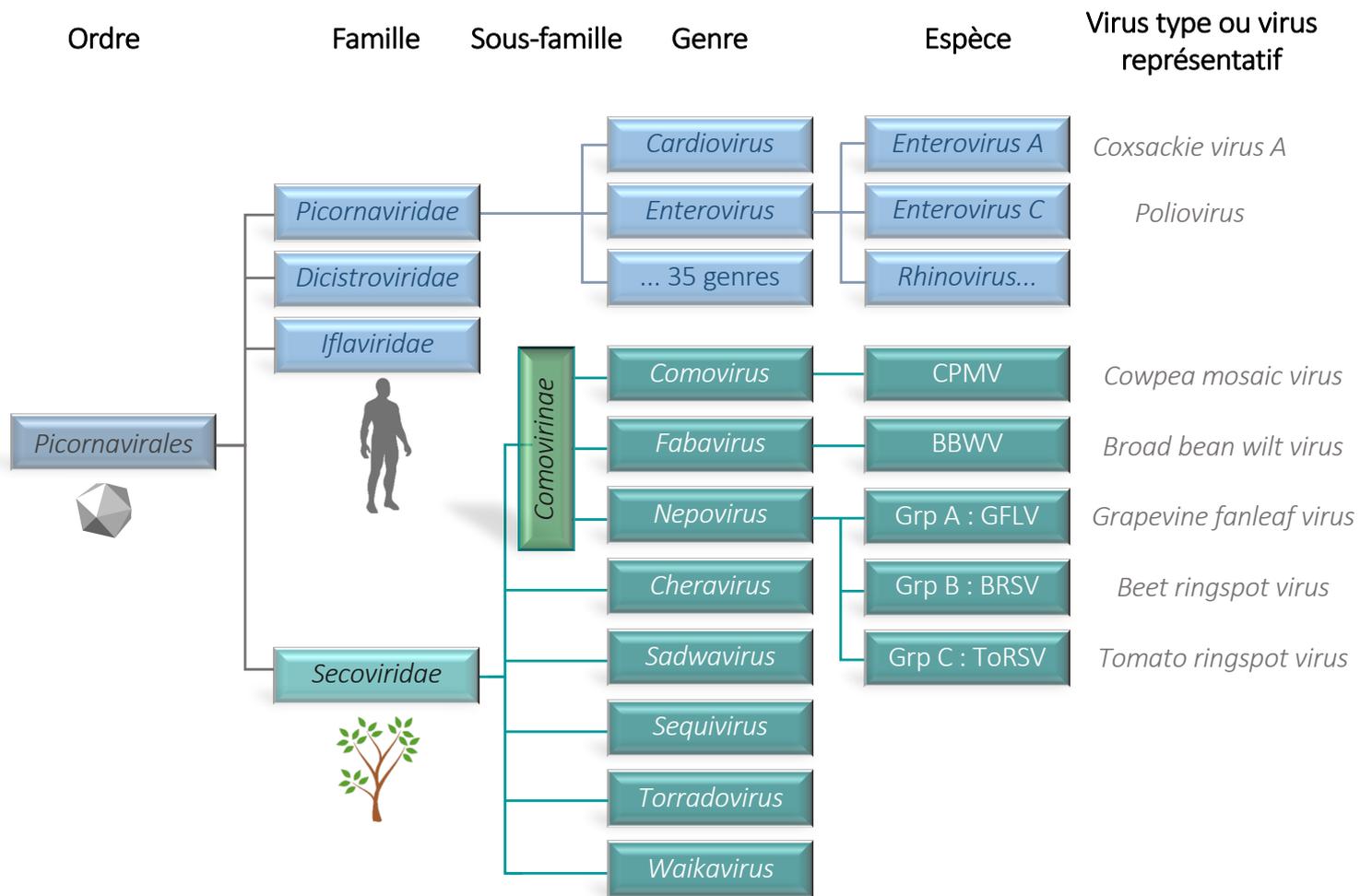


Figure 2 : Arbre reprenant la classification des *Picornavirales*

Le famille *Secoviridae* fait partie de l'ordre des *Picornavirales*. Il est composé de 8 genres dont 3 : les *Comovirus*, les *Fabavirus* et les *Nepovirus* sont associés à la sous-famille des *Comovirinae*. Le GFLV sans être le membre type est représentatif des népovirus. Il appartient au sous-groupe A avec l'ArMV. Cet arbre taxonomique n'est pas exhaustif pour les virus animaux.

### III. LES *NEPOVIRUS* INFECTANT LA VIGNE

Les népovirus représentent un enjeu majeur en phytopathologie, tant par le large panel d'hôtes qu'ils infectent (l'ArMV seul est capable d'infecter 93 espèces appartenant à 28 familles de plantes, Digiario *et al.*, 2017), que par les pertes qu'ils génèrent notamment pour le GFLV (Fuchs 2008). Ces virus sont capables d'infecter des plantes annuelles ou des plantes pérennes d'intérêt agronomique, ainsi qu'un ensemble de plantes herbacées adventices (pouvant alors servir de réservoir).

#### 1. Biologie des *Nepovirus*

##### 1.1 Taxonomie et dénomination

Le genre *Nepovirus* dans la famille des *Secoviridae* (Sanfaçon *et al.*, 2009 ; Thompson *et al.*, 2017) appartient à l'ordre des *Picornavirales* (Fig. 2) qui tire son nom du latin *pico* signifiant petit et RNA en référence à la nature du génome viral. Les virus appartenant à cet ordre sont souvent désignés par le terme de *picorna-like*. Outre la famille des *Secoviridae* qui comprend des phytovirus, cet ordre comprend également la famille des *Picornaviridae* qui regroupe des virus animaux dont le très étudié poliovirus, récemment renommé *Enterovirus C*. Le genre *Nepovirus* est le genre *picorna-like* recensant le plus grand nombre d'espèces puisque l'ICTV, y reconnaît actuellement 40 espèces (*Nepovirus online report* ICTV 2017, Thompson *et al.*, 2017). Les *Nepovirus* sont taxonomiquement proches des *Comovirus* et *Fabavirus*, deux autres genres avec lesquels ils forment la sous-famille des *Comovirinae* au sein des *Secoviridae* (Sanfaçon *et al.*, 2009 ; Thompson *et al.*, 2014). Outre cette classification taxonomique, les népovirus sont aussi classés selon leur distribution géographique en népovirus américains ou du vieux monde (Cf. III. 2.). Enfin, on distingue au sein des népovirus, les sous-groupes A, B et C, dont les membres types sont respectivement le tobacco ringspot virus (TRSV), le tomato black ring virus (TBRV) et le tomato ringspot virus (ToRSV) ; en fonction de relations sérologiques, de la longueur de leurs ARN génomiques et de la phylogénie de la région conservée entre la protéase et la polymérase (Sanfaçon 2008 ; Sanfaçon 2015) ; voir ci-dessous Cf. III. 1. 1.2).

##### 1.2 Organisation génomique et expression du génome

Les membres du genre *Nepovirus*, comme ceux des autres genres de la sous-famille des *Comovirinae* ont un génome bipartite à ARN simple-brin de polarité positive (Sanfaçon 2008). Les deux molécules d'ARN (ARN-1 et ARN-2) possèdent une petite protéine virale VPg (pour *viral protein genome-linked*) liée de façon covalente à leur extrémité 5', et une queue poly(A) en 3' (Viry *et al.*, 1993). Les ARN-1 et ARN-2 sont traduits chacun en une polyprotéine par un mécanisme coiffe-indépendant, grâce à la présence de la VPg en 5'. Il a été montré que les ARN du blackcurrant reversion virus (BRV) appartenant au sous-groupe C,

**Tableau 1 : Membres des genres *Nepovirus* et *Sadwavirus* impliqués dans la maladie du court-noué, et certaines de leur propriétés.**

Sous-groupe et membre type		Virus membres	Origine	Principaux vecteurs	Référence
A (TRSV)		RpRSV	Européen	<i>Paralongidorus maximus</i> , <i>L. elongatus</i> , <i>L. macrosoma</i>	Vuitennez <i>et al.</i> 1970
		GFLV	Européen	<i>X. index</i>	Hewitt <i>et al.</i> 1958
		GDeFV	Européen	Inconnu	Digiario <i>et al.</i> 2003
B (TBRV)		ArMV	Européen	<i>X. diversicaudatum</i> , <i>X. coxi</i>	Smith & Markham 1944
		TRSV	Américain	<i>X. Americanum</i>	Fromme <i>et al.</i> , 1927
		TBRV	Européen	<i>L. attenuatus</i>	Stellmach & Bercks 1963
C (ToRSV)		AILV	Européen	<i>L. apulus</i> , <i>L. fasciatus</i>	Jankulova <i>et al.</i> 1976 ; Savino <i>et al.</i> 1976
		GCMV	Européen	Inconnu	Martelli <i>et al.</i> 1965
		GARSV	Européen	Inconnu	Cigsar <i>et al.</i> 2003
NON-ASSIGNÉ		GTRSV	Européen	Inconnu	Ouertani <i>et al.</i> 1992
		CLRv	Européen	Inconnu	Wang <i>et al.</i> 2002
		GBLV	Européen	Inconnu	Martelli <i>et al.</i> 1977
S		ToRSV	Américain	<i>X. californicum</i> , <i>X. rivesi</i>	Martelli & Taylor 1990
		BLMoV	Américain	<i>X. americanum</i>	Ramsdell & Stace-Smith 1981
		PRMV	Américain	<i>X. americanum</i> , <i>L. elongatus</i>	Harrison <i>et al.</i> 1974
NON-ASSIGNÉ		SLRSV	NA	<i>X. diversicaudatum</i> , <i>X. coxi</i>	Lister, 1964, Vuitennez <i>et al.</i> 1970

(n'infectant pas la vigne) contiennent des séquences facilitant la traduction coiffe indépendante (Fuchs *et al.*, 2017). Ainsi une séquence de type *internal ribosome entry site* (IRES) a été identifiée dans la région 5' non traduite (UTR) et la région 3' UTR comporte un activateur de type *cap-independent translation enhancer* (CITE).

La polyprotéine P1 est maturée par la protéase virale en cinq à six protéines impliquées essentiellement dans les fonctions répliquatives des virus. Dans la polyprotéine P1, des domaines fonctionnels conservés et organisés selon le même ordre pour tous les virus *picorna-like* forment le *replication block*. Il comporte le domaine *nucleotide triphosphate-binding* (NTB) ou hélicase (Hel), la VPg, la protéase (Pro) et la RNA-polymérase RNA-dépendante (Pol). En amont de ces domaines on définit un ou deux domaines supplémentaires selon qu'un site additionnel de clivage ait été décrit ou non. Un tel clivage a été montré pour l'ArMV qui appartient au sous-groupe A (Wetzel *et al.*, 2008) et pour le ToRSV qui appartient au sous-groupe C (Wang & Sanfaçon 2000). Dans ce cas les deux protéines issues de l'extrémité N-terminale (N-ter) de P1 sont nommées X1 et X2. La protéine X1 est de fonction inconnue et X2, bien que possédant une zone retrouvée dans le cofacteur de la protéase des *Comovirus*, n'a pas de rôle démontré dans la modulation de l'activité protéase des népovirus. La protéine X2 du ToRSV est capable de s'insérer dans les membranes du réticulum endoplasmique (ER) où elle participerait à l'ancrage des complexes de réplication (VRC, Zhang *et al.*, 2006). Le clivage de la polyprotéine P2 génère, à partir de son extrémité C-terminale (C-ter), la protéine de capsid (CP) et la protéine de mouvement (MP). La protéine 2A dérivant de l'extrémité N-ter est la plus variable. Elle a un rôle démontré dans la réplication de l'ARN-2 chez le GFLV (Gaire *et al.*, 1999). La polyprotéine P2 du ToRSV contient un site de clivage additionnel donnant lieu aux protéines X3 et X4 (Jafarpour & Sanfaçon 2009). Ce clivage additionnel, mis en évidence dans des expériences de traduction et maturation *in vitro* n'est pas retrouvé dans les népovirus des sous-groupes A et B qui possèdent donc uniquement une protéine appelée 2A.

Outre le nombre de clivages et la variabilité du site de clivage, la classification des *Nepovirus* en trois sous-groupes reflète aussi des variations de la longueur de leur ARN-2 (Tableau 1), qui sont retrouvés par la phylogénie de la CP (Sanfaçon *et al.*, 2009). Chez certains *Nepovirus*, notamment du sous-groupe C comme le ToRSV, les séquences des régions non-traduites aux extrémités 5' et 3' présentent une forte homologie (attribuée à de potentielles recombinaisons (Walker *et al.*, 2015) entre les deux molécules d'ARN-1 et 2 (Fuchs *et al.*, 2017), et peuvent même être complètement conservées, comme c'est le cas chez le TBRV et le cherry leaf roll virus (CLRV) (Eastwell *et al.*, 2012). Dans certains cas l'homologie des régions 5' UTR des ARN-1 et ARN-2 inclut même une partie de la séquence codante tels que les motifs X1 et X3. Ces motifs conservés semblent jouer un rôle majeur dans la réplication et la traduction des ARN viraux.

En plus du génome viral, des ARN satellites (satRNA) peuvent être encapsidés, ils dépendront alors du virus dit *helper* pour leur réplication et leur encapsidation. Deux types de

## INTRODUCTION

satRNA existent chez les népovirus (Mayo *et al.*, 1999) : les satRNA longs, allant de 1 100 à 1 800 nt, porteurs de la VPg et d'une queue poly(A) et codant pour une protéine non structurale de fonction inconnue ; et les satRNA courts de 300 à 460 nt *a priori* sous forme circulaire et ne codant pas de protéine. Certaines homologies de séquence entre des membres du sous-groupe A des *Nepovirus* et les satRNA longs sous-entendent l'existence d'un ancêtre commun (Fuchs *et al.*, 2017).

La réplication des ARN viraux de népovirus a lieu comme pour tous les phytovirus à ARN de polarité positive dans des VRC (Nagy & Pogany 2011) contenant des membranes cellulaires. Dans le cas du GFLV et du ToRSV, il a été montré que ces membranes dérivent du réticulum endoplasmique, où les protéines virales NTB, X2 et 2A (ou X3) pourraient servir à l'ancrage des VRC.

### 1.3 Structure, encapsidation et mouvement

#### 1.3.1 Structure

Les népovirus possèdent une capsidie icosaédrique non-enveloppée (d'environ 30 nm de diamètre), de symétrie pseudo  $T = 3$ , assemblée à partir de 60 sous-unités de la CP ; la présence d'une unique CP, de grande taille contenant trois motifs *jelly roll* (notés C, B et A de l'extrémité N-ter vers l'extrémité C-ter de la protéine  $2C^{CP}$ ) est une caractéristique des népovirus (Fuchs *et al.*, 2017). C'est pourquoi, le SLRSV dont les 3 motifs *jelly roll* sont répartis sur 2 CP différentes (Tableau 1) ne fait pas partie du genre *Nepovirus*. Différentes particules virales existent et peuvent être séparées par gradient de saccharose selon leur composition. On distingue les particules T (pour *top*) en haut du gradient qui sont dépourvues d'ARN, les particules M (pour *middle*) au milieu du gradient contenant l'ARN-2, et des particules B (pour *bottom*) au bas du gradient, dans lesquelles soit de l'ARN-1, soit de l'ARN-1 et de l'ARN-2 ont été retrouvés (Fuchs *et al.*, 2017). Dans le cas du GFLV, l'ARN-1 et l'ARN-2 ont été détectés dans les particules B (Quacquarelli *et al.*, 1976).

C'est grâce à la première observation au microscope électronique de particules virales de TRSV que les népovirus sont regroupés avec les comovirus, d'après leur apparence en forme d'hexagone à la surface moletée (Hatta & Francki 1984). Dès 1998, une première structure à haute résolution de népovirus (le TRSV) est disponible, puis autour des années 2010, les structures pseudo-atomiques du BRV et de l'ArMV sont obtenues par cryo-microscopie électronique (Lai-Kee-Him *et al.*, 2013 ; Seitsonen *et al.*, 2008) et les structures cristallographiques de deux souches de GFLV sont résolues (Schellenberger *et al.*, 2011a). L'ensemble de ces données de structure a également permis d'en apprendre plus sur les interactions ARN / CP. Les népovirus adoptent différents comportements : le génome du BRV est fortement ordonné et lié à la surface intérieure de la CP, alors que le recombinant GFLV / ArMV utilisé pour déterminer la structure de la capsidie d'ArMV montre des interactions fortes uniquement avec les axes de symétrie de la CP (Lai-Kee-Him *et al.*, 2013).

### 1.3.2 Encapsidation et mouvement

Peu de choses sont connues sur l'encapsidation des népovirus. La fonction d'encapsidation est assurée par la protéine de capsid codée à partir de l'ARN-2, sans qu'aucun signal d'encapsidation n'ait été identifié (Fuchs *et al.*, 2017). Néanmoins la protrusion au niveau de l'axe pentamérique pourrait servir de porte au moment de la décapsidation du génome comme pour le *cowpea chlorotic mottle virus* (un *Comovirus*). Enfin l'existence de particules virales dépourvues d'ARN et la possibilité d'obtenir des *virus-like particles* (VLP, Singh *et al.*, 1995 ; Bertoli *et al.*, 1991 ; Belval *et al.*, 2016) suggèrent que l'ARN viral n'est pas indispensable pour l'encapsidation.

Le mouvement du virus se fait sous la forme de virions néoformés. Il nécessite la protéine de mouvement codée par l'ARN-2 (Fuchs *et al.*, 2017). Cette protéine s'auto-assemble pour former des tubules à l'intérieur du lumen des plasmodesmes des cellules de l'hôte (structures permettant la jonction entre les cellules végétales) ; ces structures virales contenant des virions ont pu être observées en microscopie électronique dans le cas du ToRSV (Wieczorek & Sanfaçon 1993) et du GFLV (Šarić & Wrischer 1975 ; Ritzenthaler *et al.*, 1995). Des expériences d'expression transitoire en protoplastes ont permis de mettre en évidence le caractère orienté de la formation des tubules, de la cellule infectée vers le milieu extérieur (Belin *et al.*, 2001). Le virion par le biais d'interactions CP / MP encore inconnues à ce jour pourrait se déplacer dans le tubule, ou être déplacé par le mouvement de croissance du tubule, et réaliser ainsi ce qu'on appelle le mouvement de cellule à cellule (*cell-to-cell movement*). La question des facteurs viraux et de l'hôte impliqués dans ce phénomène sera discutée plus loin avec l'exemple concret du GFLV (Cf. III. 3. 3.6).

## 1.4 Transmission et propagation

### 1.4.1 Transmission naturelle

À l'inverse du GFLV dont la distribution est aujourd'hui quasi-mondiale (Fuchs *et al.*, 2017), les autres népovirus suivent une répartition locale certainement due à leur provenance variée. Comme le nom népovirus l'indique, «*nematode-transmitted polyhedral viruses*», ces virus sont transmis par des nématodes telluriques des genres *Longidorus* et *Xiphinema* (Cadman *et al.*, 1960 ; Cadman 1963). Les nématodes acquièrent rapidement le virus lors de leur repas sur les racines d'un cep infecté et le transmettent à des plants sains lors d'un repas suivant. Les piqûres du nématode provoquent aussi des dommages au niveau des racines appelées galles (Van Zyl *et al.*, 2016). Un nématode peut rester virulifère très longtemps (des années) même en absence de nouveau repas, le virus sera néanmoins perdu lors de la mue du nématode, puisque le virus est retenu sur la cuticule au niveau de l'appareil alimentaire de l'animal (Demangeat *et al.*, 2005), en interaction avec des résidus externes de la capsid (Schellenberger *et al.*, 2010). L'étude des structures des capsides a ouvert la voie vers l'identification des déterminants de la transmission, le cas précis du GFLV sera traité plus loin (Cf. III. 3. 3.7). À ce jour certains vecteurs ne sont toujours pas identifiés, mais on suppose que

## INTRODUCTION

les népovirus du vieux continent et les népovirus américains sont logiquement transmis par des espèces de nématodes endémiques de leur région d'origine respective (Digiario *et al.*, 2017). La relation spécifique entre nématode et certaines espèces virales est variable et peut être large, comme pour le TRSV et le ToRSV, jusqu'à exclusive comme c'est le cas de l'ArMV et du GFLV. Une haute spécificité sous-entend des mécanismes moléculaires de reconnaissance précis. Par exemple, l'espèce vectrice identifiée est *X. index* pour le GFLV (Hewitt *et al.*, 1958) *X. diversicaudatum* pour l'ArMV et *X. americanum* pour le ToRSV (Tableau 1).

### 1.4.2 Autres modes de transmission et propagation

Certains népovirus peuvent aussi être transmis par le pollen et la graine (Lazar *et al.*, 1990). C'est le cas du GFLV (Gambino *et al.*, 2006). La propagation du BLMV sur le terrain est étroitement liée à la dispersion du pollen par les abeilles (Boyland-Pett *et al.*, 1991). Le TRSV a été observé dans des embryons et du pollen du soja (Yang & Hamilton 1974), mais cette infection affecte fortement l'organe et un taux anormalement élevé d'avortement des graines est reporté ; ces anomalies sont aussi observées chez le CLRV (Johansen *et al.*, 1994). On notera donc que la propagation des népovirus par ces modes de transmission secondaires (parfois controversés, Gasparro *et al.*, 2017) a peu d'incidence vu que la graine n'est pas utilisée (sauf dans les programmes de croisements), la vexion par nématode restant la plus efficace.

La propagation naturelle de la maladie au vignoble suit le schéma des foyers d'infection dû aux déplacements du vecteur dans le sol (Villate *et al.*, 2008). Mais il semble que l'origine de la dissémination et de la distribution mondiale de ces virus réside dans le mode d'obtention des plants et leurs échanges. En effet, ces virus sont aussi transmissibles lors de la multiplication des pieds de vigne (bouturage), et lors du greffage (Martelli 1993). Ce mode de multiplication explique comment le virus peut s'introduire dans des vignobles jusque-là indemnes de virus lors de la plantation de nouvelles parcelles. Enfin, la propagation peut être accélérée lors d'échanges de matériel végétal infecté, même si des schémas de certification et des contrôles sanitaires existent.

### 1.5 Contrôle

Les népovirus sont une menace sérieuse pour de nombreuses cultures et plantes ornementales (Sanfacon 2008). La gestion des maladies induites par les népovirus réside actuellement dans le contrôle sanitaire des plants et l'utilisation de produits chimiques à effet nématicide qui sont néanmoins interdits dans de nombreux pays dont la France (Maliogka *et al.*, 2015). D'autres technologies sont aussi disponibles mais leur utilisation est parfois délicate, ou leur stade de développement encore trop peu avancé. Les porte-greffes tolérants aux nématodes (comme le Nemadex AB, le Schwarzmann ou le O39-16) présentent un retard de l'infection (Oliver & Fuchs 2011) mais n'empêchent pas le virus de se multiplier et leur utilisation n'est pas adaptée à toutes les régions, tant d'un point de vue climatique que pédologique. Il existe aussi des hôtes herbacés et des vignes transgéniques montrant une

résistance prometteuse à des népovirus grâce à l'expression de séquences virales (Valat *et al.*, 2006 ; Liu *et al.*, 2007), ou de dérivés d'anticorps comme les scFv et les nanocorps (Nölke *et al.*, 2009 ; Hemmer *et al.*, 2018). Enfin, des études sur l'implication de facteurs cellulaires à différents niveaux du cycle viral sont en cours ; ces facteurs seraient des cibles potentielles qui couplées à des techniques de *genome editing* pourraient éventuellement conduire à des résistances contre ces pathogènes (Chandrasekaran *et al.*, 2016 ; Gal-On *et al.*, 2017).

### 1.6 Diversité et évolution

Les virus de plante, dont le génome est composé d'ARN, évoluent grâce à la micro-évolution engendrée par les mutations dues à la réplication virale et la macro-évolution entraînée par des réassortiments majeurs du génome (Hull 2014). Il faut bien faire la différence entre les mutations entraînant un changement génétique d'un individu et une réelle substitution qui a pour résultat de fixer une mutation au sein d'une population. Les recombinaisons sont dues à un environnement génétique (présence par exemple de structures secondaires sur les ARN), aux mécanismes de la réplication, et sont très communes chez les virus de plantes (Chare & Holmes 2006). Les événements de réassortiment et recombinaison peuvent donner naissance à de nouveaux variants viraux ; ce qui est facilité dans le cas des génomes multipartites (Fulton 1980). L'évolution aura donc pour effet de sélectionner les variants les plus adaptés à leur environnement, ceux capables de co-évoluer avec leur hôte, et même de contourner les résistances.

Les népovirus comme tous les virus à ARN ont un potentiel évolutif important, dû à l'absence d'activité de relecture (*proof reading*) de leur ARN-polymérase ARN-dépendante (RdRp) induisant un taux élevé de mutations (Fuchs *et al.*, 2017). Ces mutations ont lieu sur les séquences codantes ou les régions non traduites du génome (Hull 2014). L'évolution des népovirus est aussi favorisée par de nombreux événements de réassortiment et de recombinaison (entre variants viraux, voire entre espèces virales) au sein des génomes ; les génomes multipartites étant dynamiquement favorisés. Ces changements majeurs peuvent donner naissance à des virus recombinants (la souche GFLV-GHu par exemple est un recombinant entre le GFLV et l'ArMV, Vigne *et al.*, 2008), voire à de nouvelles espèces avec par exemple le grapevine deformation virus (GDeFV, Digiario *et al.*, 2015). Face à ces facteurs d'évolution, les népovirus voient leur divergence limitée par une forte sélection négative (Fuchs *et al.*, 2017) qui traduit très certainement les contraintes liées aux fonctions des protéines. Des analyses phylogénétiques indiquent que la diversification des espèces de népovirus aurait eu lieu il y a 50 à 250 ans et suggèrent un ancêtre commun avec les picornavirus d'animaux (Thompson *et al.*, 2014 ; Fuchs *et al.*, 2017).

## 2. Le Vieux et le Nouveau Monde

Parmi les 15 népovirus infectant la vigne, on distingue les espèces virales originaires du Vieux Continent (Tableau 1), c'est à dire essentiellement d'Europe et du Moyen Orient (Digiario *et al.*, 2017) : le grapevine fanleaf virus (GFLV), l'arabis mosaic virus (ArMV), le tomato black ring virus (TBRV), le grapevine chrome mosaic virus (GCMV), le grapevine bulgarian latent virus (GBLV), le raspberry ringspot virus (RpRSV), l'artichoke Italian latent virus (AILV), et le cherry leaf roll virus (CLRV) ; d'Afrique du Nord : le grapevine Tunisian ringspot virus (GTRSV), et d'Asie : le grapevine deformation virus (GDefV) et le grapevine anatolian ringspot virus (GARSV) ; de celles originaires du Nouveau Monde (appelés les népovirus américains) : le tobacco ringspot virus (TRSV), le tomato ringspot virus (ToRSV), le peach rosette mottle virus (PRMV) et le blueberry leaf mottle virus (BLMoV). La séparation entre les népovirus de l'Ancien Monde et les népovirus américains se retrouve en partie dans la divergence de la phylogénie construite à partir de la séquence codante de la CP, qui semble encore une fois être un bon marqueur de « classification » (Rowhani *et al.*, 2017). Tous les népovirus partagent néanmoins la grande majorité de leurs caractéristiques telles que leur organisation génomique, les fonctions de leurs protéines ainsi que certaines propriétés moléculaires ou encore sérologiques ; et divergent sur certains aspects comme leur distribution géographique, leur vecteur ou encore la gamme d'hôte.

### 2.1 Particularités des népovirus du Nouveau Monde

Le premier népovirus décrit est le TRSV (Fromme *et al.*, 1927), c'est pourquoi il est le membre type du genre népovirus classé parmi les népovirus américains (sous-groupe A ; Tableau 1). Les népovirus américains sont définis d'après leurs vecteurs nématodes et leurs plantes hôtes indigènes du continent américain et d'après des critères phylogénétiques. Ils appartiennent très majoritairement au sous-groupe C et infectent des plantes annuelles et pérennes. Les népovirus américains infectant la vigne sont au nombre de quatre : le TRSV, le ToRSV, le PRMV et le BLMoV (Rowhani *et al.*, 2017). Au vu de sa distribution largement répandue en Europe et bien qu'il soit détecté aux USA, le CLRV n'est pas rangé parmi les népovirus américains.

Le nématode *X. americanum* est le vecteur associé aux TRSV, ToRSV, et PRMV alors qu'aucun vecteur n'est confirmé pour le BLMoV (Brown *et al.*, 1994) ; il existe aussi certains cas de transmission par la graine (Rowhani *et al.*, 2017). Sur vigne, les népovirus américains sont plutôt associés à une forme de *decline* qu'au *fanleaf* engendré par leurs cousins européens (Uyemoto 1975). Bien que certaines infections par le TRSV et ToRSV s'avèrent asymptomatiques (ce qui a d'ailleurs favorisé leur propagation), d'autres sont impressionnantes (Uyemoto 1975) et peuvent entraîner de lourdes pertes, dans le cas du PRMV par exemple (Ramsdell *et al.*, 1995). Certaines vignes comme *M. rotundifolia* sont résistantes aux nématodes (bien qu'elles puissent être infectées par le GFLV *via* greffage), néanmoins d'autres vignes comme *V. labrusca*, une espèce cultivée dans le Nord des États-

Unis sont hautement susceptibles, précisément aux BLMoV et PRMV. Pendant longtemps, le nématode était la cible des méthodes de lutttes (traitement nématicide, jachère...), qui finalement s'avèrent peu efficaces tant il est résistant, c'est pourquoi l'utilisation de porte-greffes tolérants aux nématodes vecteurs en parallèle du contrôle sanitaire des cépages lors de la propagation de matériel végétal représentent aujourd'hui les seules solutions de contrôle du déclin sur tout le territoire américain (Rowhani *et al.*, 2017).

## 2.2 Particularités des népovirus du Vieux Monde

Bien que les népovirus du « vieux Monde » soient répartis entre l'Europe, l'Asie et l'Afrique du Nord, ils sont souvent collectivement appelés « népovirus européens ». Certains d'entre eux (GCMV, GBLV, GTRSV, GDeV et GARSV) sont restreints aux espèces *Vitis* (leur impact sur quelques hôtes herbacés étant peu déterminant), les autres ont un panel d'hôtes plus large. Seulement quatre népovirus européens : le GFLV, l'ArMV, le RpRSV et le TBRV ont un nématode vecteur identifié appartenant aux genres *Xiphinema*, *Longidorus* et *Paralongidorus* (Tableau 1). Les népovirus européens ont la particularité d'infecter la vigne de façon systémique et d'engendrer d'importants symptômes englobés sous la dénomination de court-noué de la vigne, maladie très problématique en Europe notamment (Andret-Link *et al.*, 2004a). On distinguera les souches virales déformantes induisant une marbrure chlorotique, accompagnée de malformations des feuilles et rameaux ; des souches chromogènes responsables d'un jaunissement et de décolorations des feuilles (Martelli & Boudon-Padieu 2006 ; Elbeaino *et al.*, 2014 ; Mannini & Digiario 2017).

## 3. Le grapevine fanleaf virus

### 3.1 Historique

Le GFLV est observé pour la première fois par microscopie électronique dans les années 60 (Cadman *et al.*, 1960), bien que l'on trouve les premières occurrences de son existence et des symptômes qu'il cause bien avant (Cazalis-Allut 1865). Les postulats de Koch seront rapidement vérifiés (Hewitt *et al.*, 1962), établissant le lien entre le GFLV et la maladie du court-noué de la vigne. Ce virus est essentiellement inféodé à la vigne bien qu'il ait été signalé dans certaines herbacées (Horváth *et al.*, 1994 ; Izadpanah *et al.*, 2003). Il n'est pas étonnant que son évolution soit intimement liée à celle de son hôte principal. Sachant que la vigne était déjà propagée à l'époque des romains par greffage, il est fort à parier que les virus présents en ces temps aient pu être propagés par dissémination de ceps infectés, bien qu'aucune preuve paléontologique ou historique ne puisse étayer cette hypothèse (Reynolds 2017).

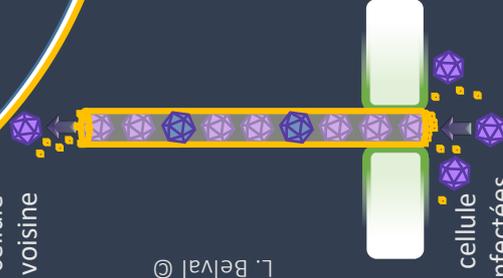
Figure 3 : Génome du GFLV et protéines de la P2



K. Heiblich ©

Au vignoble le virus est transmis spécifiquement par le nématode tellurique *X. index*. L'acquisition se fait lors de son repas sur les racines des ceps, le virus est ensuite retenu dans l'odontophore du vers, avant le prochain repas au cours duquel il sera transmis.

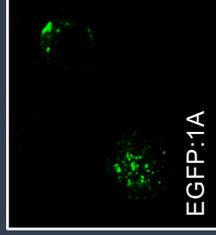
cellule voisine



cellule infectées

L. Belval ©

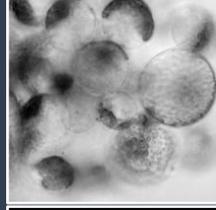
F. Berthold ©



EGFP:1A



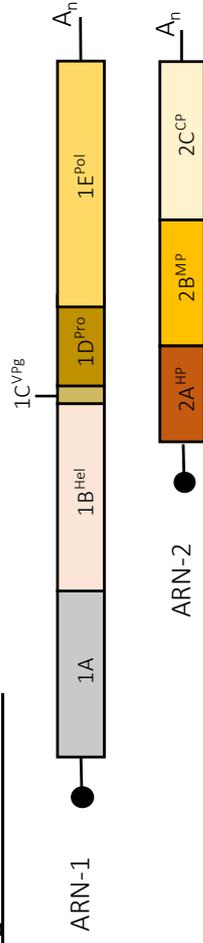
2A:TagRFP



La protéine 2A<sup>HP</sup> est colocalisée avec les complexes de réplication. Elle est nécessaire à la réplication de l'ARN-2, pour lequel le rôle de *homing protein* recrutant l'ARN-2, au sites de réplication a été proposé.

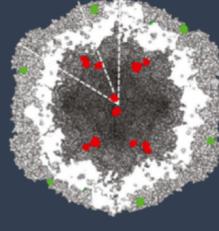
Elle a la capacité de relocaliser la protéine 1A lors de leur interaction.

### Le génome du GFLV :



Le GFLV possède un génome bipartite à ARN simple brin de polarité positive. Chaque molécule porte une VPg en 5' et une queue polyadénylée en 3'. L'ARN-1 code les fonctions répliquatives du virus, l'ARN-2 code la protéine de capsid 2C<sup>CP</sup>, la protéine de mouvement 2B<sup>MP</sup> et la *homing protein* 2A<sup>HP</sup>.

Le mouvement du virus nécessite la protéine de mouvement 2B<sup>MP</sup>. Cette protéine s'auto-assemble pour former des tubules au niveau des plasmodesmes. Ces structures permettent le passage des virions. L'avancement se fait probablement au fur et mesure de la polymérisation du tubule vers la cellule nouvellement infectée



La particule virale du GFLV est bien connue. Elle est composée de 60 sous-unités d'une unique protéine de capsid, la 2C<sup>CP</sup>, assemblées en 12 pentamères formant un icosaèdre dont la structure est résolue et qui renferment le génome viral. Les extrémités N-ter et C-ter sont indiquées respectivement en rouge et vert.

SIB ©

X 5

X 12

T = P3

### 3.2 Organisation génomique

Le GFLV fait partie avec l'ArMV, des premiers népovirus dont le passage sur hôtes herbacés est un succès (Vuittenez *et al.*, 1964), et est depuis ce jour très étudié. Rapidement des souches d'intérêts ont été caractérisées et leur séquence obtenue, comme c'est le cas de la souche GFLV-F13 qui sert actuellement de référence (Fuchs *et al.*, 1989 ; Serghini *et al.*, 1990). La poursuite des travaux nécessite rapidement de nouveaux outils et le GFLV sera le premier népovirus pour lequel des clones infectieux seront obtenus (Viry *et al.*, 1993). Depuis, des clones infectieux des souches GFLV-GHu et GFLV-B844, ont été obtenus au laboratoire (Vigne *et al.*, 2013) ; ces souches diffèrent de la souche F13 par leur virulence. Les souches virales isolées et caractérisées représentent de précieux outils notamment sur la vigne, et rendent possible l'étude de mono-infections par le GFLV, là où les infections mixtes constituent la situation normale sur le terrain. Notons que très peu de clones infectieux de virus infectant la vigne sont disponibles, ils se limitent : au GRBV (Krenz *et al.*, 2012), aux GVA et GVB (Saldarelli *et al.*, 2000), au GRSPaV (Meng *et al.*, 2013), au TRSV (Zhao *et al.*, 2015), et au GRLaV-3 (Jarugula *et al.*, 2018).

Le génome du GFLV (Fig. 3), comme celui des autres népovirus, est composé de deux molécules d'ARN simple brin de polarité positive arborant une VPg en 5' et une queue poly(A) à leur extrémité 3' (Schmitt-Keichinger *et al.*, 2017). À ce jour aucune séquence de type IRES ou CITE n'ont été décrites pour le GFLV. L'ARN-1 est auto-répliquatif en protoplastes, tandis que l'ARN-2 a besoin des fonctions portées par l'ARN-1 pour se répliquer (Viry *et al.*, 1993). Ces deux molécules d'ARN sont traduites en deux polyprotéines P1 et P2, puis clivées pour obtenir huit protéines matures (Cf. III. 3. 3.3). Certains variants possèdent aussi un ARN satellite long, nommé ARN-3 codant une protéine P3 (Fuchs *et al.*, 1989), dont la relation avec le virus *helper* a été étudiée (Hans *et al.*, 1992 ; Gottula *et al.*, 2014).

### 3.3 Réplication et expression du génome

Le génome viral à ARN simple brin de polarité positive sert à la fois de messenger pour la traduction et de matrice pour la réplication assurée par la polymérase virale 1E<sup>Pol</sup> (Quacquarelli *et al.*, 1976). Le cycle de réplication du GFLV a lieu dans le cytoplasme au niveau des VRC (Ritzenthaler *et al.*, 2002). Ces VRC sont assemblés à partir de membranes dérivées du ER qui s'accumulent sous forme de rosettes (structure très ressemblante à celle des poliovirus, Bienz *et al.*, 1992 ; Ritzenthaler *et al.*, 2002). L'ensemble des protéines virales dérivant de la P1 ainsi que les protéines 2A<sup>HP</sup> et 2C<sup>CP</sup> s'accumulent dans ces structures en parallèle des formes répliquatives néoformées d'ARN double brin (Ritzenthaler *et al.*, 2002). Le rôle de ces différentes protéines dans la réplication du virus reste mal connu, comme c'est le cas de la protéine 1A. La protéine 2A<sup>HP</sup> est nécessaire à la réplication de l'ARN-2, certainement en l'amenant vers les VRC (Gaire *et al.*, 1999 ; Ritzenthaler *et al.*, 2002), d'où son nom de *homing protein*.

L'ARN-1 (environ 7342 nt) et l'ARN-2 (environ 3774 nt) sont traduits respectivement en polyprotéines P1 de 237 kDa et P2 de 122 kDa dont la maturation est assurée (en *cis* pour la P1 et en *trans* pour la P2) par la protéase virale de 24 kDa (Margis & Pinck 1992 ; Margis *et al.*, 1994). Dans le cas du GFLV, le clivage de la P1 peut se faire en *trans*, contrairement au clivage intramoléculaire qui semble la règle pour les autres népovirus (Margis *et al.*, 1994). Les produits matures obtenus à partir de l'ARN-1 sont essentiellement impliqués dans les fonctions répliquatives du virus et sont ordonnés ainsi de l'extrémité N-ter vers l'extrémité C-ter : une protéine 1A impliquée dans la réplication du virus, une hélicase 1B<sup>Hel</sup>, la protéine VPg 1C<sup>VPg</sup>, la protéase virale 1D<sup>Pro</sup> et la RdRp 1E<sup>Pol</sup> ; la P2 donnera la protéine 2A<sup>HP</sup> impliquée dans la réplication de l'ARN-2, mais dont la fonction reste largement inconnue ; ainsi que la protéine de mouvement 2B<sup>MP</sup>, et la protéine de capsid 2C<sup>CP</sup> (Fig. 3, Fuchs *et al.*, 2017).

### 3.4 Diversité

Le GFLV présente une diversité de variants moléculaires assez importante pouvant aller au-delà de 20 % de diversité nucléotidique au niveau des ARN génomiques ; ces variants éloignés génétiquement peuvent co-infecter leur hôte lors d'infections mixtes, ce qui est courant chez la vigne, favorisant alors l'apparition de virus recombinants (Vigne *et al.*, 2004). Une étude sur le terrain démontre que la diversité des populations de GFLV est aussi élevée au sein d'un cep infecté, qu'au sein d'une parcelle entière (Vigne *et al.*, 2004). En revanche toutes les parties du génome du GFLV ne sont pas soumises à la même diversité : ainsi les régions codant pour les protéines 2B<sup>MP</sup> et 2C<sup>CP</sup> sont soumises à une haute pression de sélection (avec respectivement, seulement 22 % et 16 % de divergence nucléotidique (Nourinejhad Zarghani *et al.*, 2013) ; alors que la séquence de la 2A<sup>HP</sup> est soumise à une faible pression, son degré de divergence à l'échelle nucléotidique atteignant 31 % (Nourinejhad Zarghani *et al.*, 2013), voire 41 % (Elbeaino *et al.*, 2014). On notera que la séquence de la protéine 2A est aussi la plus variable chez l'ArMV (Wetzel *et al.*, 2002) et le GCMV (Digiario *et al.*, 2015).

Les contraintes sélectives semblent s'exercer différemment, au niveau nucléique ou protéique suivant les régions génomiques considérées. Ainsi la contrainte est plus forte sur les protéines 2B<sup>MP</sup> et 2C<sup>CP</sup> que sur leur séquence codante (avec respectivement 22,5 % de diversité nucléotidique pour 11,3 % de diversité en acides aminés et 16,4 % de diversité nucléotidique pour 8 % de diversité en acides aminés) tandis que la contrainte semble moins forte sur la protéine 2A<sup>HP</sup> qui présente une diversité nucléotidique allant jusqu'à 31,2 % pour une diversité protéique atteignant 33,5 %. Les contraintes évolutives sont également variables par sous-régions dans les séquences codantes des protéines de l'ARN-2. Ainsi alors que globalement la polyprotéine est sous sélection purificatrice, une région 5' proximale de la séquence codante de la protéine 2A<sup>HP</sup> et la première moitié de la séquence de la protéine 2B<sup>MP</sup> semblent sous sélection positive (de diversification). Cette variation intra-cistronique n'est pas visible pour la séquence de la 2C<sup>CP</sup>, entièrement sous sélection négative (Nourinejhad Zarghani *et al.*, 2013).

La taille des molécules génomiques présente également de la flexibilité, une flexibilité limitée à quelques nt pour l'ARN-1 mais pouvant aller jusqu'à près de 80 nt pour l'ARN-2 (Nourinejad Zarghani *et al.*, 2013 ; Fuchs *et al.*, 2017).

### 3.5 Structure

Récemment les structures cristallographiques de deux souches de GFLV ont été résolues à 3 et 2,7 Å (Schellenberger *et al.*, 2011a) ce qui a permis de décrire précisément la capsid et de la comparer à celle d'autres népovirus pour lesquels la structure est connue. Ainsi la capsid du GFLV (Fig. 3), comme celle des autres népovirus, présente des sous-unités dont l'extrémité N-ter est positionnée vers l'intérieur de la particule tandis que la partie C-ter pointe vers l'extérieur (Schmitt-Keichinger *et al.*, 2017). Le GFLV présente aussi les mêmes proéminences que les autres népovirus, l'une, marquée, au niveau du pentamère et l'autre, plus modérée au niveau de l'axe de symétrie d'ordre 3, ainsi qu'une légère dépression au niveau de l'axe de symétrie d'ordre 2. Toutefois, contrairement au TRSV, le GFLV ne présente pas d'extension N-ter vers l'intérieur de la capsid. Une cavité a également été identifiée à la surface de la particule virale, elle se situe à proximité de l'axe de symétrie d'ordre 3 bien en contre bas de la protubérance du pentamère. Cette cavité pourrait constituer le déterminant viral de la transmission spécifique du GFLV par *X. index*. Elle est bordée par la région R2 composée de 11 résidus (188-FFDLTAVTALR-198) et par la glycine en position 297, deux motifs du domaine *jelly roll* central, impliqués dans la transmission du virus (Schellenberger *et al.*, 2010 ; Schellenberger *et al.*, 2011b). Cette cavité se distingue d'une dépression équivalente sur la capsid de l'ArMV par sa charge qui est positive dans le cas du GFLV et négative dans le cas de l'ArMV, une constatation en accord avec les vecteurs de transmission différents pour ces deux virus.

### 3.6 Encapsidation et mouvement

L'encapsidation des ARN viraux et le mouvement des particules virales néoformées nécessitent les deux protéines 2C<sup>CP</sup> et 2B<sup>MP</sup> toutes les deux codées à partir de l'ARN-2 (Fuchs *et al.*, 2017). Comme pour les autres népovirus, aucun signal d'encapsidation n'a été identifié sur les différents ARN génomiques ou satRNA du GFLV et l'existence de capsid de type T, ne contenant aucun ARN viral suggèrent que le génome n'est pas nécessaire à la formation de nouvelles particules virales. L'existence de virus recombinants GFLV / ArMV naturels ou conçus au laboratoire, et encapsidés (Belin *et al.*, 2001 ; Andret-Link *et al.*, 2004b), indique que cette étape n'est très certainement pas spécifique.

Le mouvement du GFLV (Fig. 3) a été très étudié et ce dès les années 1970. Ainsi, des particules virales de GFLV ont été observées dans des tubules traversant la paroi de cellules de *Petunia hybrida* dès 1975 (Šarić & Wrischer 1975), rangeant dès lors le GFLV parmi les virus formant des tubules, comme le cowpea mosaic virus (CPMV). Par la suite, ces tubules contenant des particules virales ont été observés aussi dans des plants et des protoplastes de *C. quinoa* (Stussi-Garaud *et al.*, 1994 ; Ritzenthaler *et al.*, 1995). Ils sont constitués de

## INTRODUCTION

sous-unités de la protéine 2B<sup>MP</sup>, seule protéine virale nécessaire à leur assemblage (Ritzenthaler *et al.*, 1995 ; Laporte 2003). Comme pour le CPMV, le cauliflower mosaic virus (CaMV) et le brome mosaic virus (BMV), c'est l'extrémité C-ter de la protéine 2B<sup>MP</sup> qui semble interagir avec les particules virales. Dans le cas du GFLV cela a été démontré de façon indirecte, par la génétique, en utilisant des protéines chimères GFLV / ArMV (Belin *et al.*, 1999). Ce travail a montré que le mouvement des particules virales de cellule à cellule semble spécifique, puisqu'une protéine 2B<sup>MP</sup> d'ArMV ne permet pas le mouvement de particules de GFLV. Cette spécificité est liée à l'extrémité C-ter de la protéine de mouvement. En effet, en remplaçant les neuf derniers résidus de la protéine 2B<sup>MP</sup> de l'ArMV par ceux de la protéine 2B<sup>MP</sup> du GFLV, on restaure le mouvement intercellulaire du GFLV. Sur la capsid, le déterminant de ce mouvement n'a pas été clairement établi, néanmoins la région R4 de la capsid (260-MDWNE-264), située dans le motif *jelly roll* B, semble importante au mouvement de cellule à cellule puisque son remplacement par son équivalent ArMV inhibe l'infection de plants de *C. quinoa* sans empêcher la protection des ARN viraux (Schellenberger *et al.*, 2010).

Des facteurs de l'hôte impliqués dans le mouvement à courte distance du GFLV ont aussi été identifiés. Dans un premier temps Laporte et ses collègues ont montré l'implication du système sécrétoire dans la formation des tubules viraux et l'implication du cytosquelette dans l'adressage de la protéine 2B<sup>MP</sup> aux plasmodesmes (Laporte 2003). Par la suite, le rôle du système sécrétoire a été précisé : il permet l'adressage des protéines de la famille des PDLP (*plasmodesmata located proteins*) aux plasmodesmes, protéines qui servent probablement à l'ancrage de la protéine 2B<sup>MP</sup> et à sa polymérisation en tubules (Amari *et al.*, 2010). Cet adressage des protéines PDLP aux plasmodesmes se fait de façon dépendante des myosines de classe XI (Amari *et al.*, 2011). Le mouvement intracellulaire des protéines 2B<sup>MP</sup> et des capsides reste inconnu, bien qu'une libre diffusion de la protéine 2B<sup>MP</sup> ou une association aux microtubules aient été évoquées (Amari *et al.*, 2011).

### 3.7 Transmission

Le GFLV est le premier virus pour lequel une transmission par un nématode ait été décrite (Hewitt *et al.*, 1958). Cette association présente une vaste distribution quasi-mondiale puisqu'on retrouve le virus et son vecteur dans l'ensemble des régions tempérées où la vigne est cultivée (Andret-Link *et al.*, 2004b). La transmission du GFLV se caractérise par une grande spécificité entre le virus et son vecteur *X. index* (Fig. 3). Cette spécificité a constitué, avec l'obtention de clones infectieux, un outil formidable pour la caractérisation des déterminants viraux de la transmission R2 et G297 (Cf. III. 3. 3.6). Les comportements alimentaires des nématodes et notamment des *Xiphinema* ont été bien décrits (Wyss 2000). Le nématode se nourrit sur la pointe des racines, au niveau de la zone d'élongation des cellules. Le stylet s'enfonce en quelques secondes sur une épaisseur de trois à quatre cellules. L'ingestion du contenu cellulaire peut alors commencer, elle peut durer plusieurs heures et atteindre 40 cellules par heure. Pour faciliter cette ingestion, des sécrétions provenant des glandes

dorsales sont régulièrement injectées dans la plante. Au voisinage des sites d'alimentation du nématode, des cellules multinuclées sont visibles en microscopie optique et les racines peuvent présenter des galles (Wyss 2000). Lors de cette prise alimentaire il est assez facile d'imaginer que le virus est absorbé avec l'ensemble du contenu cellulaire et retenu dans le vecteur. En revanche le démarrage d'un nouveau cycle viral lors d'une nouvelle prise alimentaire est moins facilement concevable puisque le virus doit s'établir dans un contexte de liquéfaction et de disparition des premières cellules accessibles.

Les sites de rétention du virus dans le nématode sont décrits depuis les années 1970 ; le virus forme des monocouches sur la cuticule de la lumière de l'odontophore, de la partie antérieure de l'œsophage et du bulbe œsophagien (Taylor & Robertson 1970). La rétention du virus est très vraisemblablement un processus spécifique puisque des particules d'ArMV peuvent être ingérées par *X. index* mais ne sont pas retenues, comme le suggère l'absence de détection du génome viral (par des analyses d'*immuno-capture* et RT-PCR) après des périodes de rétention alors qu'il est détectable immédiatement après une période d'acquisition (Belin *et al.*, 1999 ; Schellenberger *et al.*, 2011b). La nature de ces sites de rétention n'est pas connue bien que des glucides établissant des interactions électrostatiques avec la capsidie aient été suggérés (Robertson & Henry 1986)

### 3.8 Contrôle

Il n'existe à ce jour aucune méthode de lutte efficace contre le court-noué. Certaines pratiques sont encouragées mais pas toujours réalistes du point de vue économique. Ces pratiques sont avant tout préventives et reposent sur l'arrachage des parcelles touchées, la mise en place d'une jachère prolongée (d'au moins sept ans, Demangeat 2007), et la réimplantation de matériel certifié indemne de virus. Dans les régions les moins touchées ces mesures peuvent s'avérer efficaces, mais sont complètement inappropriées sur des territoires fortement infectés. On considère que 60 % du vignoble français est concerné par le court-noué par exemple. Il semble que la solution contre le court-noué réside dans le cumul de différentes sources de résistance, ce qui devrait en améliorer la durabilité pour offrir une vraie solution stable à la profession.

Différentes voies de lutte et sources de résistance sont aujourd'hui utilisées ou encore étudiées, notamment au sein du laboratoire, ciblant le vecteur, la plante ou directement le virus. Des techniques pour réduire les populations de nématodes dans le sol sont disponibles et d'ailleurs déjà commercialisées. De nos jours l'utilisation de produits chimiques à effet nématicide est de plus en plus abandonnée (voire interdite dans certains pays) à cause de leurs faibles efficacités et des effets délétères sur l'environnement (Fuchs *et al.*, 2017) ; le couvert végétal est une approche basée sur le même concept : il est composé de plantes (telles que la luzerne) aux molécules naturelles anti-nématodes, utilisées pendant les jachères. Cette méthode alternative difficile à mettre en place au vignoble, n'a

## INTRODUCTION

malheureusement pas d'effets notables sur des terrains hautement touchés par le court-noué.

Si les sols ne peuvent donc pas être réellement assainis, ce n'est pas le cas des plantes, en effet des techniques de suppression des virus existent, comme la thermothérapie ou les cultures de méristème apicaux (Maliogka *et al.*, 2015); mais ne sont pas forcément applicables à grande échelle. Toujours au niveau de la plante, la sélection d'hybrides aux propriétés résistantes est envisageable à l'image de ce qui est réalisé au laboratoire pour la création d'hybrides résistants au mildiou. Ces nouveaux hybrides sont sélectionnés car armés de gènes de résistance; cette pratique est extrêmement longue et pour l'instant aucun gène de résistance n'a été identifié contre le GFLV (ni aucun autre virus de vigne) chez les espèces du genre *Vitis* (Maliogka *et al.*, 2015). Dans une idée tout à fait différente, de ne pas le combattre mais de vivre avec le court-noué, l'approche de la prémunition pourrait être une bonne solution, car elle s'inscrit dans une lutte utilisant le biocontrôle qui semble plus en adéquation avec les volontés de la société en matière d'écologie. Le phénomène de prémunition est connu depuis longtemps (Gal-On & Shibolet 2006), et des essais de prémunition ont déjà été réalisés contre le GFLV sur hôtes herbacés et au vignoble (Komar *et al.*, 2008; Vuittenez *et al.*, 1964). Ce processus repose sur l'inoculation de souches hypo-agressives afin qu'elles protègent les plantes de surinfections par des souches hyper-agressives. La prémunition ou protection croisée (Ziebell & Carr 2010) utilise donc une souche virale atténuée comme agent de biocontrôle (BCA) pour lutter contre des variants de ce virus. Elle nécessite d'identifier des souches ne causant que peu ou pas de symptômes et capables à la fois de se maintenir dans l'hôte, surtout s'il est pérenne comme la vigne, et d'empêcher la surinfection de cet hôte par des variants hyper-agressifs du même virus. Dans le cas du GFLV, la protection croisée s'est avérée efficace à diminuer l'impact de souches indigènes en conditions de culture au vignoble, néanmoins les souches de BCA utilisées n'ont pas été sans incidence et les pertes dues au BCA ont limité l'intérêt de cette solution dans des conditions de faible pression d'inoculum (Komar *et al.*, 2008). Cet exemple illustre la nécessité de mieux comprendre la symptomatologie du GFLV.

Les népovirus en général et le GFLV en particulier, sont parmi les virus infectant la vigne, ceux qui ont été découverts en premier et pour lesquels nos connaissances sont les plus avancées. Grâce à la possibilité de les transférer sur des hôtes herbacés modèles voire d'obtenir des clones infectieux, des avancées considérables ont été réalisées, notamment pour ce qui touche le mouvement et la transmission du virus. Ainsi des déterminants viraux de la transmission ont été caractérisés et des facteurs cellulaires intervenant dans le transport et la contre défense virale ont été identifiés (Fuchs *et al.*, 2017). Malgré ces avancées, les interactions entre ces virus et leurs hôtes restent encore assez mal connues aussi bien en ce qui concerne les facteurs impliqués dans la réplication que les mécanismes impliqués dans la pathogenèse. Pourtant ces aspects sont au cœur du développement des maladies et constituent sans nul doute des leviers intéressants pour élaborer les moyens de lutte du futur.

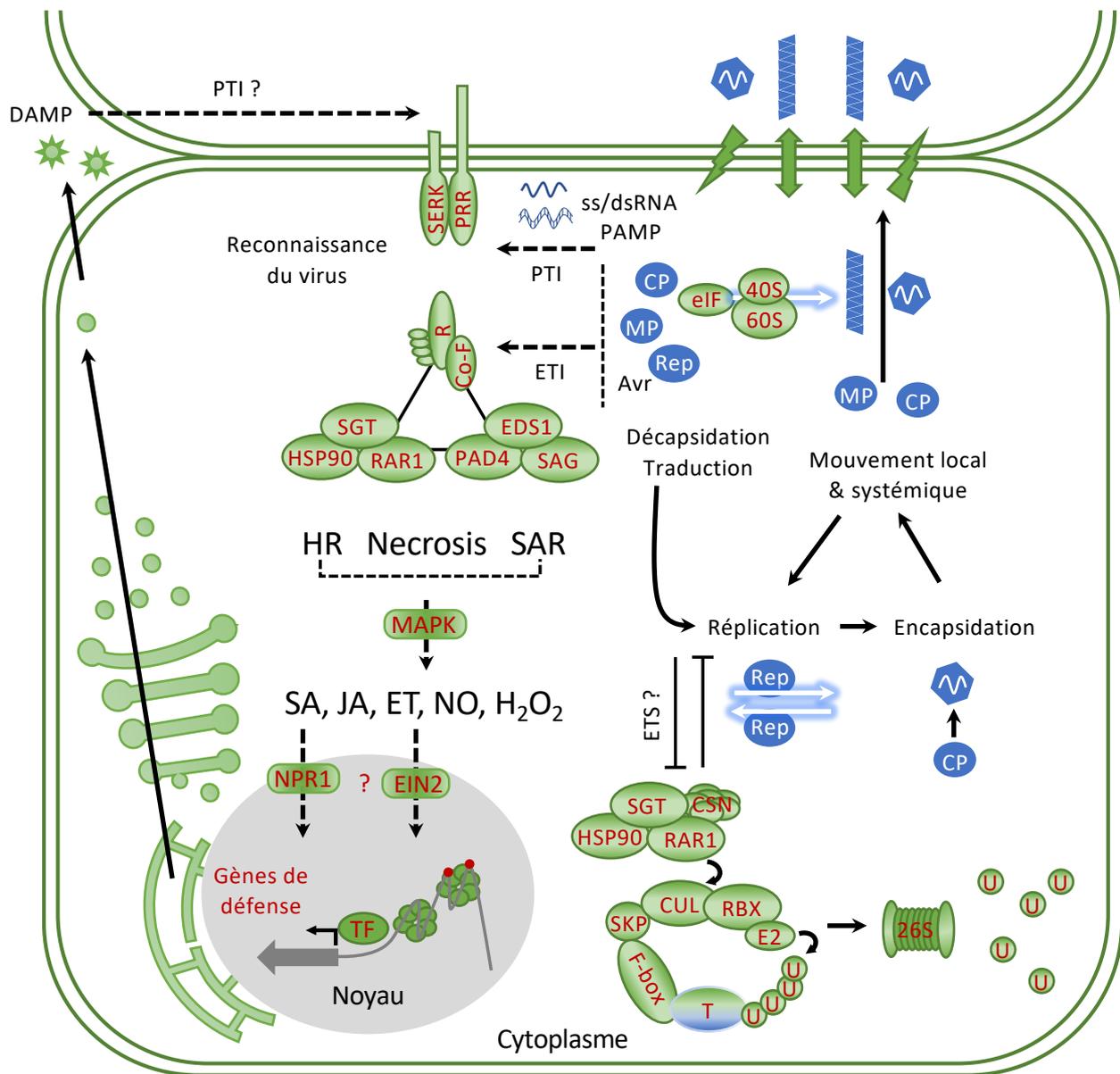
#### IV. SYMPTOMATOLOGIE DES *NEPOVIRUS*

##### 1. Les mécanismes à l'origine des symptômes viraux sur plantes

Paradoxalement, bien que les maladies virales aient d'abord été décrites sur la base des symptômes, peu de données sont disponibles pour en expliquer la mise en place. Ces données provenant de différents pathosystèmes permettent actuellement de proposer différents mécanismes, tous basés sur des interactions entre facteurs viraux et facteurs cellulaires, à l'origine de la symptomatologie (Culver & Padmanabhan 2007 ; Pallas & García 2011 ; García & Pallas 2015).

Parmi les mécanismes les plus répandus, partagés avec d'autres pathogènes et les mieux connus on peut citer la réaction d'hypersensibilité (HR). La HR (Fig. 4) dépend de l'interaction du produit d'un gène de résistance *R* de la plante avec un facteur d'aviorulence *Avr* du pathogène. Cette interaction gène pour gène conduit généralement à de la mort cellulaire programmée (PCD) et limite la propagation du virus (Jones & Dangl 2006 ; Mandadi & Scholthof 2013). Ces deux phénomènes de PCD et de résistance ont pu être découplés génétiquement ou de façon spatio-temporelle dans quelques combinaisons virus / hôte (Bendahmane *et al.*, 1999 ; Chu *et al.*, 2000 ; Cole *et al.*, 2001 ; Sekine *et al.*, 2006 ; Lukan *et al.*, 2018). L'efficacité de la réaction à restreindre la propagation du virus pourrait dépendre de la vitesse et de l'intensité de la réponse de la plante. Ainsi une réponse rapide et intense permettrait à la plante de résister efficacement et sans nécrose tandis qu'une réponse lente serait peu efficace à limiter la propagation du virus, ce qui pourrait intensifier la réaction et mener à une nécrose systémique (Künstler *et al.*, 2016). Entre ces deux extrêmes, tous les intermédiaires seraient possibles et dépendraient de l'interaction *R / Avr* (en quantité et en affinité) et de la vitesse de la mise en place de la HR (Künstler *et al.*, 2016).

Un autre mécanisme de résistance antivirale impliqué dans la symptomatologie concerne l'interférence par l'ARN (RNAi) ou *RNA silencing*. Les enzymes DICER-LIKE (DCL) de la plante clivent l'ARN double brin viral en *viral small interfering RNA* (vsiRNA) qui guident le complexe protéique RISC (pour *RNA induced silencing complex*) vers les ARN viraux simple brin, ce qui aboutira à leur clivage (et leur dégradation), ou à l'inhibition de leur traduction par des protéines argonautes (AGO, Csorba *et al.*, 2015). Cette défense antivirale utilise des effecteurs communs à la voie des microRNA (miRNA), un mécanisme de régulation de l'expression des gènes endogènes. Le *RNA silencing* peut intervenir sur la symptomatologie de deux façons : d'une part parce que des vsiRNA peuvent guider le complexe RISC vers des ARNm cellulaires (Shimura *et al.*, 2011 ; Smith *et al.*, 2011 ; Yang *et al.*, 2018) et ainsi perturber la physiologie des plantes et d'autre part parce que les virus codent pour des protéines supprimant le *RNA silencing* (VSR) qui peuvent également inhiber la voie des miRNA et ainsi causer des défauts de développement (Pallas & García 2011).



Modifié d'après Mandadi et al., 2013 et Gouveia et al., 2017

**Figure 4 : Immunité innée antivirale similaire aux bactéries et champignons**

Les phytovirus entrent dans la cellule hôte par un vecteur ou une blessure (éclair vert) et se déplacent de cellule en cellule à travers les plasmodesmes (flèches doubles). Les protéines virales (en bleu) comme la réplicase (Rep), la protéine de mouvement (MP) ou la protéine de structure (CP) sont traduites dans le cytoplasme et participent à la réplication, l'encapsidation et le mouvement du virus. Comme pour les bactéries ou les champignons, des facteurs viraux pourraient être reconnus par une protéine réceptrice PRR de surface (et son co-récepteur SERK) ou par des NB-LRR cytoplasmiques (R) pour induire une réponse ETI (*effector triggered immunity*) ou ETS (*effector triggered susceptibility*) entraînant un phénotype de HR, de SAR et/ou de nécrose. La réponse ETI implique les complexes SGT1/RAR1/HSP90 et EDS1/PAD4/SAG101. Les différentes interactions entre les facteurs viraux, les protéines R et ces deux complexes modifient différemment les niveaux d'acide salicylique (SA), d'acide jasmonique (JA), d'éthylène (ET), de monoxyde d'azote (NO) et de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ainsi que les voies de signalisation MAP-Kinases (MAPK) dépendantes. La voie NPR1 induite par le SA ne semble pas primordiale dans la réponse antivirale pour stimuler l'expression de gènes de défense via des facteurs de transcription spécifiques (TF). Les virus induisent aussi des modifications épigénétiques de la chromatine comme la méthylation de l'ADN (ronds rouges) et la recombinaison homologue. Le complexe SGT1/RAR1/HSP90 interagit aussi avec le signalosome COP9 (CSN) ce qui aboutit à la dégradation de protéines cellulaires ou viraux (T) par le système ubiquitine (U)/protéasome 26S (26). L'ARN viral simple ou double brin pourrait contenir des motifs reconnus comme PAMP (*pathogen-derived molecular pattern*) ou la plante pourrait produire des DAMP (*damage-associated molecular pattern*), reconnus à l'extérieur de la cellule. Les étapes inconnues ou les hypothèses sont marquées d'un ?.

En plus d'interférer avec ces mécanismes de défense, les virus, pour assurer leur réplication ou leur mouvement, interagissent avec de nombreux facteurs de l'hôte. Ces facteurs sont, pour beaucoup, impliqués dans des processus physiologiques importants comme la régulation hormonale, ou le transport des sucres et de l'amidon (Pallas & García 2011). Parmi les modifications majeures causées par les virus, on peut aussi citer une importante reprogrammation de l'expression des gènes cellulaires connue sous le nom de *host gene shut-off* (Havelda *et al.*, 2008 ; Conti *et al.*, 2012).

Ainsi les virus semblent causer des symptômes plus en interférant avec les processus cellulaires et physiologiques de façon spécifique qu'en détournant les nutriments par compétition (Culver & Padmanabhan 2007), ce qui explique que la sévérité des symptômes est plus souvent liée à une spécificité de souche qu'à un niveau d'accumulation du virus. Cependant malgré ces avancées la compréhension des mécanismes de la pathogenèse reste très partielle et les études très compliquées. En effet, les différents mécanismes décrits précédemment ne sont pas exclusifs et présentent des interconnexions qu'il est souvent difficile de démêler.

## 2. Les symptômes du court-noué sur vigne

Sur la vigne, l'étude des mécanismes est particulièrement complexe c'est pourquoi on dispose surtout de données descriptives. L'ensemble des 15 *Nepovirus* (et du SLRSV) induisent la même maladie connue sous divers noms, court-noué en Europe et Asie et dégénérescence infectieuse (*fanleaf*) aux USA. Il semble que les népovirus américains déclenchent aussi une affection connue sous le nom de *decline* dans le Nord des USA (Uyemoto 1975). Les symptômes du *decline* sont si proches du court-noué (malformations des rameaux, gaufrage et chlorose des feuilles, rabougrissement rapide du cep, appauvrissement des baies et grappes, fragilité des ceps face aux conditions environnementales) qu'il n'est pas certain que ce soit une autre maladie, mais plutôt une autre forme agressive de court-noué (Mannini & Digiario 2017).

### 2.1 Le court-noué de la vigne

#### 2.1.1 Description des symptômes du court-noué

Le court-noué est une maladie de la vigne qui présente une symptomatologie complexe et variée. Comme c'est le cas pour de nombreuses maladies virales, les symptômes du court-noué peuvent toucher une partie ou l'intégralité du pied infecté (Fig. 1). Les symptômes caractéristiques de cette affection sont le raccourcissement des entre-nœuds, donnant son nom au court-noué, ainsi que l'ouverture du sinus pétiolaire donnant aux feuilles une forme d'éventail, d'où le terme de *fanleaf* en anglais (Hewitt *et al.*, 1962).

a.



b.



Figure 5 : Aspects de parcelles et de plantes atteintes par le court-noué de la vigne

a. Au vignoble, les aspects de la maladie sont très variables et donnent ainsi naissance à des paysages diversifiés, allant de vignes poussantes, bien vertes et peu symptomatiques jusqu'aux « ronds de court-noué » caractéristiques où les ceps décèdent les uns après les autres. Entre ces deux extrêmes tous les intermédiaires sont possibles. La maladie du court-noué est particulièrement problématique dans de vieux vignobles (à forte valeur ajoutée) quand l'infection est installée depuis longtemps, et les sols infestés de nématodes virulifères.

b. Sur des vignes mono-infectées (par des variants uniques) en conditions contrôlées, les symptômes sont également contrastés, ces variations sont multifactorielles.

Ces deux symptômes s'accompagnent de malformations des rameaux (fasciations, double-nœuds) et des feuilles (chlorose, jaunissement, panachure), ainsi que des défauts du développement des fleurs, des baies (millerandage, coulure) et des grappes (petites et clairsemées, Martelli & Savino 1988 ; Andret-Link *et al.*, 2004a). Évidemment, les symptômes touchant les fruits affectent directement le rendement du pied. Les pertes sont variables, parfois drastiques selon les cépages et les conditions expérimentales, allant de 44 à 98 % pour le GFLV (Bovey 1970), jusqu'à 77 % pour l'ArMV (Rudel 1985), 47 % pour le GCMV, 30 % pour le RpRSV (Mannini & Digiario, 2017), et jusqu'à 95 % pour le ToRSV (Dias 1963). Les observations concernant la qualité des raisins font, elles aussi, état de résultats variables (Legin, 1972 ; Legin *et al.*, 1993 ; Komar *et al.*, 2008), il n'est pas surprenant que certaines infections paraissent avoir un effet bénéfique lorsqu'elles sont associées à une réduction quantitative de la récolte. En plus des symptômes visibles, l'ensemble du métabolisme interne est compromis, tel que les processus photosynthétiques (décrits pour le GCMV et le GFLV), respiratoires et hormonaux (Walter, 1988 ; Mannini & Digiario 2017). L'ensemble de ces dysfonctionnements affaiblit la plante et la rend susceptible à d'autres infections, et fragile face aux changements importants de température.

### 2.1.2 Origine des symptômes du court-noué

Très tôt, l'expression de la maladie est décrite comme compliquée (Fig. 5), ce syndrome complexe variant selon la susceptibilité de la cultivar infecté, la combinaison cépage / porte-greffe (Walker *et al.*, 1994), le variant viral (Walter *et al.*, 1990), la présence d'infection mixte (Vuittenez, 1956), la conduite de la vigne et les conditions pédoclimatiques (Martelli & Savino 1988). Enfin, il est important de noter que certaines saisons sont plus propices à l'apparition des symptômes foliaires, notamment les jaunissements, les chloroses et les panachures souvent accompagnées de malformations du limbe qui apparaissent en début de la saison végétative avant de s'estomper lors des moments de fortes chaleurs en été (Schmitt-Keichinger *et al.*, 2017).

Historiquement l'étude des maladies était basée sur les observations, mais parfois des techniques de greffages ou d'indexage étaient utilisées. Dans les années 50, des tentatives de descriptions précises ont mené à différencier plusieurs formes de la maladie, ainsi Vuittenez décrit trois syndromes distincts ou « types virologiques » : le rabougrissement (ramifications anormales des sarments, malformations des feuilles), la panachure (limbe tacheté, présence de macules jaunes) et la mosaïque (alternance de zones vert pâle et de zones vert foncé) s'accompagnant d'un aspect gaufré du limbe (Vuittenez 1956). Grâce à diverses expériences de greffage (et double greffage pour comprendre les interactions entre les formes), il précise alors que ces formes différentes ne constituent pas des stades différents d'une même affection, que les effets varient selon les cépages et qu'un cépage peut accueillir plusieurs formes de symptômes (sous-entendant clairement la notion de différents inocula présents au sein du pied au même moment, ou encore le terme d'infection mixte).

Quelques années plus tard, plusieurs virus responsables de dégénérescence infectieuse (ou encore court-noué, *arriciamento*, *urticato*, *Reisigkrankheit*), comme le GFLV, l'ArMV, le TBRV, le RpRSV et le SLRSV ont été classés dans le groupe appelé *Ringspot* du fait qu'ils présentaient tous la particularité d'être inoculables mécaniquement à des hôtes herbacés en provoquant des symptômes similaires (Vuittenez *et al.*, 1969). Ces virus seront effectivement classés plus tard dans le genre *Nepovirus* ou proche de ce genre viral mais non assigné pour le SLRSV. De façon plus précise : le GFLV et l'ArMV induisent le court-noué, le TBRV induit un rabougrissement très fort qui conduit à la mort des ceps ; bien qu'il puisse aussi être associé en Europe au jaunissement, le RpRSV n'est pas bien décrit sur vigne, mais il serait aussi responsable de la maladie de *Pfeffingen* chez le cerisier (aux symptômes similaires au court-noué : énation, déformation des feuilles, rabougrissement des pousses, rosette foliaire) ; et enfin le SLRSV provoque des déformations et une réduction de la taille des feuilles (Vuittenez *et al.*, 1969).

Depuis, il est aussi d'usage d'utiliser les termes de souches de GFLV déformantes et chromogènes (Martelli 2014), et une corrélation entre la séquence de la protéine 2A<sup>HP</sup> et ces types chromogènes ou déformants a été proposée (Elbeaino *et al.*, 2014). Néanmoins les séquences utilisées dans ce travail étaient essentiellement limitées à un fragment du cistron de la protéine 2A<sup>HP</sup> et le statut sanitaire complet des vignes n'a pas été établi. Ces travaux ne permettent donc pas de distinguer définitivement une souche déformante d'une souche chromogène. La seule façon d'établir la pathogénicité d'une souche virale est de l'isoler et d'infecter un cépage indemne de pathogène, puis de suivre le développement des symptômes sur plusieurs saisons dans un environnement contrôlé en absence de surinfection. Ces conclusions seraient alors solides mais probablement spécifiques de ce couple souche virale / cépage d'intérêt, non transposables à d'autres cépages ou d'autres isolats viraux, pour lesquels il faudrait systématiquement refaire ce travail, ce qui est long compte tenu des outils disponibles sur la vigne.

## 2.2 Perturbations physiologiques des vignes infectées par des *Nepovirus*

La réaction d'hypersensibilité pouvant être affectée par les virus (Nicaise 2014), une équipe italienne s'est intéressée au dérèglement de la réponse antioxydative dans des vignes *Vitis vinifera* cv. trebbiano provenant d'une parcelle expérimentale, et infectées par le GFLV. Dans cette optique les auteurs ont quantifié des espèces réactives de l'oxygène (ROS) et des composés phénoliques sur trois saisons (Sgherri *et al.*, 2013). Les vignes infectées testées présentaient de sévères symptômes qui semblaient être corrélés avec des variations de concentration d'un certain nombre de métabolites liés aux ROS et aux phénols. Ces dérèglements marquent ainsi l'infection (par rapport à des plants dits sains provenant d'une parcelle expérimentale contrôle), ainsi que la capacité de l'hôte à réguler ces balances au cours de la saison pour contrer le pathogène. Néanmoins, le statut sanitaire des vignes considérées n'a pas été clairement établi au cours de ce travail, seule la présence ou l'absence du GFLV a été vérifiée par ELISA et par indexage. Bien que ce travail ne permette

pas de déterminer les mécanismes ni les cinétiques de dérégulation des métabolites mis en place lors de l'infection, il montre que bon nombre de processus biologiques tels que la respiration sont affectés par les infections du GFLV.

Depuis le début des recherches sur le court-noué, les études concernant les symptômes, leur déterminisme ou leur mécanisme d'induction ont été assez peu nombreuses et sont essentiellement basées sur des vignes probablement multi-infectées en l'absence de données de séquences. De plus, ces travaux ont surtout porté sur le GFLV, l'ArMV, le ToRSV et le TRSV, népovirus les mieux connus. C'est pourquoi, à ce jour ces études n'ont pas permis d'établir un lien entre un génotype viral individuel (séquence complète) et des symptômes. À présent il est décrit que la maladie est complexe et qu'elle peut se manifester différemment selon les cépages ou les conditions environnementales, mais surtout selon le virobiote présent.

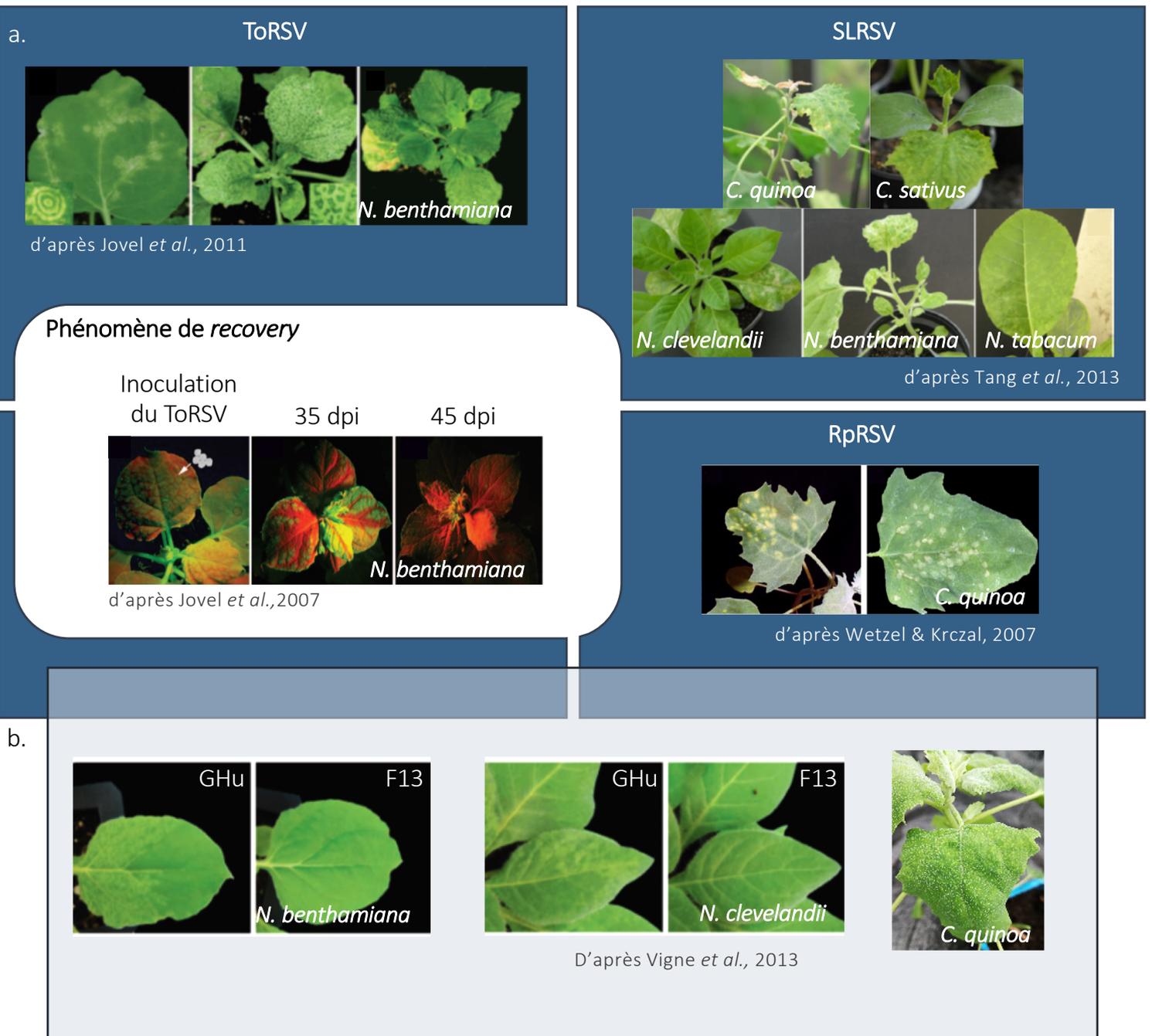
### 3. Les symptômes induits par les népovirus sur hôtes herbacés

Certains népovirus sont capables d'infecter naturellement un panel d'hôtes variés, d'autres sont plus restreints, enfin certains sont exclusifs. Quelle que soit leur gamme d'hôte ces virus sont généralement inoculables mécaniquement à des hôtes herbacés, modèles de laboratoire comme des *Nicotiana* (Fig. 6). Les expériences et outils de biologie moléculaire courants sont aussi plus faciles à utiliser que sur les hôtes agronomiques qui peuvent être greffés, ligneux ou au cycle très long. Mais le plus grand désavantage de la vigne reste l'impossibilité de l'inoculer mécaniquement et notre échec à l'agroinfiltrer avec des clones de GFLV. C'est pour toutes ces raisons que la biologie des népovirus, et notamment la symptomatologie et son déterminisme ont essentiellement été étudiés sur *Nicotiana*.

#### 3.1 Description des symptômes

##### 3.1.1 Symptômes sur hôte herbacés

Le ToRSV est un des népovirus dont les réactions symptomatiques ont été étudiées sur plantes herbacées. En plus des symptômes largement décrits sur *Nicotiana*, les réactions de défense des plantes ont été explorées (Jovel *et al.*, 2007 ; Jovel *et al.*, 2011). Le ToRSV induit sur *N. benthamiana* une HR avec des spots nécrotiques sur les feuilles inoculées. Cette réaction s'accompagne des marqueurs typiques de la HR : l'accumulation de protéines PR1 et de ROS. Cette résistance n'est pas totale puisque l'on retrouve des symptômes d'éclaircissement des nervures et du virus dans les feuilles apicales non-inoculées. En fonction de la température, la plante sera capable de récupérer de ces symptômes ou non. Ces travaux démontrent une nouvelle fois la variabilité des réactions puisque sur *N. tabacum* le ToRSV est plus restreint.



**Figure 6 : Symptômes des *Nepovirus* (et assimilé) et du GFLV sur hôtes herbacés**

a. Les *Nepovirus* induisent différents types de symptômes, ils peuvent toucher les feuilles inoculées et/ou s'étendre aux feuilles apicales. Le ToRSV par exemple provoque sur *N. benthamiana* des taches annulaires ou *ringspot* sur les feuilles inoculées et des mosaïques sur les feuilles apicales non inoculées. Une caractéristique des népovirus est la récupération des symptômes ou *recovery*, comme illustré ici sur des *N. benthamiana* infectées par le ToRSV. Le RpRSV induit des spots systémiques nécrotiques sur *C. quinoa*. Le SLRSV proche des *Nepovirus* induit : des apex nécrotiques sur *C. quinoa*, une mosaïque sur *Cucumis sativus*, des lésions locales et systémiques nécrotiques sur *N. clevelandii*, et des taches annulaires sur *N. benthamiana* et *N. tabacum*.

b. On retrouve sur hôtes herbacés la variabilité des réactions produites par le GFLV. Toutes les souches ont jusqu'à présent infecté systématiquement des *C. quinoa* en produisant un éclaircissement des nervures caractéristique sur les feuilles apicales non-inoculées. Les souches GHu et F13 sont capables d'infecter systématiquement *N. benthamiana* et *N. clevelandii*. Aucun symptôme n'est visible sur les feuilles inoculées. Sur feuilles apicales non-inoculées, la souche GFLV-GHu induit une mosaïque non-persistante et des spots chlorotiques sur *N. benthamiana* et *N. clevelandii* respectivement, alors que la souche F13 ne provoque aucun symptôme.

### 3.1.2 Le phénomène de *recovery* : une manifestation typique des népovirus

Un phénomène lié aux symptômes qui est typique des népovirus, est le phénomène de récupération des symptômes ou *recovery* (Fig. 6). Il a été documenté pour la première fois sur un tabac infecté par le TRSV (Wingard 1928), et depuis pour de nombreux népovirus comme le TBRV et le ToRSV. Le phénomène de *recovery* d'une plante infectée se traduit par l'émergence de nouvelles feuilles asymptomatiques (Ghoshal & Sanfaçon 2015), qu'il n'est généralement pas possible de réinfecter, certainement à cause de la mise en place d'un phénomène de *RNA silencing* provoquant l'exclusion du virus inoculé. On peut noter que c'est l'étude du phénomène de *recovery* d'un népovirus (le TBRV) sur *N. clevelandii* qui a permis de montrer que le processus d'ARN interférence pouvait constituer une voie de défense antivirale (Ratcliff *et al.*, 1997). La *recovery* des népovirus et notamment le mécanisme sous-jacent ont été extensivement étudiés en utilisant différents népovirus dont le ToRSV (Jovel *et al.*, 2007 ; Ghoshal & Sanfaçon 2014). Bien que les nouvelles feuilles ne présentent aucun symptôme, (voire que les symptômes préexistants sur de vieilles feuilles disparaissent), cela n'inclut pas forcément la disparition du virus ni même la diminution du titre viral dans la plante infectée, bien qu'elle aient été observées pour le TBRV (Ratcliff *et al.*, 1997). À l'inverse du TBRV, la récupération du ToRSV chez *N. benthamiana* ne s'accompagne pas de la diminution du titre viral (Jovel *et al.*, 2007), mais est dépendante de AGO1 (ce qui explique ainsi facilement sa dépendance à la température) et semble s'exercer par inhibition de la traduction. Dans le cas de l'AILV, un népovirus du sous-groupe B, le phénomène de *recovery* est précédé par une augmentation de l'accumulation des transcrits des gènes *RDR6* et *DCL4*, tous deux impliqués dans le *RNA silencing* (Santovito *et al.*, 2014).

### 3.2 Déterminisme moléculaire des symptômes

Dès la fin des années 70, le déterminisme de la symptomatologie des népovirus sur hôte herbacé a été étudié. Un travail approfondi a été mené sur le RpRSV et la distribution du déterminisme de la transmission, de la spécificité sérologique et de la symptomatologie sur les deux ARN a été extensivement décrite (Harrison *et al.*, 1974). L'utilisation de quatre souches différentes et de réassortiments entre leurs ARN-1 et ARN-2 ont permis de conclure que les jaunissements sur *Petunia hybrida* sont dus à l'ARN-2, tandis que sur *C. quinoa* et *C. amanticolor* la sévérité des symptômes systémiques dépend de l'ARN-1 et le type de lésions sur les feuilles inoculées dépend des deux ARN. Ce travail montre également que les symptômes et leur déterminisme sont très dépendants de l'hôte considéré. Lors de travaux menés sur le GCMV, la région 5' UTR de l'ARN-2 (exprimée à l'aide d'un vecteur viral dérivé du potato virus X (PVX)) a été identifiée comme le déterminant de la nécrose sur différentes espèces du genre *Nicotiana*, alors que le GCMV lui-même n'induit pas ce type de symptôme lors d'infection naturelle (Fernandez *et al.*, 1999). Plus récemment l'expression transitoire de l'hélice N-ter du block NTB du TRSV a été associée à l'induction d'une nécrose de type HR sur *N. benthamiana*. Encore une fois ces résultats ne reflètent pas les symptômes induits par le TRSV sur *N. benthamiana* qui ne développe jamais de nécrose (Hashimoto *et al.*, 2015).

### 3.2.1 Les premiers déterminants de la symptomatologie des népovirus

Au cours des dix dernières années, quelques travaux ont été menés pour mieux caractériser le déterminisme de la symptomatologie du GFLV. Une étude phylogénétique a notamment étudié la variabilité de la 2A<sup>HP</sup> de différents isolats de GFLV et son implication dans la manifestation de mosaïque jaune ou de malformation sur la vigne. Des recombinaisons sur la séquence de la 2A<sup>HP</sup> du GFLV ont été corrélées avec des symptômes de mosaïque jaune et la partie N-ter de la protéine 2A<sup>HP</sup> a été proposée comme déterminant la symptomatologie (Elbeaino *et al.*, 2014). Néanmoins cette étude a été réalisée à partir de séquences partielles, sans que soit connu le statut sanitaire des vignes à partir desquelles les fragments de la séquence codante de la protéine 2A<sup>HP</sup> ont été séquencés, ni la variabilité des autres séquences du GFLV. Il est donc prématuré d'en conclure que la partie N-ter de la 2A<sup>HP</sup> constitue un déterminant de la symptomatologie sur vigne.

Grâce à des transcrits infectieux de deux souches de GFLV et différentes espèces de *Nicotiana*, un premier travail sur le déterminisme de la symptomatologie du GFLV a été réalisé au laboratoire en collaboration avec l'université Cornell aux USA. Lors de cette étude, le déterminant viral des symptômes de mosaïque causés par la souche GFLV-GHu sur *N. benthamiana* et *N. clevelandii* a été identifié dans les 408 derniers nucléotides de la protéine 1E<sup>Pol</sup> (Vigne *et al.*, 2013). Dans ces mêmes hôtes, la souche GFLV-F13 induit une infection ne provoquant pas de symptômes sur feuilles (bien que le virus soit présent). Ce travail illustre une fois encore la variabilité des symptômes en fonction des souches virales utilisées et des espèces d'hôtes, comme c'est le cas avec le pathosystème GFLV / vigne.

Pour résumer, les premiers éléments concernant les mécanismes moléculaires à l'origine des symptômes causés par des népovirus sur des hôtes herbacés ont pu être reliés aux mécanismes de *RNA silencing*, à une HR inefficace à restreindre le virus et / ou à ces deux phénomènes. Cependant les connaissances actuelles restent très éparses et ne permettent pas de rendre compte de la complexité et de la variété des symptômes. Sur vigne, bien que les symptômes soient essentiellement subdivisés en déformations et chloroses, on retrouve la même diversité. Cependant sur cet hôte complexe à étudier, hormis le dérèglement des ROS et des phytoalexines, aucun mécanisme n'a pu être proposé. En ce qui concerne les déterminants viraux de la symptomatologie, les travaux les plus avancés portent sur l'identification des 408 derniers nucléotides de la séquence codante de la protéine 1E<sup>Pol</sup> du GFLV impliqués dans l'induction de mosaïques sur *N. benthamiana* et *N. clevelandii*.

## OBJECTIF ET PRÉSENTATION DE LA THÈSE

L'objectif des travaux menés au cours de ma thèse était de progresser dans la compréhension des mécanismes moléculaires et des déterminants impliqués dans la symptomatologie variée du GFLV, à l'aide de souches virales induisant des phénotypes contrastés sur des hôtes herbacés modèles et sur la vigne, hôte d'intérêt agronomique.

Concernant les hôtes herbacés, des travaux menés préalablement au laboratoire avaient permis d'identifier la zone virale déterminant l'apparition d'une mosaïque et de tâches chlorotiques sur les feuilles apicales respectivement de *N. benthamiana* et *N. clevelandii* (Vigne et al., 2013). Pour ces travaux, le clone infectieux de la souche GFLV-GHu avait été obtenu, venant ainsi s'ajouter à celui de la souche GFLV-F13 (Viry et al., 1993). Au cours de cette étude sur les symptômes, d'autres espèces de *Nicotiana*, et notamment *N. occidentalis*, avaient été inoculées par les souches F13 et GHu. Tandis que la souche GHu provoquait une infection systémique, de type compatible, avec des symptômes de mosaïque sur les feuilles apicales non-inoculées (très similaires à ceux décrits sur *N. benthamiana* et *N. clevelandii*), la souche F13 semblait plus inconstante à établir une infection systémique. Ainsi moins de la moitié des plantes de *N. occidentalis* inoculées par le GFLV-F13 étaient positives en ELISA au niveau des feuilles apicales. De plus, des symptômes de nécrose ont été observés sur les feuilles inoculées de certains plants de *N. occidentalis*. Ces observations ont mené à l'hypothèse d'une réaction incompatible de type hypersensible (HR) induite spécifiquement par le GFLV-F13 sur *N. occidentalis*.

Par une approche de génétique inverse, en utilisant des réassortants (ou pseudo-recombinants) puis des ARN chimères entre les souches F13 et GHu, j'ai montré que les 50 acides aminés C-terminaux de la protéine 2A<sup>HP</sup> du GFLV-F13 déterminaient effectivement une HR sur *N. occidentalis*. Ce travail est présenté dans la publication n°1 : Martin et al., 2018, *Molecular Plant Pathology* **19**, 731-743.

Afin de cartographier les déterminants viraux responsables de la HR, j'ai affiné les échanges entre les souches F13 et GHu dans la séquence C-terminale de la protéine 2A<sup>HP</sup>. J'ai également tiré parti de variants naturels apparus spontanément dans les feuilles apicales de *N. occidentalis* plusieurs mois après l'inoculation de la souche F1F2 (correspondant au clone infectieux du GFLV-F13). Ces variants qui n'induisent plus de HR présentent des modifications dans la séquence codante de la protéine 2A<sup>HP</sup>. Ces modifications ont été introduites par mutagenèse dirigée dans un vecteur d'expression transitoire contenant la séquence codante de la protéine 2A<sup>HP</sup> du GFLV-F13 pour en tester le phénotype hors contexte viral.

Enfin, l'effet de la variabilité de la protéine 2A<sup>HP</sup> sur la réaction HR a été étudié. Pour cela les séquences codantes de huit protéines 2A<sup>HP</sup> provenant de différents isolats de GFLV et d'ArMV ont été introduites dans un vecteur d'expression transitoire et dans le clone G1G2

(correspondant au clone infectieux du GFLV-GHu). Les phénotypes induits par ces différentes protéines ont été comparés à ceux induits par les souches GHu et F13, en contexte viral et hors contexte viral. L'ensemble de ce travail de caractérisation de la HR induite par la protéine 2A<sup>HP</sup> est présenté dans le chapitre 2.

Sur la vigne, l'étude de la symptomatologie est plus complexe et plus longue. Afin d'éviter les infections mixtes présentes au vignoble, il est nécessaire d'inoculer des vignes avec des souches virales de GFLV préalablement isolées sur hôtes herbacés. L'inoculation de la vigne est une opération longue et laborieuse qui nécessite de réaliser un greffage hétérologue en culture *in vitro* entre un fragment de *C. quinoa* infecté et un fragment de vigne. Il en résulte des temps d'expérimentation très longs sachant qu'il peut être nécessaire d'attendre plusieurs années pour visualiser les symptômes, et des analyses qui sont pratiquées loin du temps zéro de l'inoculation.

À mon arrivée au laboratoire, j'ai pu bénéficier d'une parcelle expérimentale de vignes mono-infectées par différentes souches de GFLV, et mise en place en 2006 dans un environnement exempt de *X. index*, de façon à éviter toute surinfection. Cette parcelle est composée de vignes des cépages gewurztraminer et chardonnay greffées sur des porte-greffes kober 5BB (inoculés par différentes souches de GFLV ou non-inoculés). Grâce à un travail de notations de symptômes et caractéristiques agronomiques réalisé pendant plusieurs années sur ces vignes, un rabougrissement causé spécifiquement par la souche GFLV-B844 sur gewurztraminer a été mis en évidence, alors que les autres souches, dont la souche F13, ne provoquaient pas ce rabougrissement (Vigne *et al.*, 2015).

J'ai mis à profit ce contraste de symptômes pour étudier les processus spécifiquement dérégulés lors de l'infection de vigne gewurztraminer par le GFLV-B844. Ce travail a été réalisé par une approche sans *a priori* de comparaison des transcriptomes en utilisant la technique de RNA-Seq. Il est présenté sous la forme d'une publication, la Publication n°2, qui sera soumise pour la fin de l'année au journal "*International Journal of Molecular Sciences*" dans le cadre du numéro spécial "*Pant viruses and virus-induced diseases*". Cette étude montre que parmi les voies spécifiquement dérégulées dans les plantes infectées par le GFLV-B844 la régulation de réponse de type HR tient une place importante (avec 43 gènes dérégulés).

Outre les vignes qui ont été utilisées pour l'étude des transcriptomes par RNA-Seq, la parcelle comprend également un autre dispositif expérimental implanté en 2013, visant à comparer le phénotype induit par les souches B844 et F13 sur trois clones différents de gewurztraminer. De façon surprenante, le virus n'a pas été détecté dans les feuilles de certains gewurztraminer inoculés par le GFLV-B844, alors que le virus est facilement détectable dans tous les pieds inoculés par la souche F13. Une analyse plus poussée de ces vignes a été réalisée et montre que le GFLV-B844 est bien présent au niveau du porte-greffe.

## OBJECTIF

Il semble donc que le GFLV-B844, bien que présent dans le porte-greffe, n'ait pas réussi à établir une infection systémique dans le greffon de certaines plantes. L'ensemble de ces résultats suggère donc que le cépage gewurztraminer pourrait établir une réaction de type HR en réponse à l'inoculation par le GFLV-B844, à l'image de l'hôte modèle *N. occidentalis* inoculé par le GFLV-F13. Les arguments obtenus en faveur de cette hypothèse sont exposés dans le chapitre 3.

L'ensemble de mes travaux a donc permis de mettre en évidence et de caractériser une HR induite par le GFLV-F13 sur l'hôte modèle *N. occidentalis* et de suggérer une réaction semblable induite par le GFLV-B844 sur vigne gewurztraminer. Dans la dernière partie de ce manuscrit je détaillerai les perspectives ouvertes par ces résultats, notamment sur la recherche de gène(s) de résistance au GFLV.

Tableau 2 : Symptômes des sept souches de GFLV sur différents hôtes herbacés

		Solanaceae																							
		Chenopodiaceae			N. benthamiana			N. clevelandii			N. occidentalis			N. glutinosa			N. tabacum cv. Xanthi			N. debneyi			N. paniculata		
		C. amaranticolor			N. benthamiana			N. clevelandii			N. occidentalis			N. glutinosa			N. tabacum cv. Xanthi			N. debneyi			N. paniculata		
		Symptômes <sup>a</sup>	Virus <sup>b</sup>	Symptômes <sup>a</sup>	Virus <sup>b</sup>	Symptômes <sup>a</sup>	Virus <sup>b</sup>	Symptômes <sup>a</sup>	Virus <sup>b</sup>	Symptômes <sup>a</sup>	Virus <sup>b</sup>														
F13	Feuilles inoculées	Taches chlorotiques	+	nd	-	+	-	-	+	Nécroses	+	-	+	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Feuilles apicales	Mosaïque persistante	+	Mosaïque	-	+	-	-	+	Nécroses ou -	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Feuilles apicales	Taches chlorotiques	+	nd	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
GHu	Feuilles inoculées	Mosaïque	+	nd	Mosaïque	+	-	-	+	Mosaïque	+	-	-	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-
	Feuilles apicales	Taches chlorotiques	+	nd	Mosaïque	+	-	-	+	Taches chlorotiques	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Feuilles apicales	Mosaïque	+	Mosaïque	+	+	-	-	+	Mosaïque ou -	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B844	Feuilles inoculées	Taches chlorotiques	+	nd	-	+	-	-	nd	Nécroses ou -	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
	Feuilles apicales	Mosaïque	+	Mosaïque	+	+	-	-	nd	Mosaïque ou -	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
	Feuilles apicales	Taches chlorotiques	+	nd	-	+	-	-	nd	Nécroses ou -	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
CO1(A17b)	Feuilles inoculées	Mosaïque	+	Mosaïque	+	+	-	-	nd	Mosaïque ou -	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
	Feuilles apicales	Taches chlorotiques	+	nd	-	+	-	-	nd	Mosaïque ou -	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
	Feuilles apicales	Mosaïque	+	Mosaïque	+	+	-	-	nd	Nécroses ou -	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
CO2(A17d)	Feuilles inoculées	Taches chlorotiques	+	nd	-	+	-	-	nd	Nécroses ou -	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
	Feuilles apicales	Mosaïque	+	Mosaïque	+	+	-	-	nd	Mosaïque ou -	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
	Feuilles apicales	Taches chlorotiques	+	nd	-	+	-	-	nd	Nécroses	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
CO4	Feuilles inoculées	Mosaïque	+	nd	-	+	-	-	nd	Nécroses ou -	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
	Feuilles apicales	Taches chlorotiques	+	nd	-	+	-	-	nd	Nécroses ou -	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
	Feuilles apicales	Mosaïque	+	nd	-	+	-	-	nd	Nécroses ou -	+/-	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
CH8673	Feuilles inoculées	Taches chlorotiques	+	nd	-	+	-	-	nd	Nécroses	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
	Feuilles apicales	Mosaïque	+	nd	-	+	-	-	nd	Nécroses ou -	+	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd
	Feuilles apicales	Taches chlorotiques	+	nd	-	+	-	-	nd	Nécroses ou -	+/-	-	-	nd	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	nd

<sup>a</sup> : les symptômes de mosaïque sont visibles de 8 à 14 dpi et généralement non persistants (sauf indication contraire), l'absence de symptômes est notée (-), nd : non déterminé

<sup>b</sup> : la détection du virus a été réalisée par ELISA. L'absence de virus est notée (-), la présence de virus dans plus de 80 % des plantes testées est notée (+) et (+/-) signale les cas où le virus est détecté dans moins de 80 % des plantes testées ; nd : aucune analyse par ELISA n'a été réalisée

## CHAPITRE II : LE GFLV-F13 INDUIT UNE RÉACTION DE HR SUR *N. OCCIDENTALIS*

### I. Introduction - Diversité des symptômes du GFLV sur hôtes herbacés

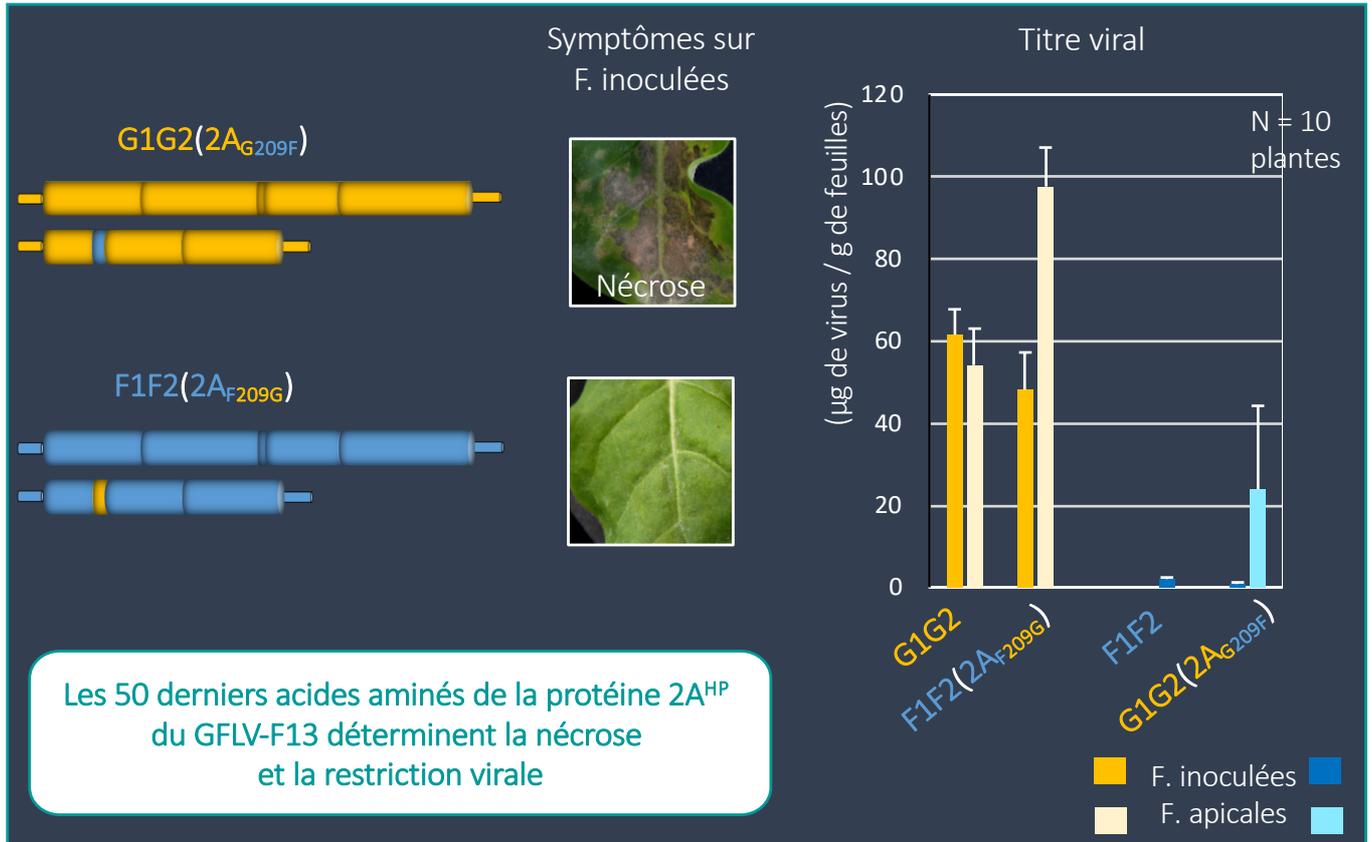
À mon arrivée au laboratoire, l'étude de la symptomatologie sur des hôtes herbacés avait été initiée. Les modèles herbacés présentent l'avantage d'être facilement inoculables mécaniquement et de produire une infection systémique en quelques jours, s'accompagnant ou non de symptômes. D'autre part, plusieurs souches de GFLV avaient été isolées à partir de vignes infectées (Tableau supp. 1, annexe) et présentaient des phénotypes contrastés (Tableau 2). Ces propriétés avaient déjà été mises à profit dans l'étude du déterminisme des symptômes de mosaïque et de chlorose causés par le GFLV-GHu sur les feuilles apicales non-inoculées, respectivement de *N. benthamiana* et *N. clevelandii* (Vigne *et al.*, 2013). Sur ces mêmes hôtes le GFLV-F13 provoque une infection systémique sans symptômes. Très vite des clones infectieux du GFLV-GHu avaient été obtenus. Comme pour la souche F13, l'inoculum provenant de ces clones reproduisait les symptômes des virus parentaux. Ceci a permis par l'échange de séquences provenant de ces deux souches, de montrer que les 408 derniers nucléotides de la séquence codante de la protéine 1E<sup>Pol</sup> de la souche GHu déterminaient les symptômes de mosaïque et de chlorose.

Parallèlement, les premières observations ont révélé des phénotypes différents sur *N. occidentalis* : alors que la souche GHu induit des mosaïques systémiques comparables à ce qui est obtenu sur *N. benthamiana*, les inoculations sur ce nouvel hôte par la souche F13 n'induisent pas toujours d'infection systémique et provoquent l'apparition de lésions nécrotiques sur les feuilles inoculées (Tableau 2). Sur les plantes qui développent une infection systémique, les feuilles apicales non-inoculées présentent, elles aussi des nécroses. Ces observations ont mené à l'hypothèse d'une réaction hypersensible (HR) induite spécifiquement par le GFLV-F13 sur *N. occidentalis*.

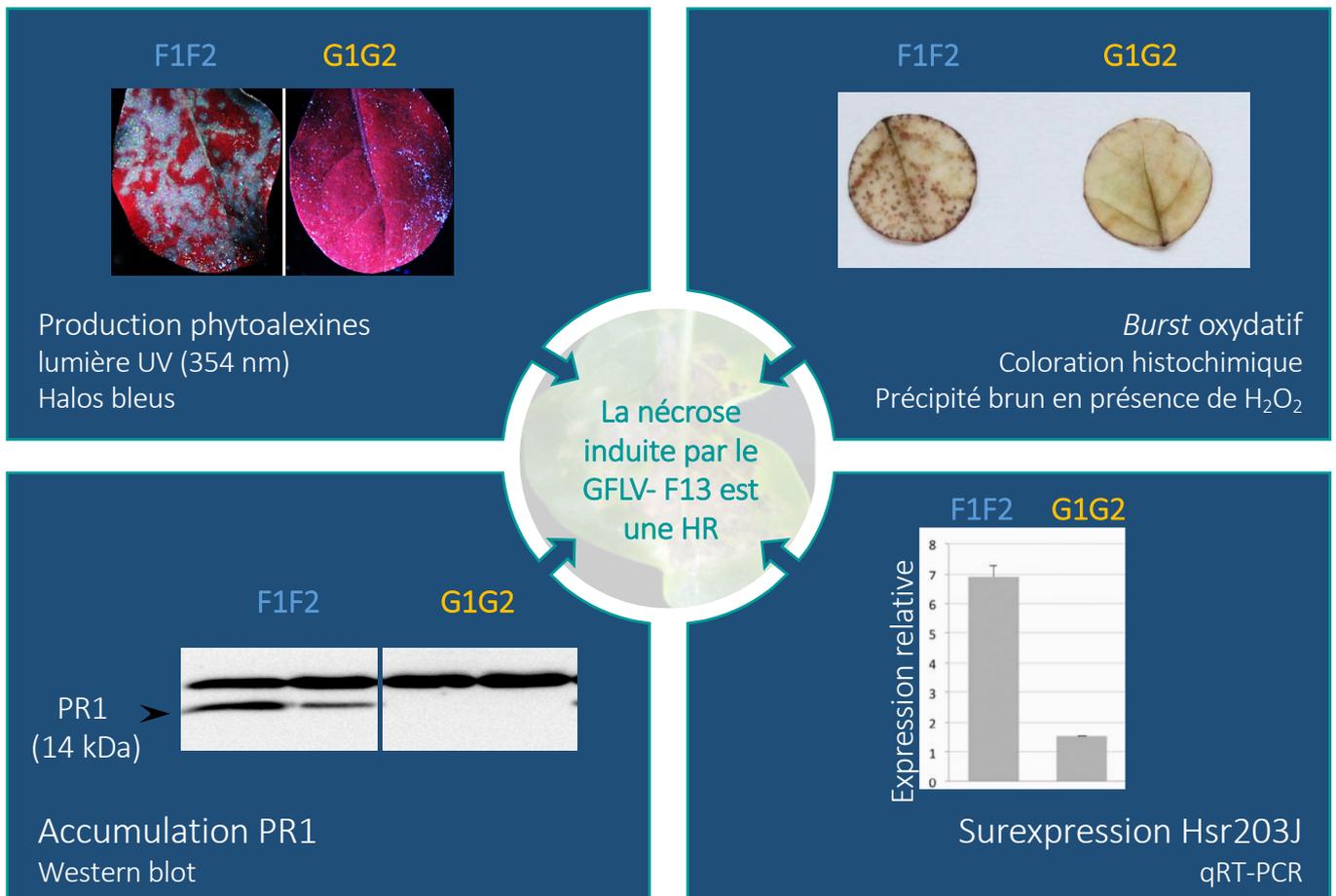
Mon objectif a donc consisté à tester cette hypothèse en caractérisant la réaction induite par le GFLV-F13 sur *N. occidentalis* et à en identifier le déterminant viral. Pour cela j'ai utilisé une approche de génétique inverse. Les expérimentations et résultats qui ont permis de conclure que le GFLV-F13 induit, sur *N. occidentalis*, une HR déterminée par les 50 derniers acides aminés de sa protéine 2A<sup>HP</sup> sont présentés dans la Publication n°1 qui s'intitule *The 50 distal amino acids of the 2A<sup>HP</sup> homing protein of Grapevine fanleaf virus elicit a hypersensitive reaction on Nicotiana occidentalis*. (Martin *et al.*, Molecular Plant Pathology, 2018, **19**: 731-743) ; elle est présentée ci-dessous, dans la partie II de ce chapitre. Par la suite, afin d'affiner la cartographie de ce déterminant viral j'ai (i) d'une part, procédé à des échanges plus restreints de séquences des souches F13 et GHu et (ii) d'autre part, maintenu et suivi des

Figure 7 : Résumé des résultats publiés sur la réaction du GFLV-F13 sur *N. occidentalis*

- Quelle région du GFLV-F13 détermine la nécrose sur *N. occidentalis* ?



- Est ce que la nécrose correspond à une HR ?



(adapté de Martin *et al.*, 2017)

plantes infectées en serre pendant plusieurs semaines pour favoriser l'apparition de variants naturels. Nous avons donc séquencé la descendance virale présente dans ces plantes et réalisé un passage sur de nouvelles plantes de *N. occidentalis* dans le but de corrélérer des modifications de séquence avec des modifications de symptômes. Ces résultats sont présentés dans le paragraphe III du chapitre. Enfin, avec une étudiante du master de Virologie, nous nous sommes intéressées à cinq souches supplémentaires de GFLV et deux souches d'ArMV pour étudier l'effet de la variabilité de la protéine 2A<sup>HP</sup> sur la réaction HR. Ces résultats sont exposés au paragraphe IV.

## **II. Les 50 derniers acides aminés de la 2A<sup>HP</sup> du GFLV-F13 déterminent une réaction de HR sur *N. occidentalis* accompagnée d'une restriction partielle.**

### **1. Résumé de la Publication n°1**

L'infection d'une plante par un virus peut résulter en une réaction compatible dans laquelle le virus n'est pas perçu et se propage dans la plante entière, en causant ou non des symptômes, ou en une réaction incompatible. Dans la réaction incompatible un facteur d'avirulence (Avr) est reconnu par le produit d'un gène R, ce qui déclenche une réaction HR. La HR se caractérise par la mise en place de réactions non-spécifiques du pathogène incluant un *burst* oxydatif, l'activation de voies dépendantes des MAP kinases, l'augmentation du niveau d'accumulation de l'acide salicylique et de composés antimicrobiens comme les phytoalexines et la surexpression des protéines *pathogenesis related* (PR). L'ensemble de ces réactions tend à limiter la propagation du virus, généralement par la mort des cellules primo-infectées. Sur *N. occidentalis* le GFLV-GHu induit une réaction compatible s'accompagnant de mosaïques sur les feuilles apicales non-inoculées tandis que le GFLV-F13 provoque des lésions chlorotiques à nécrotiques sur les feuilles inoculées et différents phénotypes sur les feuilles apicales, allant d'une absence de symptôme à des lésions chlorotiques ou nécrotiques. Notre but était donc de caractériser cette réaction et d'en identifier le déterminant viral.

Dans un premier temps les symptômes induits par le GFLV-GHu ont été corrélés à une forte accumulation du virus dans les feuilles inoculées et les feuilles apicales non-inoculées tandis que les nécroses causées par le GFLV-F13 ont été corrélées à une faible accumulation du virus (de l'ordre de 20 à 30 fois moins que la souche GHu ; Fig. 7). Une approche de génétique inverse, basée sur l'utilisation des clones infectieux des deux souches, de ré-assortants et de recombinants a alors montré que c'est la séquence codante de la protéine 2A<sup>HP</sup> du GFLV-F13 qui détermine ces nécroses sur les feuilles inoculées (Fig. 7).

Dans un deuxième temps nous avons caractérisé cette réaction nécrotique en recherchant des marqueurs de la HR dans les feuilles inoculées par le virus sauvage F1F2 (dérivant du GFLV-F13) ou par le virus recombinant G1G2-2A<sub>F</sub> dérivant de la souche GHu et

contenant la séquence codante de la protéine 2A<sup>HP</sup> du GFLV-F13. Dans ces feuilles nous avons mis en évidence une augmentation de l'accumulation de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, de scopolétine, de la protéine PR1c et du transcrit du gène *hsr203J* qui a été décrit comme un bon marqueur de la HR dans des plantes du genre *Nicotiana*. L'ensemble de ces résultats démontre que le phénotype nécrotique causé par les constructions contenant la séquence de la protéine 2A<sup>HP</sup> du GFLV-F13 correspond à une HR (Fig. 7).

L'utilisation d'un système d'agroinfiltration pour exprimer des séquences virales de manière transitoire a ensuite permis de tester une collection de mutants et de conclure que c'est la protéine 2A<sup>HP</sup> qui élicite cette HR et que celle-ci est déterminée par les 50 derniers acides aminés de la protéine.

Enfin, la séquence codante de ces 50 derniers acides aminés a été échangée dans les clones infectieux pour en tester le rôle dans la restriction du virus. L'inoculum recombinant F1F2-2A<sub>G</sub> contenant la séquence codant les derniers résidus de la protéine 2A<sub>G</sub> a induit une réaction compatible et une forte accumulation du virus tandis que le recombinant inverse (G1G2-2A<sub>F</sub> contenant la fin de la séquence codante de 2A<sub>F</sub>) a provoqué des nécroses accompagnées d'une faible accumulation virale, montrant par une approche de perte et de gain de fonction que les 50 derniers acides aminés de la protéine 2A<sup>HP</sup> du GFLV-F13 élicite une HR qui restreint le virus (Fig. 7).

## 2. Publication n°1

# The 50 distal amino acids of the 2A<sup>HP</sup> homing protein of *Grapevine fanleaf virus* elicit a hypersensitive reaction on *Nicotiana occidentalis*

ISABELLE R. MARTIN<sup>1</sup>, EMMANUELLE VIGNE<sup>1</sup>, FRANÇOIS BERTHOLD<sup>2†</sup>, VÉRONIQUE KOMAR<sup>1</sup>, OLIVIER LEMAIRE<sup>1</sup>, MARC FUCHS<sup>3</sup> AND CORINNE SCHMITT-KEICHINGER<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>Université de Strasbourg, INRA, SVQV UMR-A 1131, Colmar 68000, France

<sup>2</sup>Université de Strasbourg, CNRS, IBMP UPR 2357, Strasbourg 67000, France

<sup>3</sup>Department of Plant Pathology and Plant–Microbe Biology, Cornell University, New York State Agricultural Experiment Station, Geneva, NY 14456, USA

## SUMMARY

Avirulence factors are critical for the arms race between a virus and its host in determining incompatible reactions. The response of plants to viruses from the genus *Nepovirus* in the family *Secoviridae*, including *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), is well characterized, although the nature and characteristics of the viral avirulence factor remain elusive. By using infectious clones of GFLV strains F13 and GHu in a reverse genetics approach with wild-type, assortant and chimeric viruses, the determinant of necrotic lesions caused by GFLV-F13 on inoculated leaves of *Nicotiana occidentalis* was mapped to the RNA2-encoded protein 2A<sup>HP</sup>, particularly to its 50 C-terminal amino acids. The necrotic response showed hallmark characteristics of a genuine hypersensitive reaction, such as the accumulation of phytoalexins, reactive oxygen species, pathogenesis-related protein 1c and hypersensitivity-related (*hsr*) 203J transcripts. Transient expression of the GFLV-F13 protein 2A<sup>HP</sup> fused to an enhanced green fluorescent protein (EGFP) tag in *N. occidentalis* by agroinfiltration was sufficient to elicit a hypersensitive reaction. In addition, the GFLV-F13 avirulence factor, when introduced in GFLV-GHu, which causes a compatible reaction on *N. occidentalis*, elicited necrosis and partially restricted the virus. This is the first identification of a nepovirus avirulence factor that is responsible for a hypersensitive reaction in both the context of virus infection and transient expression.

**Keywords:** avirulence factor, defence, hypersensitive reaction, *Nepovirus*, reverse genetics, *Secoviridae*, symptom determinant.

## INTRODUCTION

The infection of a plant by a virus can result in a compatible reaction, which often leads to systemic symptoms, or in an incompatible reaction, as a result of the recognition of an avirulence (Avr) factor of the pathogen by a resistance gene of the host plant, which causes a hypersensitive reaction (HR). The two types of plant–virus interaction are well exemplified by the tobacco–*Tobacco mosaic virus* (TMV) interaction (Scholthof, 2008). In tobacco cultivars devoid of the *N* gene from *Nicotiana glutinosa*, the interaction is compatible with TMV, usually causing chlorotic local lesions, followed by systemic mosaic symptoms. In contrast, in tobacco cultivars containing the *N* gene, the interaction is incompatible with TMV, producing local necrotic lesions in which the virus remains localized in a few hundred cells around the entry site, no systemic virus spread occurs and apical leaves remain symptomless. Localized symptoms primarily result from an HR (Scholthof, 2008).

HR typically activates a non-specific plant response, including a kinase cascade, a burst of reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), an increase in Ca<sup>2+</sup> and salicylic acid content, an accumulation of antimicrobial compounds, such as phytoalexins, and an overexpression of defence gene products, such as pathogenesis-related (PR) proteins (Dangl and Jones, 2001; Künstler *et al.*, 2016; de Ronde *et al.*, 2014). The resulting cell death generally contributes to resistance by limiting the propagation of the virus (Bendahmane *et al.*, 1999; Dinesh-Kumar *et al.*, 2000; Künstler *et al.*, 2016; de Ronde *et al.*, 2014). Resistance can be extreme when the virus is localized to the infection site or non-existent when the virus induces necrosis in the whole plant as a result of a systemic HR. The timing and speed of the host response to virus infection are predicted to determine the varying degrees of resistance and symptoms seen at the macroscopic level (Künstler *et al.*, 2016).

Nepoviruses cause diseases in fruit, vegetable and ornamental crops, and infect herbaceous hosts, on which they induce a range of symptoms, depending on both the host–virus combination and environmental conditions (Fuchs *et al.*, 2017; Sanfaçon, 2008). On *Nicotiana* spp., nepoviruses often cause symptoms on inoculated

\*Correspondence: Email: keichinger@unistra.fr

†Present address: Université de Strasbourg, INRA, SVQV UMR-A 1131, Colmar 68000, France

Sequence of *N. occidentalis hsr203J* gene fragment was deposited in GenBank and given accession number KY363392.

leaves and a few uninoculated apical leaves, whilst the following emerging leaves remain asymptomatic. This phenomenon, known as recovery, is associated with RNA silencing (Ghoshal and Sanfaçon, 2015; Palukaitis, 2011). In addition to the recovery phenotype, *Tomato ringspot virus* (ToRSV) induces a systemic HR-like response on *N. benthamiana* (Jovel *et al.*, 2007), whereas systemic spread of ToRSV is much more limited in tobacco plants (Jovel *et al.*, 2011). Although the dependence of HR on salicylic acid and temperature has been demonstrated for ToRSV, the viral effector of HR remains elusive.

*Grapevine fanleaf virus* (GFLV) is another species of the genus *Nepovirus* in the family *Secoviridae*. It is the major causal agent of grapevine degeneration disease (Andret-Link *et al.*, 2004). Its genome is composed of two single-stranded, positive-sense RNAs that are covalently linked to a small viral protein (VPg) at their 5' end and contain a polyA tail at their 3' extremity. Each genomic RNA encodes a single polyprotein, which is proteolytically cleaved by the viral proteinase (1D<sup>Pro</sup>) into functional proteins. RNA1 encodes proteins involved in virus replication and polyprotein processing, whereas RNA2 encodes proteins involved in virus movement (2B<sup>MP</sup>) and morphogenesis (2C<sup>CP</sup>) in addition to RNA2 replication (2A<sup>HP</sup>) (Andret-Link *et al.*, 2004; Fuchs *et al.*, 2017; Gaire *et al.*, 1999). Systemic GFLV infection of plants requires both genomic RNAs (Viry *et al.*, 1993).

Preliminary work has revealed a differential reaction of GFLV strains GHu and F13 on *N. occidentalis*. Whereas GFLV-GHu induces systemic vein clearing and mosaic symptoms in uninoculated apical leaves, indicative of a compatible reaction, strain F13 causes chlorotic to necrotic lesions on inoculated leaves and produces variable phenotypes on uninoculated apical leaves, ranging from a lack of symptoms to a few chlorotic or necrotic spots. The response of GFLV-F13 on *N. occidentalis* is suggestive of an HR. Here, we expand on these initial observations and characterize the HR. Our research reveals that GFLV-F13 carries an Avr function that maps to the last 50 amino acids of protein 2A<sup>HP</sup> and partially limits the virus to inoculated leaves. This is the first identification and characterization of a nepovirus Avr factor that limits virus spread.

## RESULTS

### GFLV-F13 induces necrosis on *N. occidentalis*, whereas GFLV-GHu causes mosaic symptoms

Wild-type (WT) GFLV strains F13 and GHu (Vigne *et al.*, 2013) induced different reactions on *N. occidentalis* when inoculated at 350 ng/plant. GFLV-F13 caused small chlorotic and/or necrotic lesions on inoculated leaves at 3–5 days post-inoculation (dpi) (Fig. 1c). Necrotic lesions generally expanded and coalesced at 10 dpi (Fig. 1b). In addition, systemic infection rates were moderate (70%), as shown by double antibody sandwich-enzyme-linked

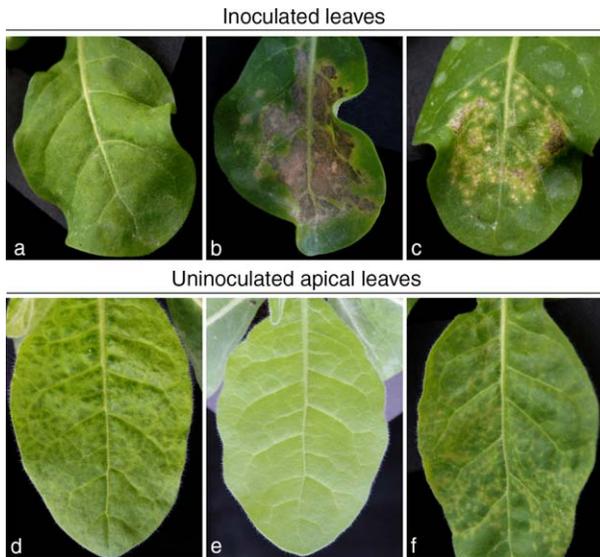
immunosorbent assay (DAS-ELISA) on uninoculated apical leaves, with symptoms falling into two categories: symptomless leaves (Table 1 and Fig. 1e) and leaves with chlorotic to necrotic spots with poorly defined borders and some distortions (Table 1 and Fig. 1f). In contrast, GFLV-GHu consistently remained asymptomatic on inoculated leaves (Fig. 1a) and caused a systemic infection, as judged from the vein clearing followed by mosaic symptoms on uninoculated apical leaves at 7–8 dpi (Fig. 1a,d). These symptoms vanished at 12–14 dpi in a process very similar to that described previously on *N. benthamiana* (Vigne *et al.*, 2013).

To characterize the reaction of the two GFLV strains on *N. occidentalis*, the virus titre was estimated in inoculated and uninoculated leaves by semi-quantitative DAS-ELISA. Systemic infection by GFLV-GHu resulted in a high virus titre (50 µg of virus per gram of fresh tissue on average) in both inoculated and uninoculated leaves (Table 1). In contrast, the titre of GFLV-F13 was very low (below 5 µg/g of fresh tissue on average) in symptomatic apical leaves, whereas symptomless leaves remained free of virus (Table 1). These results show that the GFLV-GHu–*N. occidentalis* interaction is compatible, whereas GFLV-F13, although inducing variable phenotypes on uninoculated apical leaves, consistently causes necrosis on inoculated leaves and accumulates at very low levels.

### Viral determinants of the necrotic phenotype map to the GFLV-F13 2A<sup>HP</sup> coding sequence

In order to identify the viral determinants of the necrotic phenotype caused by GFLV-F13 on *N. occidentalis*, transcripts derived from infectious clones of GFLV-F13 (Viry *et al.*, 1993) and GFLV-GHu (Vigne *et al.*, 2013) were used in inoculation experiments. As expected, G1G2 [transcripts derived from cDNA clones of GFLV-GHu RNA1 and RNA2 in pG1 and pG2, respectively (Vigne *et al.*, 2013)] reproduced the compatible infection observed with the parental WT GFLV-GHu in terms of symptoms (absence on inoculated leaves and mosaic on apical leaves) and high virus titre (Table 1). F1F2 [transcripts derived from cDNA clones of GFLV-F13 RNA1 and RNA2 in pF1 and pF2, respectively (Vigne *et al.*, 2013)] induced a necrotic reaction on inoculated leaves. However, the necrosis was less severe than with the parental WT GFLV-F13, although the virus titre was comparably low. All uninoculated leaves of plants infected with F1F2 remained symptomless and virus free (Table 1). In spite of the slight differences in behaviour of F1F2 and WT GFLV-F13, assortants of the synthetic inocula F1F2 and G1G2 were further used to map the viral determinant(s) responsible for necrosis on *N. occidentalis*.

*N. occidentalis* inoculated with assortant G1F2 exhibited necrotic lesions on inoculated leaves and either no symptoms or chlorotic or necrotic spots with leaf distortion on uninoculated apical leaves, whereas assortant F1G2 caused mosaic symptoms on uninoculated apical leaves and inoculated leaves remained



**Fig. 1** Types of symptom induced by wild-type, synthetic, assortant and chimeric *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) strains on inoculated (a–c) and uninoculated apical (d–f) leaves of *N. occidentalis* at 8 days post-inoculation (dpi). (a) Asymptomatic leaf (as exemplified here with a G1G2-inoculated leaf). (b) Intense necrotic lesions (NL) (here photographed on a G1G2(2A<sub>F</sub>)-inoculated leaf). (c) Necrotic lesions (NL) (as observed on an F1F2-inoculated leaf). (d) Mosaic symptoms (here photographed on an uninoculated leaf of a G1G2-inoculated plant). (e) Asymptomatic apical leaf (here photographed on an F1F2-inoculated plant). (f) Intense chlorotic to necrotic spots with some leaf distortion (CNS to LD) [here photographed on a plant inoculated with the recombinant G1G2(2A<sub>F</sub>)]. (See also Table 1.)

asymptomatic (Table 1). A high virus titre (70 and 40 µg/g in inoculated and apical leaves, respectively) for F1G2 and a low virus titre (2.5 and 3 µg/g in inoculated and apical leaves, respectively) for F1F2 were determined (Table 1). These results demonstrate the involvement of GFLV-F13 RNA2 in the necrotic phenotype.

To further identify the sequence responsible for the necrotic reaction of GFLV-F13 on *N. occidentalis*, the RNA2-encoded 2A<sup>HP</sup> coding sequence was exchanged between strains F13 and GHU to develop chimeric constructs. Recombinant F1F2(2A<sub>G</sub>) with the 2A<sup>HP</sup> coding sequence of GHU in the F13 RNA2 caused a compatible reaction with no symptoms on inoculated leaves, mosaic symptoms on apical leaves and a high virus titre (40 and 70 µg/g of fresh tissue in inoculated and apical leaves, respectively; Table 1). In contrast, recombinant G1G2(2A<sub>F</sub>) with the 2A<sup>HP</sup> coding sequence of F13 in the GHU RNA2 caused intense necrotic lesions on inoculated leaves and the virus titre was low (Table 1). On sequencing the progeny of recombinants F1F2(2A<sub>G</sub>) and G1G2(2A<sub>F</sub>) within the 5' untranslated region (UTR), the complete 2A<sup>HP</sup> coding region and the beginning of the 2B<sup>MP</sup> coding region after immunocapture-reverse transcription-polymerase chain reaction (IC-RT-PCR) indicated genetic stability and consistency with the sequence of the inoculum. Thus, the GFLV-F13 RNA2-encoded

2A<sup>HP</sup> region determines the necrotic phenotype on inoculated leaves of *N. occidentalis*.

### The necrotic phenotype of GFLV-F13 on *N. occidentalis* displays hallmark characteristics of an HR

*N. occidentalis* inoculated with WT GFLV-F13, assortants and recombinants harbouring the 2A<sup>HP</sup> sequence of F13 exhibited necrotic lesions on inoculated leaves (Fig. 1 and Table 1), accumulated 7–10 times less virus than GFLV inocula devoid of the F13 2A<sup>HP</sup> coding sequence and showed variable symptom severity on uninoculated apical leaves, ranging from no symptoms to intense necrotic spots, all reminiscent of an HR. To verify the occurrence of an HR, inoculated leaves of *N. occidentalis* were tested for hallmarks of HR, such as the accumulation of phytoalexins, ROS, PR proteins and hypersensitivity-related (hrs) 203J transcripts.

*N. occidentalis* leaves inoculated with WT GFLV-F13, synthetic F1F2 or chimeric G1G2(2A<sub>F</sub>), observed under UV illumination, showed bright blue rings of fluorescent cells around necrotic lesions as early as 2 dpi, demonstrating an increase in scopoletin and scopolin content (Chong *et al.*, 2002) of the living cells surrounding the necrotic lesions (Fig. 2a). In contrast, *N. occidentalis* leaves inoculated with WT GFLV-GHU, synthetic G1G2 or chimeric F1F2(2A<sub>G</sub>) only showed the red fluorescence background of chlorophyll (Fig. 2a). No increase in scopoletin was observed.

The massive production of ROS, known as the oxidative burst, is an early response activated in many incompatible interactions (Lamb and Dixon, 1997). This oxidative burst can easily be visualized *in situ* through the instant polymerization of 3,3'-diaminobenzidine (DAB) when it comes into contact with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the presence of peroxidases (Thordal-Christensen *et al.*, 1997). The application of DAB to the inoculated leaves of *N. occidentalis* showed that only GFLV constructs harbouring the F13 2A<sup>HP</sup> sequence, i.e. WT F13, synthetic F1F2 and chimeric G1G2(2A<sub>F</sub>), presented brown speckles, indicating H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation (Fig. 2b). A close observation of leaf discs with a binocular microscope confirmed the spatial correlation between necrotic spots and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in surrounding living cells (data not shown). Leaves inoculated with the synthetic G1G2 and chimeric F1F2(2A<sub>G</sub>) constructs remained unstained and similar to mock-inoculated leaf discs (Fig. 2b).

The PR1c protein, a defence-related inducible protein (Cornelissen *et al.*, 1986; Sels *et al.*, 2008), accumulated to detectable levels in *N. occidentalis* leaves inoculated with the necrogenic synthetic F1F2 and recombinant G1G2(2A<sub>F</sub>), but not in leaves infected with synthetic G1G2 and recombinant F1F2(2A<sub>G</sub>), which do not induce symptoms on inoculated leaves (Fig. 2c).

To further characterize the necrotic response of *N. occidentalis* inoculated with F1F2 and G1G2(2A<sub>F</sub>), the accumulation level of hrs203J transcripts, which are correlated with controlled cell death in *Solanaceae* plants as diverse as tobacco and tomato (Pontier

**Table 1** Symptoms and virus titres of wild-type, synthetic, assortant and chimeric *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) strains in inoculated and apical leaves of *Nicotiana occidentalis*.

Inoculum*		Expt†	Ratio‡	Symptoms on leaves§		Virus titre¶ (µg of virus/g of fresh leaf tissue)			
				Inoculated	Apical	Inoculated		Apical	
Wild-type	GHu	1	10/10	–	Mosaic	51.1	(±6.1)	45.0	(±7.2)
	F13	1	3/10	NL	–	1.7	(±0.5)	0	(±0.0)
Synthetic			7/10	NL	CNS to LD	2.3	(±0.6)	3.0	(±2.9)
	G1G2	1	10/10	–	Mosaic	61.5	(±6.2)	54.1	(±8.9)
	G1G2	2	10/10	–	Mosaic	50.0	(±6.4)	51.5	(±9.8)
	F1F2	1	10/10	NL	–	1.9	(±0.4)	0	(±0.0)
	F1F2	2	10/10	NL	–	1.2	(±0.4)	0	(±0.0)
Assortant	F1G2	1	10/10	–	Mosaic	74.4	(±11.3)	39.3	(±9.8)
	G1F2	1	3/10	NL	–	2.4	(±0.5)	0	(±0.0)
Chimeric			6/10	NL	CNS to LD	2.6	(±0.5)	6.7	(±12.7)
	F1F2(2A <sub>G</sub> )	2	10/10	–	Mosaic	40.0	(±4.1)	68.9	(±10.5)
	G1G2(2A <sub>F</sub> )	2	10/10	NL	CNS to LD	1.3	(±0.5)	10.3	(±6.7)
	F1F2(2A <sub>F</sub> 209G)	2	10/10	–	Mosaic	41.1	(±9.1)	97.6	(±9.5)
	G1G2(2A <sub>G</sub> 209F)	2	1/10	NL	–	0.6		0	
			9/10	NL	CNS to LD	0.8	(±0.4)	23.9	(±20.3)

\*Crude sap of *Chenopodium quinoa* plants infected with wild-type, synthetic, assortant or chimeric GFLV strains was used as inoculum at 350 ng/plant.

†Two independent experiments performed on 18 January (Exp 1) and 1 February (Exp 2) 2016 on 10 plants each. The GFLV assortants G1G2 and F1F2 were used in both experiments.

‡Number of plants showing a given phenotype divided by the total number of inoculated plants.

§Necrotic lesions (NL) or chlorotic and necrotic spots (CNS) to leaf deformation (LD).

¶Virus concentration ± standard deviation (in parentheses) estimated by semi-quantitative double antibody sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA).

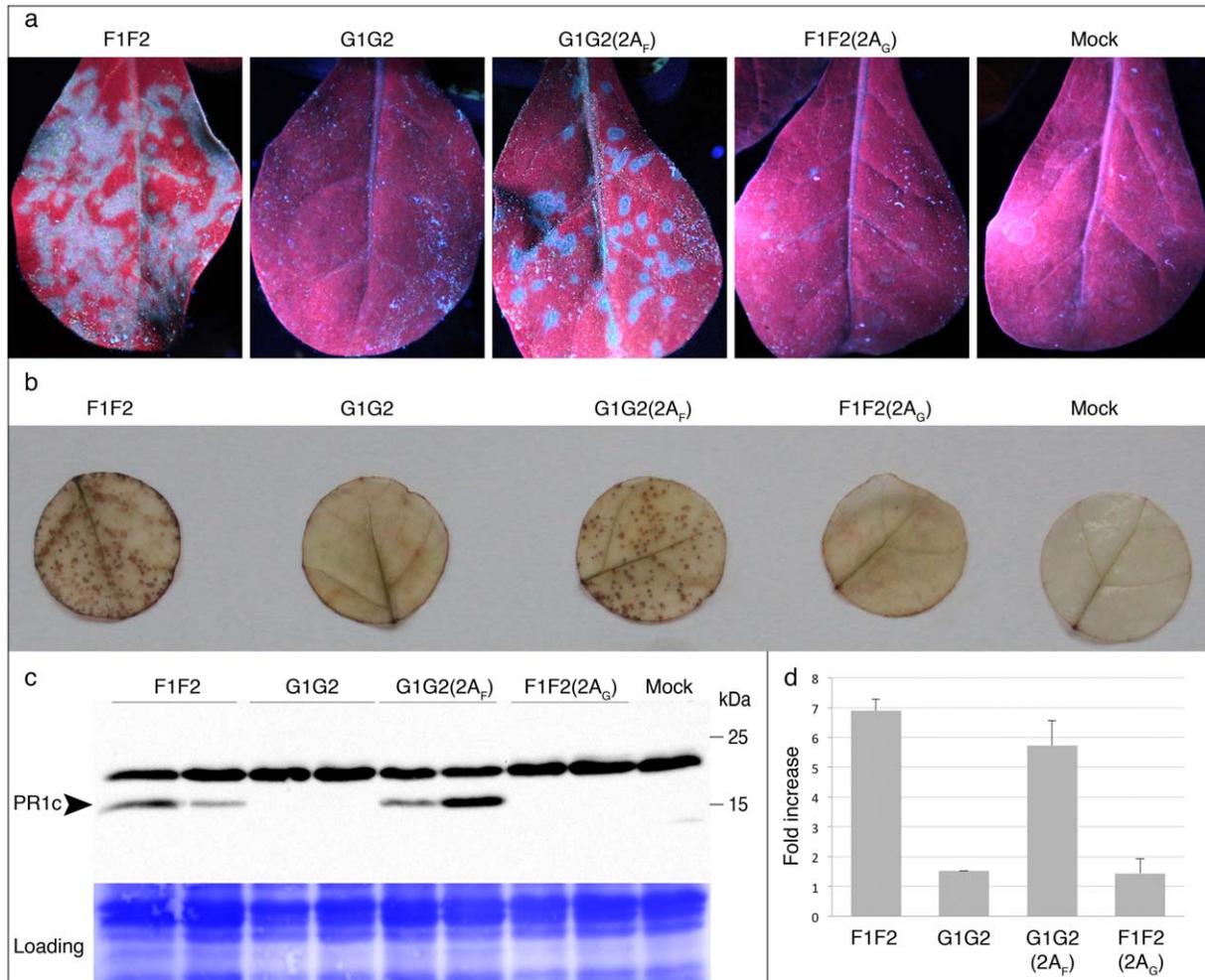
*et al.*, 1994, 1998), was evaluated. As no *hsr203J* sequence was available in public databases for *N. occidentalis* at the onset of this study, primers were designed on the basis of *hsr203J* of *N. tabacum* (GenBank X77136). A unique cDNA fragment of 391 bp was amplified by RT-PCR from total RNA extracts of *N. occidentalis* (GenBank KY363392), which shared 93.9% nucleotide identity with the corresponding fragment of the *N. tabacum hsr203J* gene. From this sequence, new primers were designed for quantitative RT-PCR analysis of the steady-state level of *hsr203J* transcripts in infected *N. occidentalis*. The results indicated a four-fold increased accumulation of *hsr203J* transcripts in necrotic leaves inoculated with synthetic F1F2 and recombinant G1G2(2A<sub>F</sub>), compared with symptomless leaves inoculated with synthetic G1G2 and recombinant F1F2(2A<sub>G</sub>) (Fig. 2d).

Knowing that enhanced production of phytoalexins, ROS, PR proteins and *hsr203J* transcripts is associated with HR (Watanabe and Lam, 2006), we can conclude that the necrotic phenotype of GFLV constructs carrying an F13-2A<sup>HP</sup> coding sequence on *N. occidentalis* corresponds to an HR.

### Protein 2A<sup>HP</sup> of GFLV-F13 elicits HR in *N. occidentalis*

To characterize the viral elicitor of the necrotic response of GFLV-F13 on *N. occidentalis*, an enhanced green fluorescent protein (EGFP)-tagged 2A<sup>HP</sup> protein and a mutant 2A<sup>HP</sup> construct bearing a stop codon downstream of the start codon (construct

2A<sub>F-stop</sub>:EGFP) were used in a transient expression system (Fig. 3a). None of the constructs caused necrosis on *N. benthamiana* plants, ruling out their possible phytotoxicity *in planta*. No fluorescent protein was observed in *N. occidentalis* and *N. benthamiana* by confocal microscopy observations following agroinfiltration of bacteria containing the 2A<sub>F-stop</sub>:EGFP construct, although the production of the corresponding transcript was readily detected by RT-PCR (Fig. 3b). In contrast, EGFP, 2A<sub>F</sub>:EGFP and 2A<sub>G</sub>:EGFP proteins were visible at 2 dpi. In addition, EGFP had a typical nucleocytoplasmic localization, as anticipated, whereas 2A<sub>F</sub>:EGFP and 2A<sub>G</sub>:EGFP formed punctate structures in the cytoplasm (Fig. 3c). This subcellular localization is in agreement with the localization of 2A<sub>F</sub>:GFP in protoplasts either early during infection or in the absence of virus (Gaire *et al.*, 1999). Following the agroinfiltration of *N. occidentalis* leaves, only 2A<sub>F</sub>:EGFP induced chlorosis at 3 dpi in the infiltrated leaf area; this symptom evolved into necrosis at 5–7 dpi. By contrast, no symptoms were visible in leaf patches of *N. occidentalis* infiltrated with agrobacteria carrying 2A<sub>F-stop</sub>:EGFP, EGFP or 2A<sub>G</sub>:EGFP constructs (Fig. 3d). The observation of agroinfiltrated leaf areas under UV light further showed that scopolin and scopoletin production was correlated with the expression of only 2A<sub>F</sub>:EGFP (Fig. 3e). These observations demonstrate that the GFLV-F13 2A<sup>HP</sup> protein, rather than its coding RNA sequence, induces necrosis on *N. occidentalis*.



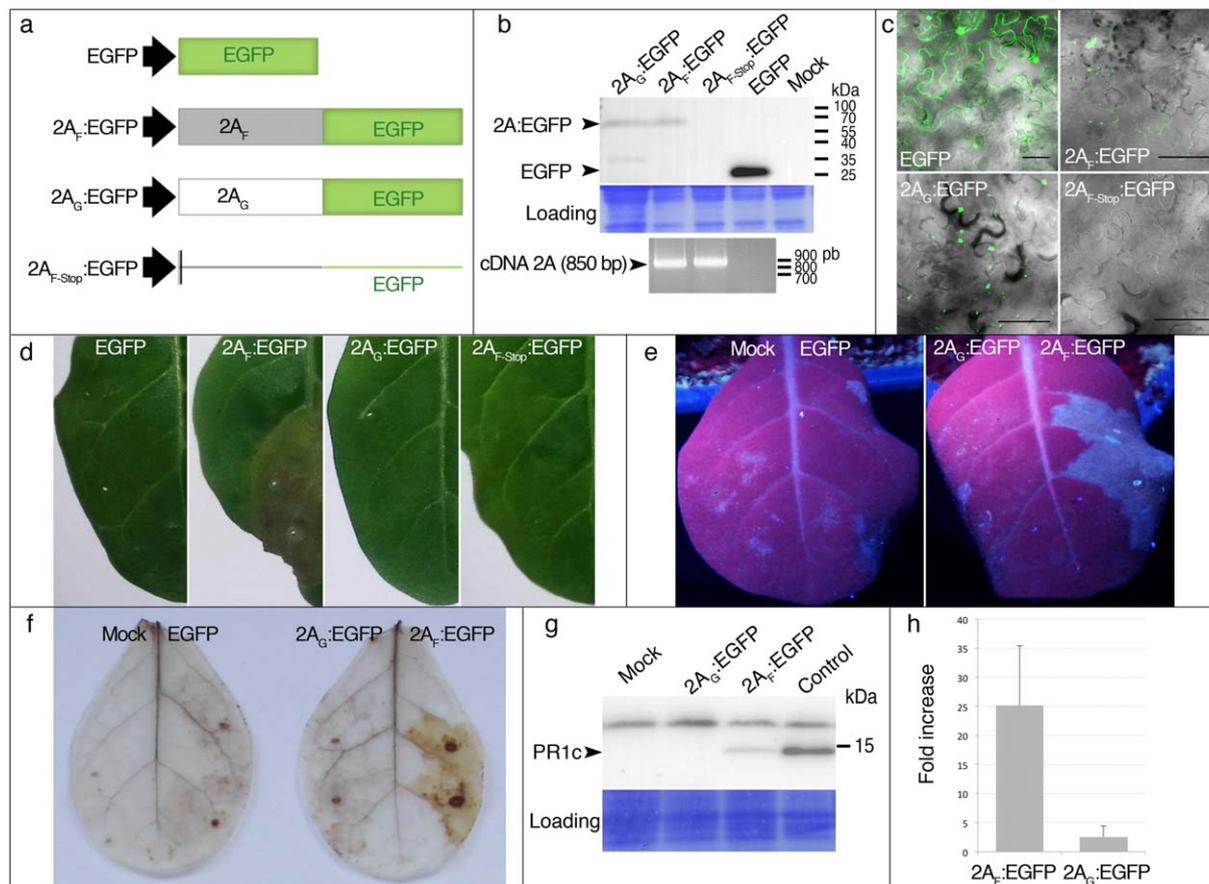
**Fig. 2** Induction of hypersensitive reaction (HR) markers by synthetic, assortant and chimeric *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) strains on inoculated leaves of *Nicotiana occidentalis*. (a) Leaves infected with F1F2 and G1G2(2A<sub>F</sub>) photographed under UV (354 nm) light show a fluorescent blue halo of phytoalexin-producing cells around the necrotic lesions. (b) 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) staining of hydrogen peroxide production in leaf discs infected with F1F2 and G1G2(2A<sub>F</sub>) at 3 days post-inoculation (dpi). (c) Western blot analysis of pathogenesis-related 1c (PR1c) protein accumulation at 10 dpi. Total protein samples of two separate plants are shown for each construct. (d) Relative accumulation of hypersensitivity-related (hr) 203J transcripts as determined by quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) compared with mock-inoculated plants using EF1α transcripts as a reference (mock inoculation consisted here in rubbing the leaves with grinding buffer).

Transient expression of 2A<sub>F</sub>:EGFP induced the accumulation of HR markers, such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PR1c (although weaker than in the viral context) and hsr203J transcripts, in agroinfiltrated leaf patches of *N. occidentalis* (Fig. 3f–h). These observations previously made for necrogenic synthetic F1F2 and recombinant G1G2(2A<sub>F</sub>) confirmed that GFLV-F13 protein 2A<sup>HP</sup> is the viral elicitor of the necrotic phenotype on *N. occidentalis*.

#### The C-terminal 50 amino acids of GFLV-F13 2A<sup>HP</sup> determine HR

Protein 2A<sup>HP</sup> of GFLV strains F13 and GHu (Fig. 4a) contain 258 amino acids, 170 (residues 89–258) of which are included in the

NeA\_P2 motif (pfam12312), a signature motif shared by P2 polyproteins of subgroup A nepoviruses that also encompass the 2B<sup>MP</sup> and 2C<sup>CP</sup> coding sequences. The 88 residues upstream of this motif constitute the N-terminal region of protein 2A<sup>HP</sup>. Sequence analysis with myHits (<http://myhits.isb-sib.ch>) highlighted the existence of two regions particularly rich in proline (Pro) residues, both including a four to five Pro stretch. These regions were designated PRM1 for Proline Rich Motif-1 (amino acids 86–118) and PRM2 (amino acids 199–214). The highest divergence (34%) between the F13 and GHu protein 2A<sup>HP</sup> sequence is in the C-terminal region downstream of the second PRM (amino acids 215–258). Interspecies recombination between GFLV and *Arabis mosaic virus* (ArMV) at the origin of the mosaic structure in the

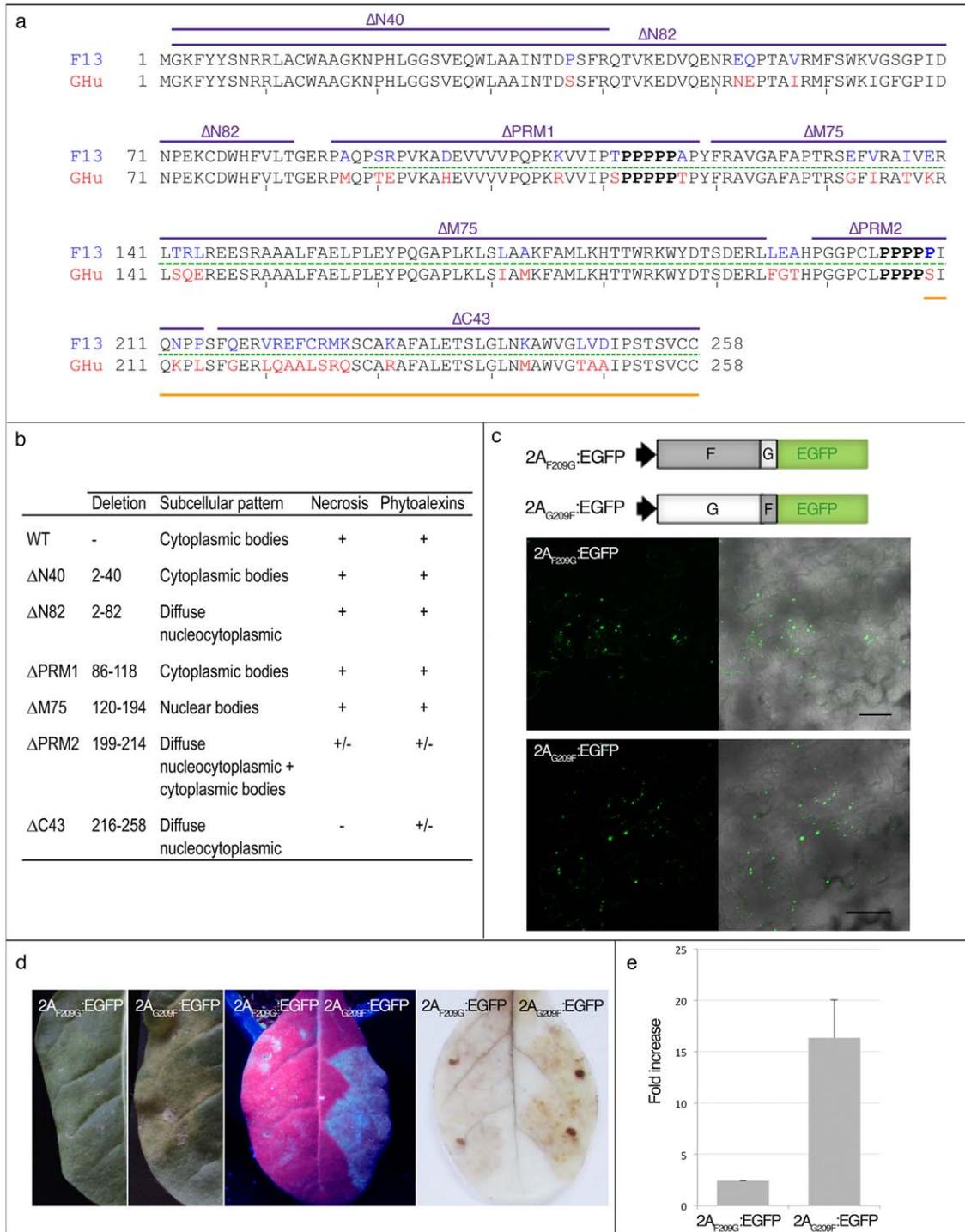


**Fig. 3** Protein 2A<sup>HP</sup> of GFLV strain F13 elicits necrosis on *Nicotiana occidentalis*. (a) Constructs used to transiently express protein 2A<sup>HP</sup> of GFLV in fusion with EGFP or its coding RNA. Black arrows represent the 35S promoter, horizontal lines represent untranslatable sequences and the vertical line represents the mutated initiation and stop codons. (b) Expression of the GFLV 2A<sup>HP</sup> EGFP-tagged constructs was verified by western blot using anti-GFP antibodies and/or by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) using 2A<sup>HP</sup>-specific primers. (c) Proteins 2A<sub>F</sub>:EGFP and 2A<sub>G</sub>:EGFP form cytoplasmic aggregates, whereas EGFP shows a nucleocytoplasmic localization. No fluorescence is detected with the 2A<sub>F-Stop</sub>:EGFP construct. Scale bar, 50 μm. Confocal images show the superimposition of fluorescence and differential interference contrast (DIC) channels in *N. benthamiana*. (d–h) Agroinfiltrated patches of *N. occidentalis*. (d) Patches photographed at 5 dpi under visible light. (e) Phytoalexin production photographed at 3 dpi under UV light. Detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> DAB staining (f), pathogenesis-related 1c (PR1c) by western blot (g) and hypersensitivity-related (hrs) 203J transcripts by quantitative RT-PCR (h). The mock sample was infiltrated with agroinfiltration buffer only. Fold increase indicates expression compared with plant patches expressing unfused EGFP.

C-terminus of GFLV-GHu protein 2A<sup>HP</sup> accounts for this high divergence in the C-terminal part of the protein (Vigne *et al.*, 2008), rather than in its N-terminal region, which shows only 4.5% divergence.

Because sequence alignments were not very useful at informing the domain of protein 2A<sup>HP</sup> responsible for the necrotic phenotype on *N. occidentalis*, a series of deletion mutants was constructed for transient expression assays (Fig. 4a). When expressed as fusion products to EGFP in *N. occidentalis* leaves, the mutant proteins, ΔN46, ΔN82, ΔPRM1 and ΔM75, elicited a necrotic patch at 5–7 dpi and a blue halo was observed under UV illumination at 2 or 3 dpi, similar to the WT control (Fig. 4b). No necrosis was observed with protein ΔC43, in which the 43 C-

terminal residues are deleted, whereas necrosis was very weak with protein ΔPRM2, in which the second PRM is deleted. In addition, the blue halo under UV illumination was weaker for these two mutants. The drastic reduction in the response of *N. occidentalis* infiltrated with mutant proteins with deletion of the 58 C-terminal residues suggests the involvement of the protein 2A<sup>HP</sup> C-terminus in the HR. However, large deletions can cause changes in protein stability, conformation or localization, revealing an indirect involvement of the deleted region rather than a direct and active effect. This possibility was suggested for some deletion 2A<sup>HP</sup> mutants by their altered subcellular localization (Fig. 4b). Thus, to confirm the role of the C-terminus of GFLV-F13 protein 2A<sup>HP</sup> in the necrotic response of *N. occidentalis*, the



**Fig. 4** The 50 C-terminal residues of protein 2A<sup>HP</sup> of GFLV strain F13 elicit HR. **a**. Sequence alignment of proteins 2A<sub>F</sub> and 2A<sub>G</sub>. Common residues are in black and divergent residues are in blue (F13) and red (GHu). The proline residues conserved among nepoviruses are in bold. The green dotted line represents the sequence of the NeA\_P2 conserved domain. The purple lines delineate deleted residues in the 2A<sub>F</sub> mutants. The orange line underlines the 50 residues selected for reciprocal exchange. **b**. Subcellular localization and phenotype of protein 2A<sup>HP</sup> mutants when transiently expressed in *N. occidentalis* leaves as a fusion to EGFP. **c**. Schematic representation of the two recombinant 2A<sup>HP</sup> constructs with the swapped residues and their expression in *N. occidentalis* observed by confocal microscopy. Scale bar: 50 μm. Protein 2A<sup>HP</sup> containing the fifty distal residues of GFLV-F13 induced necrotic symptoms (**d**, second left panel), the production of phytoalexins visualized under UV (**d**, middle panel), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as shown by DAB staining (**d**, right panel) and an increase in the steady state level of *hsr203* transcripts as measured by RT-qPCR (**e**). Fold increase represents the relative level of expression compared to the EGFP-expressing control.

last 50 amino acids were exchanged in two reciprocal recombinant clones. These 50 residues span the PRM2 and C-terminal domain containing divergent amino acids. The recombinant clones were called 2A<sub>F209G</sub>:EGFP and 2A<sub>G209F</sub>:EGFP, where the first subscript letter indicates the GFLV strain from which the N-terminus originated, the second subscript letter indicates the strain from which the C-terminus originated and 209 gives the position of the first swapped residue (Fig. 4a,c). The EGFP-tagged chimeric proteins exhibited the same cytoplasmic fluorescent aggregates as the parental proteins (Fig. 4c), suggesting that recombination did not substantially disrupt the correct folding of the protein.

The expression of recombinant protein 2A<sub>G209F</sub>:EGFP (which contains the 50 C-terminal amino acids of GFLV-F13) induced a necrotic reaction on agroinfiltrated *N. occidentalis* leaves at 5–7 dpi, preceded by the production of phytoalexins and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, and an increased accumulation of *hsr203J* transcripts, similar to 2A<sub>F</sub>:EGFP. By contrast, the expression of recombinant protein 2A<sub>F209G</sub>:EGFP caused no symptoms, similar to the 2A<sub>G</sub>:EGFP control (Fig. 4d,e). These results show that the HR-eliciting property of the GFLV-F13 protein 2A<sup>HP</sup> maps to the 50 distal amino acids.

#### Do the C-terminal 50 amino acids of GFLV-F13 2A<sup>HP</sup> limit virus propagation?

To test whether the C-terminus of protein 2A<sup>HP</sup> is involved in virus restriction, recombinant 2A<sup>HP</sup> coding sequences were introduced back into the GFLV RNA2 cDNAs to engineer the recombinants F1F2(2A<sub>F209G</sub>) and G1G2(2A<sub>G209F</sub>). Recombinant F1F2(2A<sub>F209G</sub>) reproduced a compatible reaction with no symptoms on inoculated leaves and a mosaic on apical leaves, as observed in plants infected with viral constructs harbouring the GFLV-GHu protein 2A<sup>HP</sup> sequence (Table 1 and Fig. S1a, see Supporting Information). In addition, the virus titre was comparably high to that of inocula encoding the GFLV-GHu protein 2A<sup>HP</sup>. Reciprocally, recombinant G1G2(2A<sub>G209F</sub>) reproduced the necrotic lesions on inoculated leaves (Fig. S1b) and the virus titre was low (1 µg/g of fresh leaf tissue in inoculated leaves), confirming the results from transient expression experiments (Table 1). The two phenotypes on apical leaves (no symptoms or chlorotic and necrotic spots to leaf deformation) were identical to those observed with other viral constructs carrying the GFLV-F13 protein 2A<sup>HP</sup>. Either no virus or less than 1 µg of virus/g of leaf tissue were detected, showing that the C-terminal 50 amino acids of 2A<sub>F</sub> limit virus propagation, although virus accumulation occurs in uninoculated apical leaves (Table 1). The sequence of the complete genome progeny was verified to correspond to the recombinant inocula. Together, these results show, in both a loss- and gain-of-function approach, that the C-terminal 50 amino acids of GFLV-F13 protein 2A<sup>HP</sup> elicit an HR that limits virus propagation.

## DISCUSSION

In this work, we have demonstrated, by reciprocal exchanges made in the infectious clones of two GFLV strains, that protein 2A<sup>HP</sup> of GFLV-F13 determines a strain-specific necrosis on inoculated leaves of the herbaceous host *N. occidentalis*. The accumulation of hallmarks of HR, i.e. phytoalexins, ROS, PR1c and *hsr203J* transcripts, revealed that the necrotic phenotype fulfils the criteria of a *bona fide* HR. Transient expression of protein 2A<sup>HP</sup> fused to an EGFP tag demonstrated that the protein is sufficient to trigger HR and can therefore be considered as an Avr factor. The use of an untranslatable sequence further showed that the protein, rather than the RNA, elicits an HR. These features are consistent with those of the vast majority of Avr factors described so far (de Ronde *et al.*, 2014), with only very limited examples of avirulent RNAs (Szittyá and Burgyán, 2001).

This work, demonstrating the role of 2A<sup>HP</sup> as a viral determinant of symptoms in an incompatible interaction between GFLV and *N. occidentalis*, completes a previous study on other Nicotianae plants, where 1E<sup>Pol</sup> was shown to determine the mosaic symptoms in a compatible reaction (Vigne *et al.*, 2013). This specificity suggests that protein 2A<sup>HP</sup> of GFLV-F13 interacts with a resistance gene product; either directly or via a guard factor, only in this particular *Nicotiana* species, and not in other tested Nicotianae. This hypothesis is corroborated by the absence of necrosis on transient expression of 2A<sub>F</sub>:EGFP or 2A<sub>G209F</sub>:EGFP proteins in *N. benthamiana* (this work), and by the similar accumulation of F13 and GHu strains in *N. benthamiana* or *N. clevelandii* (Vigne *et al.*, 2013).

GFLV-F13 protein 2A<sup>HP</sup> is the first Avr factor identified in the genus *Nepovirus* that accounts for HR triggered by a viral infection on a host plant. Transient expression of a portion of the helicase protein of *Tobacco ringspot virus* (TRSV, another subgroup A nepovirus), which encompasses an amphipathic helix, induces cell death in *N. benthamiana* (Hashimoto *et al.*, 2015). However, this necrotic phenotype is not observed in TRSV-infected *N. benthamiana*, a result that questions the link between virus-induced symptoms and the elicitor activity of the amphipathic helix (Hashimoto *et al.*, 2015). Similarly, an RNA structure of *Grapevine chrome mosaic virus* (GCMV) expressed in a viral vector induced necrosis in host and non-host *Nicotiana* species (Fernandez *et al.*, 1999), a phenotype which is not observed in GCMV-infected plants. Such symptoms induced by viral sequences only when expressed outside of the viral context could indicate either an intrinsic property of the RNA sequence, which is counteracted during virus infection, or an interaction with a host factor that does not exist during the infection cycle.

Based on sequence comparisons between nepovirus isolates and the fact that the GFLV 2A<sup>HP</sup> coding sequence seems to be under weaker selection pressure than other coding sequences (Oliver *et al.*, 2010), the N-terminal region of protein 2A<sup>HP</sup> was

predicted as a host or symptom determinant in grapevine (Elbeaino *et al.*, 2014). Here, the GFLV protein 2A<sup>HP</sup> was shown to determine symptomatology on *N. occidentalis*; however, the 50 C-terminal residues cause the necrotic phenotype. Although globally more conserved among nepoviruses, this region contains 17 different residues between GFLV strains F13 and GHu. As it is not uncommon for single amino acids to act as symptom determinants (Divéki *et al.*, 2004; Hasiów-Jaroszewska *et al.*, 2011; Kagiwada *et al.*, 2005; Ozeki *et al.*, 2006), these 17 different residues could be tested individually to identify the minimal number of amino acid(s) involved in the necrotic response of *N. occidentalis* to GFLV-F13 infection. Alternatively, a more complex amino acid pattern could determine symptomatology, as is the case for the tobacco vein necrosis symptoms induced by *Potato virus Y<sup>N</sup>* isolates, for which three amino acids scattered throughout the HC-Pro sequence (N<sub>339</sub>, K<sub>400</sub> and E<sub>419</sub>) are important determinants, although they do not alone explain all known relationships between genotype and phenotype (Faurez *et al.*, 2012).

The Avr role of protein 2A<sup>HP</sup> of GFLV-F13 was determined in the context of virus infection by gene exchanges between two GFLV strains, making sure the sequence was in a viral background very similar to that from which it originated (Szittyá and Burgyán, 2001). This feature has the advantage of avoiding the use of a vector derived from a heterologous virus, a system which can modify the virulence activity of a viral factor (Li *et al.*, 1999; Szittyá and Burgyán, 2001). The Avr nature of protein 2A<sup>HP</sup> of GFLV-F13 was further verified and mapped in a transient expression assay as a C-terminal fusion to EGFP. In the absence of this fusion, no necrosis was observed (data not shown). As an anti-2A serum is unavailable, the expression and stability of protein 2A<sup>HP</sup> could not be analysed. The instability of an unfused protein 2A<sup>HP</sup> has been hypothesized previously to explain the need for non-viral sequences in GFLV RNA2 replication during protoplast transfection (Gaire *et al.*, 1999). The coding sequence of both the 2B<sup>MP</sup> and 2C<sup>CP</sup> products could be deleted without affecting the RNA2 replication, as long as the 2A<sup>HP</sup> sequence was fused to the GFP coding sequence. This was interpreted as a possible need for a protein stabilization role by the downstream heterologous coding sequence, although this hypothesis was not further tested with non-coding sequences. In the context of an HR elicitor, a similar need for protein 2A<sup>HP</sup> stabilization could be critical for a direct or an indirect recognition of the host R protein.

The local HR induced by WT GFLV-F13, synthetic assortant G1F2 and recombinants G1G2(2A<sub>F</sub>) and G1G2(2A<sub>G209F</sub>) is insufficient to restrict the virus to the inoculation sites in all inoculated plants. Indeed, only a small proportion of the inoculated plants showed a complete absence of virus accumulation in the uninoculated apical leaves, although necrosis was visible on inoculated leaves (Table 1).

It is probable that viral escape did not result from viral mutations, as indicated by the sequencing of large segments of the

progeny genome. Thus, the variability in the level of resistance to GFLV infection most probably reflects the dynamics of virus–plant interaction outcomes, with some plants reacting rapidly and sufficiently strongly to establish an efficient resistance, whereas other plants react slowly or weakly and fight with limited efficacy against the virus (Künstler *et al.*, 2016). Alternatively, the virus could replicate more rapidly in the latter plants and overcome the plant defence. In both cases, a variable physiological state of the plants could explain the differences in the outcome of the competition between plant defence and virus spread. An inefficient systemic resistance following an initial HR-type symptom induction has been described previously in tobacco plants infected with ToRSV, a subgroup C nepovirus, which is partially restricted in only a fraction of plants (Jovel *et al.*, 2011). Thus, nepoviruses belong to an increasing list of viruses for which there is no strict correlation between HR and virus restriction (Bendahmane *et al.*, 1999; Chu *et al.*, 2000; Culver and Dawson, 1989; Sekine *et al.*, 2006).

The mechanism by which the virus is partially restricted in our model plant remains to be explored. Induced cell death and defence reactions by the HR could explain the limited virus multiplication and spread. Alternatively, as protein 2A<sup>HP</sup> is involved in RNA2 replication (Gaire *et al.*, 1999), and thus indirectly in encapsidation and movement, the host resistance gene could act directly by inhibiting virus replication and movement. However, many Avr factors act independently of virus accumulation (Hasiów-Jaroszewska *et al.*, 2011; Mansilla *et al.*, 2009; Schoelz, 2006). Future experiments will aim to uncouple these two functions of GFLV protein 2A<sup>HP</sup>.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Virus strains and corresponding infectious cDNA clones

Strains F13 and GHu of GFLV (Ritzenthaler *et al.*, 1991; Serghini *et al.*, 1990; Vigne *et al.*, 2008) were propagated on *Chenopodium quinoa*. Full-length cDNA clones corresponding to all genomic RNAs under the control of the T7 transcription promoter were available at the onset of this study for the *in vitro* synthesis of infectious transcripts (Vigne *et al.*, 2013; Viry *et al.*, 1993). Transcripts F1, F2, G1 and G2 correspond to RNA1 of GFLV-F13, RNA2 of GFLV-F13, RNA1 of GFLV-GHu and RNA2 of GFLV-GHu, respectively.

### Development of chimeric GFLV-F13 and GFLV-GHu RNA2

PCRs for cloning purposes were carried out using the Phusion polymerase (Finnzyme, Vantaa, Finland). Plasmid pGORF2 (Vigne *et al.*, 2013) containing the P2 coding sequence of GFLV-GHu and the 5' and 3' UTRs of GFLV-F13 (Fig. S2b, see Supporting Information) was digested with *AlwNI* and *AgeI*. The 1815-nucleotide-long fragment was cloned into plasmid pF2 after *AlwNI/AgeI* digestion. The resulting pF2(2A<sub>G</sub>) plasmid contains the

2A<sup>HP</sup> coding sequence of GFLV-GHu in a GFLV-F13 backbone. As a result of the use of a restriction site within the 2B<sup>MP</sup> coding sequence, pF2(2A<sub>G</sub>) also encodes an arginine (Arg) residue of GHu origin at the fourth position of the 2B<sup>MP</sup> coding region (Fig. S2c). The reciprocal plasmid pG2(2A<sub>F</sub>) was obtained by overlap PCR extension (Ho *et al.*, 1989). The GFLV-F13 2A<sup>HP</sup> coding sequence was PCR amplified with primers G80 and G79, whereas the GFLV-GHu RNA2-5'UTR was PCR amplified with primers G78 and G82 (Table S1, see Supporting Information). These overlapping fragments were assembled by PCR amplification using primers G78 and G79, and the amplicon was inserted into an *AlwNI/AgeI*-digested plasmid pG2 to give rise to plasmid pG2(2A<sub>F</sub>). It is noteworthy that this recombinant plasmid also codes for a lysine (Lys) residue of F13 origin at the fourth position of the GHu-2B<sup>MP</sup> sequence (Fig. S2c).

Plasmids pG2(2A<sub>G209F</sub>) and pF2(2A<sub>G209F</sub>), allowing the transcription of the recombinant RNAs G2(2A<sub>G209F</sub>) and F2(2A<sub>F209G</sub>), were assembled from plasmids pG2 and pF2 by replacing the *RsrII/AgeI* restriction fragments by the corresponding fragments amplified from pK7FWG2-2A<sub>G209F</sub> and pK7FWG2-2A<sub>F209G</sub> (see 'Transient expression of WT and mutant 2A<sup>HP</sup> proteins' section) with primers E28 and E46, and primers E28 and E45, respectively.

All plasmids were amplified in *Escherichia coli* and checked by enzyme restriction and sequencing (primers in Table S2, see Supporting Information).

### ***In vitro* transcription of viral cDNA clones and mechanical inoculation**

Transcripts were synthesized by *in vitro* transcription of the corresponding linearized plasmids using the mMESSAGe mMACHINE T7 kit (Ambion, Foster City, California, USA). *C. quinoa* plants (four- to six-leaf stage) were mechanically inoculated by rubbing the leaf blades with transcripts corresponding to WT or recombinant GFLV-RNA1 and GFLV-RNA2, or combinations thereof. Symptoms were monitored at 6–14 dpi and systemic infection was assessed in uninoculated apical leaves at 14 dpi by DAS-ELISA (Vigne *et al.*, 2013). *N. occidentalis* plants (four- to six-leaf stage) were mechanically inoculated with the crude sap of infected *C. quinoa* after estimating the virus titre by semi-quantitative DAS-ELISA and adjusting the inoculum to 350 ng per plant (corresponding to crude sap of 1.2–3.5 g of infected *C. quinoa* leaf tissue). Symptoms were monitored for at least 14 dpi and virus accumulation in inoculated and uninoculated leaves was estimated by semi-quantitative DAS-ELISA at 10 dpi. These inoculation experiments were repeated at least twice with passages or purified viruses.

### **Sequencing of GFLV progeny**

The progeny of WT (F13 and GHu), synthetic (F1F2 and G1G2), assorted (F1G2 and G1F2) and chimeric (F1F2-2A<sub>G</sub>, G1G2-2A<sub>F</sub>, F1F2-2A<sub>F209G</sub> and G1G2-2A<sub>G209F</sub>) viruses were characterized at 10 dpi by IC-RT-PCR (Vigne *et al.*, 2004). The RT reaction was primed using oligo(dT) or random primers. PCR was performed with specific primer pairs, generating eight and five overlapping fragments for RNA1 and RNA2, respectively. Sequencing covered almost the complete RNA1 (nucleotides 160–7270) and RNA2 (nucleotides 60–3780) for recombinants F1F2-2A<sub>F209G</sub> and G1G2-2A<sub>G209F</sub>, and from the end of the 1E<sup>Pol</sup> coding sequence to the 3' UTR end of RNA1

(nucleotides 6530–7270) and from the end of the 2A<sup>HP</sup> coding sequence into the 2B<sup>MP</sup> coding sequence of RNA2 (nucleotides 800–1500) for all the other virus constructs. The primers used for sequencing are listed in Table S2.

### **Detection of GFLV by DAS-ELISA and semi-quantitative DAS-ELISA**

GFLV detection by DAS-ELISA and virus titre determination in *N. occidentalis* by semi-quantitative DAS-ELISA were performed as described previously (Vigne *et al.*, 2013). The virus concentration in the crude sap of *C. quinoa* was estimated for inoculum calibration in a rapid (1-day) semi-quantitative DAS-ELISA by reducing the incubation times (Table S4, see Supporting Information) to allow for same-day inoculations.

### **Transient expression of WT and mutant 2A<sup>HP</sup> proteins**

Gateway technology (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) was used to construct plasmids for transient expression. The GFLV-F13 and GFLV-GHu 2A<sup>HP</sup> coding region was PCR amplified and flanked with attB1 and attB2 recombination sequences, from pF2 and pG2, using primers m36 and m44, and primers 104 and 105, respectively (Table S1). After a first recombination into the donor plasmid pDonR/Zeo, the 2A<sup>HP</sup> coding sequences were further recombined into the destination vector pK7FWG2 (Karimi *et al.*, 2002).

To transiently express recombinant proteins 2A<sub>F209G</sub> and 2A<sub>G209F</sub>, plasmids pK7FWG2-2A<sub>F209G</sub> and pK7FWG2-2A<sub>G209F</sub> were constructed with overlap PCR extension (Fig. S3a, see Supporting Information). For pK7FWG2-2A<sub>F209G</sub>, an N-proximal fragment was amplified using pF2 as a template and primers E31 and E34, whereas the C-terminal fragment was amplified from plasmid pG2 with primers E33 and E29 (Table S1). The amplicons were assembled and flanking attB1 and attB2 sequences were added during a third amplification PCR with primers m36 and 105. The resulting fragment was successively recombined into pDonR/Zeo and pK7FWG2 Gateway vectors. The reciprocal pK7FWG2-2A<sub>G209F</sub> was similarly obtained from plasmid pG2 with primers E30 and E34, and plasmid pF2 with primers E33 and E32 (Table S1). The fragments were assembled together and flanked with attB sequences with primers 104 and m44 prior to recombination into pDonR/Zeo and pK7FWG2 vectors.

As a result of the Gateway cassette in the pK7FWG2 vector, a non-recombined vector does not correspond to a classical empty control vector and, consequently, would not allow expression of the EGFP tag. Thus, we recombined the pDonR/Zeo vector with a DNA fragment (amplified from the TagRFP sequence with primers 511 and 512) flanked by two *AvrII* restriction sites, one immediately downstream of the attB1 sequence and the second, together with an initiation codon, immediately upstream of the attB2 sequence. The removal of the *AvrII* restriction fragment from the entry clone prior to recombination into pK7FWG2 resulted in plasmid pK7FWG2-Control, which only differs from the pK7FWG2-2A constructs by an extra *AvrII* site and the absence of any 2A<sup>HP</sup> coding sequence (Fig. S3b). This plasmid allows the expression of an untagged EGFP.

Plasmid pK7FWG2-2A<sub>F-stop</sub>, which allows the transcription of an untranslatable RNA, was obtained by recombination of the destination vector with a mutagenized entry vector. Mutagenesis was performed using the Quick Change II kit (Stratagene, San Diego – La Jolla, California,

USA), the reverse primer m44 and the mutagenic forward primer IM11, in which (i) the start codon ATG is changed into TTG and (ii) the fifth sense codon (TAT) is changed into a stop codon (TAA).

Deletion mutants within protein 2A<sup>HP</sup> were constructed as follows: (i) by PCR using primers m37, m38, m44, m43 and m36 containing attB1 or attB2 recombination sequences fused to the target border sequence, for the N- and C-terminal deletions  $\Delta$ N40,  $\Delta$ N82 and  $\Delta$ C43, and subsequent recombination into the pDonR/Zeo donor plasmid; (ii) by inverse PCR on the pDonR/Zeo-2A<sub>F</sub> plasmid using the Quick Change kit and the mutagenic primers m39 with m40 and m41 with m42 for internal deletions  $\Delta$ PRM1 and  $\Delta$ PRM2; and (iii) by restriction digestion of the pDonR/Zeo-2A<sub>F</sub> plasmid with EcoNI, Klenow filling and ligation for  $\Delta$ M75. All the mutant constructs were sequenced, recombined into the pK7FWG2 destination vector and further checked by restriction digestion and sequencing, before transformation of *Agrobacterium tumefaciens* strain GV3101::pMP90 (Koncz *et al.*, 1994) by heat shock (Sparkes *et al.*, 2006) or electroporation. For protein expression, freshly transformed or streaked agrobacteria were grown overnight at 28 °C, centrifuged, washed and resuspended in 10 mM 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES), pH 5.7, 10 mM MgCl<sub>2</sub> at an optical density at 600 nm (OD<sub>600</sub>) of 0.4–0.5 prior to plant infiltration. To optimize protein expression, agrobacteria with a binary plasmid encoding the *tomato bushy stunt virus* suppressor of silencing P19 were co-infiltrated at a 1 : 1 ratio in all samples, including the EGFP-expressing control. The transient expression of recombinant 2A proteins fused to EGFP was conducted at least four times on four to nine plants.

### Protein extraction and western blot analysis

For the detection of PR1c, total proteins were extracted from agroinfiltrated leaf patches (2–5 dpi) or inoculated leaves (8–10 dpi) of *N. occidentalis* in phosphate-buffered saline, pH 7.4, in the presence of protease inhibitors (Complete, Roche, Basel, Switzerland). For the detection of protein 2A:EGFP, proteins were extracted with phenol and precipitated with ammonium acetate in methanol (Hurkman and Tanaka, 1986). In both cases, proteins were resolved by electrophoresis in sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gels and electrotransferred onto Immobilon Polyvinylidene fluoride (PVDF) membranes. Specific polyclonal PR1c and GFP antisera, kindly provided by T. Heitz (Heitz *et al.*, 1994) and D. Scheidecker, were used in western blot analysis at 1 : 5000 and 1 : 10 000 dilutions, respectively. Horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit antibodies (1 : 12 500) and the lumi-light chemiluminescence system (Roche) were used for antigen detection. Loading was controlled by Coomassie blue staining.

### Gene expression analysis by quantitative RT-PCR

Total RNA was extracted from 50 mg of *N. occidentalis* leaf tissue using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). After DNase treatment, 1 µg of total RNA was reverse transcribed in 20 µL using the SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and oligo(dT) primers. Quantitative PCRs were performed in a CFX96 system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using SsoFast™EvaGreen®Supermix. Thermal cycling conditions were 30 s at 95 °C, followed by 40 cycles of 5 s at 95 °C, 5 s at 55 °C and 30 s at 72 °C. The results were normalized to the expression of three reference genes, Actin (GenBank JQ256516.1), Cdc2

(GenBank D50738.1) and EF1 $\alpha$  (GenBank AY206004.1), as described previously (Vandesompele *et al.*, 2002). The relative expression (fold induction) compared with appropriate controls (mock-inoculated leaves for the infection experiments and EGFP-expressing leaf patches for the transient expression experiments) was calculated with the Livak method ( $\Delta\Delta C_t$ ) after primer efficiencies had been checked. Mean values and standard deviations were obtained from at least three technical and two biological replicates. The primers used are listed in Table S3 (see Supporting Information).

### Plant growth conditions

*N. occidentalis*, *N. benthamiana* and *C. quinoa* plants were grown in a glasshouse at 22 °C (with fluctuations from 18 to 26 °C) with a 14-h/10-h (light/dark) photoperiod. Agroinfiltrated plants were transferred to a growth chamber with an 18 °C/22 °C (day/night) temperature regime and a 14-h/10-h (light/dark) photoperiod.

### DAB staining

Staining of entire leaves or leaf discs with DAB was performed as described previously (Daudi and O'Brien, 2012).

### ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Lalaina Rakotomalala and Shahinez Garcia for technical assistance, Drs Jean-Michel Hily and Julie Chong for helpful discussions, and Dr Thierry Heitz and Danièle Scheidecker for the generous gift of anti-PR1c and anti-GFP sera, respectively. This work was supported in part by INRA and by a fellowship from Moët & Chandon, Comité Interprofessionnel du Vin de Champagne, Bureau Interprofessionnel des Vins de Bourgogne and the Conseil Interprofessionnel des Vins d'Alsace to I.R.M.

### REFERENCES

- Andret-Link, P., Laporte, C., Valat, L., Ritzenthaler, C., Demangeat, G., Vigne, E., Laval, V., Pfeiffer, P. and Fuchs, M. (2004) *Grapevine fanleaf virus*: still a major threat to the grapevine industry. *J. Plant Pathol.* **86**, 183–195.
- 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.
- 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.
- Chu, M., Desvoyes, B., Turina, M., Noad, R. and Scholthof, H.B. (2000) Genetic dissection of tomato bushy stunt virus P19-protein-mediated host-dependent symptom induction and systemic invasion. *Virology*, **266**, 79–87.
- Cornelissen, B.J.C., van Huijsduijnen, R.A.M.H., Van Loon, L.C. and Bol, J.F. (1986) Molecular characterization of messenger RNAs for 'pathogenesis-related' proteins 1a, 1b and 1c, induced by TMV infection of tobacco. *EMBO J.* **5**, 37–40.
- Culver, J.N. and Dawson, W.O. (1989) Point mutations in the coat protein gene of tobacco mosaic virus induce hypersensitivity in *Nicotiana sylvestris*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* **2**, 209–213.
- Dangl, J.L. and Jones, J.D.G. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, **411**, 826–833.
- Daudi, A. and O'Brien, J.A. (2012) Detection of hydrogen peroxide by DAB staining in Arabidopsis leaves. *Bio Protoc.* **2**, e263.
- Dinesh-Kumar, S.P., Tham, W.-H. and Baker, B.J. (2000) Structure–function analysis of the tobacco mosaic virus resistance gene *N*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 14 789–14 794.

- Divéki, Z., Salánki, K. and Balázs, E. (2004) The necrotic pathotype of the cucumber mosaic virus (CMV) Ns strain is solely determined by amino acid 461 of the 1a protein. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **17**, 837–845.
- Elbeaino, T., Kiyi, H., Boutarfa, R., Minafra, A., Martelli, G. and Digiaro, M. (2014) Phylogenetic and recombination analysis of the homing protein domain of grapevine fanleaf virus (GFLV) isolates associated with 'yellow mosaic' and 'infectious malformation' syndromes in grapevine. *Arch. Virol.* **159**, 2757–2764.
- 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.
- Fernandez, I., Candresse, T., Le Gall, O. and Dunez, J. (1999) The 5' noncoding region of grapevine chrome mosaic nepovirus RNA-2 triggers a necrotic response on three *Nicotiana* spp. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **12**, 337–344.
- Fuchs, M., Schmitt-Keichinger, C. and Sanfaçon, H. (2017) A renaissance in nepovirus research provides new insights into their molecular interface with hosts and vectors. *Adv Virus Res.* **97**, 61–105.
- Gaire, F., Schmitt, C., Stussi-Garaud, C., Pinck, L. and Ritzenthaler, C. (1999) Protein 2A of Grapevine fanleaf nepovirus is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replication site. *Virology*, **264**, 25–36.
- Ghoshal, B. and Sanfaçon, H. (2015) Symptom recovery in virus-infected plants: revisiting the role of RNA silencing mechanisms. *Virology*, **479–480**, 167–179.
- Hashimoto, M., Komatsu, K., Iwai, R., Keima, T., Maejima, K., Shiraishi, T., Ishikawa, K., Yoshida, T., Kitazawa, Y., Okano, Y., Yamaji, Y. and Namba, S. (2015) Cell death triggered by a putative amphipathic helix of radish mosaic virus helicase protein is tightly correlated with host membrane modification. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **28**, 675–688.
- Hasiów-Jaroszewska, B., Borodynko, N., Jackowiak, P., Figlerowicz, M. and Pospieszny, H. (2011) Single mutation converts mild pathotype of the Pepino mosaic virus into necrotic one. *Virus Res.* **159**, 57–61.
- Heitz, T., Fritig, B. and Legrand, M. (1994) Local and systemic accumulation of PR proteins in tobacco plants infected with Tobacco mosaic virus. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **7**, 776–779.
- Ho, S.N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K. and Pease, L.R. (1989) Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, **77**, 51–59.
- Hurkman, W. and Tanaka, C. (1986) Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant Physiol.* **81**, 802–806.
- Jovel, J., Walker, M. and Sanfaçon, H. (2007) Recovery of *Nicotiana benthamiana* plants from a necrotic response induced by a nepovirus is associated with RNA silencing but not with reduced virus titer. *J. Virol.* **81**, 12 285–12 297.
- Jovel, J., Walker, M. and Sanfaçon, H. (2011) Salicylic acid-dependent restriction of Tomato ringspot virus spread in tobacco is accompanied by a hypersensitive response, local RNA silencing, and moderate systemic resistance. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **24**, 706–718.
- Kagiwada, S., Yamaji, Y., Komatsu, K., Takahashi, S., Mori, T., Hirata, H., Suzuki, M., Ugaki, M. and Namba, S. (2005) A single amino acid residue of RNA-dependent RNA polymerase in the Potato virus X genome determines the symptoms in *Nicotiana* plants. *Virus Res.* **110**, 177–182.
- Karimi, M., Inzé, D. and Depicker, A. (2002) GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* **7**, 193–195.
- Koncz, C., Martini, N., Szabados, L., Hroudá, M., Bachmair, A. and Schell, J. (1994) Specialized vectors for gene tagging and expression studies. In: *Plant Molecular Biology Manual* (Gelvin, S. and Schilperoort, B., eds.), pp. 1–22. Dordrecht: Kluwer Academic.
- 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.
- Lamb, C. and Dixon, R.A. (1997) The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Phys.* **48**, 251–275.
- Li, H.W., Lucy, A.P., Guo, H.S., Li, W.X., Ji, L.H., Wong, S.M. and Ding, S.W. (1999) Strong host resistance targeted against a viral suppressor of the plant gene silencing defence mechanism. *EMBO J.* **18**, 2683–2691.
- Mansilla, C., Sánchez, F., Padgett, H.S., Pogue, G.P. and Ponz, F. (2009) Chimeras between Oilseed rape mosaic virus and Tobacco mosaic virus highlight the relevant role of the tobamoviral RdRp as pathogenicity determinant in several hosts. *Mol. Plant Pathol.* **10**, 59–68.
- Oliver, J.E., Vigne, E. and Fuchs, M. (2010) Genetic structure and molecular variability of Grapevine fanleaf virus populations. *Virus Res.* **152**, 30–40.
- Ozeki, J., Takahashi, S., Komatsu, K., Kagiwada, S., Yamashita, K., Mori, T., Hirata, H., Yamaji, Y., Ugaki, M. and Namba, S. (2006) A single amino acid in the RNA-dependent RNA polymerase of Plantago asiatica mosaic virus contributes to systemic necrosis. *Arch. Virol.* **151**, 2067–2075.
- Palukaitis, P. (2011) The road to RNA silencing is paved with plant–virus interactions. *Plant Pathol. J.* **27**, 197–206.
- 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 hsr203, a plant gene expressed during incompatible plant–pathogen interactions, is correlated with programmed cell death. *Mol. Plant–Microbe Interact.* **11**, 544–554.
- Ritzenthaler, C., Viry, M., Pinck, M., Margis, R., Fuchs, M. and Pinck, L. (1991) Complete nucleotide sequence and genetic organization of grapevine fanleaf nepovirus RNA1. *J. Gen. Virol.* **72**, 2357–2365.
- de Ronde, D., Butterbach, P. and Kormelink, R. (2014) Dominant resistance against plant viruses. *Front. Plant Sci.* **5**, 307–323.
- Sanfaçon, H. (2008) Nepovirus. In: *Encyclopedia of Virology, 3rd edn.* (Mahy, B.W.J. and van Regenmortel, M.H.V., eds.), pp. 405–413. Oxford: Academic Press.
- Schoelz, J.E. (2006) Viral determinants of resistance versus susceptibility. In: *Natural Resistance Mechanisms of Plants to Viruses* (Loebenstein, G. and Carr, J.P., eds.), pp. 13–43. Dordrecht: Springer.
- Scholthof, K.-B.G. (2008) Tobacco mosaic virus: the beginning of plant pathology. *Online. APSnet Features.* doi: 10.1094/APSnetFeatures-2008-0408
- Sekine, K.-T., Ishihara, T., Hase, S., Kusano, T., Shah, J. and Takahashi, H. (2006) Single amino acid alterations in *Arabidopsis thaliana* RY1 compromise resistance to cucumber mosaic virus, but differentially suppress hypersensitive response-like cell death. *Plant Mol. Biol.* **62**, 669–682.
- Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B.M.A., Cammue, B.P.A. and De Bolle, M.F.C. (2008) Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiol. Biochem.* **46**, 941–950.
- Serghini, M.A., Fuchs, M., Pinck, M., Reinbolt, J., Walter, B. and Pinck, L. (1990) RNA2 of Grapevine fanleaf virus: sequence analysis and coat protein cistron location. *J. Gen. Virol.* **71**, 1433–1441.
- Sparkes, I.A., Runions, J., Kearns, A. and Hawes, C. (2006) Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nat. Protoc.* **1**, 2019–2015.
- Szittyá, G. and Burguán, J. (2001) Cymbidium ringspot tomosvirus coat protein coding sequence acts as an avirulent RNA. *J. Virol.* **75**, 2411–2420.
- Thordal-Christensen, H., Zhang, Z., Wei, Y. and Collinge, D.B. (1997) Subcellular localization of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in plants. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley–powdery mildew interaction. *Plant J.* **11**, 1187–1194.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. and Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, research0034.
- Vigne, E., Bergdoll, M., Guyader, S. and Fuchs, M. (2004) Population structure and genetic variability within isolates of Grapevine fanleaf virus from a naturally infected vineyard in France: evidence for mixed infection and recombination. *J. Gen. Virol.* **85**, 2435–2445.
- Vigne, E., Marmonier, A. and Fuchs, M. (2008) Multiple interspecies recombination events within RNA2 of Grapevine fanleaf virus and Arabis mosaic virus. *Arch. Virol.* **153**, 1771–1776.
- Vigne, E., Gottula, J., Schmitt-Keichinger, C., Komar, V., Ackerer, L., Belval, L., Rakotomalala, L., Lemaire, O., Ritzenthaler, C. and Fuchs, M. (2013) A strain-specific segment of the RNA-dependent RNA polymerase of Grapevine fanleaf virus determines symptoms in *Nicotiana* species. *J. Gen. Virol.* **94**, 2803–2813.
- Viry, M., Serghini, M.A., Hans, F., Ritzenthaler, C., Pinck, M. and Pinck, L. (1993) Biologically active transcripts from cloned cDNA of genomic grapevine fanleaf nepovirus RNAs. *J. Gen. Virol.* **74**, 169–174.
- Watanabe, N. and Lam, E. (2006) The hypersensitive response in plant disease resistance. In: *Multigenic and Induced Systemic Resistance in Plants* (Tuzun, S. and Bent, E., eds.), pp. 83–111. Boston, MA: Springer.

## SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's website:

Table S1 Primers used for cloning.

**Table S2** Consensus or degenerate primers used to sequence virus progeny.

**Table S3** Primers used for quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR).

**Table S4** Comparison of incubation conditions in classical and rapid semi-quantitative double antibody sandwich-enzyme-linked immunosorbent assay (DAS-ELISA).

**Fig. S1** Symptoms induced by the recombinant viruses on *Nicotiana occidentalis* inoculated leaves. (a) Symptomless leaf inoculated with F1F2(2A<sub>F209G</sub>). Note that some mechanical lesions caused by the inoculation procedure are visible. (b) Intense necrotic lesions on a leaf inoculated with G1G2(2A<sub>G209F</sub>).

**Fig. S2** Schematic representation of the plasmids used to generate the chimeric F13/GHu RNA2. (a) Genomic organization of RNA2 of GFLV-F13 and GFLV-GHu. The black circle represents the genome-linked VPg and AAAA symbolizes the polyA tail. Narrow open boxes designate 5' and 3' untranslated regions (UTRs) and large open boxes represent coding sequences. Grey indicates F13 sequences and white denotes GHu sequences. (b) Infectious cDNA clones available from previous studies. The positions of the three restriction sites used to generate recombinant clones are shown. Note that the *Age*I site lies within the 2B<sup>MP</sup> coding sequence, which only differs by one amino acid sequence upstream of this site between F13

and GHu (K in F13-2B<sup>MP</sup> vs. R in GHu-2B<sup>MP</sup>). (c) Recombinant clones generated in the present study by swapping either the complete 2A<sup>HP</sup> coding sequence or its 150 3'-terminal nucleotides. The thin line depicts plasmid sequences and the black arrow shows the T7 bacteriophage transcription promoter. Extraviral nucleotides at the junction of the open reading frame (ORF) and the UTRs (narrow open boxes) are indicated.

**Fig. S3** Construction of binary vectors for the transient expression of the enhanced green fluorescent protein (EGFP)-tagged wild-type and recombinant proteins 2A<sub>F</sub>:EGFP, 2A<sub>G</sub>:EGFP, 2A<sub>G209F</sub>:EGFP and 2A<sub>F209G</sub>:EGFP (a) or of the control EGFP (b). Horizontal arrows represent primers. Primers adding attB sequences have double lines and are drawn above the coding regions to which they hybridize. Narrow open boxes represent polymerase chain reaction (PCR) products, whereas wide open boxes represent open reading frames (ORFs) contained in plasmids. Grey filled boxes are of F13 origin, whereas sequences of GHu origin are white. Conserved sequences between *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) strains GHu and F13 in which fragments overlap are shaded white to grey. attB sequences are hatched. Light lines represent plasmid sequences. T7 denotes the bacteriophage T7 *in vitro* transcription promoter and 35S is the 35S transcription sequence derived from *Cauliflower mosaic virus*.



**Figure 8 : Phénotypes induits par les protéines 2A recombinantes ou mutées en expression transitoire**

a. Alignement des 58 derniers résidus des protéines 2A<sub>F</sub> et 2A<sub>G</sub>. Les têtes de flèches indiquent la position des échanges. Les lignes rouges délimitent les régions successivement identifiées comme déterminant la HR. Les gouttes violettes marquent la position des mutations apparues dans les variants naturels. Ce schéma récapitulatif présente les 2A<sub>F</sub> et 2A<sub>G</sub> recombinantes de l'article (b), les nouveaux recombinants (c) et les 2A<sub>F</sub> mutantes (d) ainsi que les phénotypes induits par leur expression transitoire. L'absence (-) et la présence(+) de nécroses (N) et de phytoalexines (P) sont indiquées. Nb : nombre de plantes testées. Ces résultats proviennent respectivement de deux et une expériences indépendantes pour les constructions recombinantes et les 2A<sub>F</sub> mutées).

### III. Cartographie fine du facteur d'avirulence 2A<sup>HP</sup> du GFLV-F13

#### 1. La zone des résidus 220 à 231 de la protéine 2A<sub>F13</sub> détermine la réaction nécrotique

Pour poursuivre la cartographie et affiner l'identification de la zone déterminant la HR, de nouveaux recombinants ont été construits (Tableaux supp. 2 et 3, annexe), dans le vecteur d'expression transitoire, à partir des 2A<sup>HP</sup> des souches F13 et GHu (Fig. 8b). Ainsi un nouvel échange, réalisé en position 243 de la 2A<sub>F</sub>, a permis l'obtention des protéines recombinantes 2A<sub>F243G</sub> et 2A<sub>G243F</sub>. Comme dans l'article (Cf. I-2), les noms en indice indiquent : la souche d'origine de la région N-terminale (première lettre) puis la position du premier acide aminé échangé (nombre) et enfin la souche d'origine de la région C-terminale (deuxième lettre). Ces protéines recombinantes, fusionnées à la EGFP, ont été exprimées transitoirement par agroinfiltration. L'expression de la 2A<sub>F243G</sub>:EGFP conduit au développement de nécroses à 5 jours après infiltration (dpa) et de phytoalexines dès 2 dpa, alors que la 2A<sub>G243F</sub>:EGFP n'induit aucun phénotype (Fig. 8c). D'après ce résultat on peut exclure les 16 derniers résidus et restreindre la zone déterminant la HR à la région s'étendant des résidus 209 à 242. Les acides aminés 232 à 242 étant identiques entre les deux souches on peut conclure que le déterminant des symptômes est contenu dans l'intervalle 209-231 sur la 2A<sub>F</sub>:EGFP (Fig. 8a).

Afin de poursuivre la cartographie de la zone déterminant la nécrose, la séquence codant la région comprise entre les acides aminés 220 et 231 a été échangée entre les deux souches donnant les constructions 2A<sub>G220-231F</sub> et 2A<sub>F220-231G</sub> (Tableaux supp. 2 et 3, annexe), où la première lettre indique l'origine de séquence majoritaire de la 2A et la deuxième lettre indique l'origine de la séquence codant la région 220-231. L'expression de la protéine 2A<sub>G220-231F</sub>:EGFP induit une nécrose à 5 dpa précédée par la production de phytoalexines à 2 dpa, ce qui n'est pas le cas de la 2A<sub>F220-231G</sub> qui se comporte comme la protéine 2A<sub>G</sub>:EGFP (Fig. 8c). Ainsi la région de la protéine 2A<sup>HP</sup> du GFLV-F13 qui détermine la nécrose et la production de phytoalexines se situe entre les acides aminés 220 et 231.

#### 2. Les résidus 222-234 sont impliqués dans la nécrose induite par la protéine 2A<sub>F</sub>

Comme la HR induite par la 2A<sup>HP</sup> du GFLV-F13 ne limite que partiellement la propagation du virus, une infection systémique est toujours possible. Elle correspond à une HR systémique visualisable par des lésions chlorotiques à nécrotiques sur les feuilles apicales non-inoculées. Dans ces plantes, le virus se multiplie (plus faiblement que le GFLV-GHu puisqu'il ne dépasse pas 3 µg de virus / g de poids frais) et est constamment confronté aux réactions de défense de la plante. C'est pour suivre l'évolution de cette relation que nous avons inoculé des plantes de *N. occidentalis* avec un inoculum dérivant du clone F1F2 et que nous avons conservé ces plantes plusieurs mois en serre. Comme attendu ces plantes ont développé des nécroses sur les feuilles inoculées dès 10 dpi (Fig. 9a), et parmi elles quelques-unes ont présenté une nécrose systémique. Après six semaines, ces plantes ont montré un

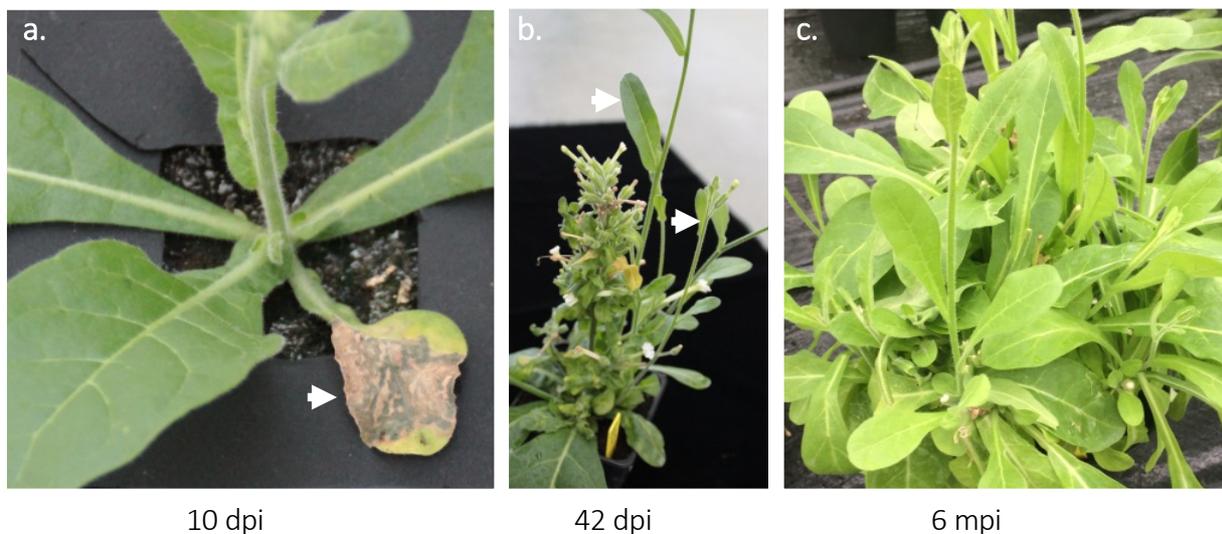


Figure 9 : Phénotype de récupération de *N. occidentalis* 6 mois après inoculation avec le virus F1F2

Dix jours après l'inoculation de *N. occidentalis* avec le virus F1F2 on voit apparaître une nécrose sur les feuilles inoculées (a). Six semaines après l'inoculation certaines parties de la plante ne présentent plus de symptômes (b, récupération partielle). Environ 6 mois après l'inoculation (mpi) une récupération totale est observée (c).

phénotype de récupération partielle des symptômes avec de nouvelles feuilles apicales ne montrant ni nécroses ni chloroses (Fig. 9b). Après six mois, ces plantes avaient récupéré totalement et présentaient un aspect similaire aux plantes inoculées par G1G2 (Fig. 9c).

Les feuilles apicales de ces plantes ont été collectées et ont servi d'inoculum pour inoculer une deuxième série de plantes (au total 16 plants de *N. occidentalis*). Sur ces nouvelles plantes, aucune nécrose typique de F1F2 n'a été observée sur les feuilles inoculées, par contre une mosaïque similaire à celle induite par G1G2 est apparue sur les feuilles apicales à 10 dpi. Le niveau d'accumulation du virus quantifié à 12 dpi sur feuilles apicales était similaire au titre viral généralement observé pour G1G2 (entre 20 et 50 µg de virus / g de feuille). Pour analyser l'évolution ayant abouti au contournement de la résistance (partielle), nous avons séquencé la région codant la protéine 2A<sup>HP</sup> et le début de la protéine 2B<sup>MP</sup> des variants de ces 16 *N. occidentalis*. Seules deux mutations ont été obtenues : (i) la transversion de l'adénine 665 en uracile a été observée dans quatre plantes (transformant le triplet GAG en GUG) ce qui a abouti à la mutation E222V dans la protéine 2A<sup>HP</sup>, tandis que (ii) la transition de la guanine 700 en adénine a été observée dans 12 plantes (transformant le triplet GCC en ACC) ce qui a abouti à la mutation A234T dans la protéine 2A<sup>HP</sup>. Il est à noter que le résidu 222 est différent entre F13 (glutamate) et GHu (alanine) alors que le résidu 234 est conservé entre les souches F13 et GHu (alanine).

Afin de vérifier l'implication de ces mutations dans le phénotype de nécrose les protéines 2A<sub>F(E222V)</sub> et 2A<sub>F(A234T)</sub>, où la mutation est notée entre parenthèses, ont été exprimées transitoirement par agroinfiltration dans *N. occidentalis*. Aucune n'a provoqué de nécrose contrairement à la protéine 2A<sub>F</sub> (Fig. 8d), indiquant que ces mutations sont bien responsables d'une perte de fonction. Il conviendra de tester l'effet de ces mutations sur la restriction virale en les introduisant dans le clone infectieux correspondant à l'ARN-2 du GFLV-F13 afin de générer les virus mutants F1F2-2A<sub>F(E222V)</sub> et F1F2-2A<sub>F(A234T)</sub>. Il faudra maintenant vérifier, en reproduisant ces mutations dans le clone infectieux qu'elles sont seules responsables du phénotype observé.

Il est à noter que la mutation du glutamate ou E (acide aminé chargé négativement), en valine ou V (acide aminé avec chaîne hydrophobe non chargé) provoque un changement de charge. Concernant le résidu 234, la mutation d'une alanine ou A (acide aminé avec chaîne hydrophobe non chargé) en thréonine ou T (acide aminé polaire non chargé) ne provoque pas de changement de charge.

### 3. Conclusion

L'expression transitoire des protéines 2A<sup>HP</sup> recombinantes entre les souches F13 et GHu dans *N. occidentalis* a permis de cartographier le facteur Avr du GFLV-F13. Nous avons ainsi pu restreindre la zone déterminant les symptômes nécrotiques et la production de

phytoalexines à la région comprise entre les acides aminés 220 et 231 de la protéine 2A<sub>F</sub>. Dans cette zone seulement neuf résidus sont différents entre les deux souches, dont un motif de huit acides aminés situé en position 220-227. Il serait intéressant de poursuivre ces travaux en testant l'échange de ce motif d'une part et du résidu 231 d'autre part. Cette approche a permis de tester rapidement la perte et le gain de fonction de l'éliciteur de la HR en nous affranchissant du rôle de la protéine dans la réplication. Néanmoins elle ne nous renseigne pas sur l'effet de nos échanges concernant l'efficacité de la réaction déclenchée à limiter la propagation du virus. Il faudra donc produire les constructions chimères en échangeant la séquence codant les acides aminés 220 à 231 dans les clones infectieux et vérifier que ces échanges ne perturbent pas la réplication des virus.

En conservant des plantes infectées par le GFLV-F1F2 en serre, nous avons favorisé l'apparition de variants naturels. Les deux mutations ponctuelles qui ont été générées mettent en évidence l'importance des résidus 222 et 234 dans l'induction de la nécrose et de l'accumulation des phytoalexines. Le résidu 222 fait partie du déterminant suggéré par les recombinants et la modification de l'acide glutamique en une valine semble indiquer que la charge pourrait être importante. En effet, la valine apparue naturellement est assez semblable à l'alanine présente à cette position dans la protéine 2A<sub>G</sub>, par sa chaîne aliphatique et sa charge mais pas par son hydrophobicité. Ce résultat suggère donc que c'est la charge de ce résidu qui pourrait être importante pour la reconnaissance entre le produit du gène R de *N. occidentalis* (ou son cofacteur) et la protéine 2A<sub>F</sub>.

En revanche, le résidu 234 (une alanine) est à la fois conservé entre les souches F13 et GHu, et en dehors de la zone 220-231, ce qui indique qu'il doit avoir un rôle indirect pour la reconnaissance R-Avr. Ce résultat sous-entend que l'extrémité C-ter de la protéine pourrait avoir un rôle important pour le repliement ou la stabilité de la protéine 2A<sup>HP</sup> est conforté par l'observation que l'agroinfiltration d'une construction ne fusionnant pas la protéine 2A<sub>F</sub> en son extrémité C-ter, ne provoque pas de nécrose. En absence d'anticorps anti-2A il n'est pas possible de vérifier l'expression et la stabilité de cette construction. Ces deux mutants ponctuels de la protéine 2A<sub>F</sub> pourront également constituer de bons témoins négatifs dans la recherche de partenaires cellulaires en lien avec sa fonction d'Avr.

#### IV. Effet de la variabilité des protéines 2A<sup>HP</sup> du GFLV et de l'ArMV sur la HR

Les travaux sur les souches F13 et GHu ont permis d'identifier la protéine 2A<sup>HP</sup> comme Avr sur *N. occidentalis* et de restreindre la zone déterminante pour la HR à l'extrémité C-ter de cette protéine (Fig. 7 et 8). Il est à noter que des précédentes analyses réalisées au niveau nucléotidique ont permis de montrer que la souche GHu était un recombinant interspécifique entre le GFLV et l'ArMV, notamment dans cette région C-ter de la protéine 2A<sup>HP</sup> (Vigne *et al.*, 2008). Du fait des différents points de recombinaison proposés, la protéine 2A<sub>G</sub> serait en fait

essentiellement d'origine GFLV à l'exception des 59 derniers résidus qui seraient d'origine ArMV.

En plus de ces souches GHu et F13, le laboratoire disposait avant mon arrivée d'une collection de souches de GFLV et d'ArMV caractérisées. Nous avons donc mis à profit cette collection pour étudier l'effet de la diversité des protéines 2A<sup>HP</sup> de ces souches (non seulement de GFLV mais aussi d'ArMV) sur les réactions de *N. occidentalis*.

### 1. Souches de GFLV et d'ArMV

Nous avons utilisé des souches qui avaient été prélevées sur des vignes infectées et isolées par des passages successifs sur les hôtes herbacés *Gomphrena globosa* ou *C. quinoa* (Tableau supp. 1, annexe). Il s'agit des souches de GFLV A17b et A17d (Vigne *et al.*, 2005) renommées CO1 et CO2, de la souche CB844 (Legin *et al.*, 1993) renommée B844 et abrégée B, des souches CO4 et CH8673, abrégée CH (non publiées) et des souches d'ArMV Tannat (notée Ta) et Syrah (noté S, Loudes *et al.*, 1995). Il est à préciser que la souche B844 comporte deux ARN-2 que nous avons appelés RNA-2a et RNA-2b (par ordre décroissant de leur taille). De même, la souche Syrah d'ArMV contient deux ARN-2 nommés RNA-2 U et RNA-2 L (par ordre décroissant de leur taille).

Les différentes souches de GFLV avaient été inoculées à des hôtes herbacés, et notamment *N. occidentalis*. Comme on peut le constater dans le Tableau 2, elles induisent différents types de réactions sur *N. occidentalis* dénotant d'un large panel de variabilité et d'intensité dans les nécroses. Le niveau de la restriction virale semble aussi variable en fonction des souches. Nous avons voulu étudié le rôle de la protéine 2A dans cette variabilité des symptômes.

La séquence nucléotidique et protéique des six protéines 2A de GFLV et deux protéines d'ArMV est connue. Ces protéines, dont le nom comporte le nom de la souche voire de l'ARN-2 en indice : 2A<sub>CO2</sub> (255 résidus), 2A<sub>CH</sub> (256 résidus), 2A<sub>Ba</sub> (257 résidus), 2A<sub>Bb</sub> (257 résidus), 2A<sub>CO4</sub> (258 résidus) et 2A<sub>CO1</sub> (258 résidus), ainsi que des protéines d'ArMV 2A<sub>Ta</sub> (259 résidus) et 2A<sub>SU</sub> (280 résidus) varient en taille et en séquence.

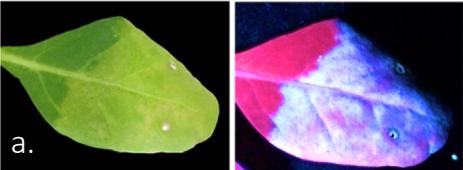
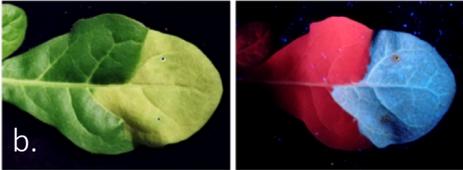
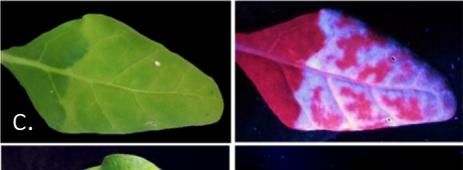
		Nécrose	Phytoalexines	2A <sup>HP</sup>
a.		++	++	2A <sub>F</sub> - 2A <sub>CO4</sub> - 2A <sub>Ba</sub>
b.		+*	++	2A <sub>CH</sub>
c.		+/-	++	2A <sub>CO1</sub> - 2A <sub>CO2</sub> - 2A <sub>Bb</sub>
d.		-	-	2A <sub>G</sub> - 2A <sub>Ta</sub> - 2A <sub>SU</sub> - EGFP

Figure 10 : Phénotypes de nécrose et accumulation de phytoalexines induits par l'expression de différentes protéines 2A<sup>HP</sup> fusionnées à la EGFP

Suite à l'expression transitoire des différentes protéines 2A:EGFP des observations ont été réalisées en lumière visible pour visualiser les nécroses à 5 dpa et sous U.V. pour visualiser la production de phytoalexines à 2 ou 3 dpa.

4 catégories de phénotype ont été obtenues.

\* témoigne d'un retard d'apparition de la nécrose

- : absence de nécrose ou de phytoalexines

+/- : nécrose faible voire chlorose

Ces résultats ont été obtenus au cours de deux expériences indépendantes de 10 plantes chacune.

Elles présentent une identité de 69 % entre souches d'ArMV, de 83 à 94 % entre souches de GFLV. Enfin l'identité entre les protéines 2A<sup>HP</sup> des souches de GFLV et d'ArMV varie de 57 à 81 % (Tableau 2).

## 2. Phénotypes induits par les différentes protéines 2A<sup>HP</sup> exprimées transitoirement

Les huit protéines 2A<sup>HP</sup>, fusionnées en leur extrémité C-ter à la EGFP, ont été exprimées transitoirement par agroinfiltration dans des *N. occidentalis*, en parallèle des deux contrôles 2A<sub>G</sub>:EGFP et 2A<sub>F</sub>:EGFP (Fig. 10).

Aucune des protéines 2A<sup>HP</sup> des différentes souches de GFLV testées ne se comporte comme la 2A<sub>G</sub>:EGFP. L'absence de nécrose et de production de phytoalexines toutes deux typiques de la 2A<sub>G</sub>:EGFP sont retrouvées uniquement pour les 2A<sup>HP</sup> d'ArMV à savoir les protéines 2A<sub>Ta</sub>:EGFP et 2A<sub>SU</sub>:EGFP, ce qui semble assez cohérent avec le fait que la 2A<sub>G</sub> soit en partie d'origine ArMV, notamment au niveau de ses 50 derniers acides aminés (Vigne et al., 2008). L'expression des protéines 2A<sub>CO4</sub>:EGFP et 2A<sub>Ba</sub>:EGFP provoque une nécrose franche l'accumulation de phytoalexines ; l'intensité de la nécrose est similaire à celle obtenue avec la protéine 2A<sub>F</sub>:EGFP. Les protéines 2A<sub>CO1</sub>:EGFP, 2A<sub>CO2</sub>:EGFP, 2A<sub>CH</sub>:EGFP et 2A<sub>Bb</sub>:EGFP induisent un phénotype intermédiaire avec production de faibles nécroses, et accumulation de phytoalexines. Selon les expériences, voire selon les plantes au sein d'une même expérience, l'intensité de la nécrose et la production de phytoalexines peuvent varier sans jamais atteindre néanmoins le niveau d'intensité obtenu lors de l'expression de la protéine 2A<sub>F</sub>:EGFP. Il semble donc que toutes les protéines dont l'extrémité C-ter est d'origine GFLV soient capables d'induire une nécrose et l'accumulation de phytoalexines (plus ou moins importante) alors que celles possédant une extrémité d'origine ArMV ne le puissent pas. De la même façon que lors des travaux déjà publiés, l'expression des 2A<sup>HP</sup>:EGFP a été vérifiée par microscopie à épifluorescence et apparait cohérente sous forme d'agrégats cytoplasmiques. Lors de ces manipulations, malgré l'harmonisation relative des concentrations en agrobactéries pour les différentes constructions, les niveaux d'accumulation des transcrits ou des protéines n'ont pas été quantifiés, c'est pourquoi les résultats ont été analysés de façon essentiellement qualitative.

## 3. Phénotypes induits par les différentes protéines 2A<sup>HP</sup> en contexte viral

Les différentes 2A<sup>HP</sup> ont ensuite été introduites en contexte viral dans le clone infectieux du GFLV-GHu à la place de la séquence d'origine 2A<sub>G</sub> (Tableaux supp. 2 et 3, annexe). Pour estimer le rôle des protéines 2A<sup>HP</sup>, il nous paraissait important que le contexte viral soit le même pour toutes les protéines 2A<sup>HP</sup> testées.

**Tableau 3 : Symptômes, production de phytoalexines et titre viral des souches de GFLV synthétiques, ré-assortantes et chimères sur les feuilles inoculées et apicales**

Phenotype <sup>a</sup>	Exp. <sup>b</sup>	Ratio <sup>c</sup>	Symptôme sur feuilles <sup>d</sup>		Phytoalexines sur feuilles <sup>e</sup>		Titre viral <sup>f</sup> (µg de virus/g de feuille)		
			Inoculées	Apicales	Inoculées	Apicales	Inoculées	Apicales	
Similaire F13	G1G2-2A <sub>F</sub>	1	5/10	LN	SCD/SC	+	+	0,3 ± 0,05	0,2 ± 0,6
			5/10	LN	-	+	-		
	G1G2-2A <sub>F</sub>	2	2/4	LN	SC	+	+	1,8 ± 0,8	0,7 ± 1,2
			2/4	LN	-	+	-		
	G1G2-2A <sub>F</sub>	3	5/6	LN	SC	+	+	2,8 ± 0,3	2 ± 3
			1/6	LN	-	+	-		
	G1G2-2A <sub>F</sub>	4	4/12	LN	SC	+	+	0,6 ± 0,3	2 ± 4
			8/12	LN	-	+	-		
G1G2-2A <sub>CO4</sub>	3	6/7	LN	SC	+	+	4 ± 1,5	18 ± 9	
		1/7	LN	-	+	-			
G1G2-2A <sub>CO4</sub>	4	11/12	LN	SC	+	+	1,7 ± 0,9	5 ± 3,5	
		1/12	LN	-	+	-			
G1G2-2A <sub>Ba</sub>	3	3/7	LN	SC	+	+	2 ± 0,5	0,8 ± 2	
		4/7	LN	-	+	-			
G1G2-2A <sub>Ba</sub>	4	6/12	LN	SC	+	+	0,6 ± 0,5	0,4 ± 0,9	
		6/12	LN	-	+	-			
Intermédiaire F13/GHu	G1G2-2A <sub>CH</sub>	3	7/7	-	Mosaïque	+	+	19 ± 5	27 ± 10
			8/8	-	Mosaïque	+	+		
Similaire GHu	G1G2-2A <sub>Bb</sub>	3	7/7	-	Mosaïque	-	-	18 ± 6	35 ± 12
			8/8	-	Mosaïque	-	-		
	G1G2-2A <sub>CO1</sub>	3	7/7	-	Mosaïque	-	-	24 ± 6	31 ± 13
			8/8	-	Mosaïque	-	-		
	G1G2-2A <sub>CO1</sub>	4	8/8	-	Mosaïque	-	-	15 ± 5	14 ± 4
			7/7	-	Mosaïque	-	-		
	G1G2-2A <sub>CO2</sub>	3	7/7	-	Mosaïque	-	-	25 ± 7	28 ± 11
			8/8	-	Mosaïque	-	-		
	G1G2-2A <sub>CO2</sub>	4	8/8	-	Mosaïque	-	-	14 ± 2,5	17 ± 6
			10/10	-	Mosaïque	-	-		
	G1G2	1	10/10	-	Mosaïque	-	-	27 ± 3,5	38 ± 4
			4/4	-	Mosaïque	-	-		
	G1G2	2	4/4	-	Mosaïque	-	-	32 ± 5	69 ± 25
			6/6	-	Mosaïque	-	-		
G1G2	3	6/6	-	Mosaïque	-	-	26 ± 12	32 ± 11	
		8/8	-	Mosaïque	-	-			
G1G2	4	8/8	-	Mosaïque	-	-	16 ± 2	15 ± 4	
		10/10	-	Mosaïque	-	-			
G1G2-2A <sub>Ta</sub>	1	10/10	-	Mosaïque	-	-	25 ± 4	33 ± 6	
		6/6	-	Mosaïque	-	-			
G1G2-2A <sub>Ta</sub>	2	6/6	-	Mosaïque	-	-	28 ± 8	59 ± 22	
		10/10	-	Mosaïque	-	-			
G1G2-2A <sub>SU</sub>	1	10/10	-	Mosaïque	-	-	27 ± 7	27 ± 6	
		6/6	-	Mosaïque	-	-			
G1G2-2A <sub>SU</sub>	2	6/6	-	Mosaïque	-	-	28 ± 4	69 ± 8	
		6/6	-	Mosaïque	-	-			

<sup>a</sup>Des *C. quinoa* infectés systématiquement par les transcrits des virus synthétiques, ré-assortants et chimères ont servi d'inoculum pour inoculer des *N. occidentalis* (350 ng/plante).

<sup>b</sup>Numéro de l'expérience ; 4 expériences indépendantes d'environ 10 plantes chacune ont été réalisées.

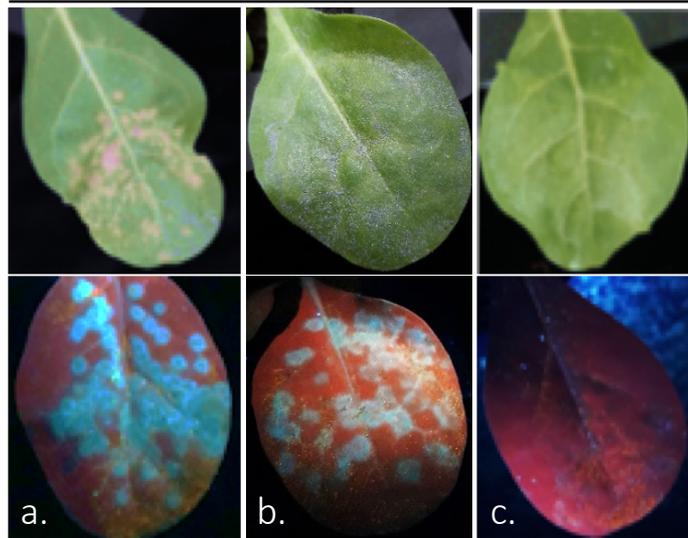
<sup>c</sup>Nombre de plantes manifestant les symptômes décrits sur le nombre de plantes testées dans l'expérience.

<sup>d</sup>Lésion nécrotique (LN), spot chlorotique et spot chlorotique discret (SC et SCD)

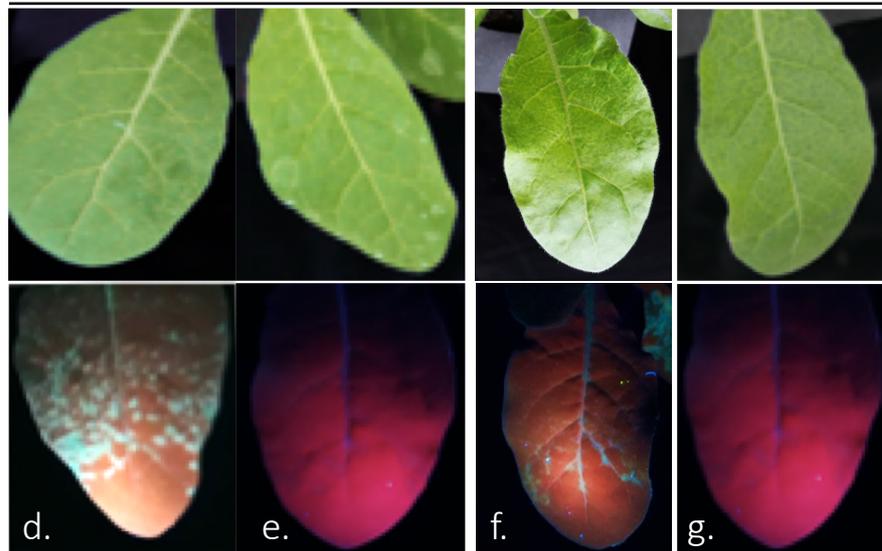
<sup>e</sup>Accumulation de phytoalexines : présence (+) ou absence (-)

<sup>f</sup>Titre viral ± déviation standard sur les feuilles inoculées et apicales, estimé par DAS-ELISA semi quantitatif

### Feuilles inoculées



### Feuilles apicales



**Figure 11 : Symptômes et production de phytoalexines en contexte viral**

Selon l'origine de la protéine 2A codée par l'ARN-2, les symptômes peuvent être de différents types. Les feuilles inoculées (panel du haut) peuvent : présenter des lésions nécrotiques accompagnées de phytoalexines autour des lésions (a) pour G1G2-2A<sub>F</sub>, G1G2-2A<sub>Ba</sub> et G1G2-2A<sub>CO4</sub>, ou rester asymptomatiques tout en accumulant des phytoalexines (b) dans le cas de G1G2-2A<sub>CH</sub>. G1G2, G1G2-2A<sub>CO1</sub>, G1G2-2A<sub>CO2</sub>, G1G2-2A<sub>Bb</sub>, G1G22A<sub>SU</sub> et G1G22A<sub>Ta</sub> il y a absence de symptômes et de phytoalexines (c).

Les feuilles apicales (panel du bas) restent asymptomatiques (e) en cas de restriction totale, ou montrent des spots nécrotiques accompagnés de phytoalexines autour des spots (d) pour F1F2, G1G2-2A<sub>Ba</sub> et G1G2-2A<sub>CO4</sub>. Pour G1G2-2A<sub>CH</sub>, on peut observer de discrètes mosaïques accompagnées de phytoalexines le long des nervures (f). Par contre, pour G1G2, G1G2-2A<sub>CO1</sub>, G1G2-2A<sub>CO2</sub> et G1G2-2A<sub>Bb</sub>, il y a une discrète mosaïque sans phytoalexines (g).

Les virus chimères obtenus (G1G2-2A<sub>CO1</sub>, G1G2-2A<sub>CO2</sub>, G1G2-2A<sub>CO4</sub>, G1G2-2A<sub>Ba</sub>, G1G2-2A<sub>Bb</sub>, G1G2-2A<sub>CH</sub>, G1G2-2A<sub>Ta</sub> et G1G2-2A<sub>SU</sub>) ainsi que les contrôles G1G2 et G1G2-2A<sub>F</sub> ont ensuite été inoculés à des *N. occidentalis* puis les symptômes et la production de phytoalexines ont été suivis quotidiennement de 3 à 10 dpi, et le titre viral mesuré à 10 dpi, par ELISA semi-quantitatif. Ainsi le niveau de restriction virale associé aux différentes réactions phénotypiques a pu être déterminé (Tableau 3 et Fig. 11).

Comme attendu G1G2 induit une réaction compatible définie par l'absence de symptômes sur les feuilles inoculées et une mosaïque non-persistante sur les feuilles apicales ; dans les feuilles inoculées et les feuilles apicales le virus s'accumule très bien (avec des niveaux d'accumulation respectifs de  $\approx 32$  et  $69 \mu\text{g}$  de virus / g de feuille). Le virus chimère G1G2-2A<sub>F</sub> (contrôle positif) induit la réaction incompatible précédemment décrite et caractérisée par le développement de lésions nécrotiques sur les feuilles inoculées et l'accumulation de phytoalexines. On retrouve sur les feuilles apicales des nécroses et des phytoalexines associées à une restriction partielle du virus ( $\approx 2 \mu\text{g}$  de virus / g de feuille), ou une absence de symptôme corrélée à une restriction totale. Comme suspecté les deux virus chimères dotés des 2A<sup>HP</sup> d'origine ArMV se comportent tous deux comme G1G2 puisque les virus G1G2-2A<sub>Ta</sub> et G1G2-2A<sub>SU</sub> n'induisent pas de symptômes sur les feuilles inoculées et une mosaïque non-persistante sur les feuilles apicales, et s'accumulent très bien dans les feuilles inoculées ( $\approx 27 \mu\text{g}$  de virus / g de feuille pour les deux) et apicales (respectivement à  $\approx 59$  et  $68 \mu\text{g}$  de virus / g de feuille ; Tableau 3).

Les deux virus porteurs des 2A<sup>HP</sup> nécrotiques en expression transitoire, à savoir G1G2-2A<sub>CO4</sub> et G1G2-2A<sub>Ba</sub> reproduisent des lésions nécrotiques accompagnées d'une production de phytoalexines sur les feuilles inoculées ; les feuilles apicales restent asymptomatiques ou développent des nécroses systémiques accompagnées d'une production de phytoalexines tout en s'accumulant assez peu (respectivement  $\approx 18$  et  $2 \mu\text{g}$  de virus / g de feuille), et comme dans le cas de G1G2-2A<sub>F</sub>, l'absence de symptômes sur les feuilles apicales est corrélée à l'absence de virus.

De façon tout à fait remarquable, le virus G1G2-2A<sub>CH</sub> ne provoque pas de lésions nécrotiques sur les feuilles inoculées, mais provoque l'accumulation de phytoalexines, tandis que les feuilles apicales dans lesquelles le virus s'accumule à un titre élevé (similaire à G1G2) présentent une mosaïque non-persistante typique de G1G2 elles-aussi accompagnées d'une production de phytoalexines non persistantes. Ainsi G1G2-2A<sub>CH</sub>, ne montre pas de nécroses en contexte viral contrairement à ce qui était observé dans les patchs d'agroinfiltration. C'est aussi le seul recombinant pour lequel des symptômes de mosaïque sont associés à l'accumulation (même fugace) de phytoalexines.

Enfin les virus chimères G1G2-2A<sub>CO1</sub>, G1G2-2A<sub>CO2</sub> et G1G2-2A<sub>Bb</sub> provoquent la même réaction que G1G2, à savoir absence de symptômes et de phytoalexines sur les feuilles inoculées et l'induction d'une mosaïque non-persistante sur les feuilles apicales dans

lesquelles ils s'accumulent bien (entre 14 et 35 µg de virus / g de feuille selon les souches). Ces derniers se différencient eux aussi des expériences hors contexte viral réalisées sur les 2A<sub>CO1</sub>:EGFP, 2A<sub>CO2</sub>:EGFP et 2A<sub>Bb</sub>:EGFP exprimées transitoirement puisqu'en contexte viral il n'y a ni nécroses ni phytoalexines sur les feuilles inoculées alors que ces phénotypes étaient visibles lors de l'expression transitoire des protéines 2A<sup>HP</sup>:EGFP.

Il est à noter que les expérimentations d'expression ectopique sont réalisées dans une enceinte climatique alors que celles en contexte viral sont réalisées en serre. La photopériode est la même dans les deux conditions (14 H de jour et 10 H de nuit), par contre les fluctuations de température sont différentes : en serre la T° varie de 18°C à 26°C, alors que dans l'enceinte climatique elle varie de 18°C à 22°C. Comme aucune expérimentation comprenant des *N. occidentalis* inoculés et agroinfiltrés n'a été réalisée à ce jour exactement dans les mêmes conditions, il est difficile de savoir si la température pourrait influencer l'intensité de la nécrose et la production de phytoalexines induites par les différentes 2A<sup>HP</sup> de GFLV. Par contre nos expérimentations nous permettent de conclure sur l'absence de nécrose et de phytoalexines quelles que soient les conditions de température pour les 2A<sup>HP</sup> ayant une extrémité C-ter d'origine ArMV (2A<sub>G</sub>, 2A<sub>Ta</sub> et 2A<sub>SU</sub>).

#### 4. Conclusions

Comme c'est le cas pour la 2A<sub>F</sub>, les 2A<sub>CO4</sub> et 2A<sub>Ba</sub> semblent induire une réaction incompatible où la restriction virale et la nécrose sont associées. Il y a entre deux résidus (pour 2A<sub>Ba</sub>) et huit résidus (2A<sub>CO4</sub>) différents par rapport à F13 (Fig. 12). Ces résidus pourraient donc ne pas être impliqués dans la HR. De même les protéines 2A<sub>Ta</sub> et 2A<sub>SU</sub> reproduisent la réaction compatible typique de la protéine 2A<sub>G</sub> que ce soit en expression transitoire ou en contexte viral. Il semble que ce comportement puisse être dû à leur origine ArMV. Comme on peut le voir sur l'alignement (Fig. 12), un motif localisé entre les résidus 220 et 227 semble nettement différent entre les GFLV et ArMV.

Cette séquence est :

220	221	222	223	224	225	226	227	
L	Q/R	A	A	L	S/H/E	R	Q	ArMV
V	R	E/K	F/S	C	R	M/A/V/L	K/R	GFLV

Par contre les prolines et la sérine additionnelles en position 210, 211 et 212 ne semblent pas avoir un rôle prédominant dans le phénotype sachant qu'elles ne sont pas présentes dans le GFLV-GHu.

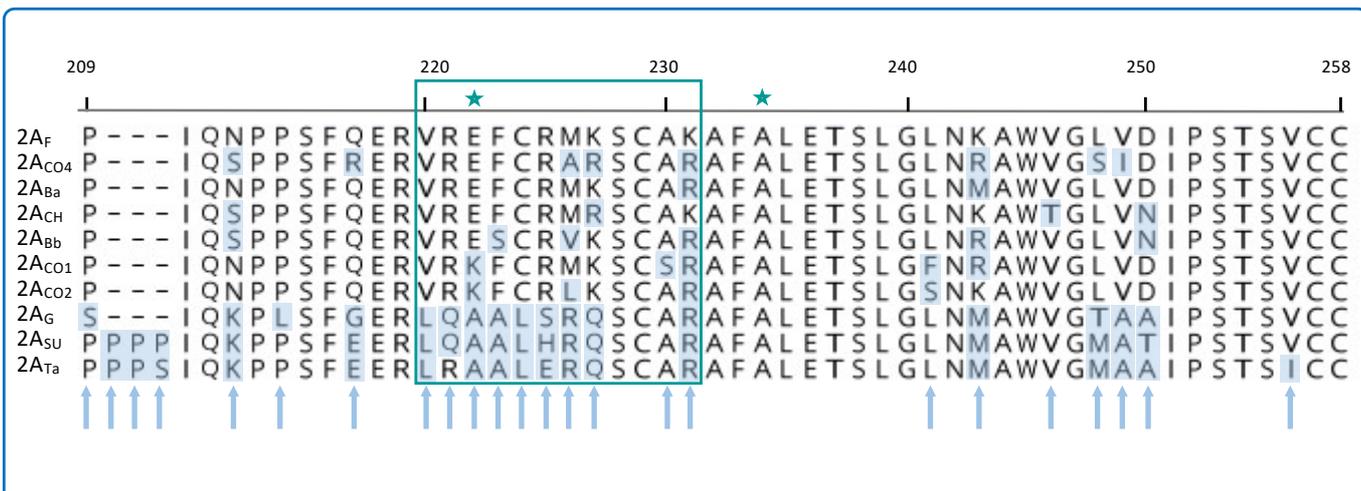


Figure 12 : Régions C-ter des différentes protéines 2A<sup>HP</sup> de GFLV et ArMV

Alignement des séquences protéiques des 2A<sup>HP</sup> réalisé à l'aide du logiciel *Geneious*. Seule la région C-terminale, qui correspond aux 50 derniers résidus (résidus 209 à 258) de la protéine 2A<sub>F</sub> déterminant la HR sur *N. occidentalis*, est représentée. Les nombres au dessus de l'alignement indiquent les positions des résidus par rapport à la protéine 2A<sub>F</sub>. Les flèches indiquent les positions des résidus différents (surlignés eux-mêmes en bleu) de la séquence 2A<sub>F</sub>. Il y a 24 positions de polymorphisme par rapport à 2A<sub>F</sub> (19 résidus variables et 3 insertions).

L'encadré turquoise représente la zone de 2A<sub>F</sub> (résidus de 220 à 231) déterminant la nécrose et la production de phytoalexines en expression ectopique. Les étoiles turquoise correspondent aux deux mutations des résidus 222 et 234, qui suffisent en expression ectopique à provoquer la perte de la nécrose.

Entre ces deux extrêmes on retrouve des réactions intermédiaires où se confrontent comportement intrinsèque en expression transitoire et comportement en contexte viral (Tableau 4). Ainsi les protéines 2A<sub>CO1</sub>, 2A<sub>CO2</sub> et 2A<sub>Bb</sub> provoquent de faibles nécroses et l'accumulation de phytoalexines en expression ectopique, mais induisent une réaction compatible similaire à la protéine 2A<sub>G</sub> en contexte viral. Ces protéines montrent de quatre à cinq résidus différents de la protéine 2A<sub>F</sub> dans les 50 derniers aa (Fig. 12). La protéine 2A<sub>CH</sub> (quatre résidus différents par rapport à 2A<sub>F</sub>) induit des nécroses et des phytoalexines en expression transitoire, mais en contexte viral elle provoque l'accumulation de phytoalexines (sans induction de nécrose) sur les feuilles inoculées et sur les feuilles apicales ; et cette fois encore l'absence de nécrose en contexte viral est corrélée avec une forte accumulation virale (Tableau 4).

Ces résultats permettent pour la première fois dans notre étude d'affirmer que le développement de nécrose est certainement découplé de la production de phytoalexines. En revanche on retrouve l'incapacité des lésions nécrotiques à restreindre totalement le virus dans certaines plantes (déjà décrite pour G1G2-2A<sub>F</sub> et qui est encore moins efficace pour G1G2-2A<sub>CO4</sub>), alors que l'absence de symptômes sur les feuilles apicales est toujours corrélée à l'absence de virus.

Les symptômes de mosaïque sont déterminés par la protéine 1E<sup>Pol</sup> du GFLV-GHu lors d'une réaction compatible sur *N. benthamiana*. On retrouve cette réaction sur *N. occidentalis*. Mais lorsque la protéine 2A<sub>F</sub>, qui est Avr sur cet hôte, est présente, une HR est activée et la réaction devient incompatible, et même si le virus peut encore infecter la plante de façon systémique, la mosaïque ne se développe pas (G1G2-2A<sub>F</sub>, G1G2-2A<sub>Ba</sub>, G1G2-2A<sub>CO4</sub>). L'interaction entre *N. occidentalis* et G1G2-2A<sub>CH</sub> conduit à déclencher la HR puisque des phytoalexines sont produites mais ne parvient pas à restreindre le virus ce qui aboutit à une réaction compatible typique avec des symptômes de mosaïque. On a donc une situation très particulière où la réaction semble "basculer" d'incompatible à compatible.

## V. Conclusion et perspectives

En tirant parti de l'ensemble des résultats présentés dans ce chapitre, l'hypothèse établie a été validée en confirmant la HR sur *N. occidentalis* et en la caractérisant ; les 50 derniers acides aminés de la protéine 2A<sup>HP</sup> de la souche F13 ont été identifiés comme Avr de cette HR et la zone d'intérêt cartographiée. Enfin, l'effet de la diversité de la protéine 2A<sup>HP</sup> dans l'expression des symptômes a été étudié grâce à une collection de protéines 2A<sup>HP</sup> aux réactions contrastées. Ces travaux représentent une avancée dans la compréhension des mécanismes de la symptomatologie du GFLV sur hôtes herbacés, et constituent avec les précédents résultats de l'équipe la première étude approfondie établissant un lien entre un génotype viral et un symptôme, ce qui ouvre plusieurs perspectives, à courts et longs termes

**Tableau 4 : Récapitulatif des propriétés des protéines 2A<sup>HP</sup> en expression transitoire et en contexte viral**

	Expression ectopique		Contexte viral				
	Nécrose <sup>a</sup>	Phytoalexine <sup>b</sup>	Symptôme sur feuilles <sup>c</sup>		Phytoalexine sur feuilles <sup>d</sup>		Restriction <sup>f</sup>
			Inoculées	Apicales	Inoculées	Apicales	
2A <sub>F</sub>	++	++	LN	SC	+	+	+
			LN	-	+	-	
2A <sub>Ba</sub>	++	++	LN	SC	+	+	+
			LN	-	+	-	
2A <sub>CO4</sub>	++	++	LN	SC	+	+	+ <sup>g</sup>
			LN	-	+	-	
2A <sub>CH</sub>	+	++	-	M	+	+ <sup>e</sup>	-
2A <sub>CO1</sub>	±	++	-	M	-	-	-
2A <sub>CO2</sub>	±	++	-	M	-	-	-
2A <sub>Bb</sub>	±	++	-	M	-	-	-
2A <sub>G</sub>	-	-	-	M	-	-	-
2A <sub>Ta</sub>	-	-	-	M	-	-	-
2A <sub>SU</sub>	-	-	-	M	-	-	-

<sup>a</sup>Présence de nécroses similaires à la 2A<sub>F</sub> (++) , plus faibles (+), ou apparaissant tardivement/proches de chlorose (±), absence de nécroses (-).

<sup>b</sup>Accumulation importante de phytoalexines similaire à la 2A<sub>F</sub> (++) , ou absence (-). Les phytoalexines sont visibles dès 2 dpa en expression transitoire.

<sup>c</sup>LN pour lésions nécrotiques, SC pour spots chlorotiques, M pour mosaïque et (-) pour absence de symptôme.

<sup>d</sup>Accumulation de phytoalexines légèrement moins forte (par rapport à ++ en expression transitoire), pouvant apparaître dès 3 dpi mais néanmoins persistante.

<sup>e</sup>Accumulation de phytoalexines observable à 8 dpi mais disparaissant à 9 dpi.

<sup>f</sup>Présence de restriction virale (+) ou absence de restriction virale (-). La restriction virale est caractérisée par une faible accumulation virale au niveau des feuilles inoculées et apicales voire dans certains cas une absence de virus dans les feuilles apicales.

<sup>g</sup>Restriction virale semblable à G1G2-2A<sub>F</sub> au niveau des feuilles inoculées et intermédiaires entre G1G2-2A<sub>F</sub> et G1G2 au niveau des feuilles apicales

qui s'inscrivent complètement dans les objectifs de l'équipe à savoir l'étude de la biologie du GFLV, l'identification des fonctions des protéines virales et leurs interactions ainsi que les réactions que le virus induit sur ses hôtes.

### 1. La cartographie

La cartographie de l'Avr de F13 a permis de poser de nouvelles hypothèses qui pourront être testées facilement avec les outils disponibles au laboratoire et les connaissances récemment acquises. D'après l'étude de l'alignement de séquences protéiques des 2A<sup>HP</sup> recombinantes (Fig. 12), la séquence comprise entre les résidus 220 et 231 semble déterminer le développement des nécroses et la production de phytoalexines. Cette séquence se compose d'un *stretch* de huit résidus (220-227) et d'un résidu unique, qui diffère entre la souche nécrogène et la souche non-nécrogène. Dans un premier temps il faudra éventuellement discriminer entre les deux et exprimer transitoirement les nouvelles protéines réciproques 2A<sub>G220-231F</sub> et 2A<sub>F220-231G</sub>, et 2A<sub>K231R</sub> et 2A<sub>R231K</sub>. La mutation du résidu 231 peut être réalisée même si son implication directe dans la reconnaissance du produit du gène R (ou d'un co-facteur) est peu probable puisque l'arginine et la lysine ont des propriétés physico-chimiques assez semblables (aa basiques et hydrophiles). De plus le résidu 231 présente aléatoirement une arginine ou une lysine indépendamment des phénotypes, ce qui tend à montrer que ce n'est pas lui qui sera déterminant mais plutôt une structure. En parallèle ces nouvelles protéines recombinantes seront replacées en contexte viral pour connaître leur phénotype et tester la restriction virale induite par leurs réactions chez *N. occidentalis*.

En plus de ce *stretch*, l'Ala en position 234 est importante dans la perte du phénotype nécrotique laissant penser que d'autres résidus pourraient être importants par leur effet sur la structure. La structure peut être importante pour la HR, car il a été suggéré que suite à la reconnaissance R / Avr un changement conformationnel serait nécessaire à la transduction du signal et au déclenchement des réactions de défense (Moffett, 2016). La conformation de l'Avr pourrait avoir une incidence sur cette transduction. Alternativement la structure de la protéine 2A<sup>HP</sup> pourrait être importante pour sa stabilité.

### 2. La collection des protéines 2A<sup>HP</sup>

Les résultats obtenus à partir de la collection des protéines 2A<sup>HP</sup> ont montré une différence entre l'expression transitoire où toutes les protéines ayant une extrémité C-ter d'origine GFLV étaient capables d'induire la formation de nécroses et l'accumulation de phytoalexines, montrant qu'elles sont capables d'interagir (directement ou indirectement) avec le produit du gène R ; et l'expression en contexte viral où seules les protéines 2A<sub>F</sub>, 2A<sub>Co4</sub>

et 2A<sub>Ba</sub> provoquent une HR caractérisée par des nécroses, des phytoalexines et une restriction du virus. La protéine 2A<sub>CH</sub> induit l'accumulation transitoire des phytoalexines. Ces quatre protéines interagissent donc avec R. Les protéines 2A<sub>CO1</sub>, 2A<sub>CO2</sub> et 2A<sub>Bb</sub> sont donc intrinsèquement capables d'interagir avec R mais ne le font pas en contexte viral. Ceci pourrait être dû à une faible affinité de ces protéines pour R qui, hors contexte viral, est compensée par la quantité de protéine tandis qu'en contexte viral moins de protéine serait disponible pour interagir avec R. En considérant ainsi trois catégories de protéines 2A<sup>HP</sup> : (i) celles qui interagissent avec R de façon à déclencher la HR en contexte viral, même si celle-ci n'aboutit pas à une résistance efficace (2A<sub>F</sub>, 2A<sub>CO4</sub>, 2A<sub>Ba</sub> et 2A<sub>CH</sub>), (ii) celles qui sont capables d'interagir avec R avec une efficacité / affinité réduite sans déclencher de HR en contexte viral (2A<sub>CO1</sub>, 2A<sub>CO2</sub> et 2A<sub>Bb</sub>), et (iii) celles qui n'interagissent pas avec R (2A<sub>G</sub>, 2A<sub>Ta</sub> et 2A<sub>SU</sub>), on voit que le doublet d'aa 222-223 semble jouer un rôle important dans l'interaction avec R et le déclenchement de la HR. En effet la première catégorie de protéines partage le doublet <sup>222</sup>EF<sup>223</sup>, la deuxième catégorie comporte une modification dans ce doublet (KF ou ES) et la 3<sup>e</sup> catégorie de protéine porte le doublet AA. Cette hypothèse est compatible avec l'obtention du mutant naturel dans lequel ce doublet est modifié (E222V). Une mutagenèse ciblée sur ces deux résidus dans les clones infectieux des souches contrôles (F13 et GHu) ou dans les recombinants obtenus ici pourrait rapidement confirmer ou infirmer cette hypothèse.

Cette collection a donc permis de faire un lien entre le génotype de la protéine 2A<sup>HP</sup> et son phénotype d'induction de la HR. Elle constitue également un outil intéressant pour disséquer la réaction HR puisqu'elle a permis de découpler certains aspects de la réponse HR. Ces différentes souches du GFLV causant des symptômes variés semblent bien illustrer le concept de *continuum* de réponse de la HR en lien avec la cinétique et l'efficacité de reconnaissance de l'Avr (Künstler *et al.*, 2016).



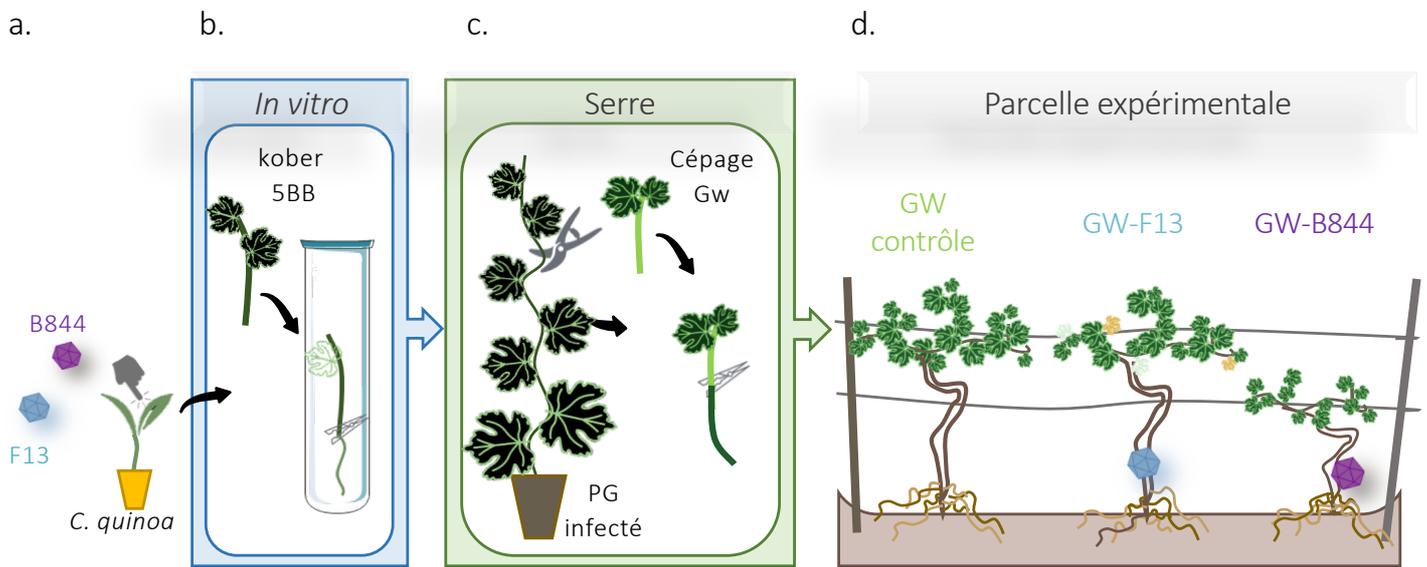


Figure 13 : Obtention du matériel végétal infecté par greffage hétérologue et greffage bouture herbacée

L'inoculation mécanique de virus ne fonctionne pas sur la vigne. Une technique de greffage hétérologue a été mise au point dans l'équipe pour inoculer le GFLV à des vignes. Cette technique suit plusieurs étapes clés avant la plantation d'une parcelle expérimentale :

Premièrement un hôte herbacé (*Chenopodium quinoa*) est inoculé mécaniquement par un variant de GFLV (a). Puis un fragment de tige avec un bourgeon du porte-greffe kober 5BB (PG) est greffé en culture *in vitro* sur une section de tige de *C. quinoa* infectée (b). Cet assemblage est maintenu pendant environ quatre semaines, puis le fragment de vigne est transplanté dans un pot avec terreau pour acclimatation en serre. Une fois que le porte-greffe est infecté, il est propagé en serre sous forme de liane (c). Cette étape prend entre une à deux années. Il sert ensuite de source et accueille la greffe d'un cépage d'intérêt (greffe de bouture herbacée), comme le gewurztraminer (Gw ; c). L'obtention de ce genre de vignes qu'elles soient conservées en serre ou plantées à l'extérieur, prend environ trois ans (d). Les premiers symptômes peuvent être observés entre la première année et la troisième suivant le greffage.

## CHAPITRE III : SYMPTOMATOLOGIE INDUITE PAR LE GFLV SUR *VITIS VINIFERA*

Dans le but d'étudier les mécanismes aux commandes de la symptomatologie induite par le GFLV sur vigne, il est nécessaire de travailler sur des vignes mono-infectées. La vigne présente les désavantages de ne pas pouvoir être infectée mécaniquement et d'avoir un cycle végétatif (en plus d'être pérenne) très long (et durant lequel l'homme intervient, dès le greffage). Grâce aux souches virales déjà caractérisées (Cf. chapitre II), et à une technique particulière de greffage hétérologue développée au laboratoire, ces limitations ont été surmontées et l'infection mixte ainsi contournée, permettant l'implantation par l'équipe avant mon arrivée au laboratoire d'une parcelle expérimentale adaptée. Cet essai expérimental m'a permis d'associer les réactions différentielles induites par des souches de GFLV à leurs phénotypes contrastés sur le cépage gewurztraminer.

### I. Outils et approche

#### 1. Comment étudier les symptômes de différentes souches du GFLV sur vigne ?

Pour étudier les réactions induites par le GFLV sur l'hôte d'intérêt agronomique, des vignes de différents cépages ont été infectées par l'une des souches disponibles au laboratoire (Cf. en chapitre II) grâce à deux greffages successifs dont le premier est dit hétérologue parce qu'il a lieu entre deux espèces différentes. Ce processus suit plusieurs étapes clefs (Fig. 13) : premièrement un hôte herbacé (*C. quinoa*) est infecté mécaniquement grâce à des transcrits infectieux, du virus purifié ou d'un broyat de plante infectée par la souche virale d'intérêt. Des fragments de ces tiges infectées par le virus sont ensuite utilisés pour accueillir des fragments d'un porte-greffe lors du greffage dit hétérologue en conditions *in vitro*. L'hôte herbacé constitue le porte-greffe tandis que le génotype de porte-greffe est le greffon. La connexion des tissus vasculaires va alors permettre le passage du virus de la plante herbacée vers la vigne. Dans un deuxième greffage, homologue et dit de bouture herbacée, la vigne infectée et propagée en serre fournit des boutures qui sont utilisées comme porte-greffe. Lors de ce greffage des boutures du cépage d'intérêt sont greffées sur des fragments du porte-greffe infecté. Cette vigne greffée (l'assemblage porte-greffe / greffon) est ensuite plantée dans une parcelle exempte de nématodes vecteurs pour éviter tout épisode de surinfection. Dans ces vignes le virus doit d'abord passer du porte-greffe au greffon avant qu'elles puissent montrer leurs premiers symptômes, ce qui peut prendre plusieurs années.

**Tableau 5 : Symptômes induits sur gewurztraminer (Gw) et chardonnay (Ch) par 5 souches de GFLV**

Variété	Virus	N <sup>(a)</sup>	Décoloration feuilles <sup>(b)</sup>	Déformation feuilles	Anomalies rameaux	Rabougrissement <sup>(c)</sup>	Coulure <sup>(d)</sup>
Gw	Non inoculé	8	0 (±0,0)	0 (±0,0)	0 (±0,0)	0 (±0,0)	1,1 (±0,3)
	B844	6	0,8 (±0,4)	<b>1,6 (±0,5)</b>	0,8 (±0,7)	<b>2,6 (±0,5)</b>	1,8 (±0,9)
	F13	8	0,8 (±0,4)	0 (±0,0)	1 (±0,7)	0 (±0,0)	1,8 (±0,4)
	CO1 (A17b)	8	0,1 (±0,3)	0 (±0,0)	0,7 (±0,6)	0 (±0,0)	2,3 (±0,4)
	CO2 (A17d)	7	0,1 (±0,3)	0 (±0,0)	1,1 (±0,6)	0 (±0,0)	1,8 (±0,4)
	GHu	8	0,6 (±0,5)	0 (±0,0)	0,5 (±0,6)	0 (±0,0)	1,9 (±0,3)
Ch	Non inoculé	8	0 (±0,0)	0 (±0,0)	0 (±0,0)	0 (±0,0)	1,8 (±0,6)
	B844	8	0,7 (±0,5)	0 (±0,0)	0,4 (±0,5)	0 (±0,0)	3,3 (±0,7)
	F13	7	0,5 (±0,5)	0 (±0,0)	0,4 (±0,5)	0 (±0,0)	3 (±0,8)
	CO1 (A17b)	8	0 (±0,0)	0 (±0,0)	0,3 (±0,4)	0 (±0,0)	3,5 (±0,5)
	CO2 (A17d)	7	0,4 (±0,5)	0,1 (±0,4)	0 (±0,2)	0 (±0,0)	3 (±0,8)
	GHu	7	0,2 (±0,3)	0 (±0,0)	0,2 (±0,4)	0 (±0,0)	3,1 (±0,8)

Les symptômes ont été notés sur chaque plante en 2012, 2013 et 2014 par une estimation visuelle basée sur une échelle de notation. Pour chaque type de symptôme, le premier nombre indique, pour chaque combinaison cépage-souche virale, la moyenne cumulative pour les 3 années des notes obtenues pour chacune des plantes de la catégorie et entre parenthèses figure la déviation standard.

<sup>(a)</sup> Nombre de plantes testées

<sup>(b)</sup> Pour les décolorations, déformations des feuilles et les anomalies des rameaux, la note 0 correspond à une absence de symptôme. Les notes 1, 2, 3 et 4 correspondent à la présence du symptôme respectivement sur 1-25 %, 25-50 %, 50-75 % et 75-100 % de la plante. Pour les anomalies des rameaux, à nouveau, une note de 0 à 4 a été attribuée en fonction de la prédominance du symptôme sur la plante. Des entrenœuds plus courts ont été aussi observés sur les vignes infectées mais du fait de leur répartition très aléatoire sur les rameaux, il n'a pas été attribué de note pour ce symptôme.

<sup>(c)</sup> Les notes 1, 2, 3 et 4 correspondent respectivement à un faible, un moyen, un fort et un très fort rabougrissement (Fig. 14b). La note 0 correspond à un développement du plant similaire aux plantes non inocuées.

<sup>(d)</sup> Pour la coulure (Fig. 14a), une estimation visuelle à 4 niveaux a été réalisée : 1, pas de coulure, 2 peu de coulure, 3 coulure moyenne, 4 coulure importante.

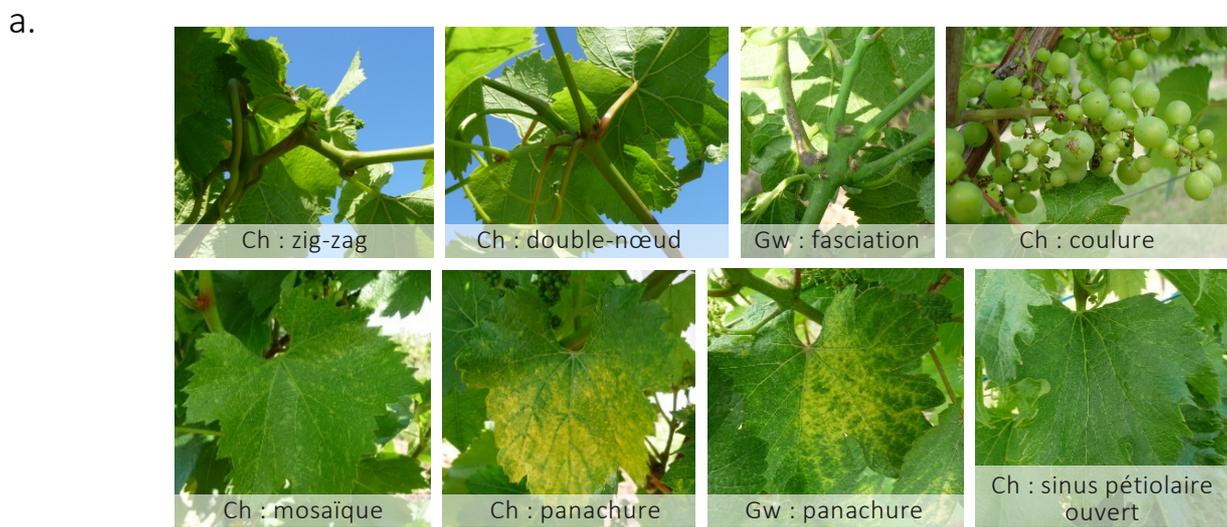
L'équipe dispose ainsi d'une collection de porte-greffes kober 5BB (clone 259) infectés par différentes souches de GFLV et conservée en conditions protégées (parcelle ou en serre) qui sert de source pour les greffes de bouture herbacée de différents cépages selon les besoins (gewurztraminer (Gw), chardonnay (Ch), riesling (Ri) et pinot noir (PN)). Le processus de greffage hétérologue, bien que très long, est efficace et permet d'obtenir des vignes mono-infectées ayant la même origine et pouvant être considérées comme des répliques biologiques au sein d'une expérience.

## 2. Phénotypes induits par les souches B844 et F13 du GFLV sur les cépages Ch et Gw

Une parcelle expérimentale composée de vignes des cépages gewurztraminer (clone 643) et chardonnay (clone 143), greffées sur des porte-greffes kober 5BB (clone 259) a été mise en place à Colmar. Elles sont soit non-infectées, soit mono-infectées par l'une des cinq souches de GFLV suivantes : F13, GHu, CO1, CO2 ou B844. En 2006, 80 vignes inoculées par ces cinq différentes souches de GFLV et 16 ceps non-inoculés ont été implantés dans une parcelle dépourvue de *X. index*. Seules six ceps ne se sont pas bien développés, laissant ainsi un dispositif expérimental de 90 ceps. De 2009 à 2011, le statut infectieux de chaque cep a été confirmé par des analyses sérologique et moléculaire. Comme attendu la présence de la souche de GFLV utilisée pour inoculer chaque vigne a été confirmée par IC-RT-PCR-RFLP et le virus n'a jamais été détecté dans les vignes non-inoculées contrôles.

De 2012 à 2014, les symptômes ont été notés sur chaque vigne individuellement. En juin et juillet les symptômes ont été examinés au niveau des feuilles, des rameaux, des grappes et de l'aspect général de la plante à l'aide d'une échelle de notation allant de 0 à 4 (Tableau 5). Pour la plupart des souches, des symptômes courants du court-noué (décoloration des feuilles, développement anormal des rameaux et coulure) ont été notés sur Gw et Ch (Fig. 14). Ces symptômes étaient absents des vignes témoins, non-inoculées. Seule la souche GFLV-B844 a montré un phénotype très marqué de rabougrissement général du pied et des feuilles sur Gw. Alors que ce phénotype est clairement visible chaque année l'intensité du rabougrissement induit par B844 peut être différente d'un pied de Gw à l'autre (Fig. 15). Ce phénotype est spécifiquement induit par B844 sur Gw alors que les vignes de cépage Ch inoculées par le GFLV-B844 ne montrent pas ce rabougrissement. Rapidement les analyses se sont concentrées sur le cépage Gw inoculé par les souches B844 et F13 du GFLV, qui présentent les phénotypes les plus contrastés.

Le couple F13 / B844 sur Gw semble adéquat pour comprendre comment un même génotype hôte réagit spécifiquement à différentes souches pour aboutir à des phénotypes contrastés, ainsi que cela avait été réalisé sur les hôtes herbacés du genre *Nicotiana*. Mon objectif était de comparer les transcriptomes de ces vignes Gw infectées par les deux souches



E. Vigne ©



Figure 14 : Symptômes induits par le GFLV (a) et plus particulièrement B844 (b) sur chardonnay (Ch) et gewurztraminer (Gw)

Les symptômes de la parcelle ont été suivis sur Gw et Ch en réponse au GFLV (a), et plus particulièrement au GFLV-B844 (b) durant l'été. Les différents types de décolorations observés dans cette parcelle sont des mosaïques et des panachures. Les déformations des feuilles observées correspondent à des feuilles au sinus pétiolaire ouvert en forme d'éventail et spécifiquement pour Gw-B844 à de petites feuilles rabougries (b). Les anomalies des rameaux correspondent à des croissances en zig-zag, des double-nœuds et de la fasciation. Des entre-nœuds plus courts ont été aussi observés sur les vignes infectées et leur répartition peut être très aléatoire sur les rameaux. Enfin de la coulure a été observée et reste le symptôme le plus problématique au vignoble.

afin d'identifier des voies spécifiquement dérégulées par la souche sévère qui pourraient expliquer le mécanisme à l'origine du rabougrissement.

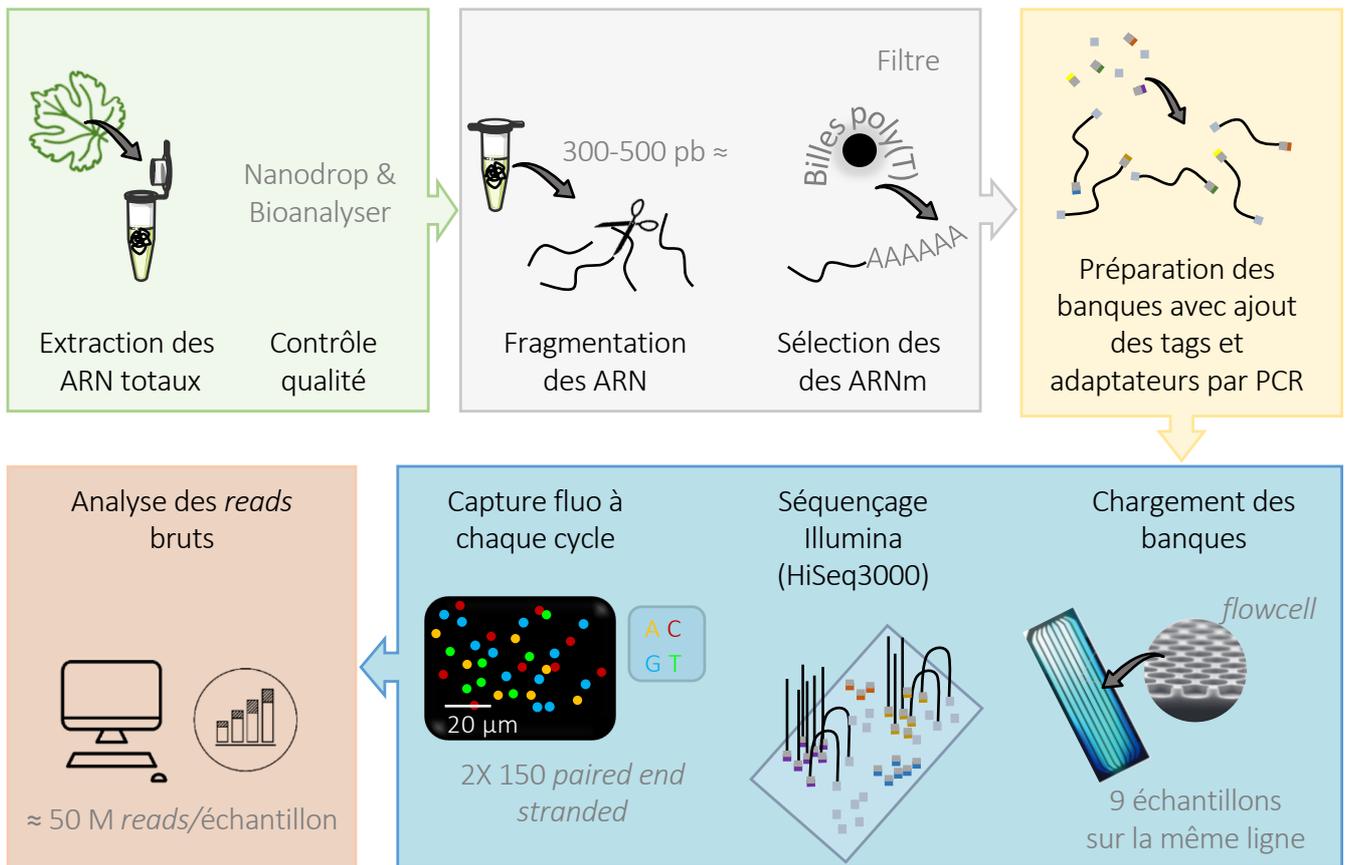
Les récentes avancées en matière de séquençage à haut débit (ou *High Throughput Sequencing* HTS en anglais) ont permis le développement de systèmes de quantification du profil d'expression tel que le *RNA-Sequencing* (RNA-Seq) (Fig. 15). De nombreux outils bio-informatiques ont été développés pour s'adapter aux métadonnées que cette technique génère. Le RNA-Seq permet : (i) le diagnostic sanitaire des échantillons, (ii) d'établir le transcriptome d'un échantillon à un temps t, et (iii) rend possible l'étude des interactions hôte / virus. Cette technique a donc été choisie pour conduire une analyse transcriptomique comparative sur des vignes Gw non-inoculées, inoculées avec du GFLV-F13 ou inoculées avec du GFLV-B844. Cette approche sans *a priori* a été choisie, car contrairement au travail sur *N. occidentalis* nous n'avons pas réellement d'hypothèse quant aux voies et gènes spécifiquement dérégulés par la souche B844 qui pouvaient être à l'origine du fort rabougrissement observé sur Gw.

## II. L'analyse transcriptomique révèle qu'une réaction de type HR serait induite spécifiquement par le GFLV-B844 sur Gw

### 1. Résumé de la Publication n°2

Les réactions de *V. vinifera* en réponse aux infections par des népovirus incluant le GFLV sont peu caractérisées. Cet hôte d'intérêt agronomique, est une plante pérenne, greffée, qui ne s'infecte pas mécaniquement, autrement dit, un challenge pour étudier et comprendre les réactions conduisant à la symptomatologie induite par une infection virale. Le GFLV est à l'origine de la maladie du court-noué qui est accompagnée de symptômes multiples et complexes. Le cépage, la combinaison porte-greffe / greffon, le variant viral et les conditions environnementales jouent un rôle dans la diversité de ces symptômes, mais pour l'heure aucune étude n'a permis de faire un lien entre un phénotype sur vigne et un génotype viral de GFLV, ni de proposer un mécanisme de pathogenèse. Une étude de transcriptomique sans *a priori* a été conduite sur un dispositif expérimental, composé de vignes gewurztraminer infectées par la souche hyper-agressive B844 causant un fort rabougrissement de la plante ; par la souche F13 induisant des symptômes plus modérés, et enfin de vignes contrôles non-inoculées.

L'effet de l'infection de vignes Ch et Gw par les souches F13 et B844 montre que le GFLV réduit les rendements des deux cépages en diminuant le poids moyen des grappes, à la fois par une réduction du nombre de baies par grappe et du poids moyen des baies. Sur Gw, la souche B844 aggrave significativement ces dégâts par rapport à la souche F13. De plus, elle provoque une diminution significative du nombre de grappes et du poids de bois de taille, un



**Figure 15 : Principe du RNA-Seq par Illumina et ses étapes majeures**

Le RNA-Seq, appartenant aux techniques de séquençage à haut débit (aussi connue sous les terminologies NGS, HTS ou MPS), permet le séquençage de différents types d'ARN (dans notre cas les ARN messagers). Cette technique de séquençage est basée sur l'élongation de la polymérisation et sur la technologie de fluorochrome à terminateurs réversibles. Rapidement, les ARN totaux d'un échantillon sont extraits et leur qualité vérifiée dans le but de construire des banques composées d'ADNc à partir d'ARN fragmentés et sélectionnés (ici, ARN polyadénylés uniquement) flanqués d'adaptateurs et de tags [double tags uniques pour chaque échantillon, ce qui permet de multiplexer (mélanger sans perdre d'information sur la provenance) ceux-ci sur une même ligne de séquençage]. Les banques de chaque échantillon sont ensuite chargées sur une cellule (ou *flow cell*) prise en charge par le séquenceur. La PCR génère automatiquement des clusters pour chaque fragment qui seront séquencés. L'incorporation de chaque dNTP couplé à un fluorochrome spécifique est suivie à chaque cycle par imagerie, puis le terminateur réversible est clivé pour permettre l'incorporation de la base suivante. Les méta-données générées sous forme de millions de *reads* (fragment de transcrit) par échantillon sont analysées à l'aide d'outils bio-informatiques adaptés.

marqueur de la vigueur des ceps. Ces résultats quantifiés montrent que sur le cépage Gw, les souches F13 et B844 provoquent une symptomatologie contrastée.

Une analyse transcriptomique par RNA-Seq a ensuite été menée sur ces vignes. Neuf plantes du dispositif expérimental (3 par modalité : F13, B844 et non-inoculé) ont été utilisées pour cette analyse. À la date du prélèvement une estimation du phénotype de rabougrissement a été effectuée sur chacune de ces neuf plantes, en comptant le nombre de feuilles ouvertes et en mesurant la longueur des feuilles et des rameaux.

L'analyse par RNA-Seq a tout d'abord permis de dresser le virobiote de chaque plante en comparant les séquences obtenues avec l'ensemble des séquences connues de virus et viroïdes infectant la vigne. Seules quelques séquences de GRSPaV, GYSVd et HSVd (< 90 RPKM) ont été obtenues, la grande majorité des séquences correspondant aux séquences virales attendues. Ces séquences ont servi à assembler des génomes pour en faire des arbres phylogénétiques. Les résultats montrent que les séquences obtenues dans chaque plante correspondent à des quasi-espèces virales attendues pour chaque inoculum.

Ensuite l'analyse a porté sur le transcriptome des vignes en utilisant le clone PN40024 comme référence. 77 à 82 % des séquences obtenues ont pu être assignées à des gènes, parmi lesquels 1 023 apparaissent spécifiquement dérégulés par la souche B844 (419 sont surexprimés et 604 sont réprimés par rapport aux plantes contrôles). Les résultats de transcriptomique ont été confirmés par qRT-PCR pour 16 gènes parmi 19 choisis au hasard.

Les gènes spécifiquement dérégulés par la souche sévère B844 appartiennent pour certains à des catégories de gènes (termes GO) que l'on retrouve souvent associées à des infections virales, comme des processus photosynthétiques, la biogenèse des ribosomes ou le métabolisme des sucres. D'autres sont impliqués dans la régulation de la croissance des méristèmes, ce qui est tout à fait cohérent avec un phénotype de rabougrissement. Le résultat le plus marquant est que 43 des gènes dérégulés sont associés à la régulation de la HR, suggérant qu'une HR ait pu être préalablement mise en place dans ces plantes.

Pour conforter ces résultats, des plantes provenant du même dispositif et des plantes provenant d'un nouveau dispositif expérimental similaire, implanté en 2014 en serre ont été analysées par qRT-PCR. Pour cette analyse, 11 gènes ont été sélectionnés dans les différentes catégories et nous avons également testé l'expression des gènes codant pour les protéines PR10 et RDR1. Malgré les fortes fluctuations en raison des conditions de culture variables et des temps de prélèvement différents, on peut voir que les gènes sont différentiellement affectés par ces deux souches virales.

Cette expérimentation unique a donc permis d'identifier des souches virales provoquant des symptômes contrastés sur le cépage gewurztraminer. L'analyse transcriptomique comparée de ces plantes a montré que la souche sévère dérégulait

### CHAPITRE III

spécifiquement des gènes associés à la régulation de la HR ce qui permet de supposer que le mécanisme d'induction de ces symptômes pourrait avoir un lien avec la HR.

#### 2. Publication n°2



1 Article

# 2 Comparative analysis of grapevine transcriptome in 3 response to grapevine fanleaf virus strains with 4 contrasted symptomatology.

5 Isabelle R. Martin, Emmanuelle Vigne, Amandine Velt, Jean-Michel Hily, Véronique Komar,  
6 Camille Rustenholz, Olivier Lemaire and Corinne Schmitt-Keichinger \*

7 Université de Strasbourg, INRA, SVQV UMR-A 1131, Colmar 68000, France

8 \* Correspondence: keichinger@unistra.fr

9 Received: date; Accepted: date; Published: date

10 **Abstract:** Grapevine degeneration or fanleaf is the oldest described and widespread viral disease of  
11 grapevine. It causes variable damages ranging from some yield losses to complete decline of the  
12 vineyard. Grapevine fanleaf virus represents the major virus responsible for this disease. It belongs  
13 to the genus *Nepovirus* family *Secoviridae* in the order *Picornavirales*. Studies on its pathogenicity in  
14 grapevine have been hindered by the high incidence of multiple infections in this perennial crop  
15 and the difficulty to inoculate it with isolated strains. To gain insights into GFLV-vine interactions  
16 in relation to symptom development we established a controlled field trial and identified a vine  
17 genotype exhibiting differential symptomatology in response to inoculation with two different  
18 strains of GFLV. We used RNA-Seq to analyze transcriptomic changes and found 1458 genes  
19 commonly deregulated upon GFLV infection and 1023 genes specifically deregulated by the more  
20 severe strain, among which genes implicated in the regulation of the hypersensitive response.

21 **Keywords:** *Nepovirus*; grapevine; RNA-Seq; hypersensitive response; transcriptome; contrasting  
22 phenotypes; symptomatology.  
23

## 24 1. Introduction

25 Of the fifteen grapevine-infecting viruses in the genus *Nepovirus*, family *Secoviridae*, grapevine  
26 fanleaf virus (GFLV) appears as the major causal agent of grapevine degeneration, the most  
27 detrimental viral disease to this worldwide cultivated crop [1]. Symptoms induced by GFLV vary  
28 according to viral strain, vine genotype and environmental conditions leading to 10 – 100 % of crop  
29 losses [2] devastating the grapevine industry in some regions. Symptoms range from foliar  
30 discolorations to severe deformations and stunting [2, 3] and have been classified in two main  
31 syndromes: (i) infectious malformations where abnormal development affects foliage, shoots,  
32 branches and bunches, and (ii) yellow mosaics where variable chromatic alterations are visible and  
33 can fade away during summer and where developmental defects only impact on the number and  
34 size of bunches [4]. Despite the analysis of a coding fragment from 28 GFLV isolates of various  
35 countries no viral determinant could be clearly identified [5] and the vine-virus interaction  
36 controlling pathogenicity remains poorly understood.

37 GFLV is a non-enveloped isometric virus specifically transmitted by the ectoparasitic nematode  
38 *Xiphinema index* belonging to the family *Longidoridae*. Its genome is composed of two single-stranded  
39 positive-sense RNAs, both being required for systemic infection. Each RNA encodes a polyprotein  
40 which is cleaved by a viral proteinase into functional mature proteins. RNA1 gives rise to polyprotein  
41 P1 which is matured into five proteins involved in replication and polyprotein processing: protein  
42 1A of unknown function, the helicase-motif containing-1B<sup>Hel</sup>, the small genome linked protein 1C<sup>VPg</sup>,  
43 the proteinase 1D<sup>Pro</sup> and the RNA-dependent RNA polymerase 1E<sup>Pol</sup>. RNA2 is translated in

44 polyprotein P2 which is processed into three proteins: the homing protein 2A<sup>HP</sup> involved in RNA2  
45 replication, the tubule-forming movement protein 2B<sup>MP</sup> and the structural protein 2C<sup>CP</sup> [for a review,  
46 see 3].

47 In addition to infecting most *Vitis* species, GFLV also infects herbaceous plants either naturally  
48 under field conditions [6, 7] or in experimental settings following mechanical inoculation. Based on  
49 a reverse genetics approach using strains expressing different phenotypes in *Nicotiana* species, we  
50 previously identified the sequence encoding the 136 last aminoacids of protein 1E<sup>Pol</sup> as a symptom  
51 determinant in the compatible interaction between *N. benthamiana* or *N. clevelandii* and the GFLV  
52 strain GHu [8]. More recently we showed that a hypersensitive reaction is responsible for the necrotic  
53 symptoms induced by GFLV strain F13 in *N. occidentalis* and identified the 50 last residues of protein  
54 2A<sup>HP</sup> as the avirulence factor (Avr) [9].

55 In the perennial crop grapevine many factors complicate the studies on symptom development:  
56 the incidence of multiple infections makes it difficult to attribute a phenotype to a given virus  
57 genotype and the lack of an easy and reliable inoculation technique still hinders reverse genetic  
58 experiments. Here we describe the establishment of a controlled field trial with a single genotype of  
59 *Vitis vinifera* cultivar Gewurztraminer exhibiting differential symptoms when inoculated by two  
60 different GFLV strains and compare their transcriptomes using high throughput sequencing.  
61 Expression profiles reveal commonly and differentially regulated genes in response to a mild or an  
62 aggressive strain causing stunting and suggest a specific deregulation of the hypersensitive reaction  
63 pathway in response to the aggressive strain. This represents the first genome-wide non-targeted  
64 study on nepovirus-induced symptoms on the agronomically important host grapevine.  
65

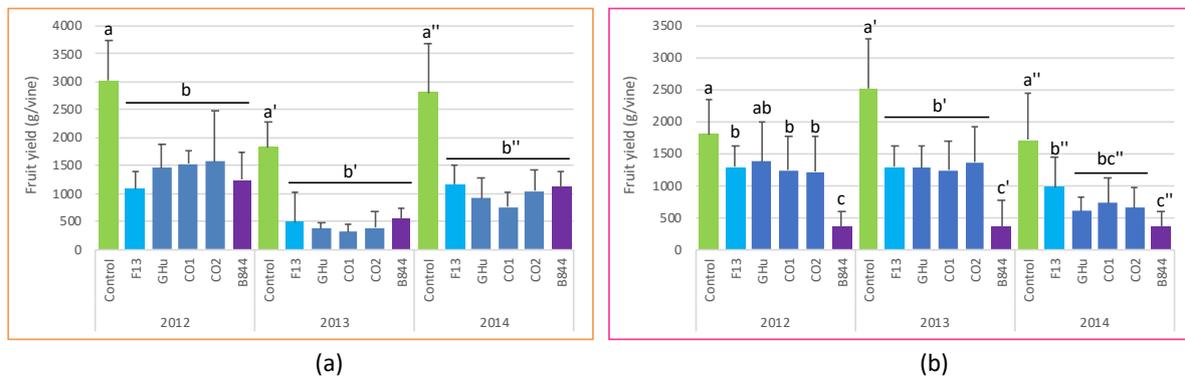
## 66 2. Results

### 67 2.1. Differential symptoms in *Vitis vinifera* Gewurztraminer infected by two different GFLV strains.

68 In order to gain insights into symptom determination and development in relation to GFLV and  
69 vine genotypes we needed to inoculate plants of known vine varieties with known virus strains in  
70 controlled conditions. We tested five GFLV strains originating from naturally infected grapevines.  
71 Strains were isolated and maintained by sequential passages on herbaceous plants [10]. These strains  
72 include GFLV-F13 and GFLV-GHu already used to study GFLV symptomatology on *Nicotiana* spp  
73 [8, 9], strain GFLV-CB844 [11] hereafter renamed B844, A17b and A17d [10], hereafter renamed CO1  
74 and CO2 respectively. Noteworthy, all strains are composed of an RNA1 and an RNA2, except strain  
75 B844 which contains two RNA2 designated RNA2a and RNA2b. Mechanically inoculated  
76 *Chenopodium quinoa* plants developed a systemic infection and were used to inoculate the grapevine  
77 rootstock variety Kober 5BB (*V. berlandieri* X *V. riparia*) by *in vitro* heterologous grafting [12].  
78 Chardonnay (Ch) and Gewurztraminer (Gw) scions were then grafted onto the infected rootstock  
79 (Supplemental fig. 1). Ch and Gw cuttings were also grafted on non-inoculated rootstocks to serve as  
80 controls. Eight plants of each grapevine variety-virus strain (or control) combination were planted in  
81 2006 in a field devoid of *X. index* to avoid transmission and thus superinfection. Of these 80 inoculated  
82 and 16 control vines, only 6 did not develop well. From 2009 to 2011, the infectious status of each  
83 plant of our experimental system was checked by serological and molecular analyses. As expected,  
84 GFLV was never detected in the control vines. For each infected (GFLV-positive) vine the strain was  
85 confirmed by IC-RT-PCR-RFLP (data not shown).

86 Symptoms were monitored over time on these 90 individual vines and fruits were harvested and  
87 weighted. All GFLV strains induced symptoms on Ch and Gw vines compared to non-inoculated  
88 controls. On Ch vines all strains induced discolorations like mosaics or mottling on leaves. Symptoms  
89 were more variable over years than between strains as shown by fruit yield reduction that ranged  
90 from 48 to 65 % in 2012, from 70 to 83 % in 2013 and from 60 to 72 % in 2014 (Fig. 1a). On Gw vines,  
91 strains F13, GHu, CO1 and CO2 induced very similar discolorations whereas strain B844 induced a  
92 severe growth diminution giving the vine a stunted aspect. This symptom was already visible during  
93 the third growing season (in 2009) and persisted over the years (Fig. 2). Also, at the level of fruit yield,

94 B844 exhibited a more severe phenotype than other strains. Whereas strains F13, GHu, CO1 and CO2  
 95 caused a yield reduction ranging from 22 to 34 % in 2012, from 46 to 53 % in 2013 and from 42 to 64 %  
 96 in 2014, strain B844 consistently reduced fruit yield by 80 % (Fig. 1b). Since strain F13 behaved  
 97 essentially similarly to strains GHu, CO1 and CO2 in regard to yield reduction on both grapevine  
 98 varieties, we limited our further work to GFLV-F13 in comparison to GFLV-B844.



99

100

101

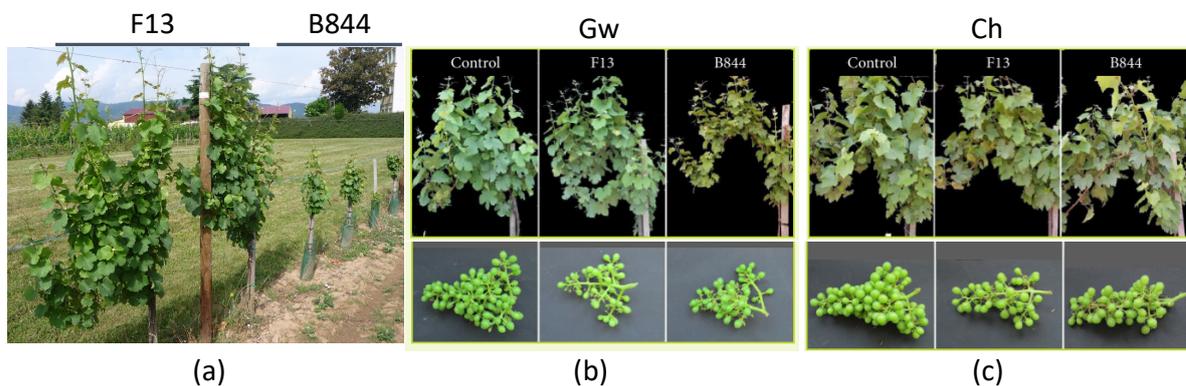
102

103

104

105

**Figure 1:** Yield reduction in Ch (a) and Gw (b) vines infected by five different strains of GFLV. The five strains induced similar yield reduction on Ch vines whereas strain B844 is more severe than strains F13, CO1, CO2 and GHu in Gw vines. Eight plants of each plant-virus combination were tested for their fruit yield over three seasons. Different letters identify significant differences ( $P < 0.05$ ).



106

107

108

109

110

**Figure 2:** GFLV-B844 and GFLV-F13 induce contrasting phenotypes in Gw vines. (a) Gw plants were photographed in spring 2009. (b) Gw plants and fruits photographed in 2012. (c) Ch plants photographed in 2012 show similar effects of the two GFLV strains.

111

112

113

114

115

116

117

118

119

120

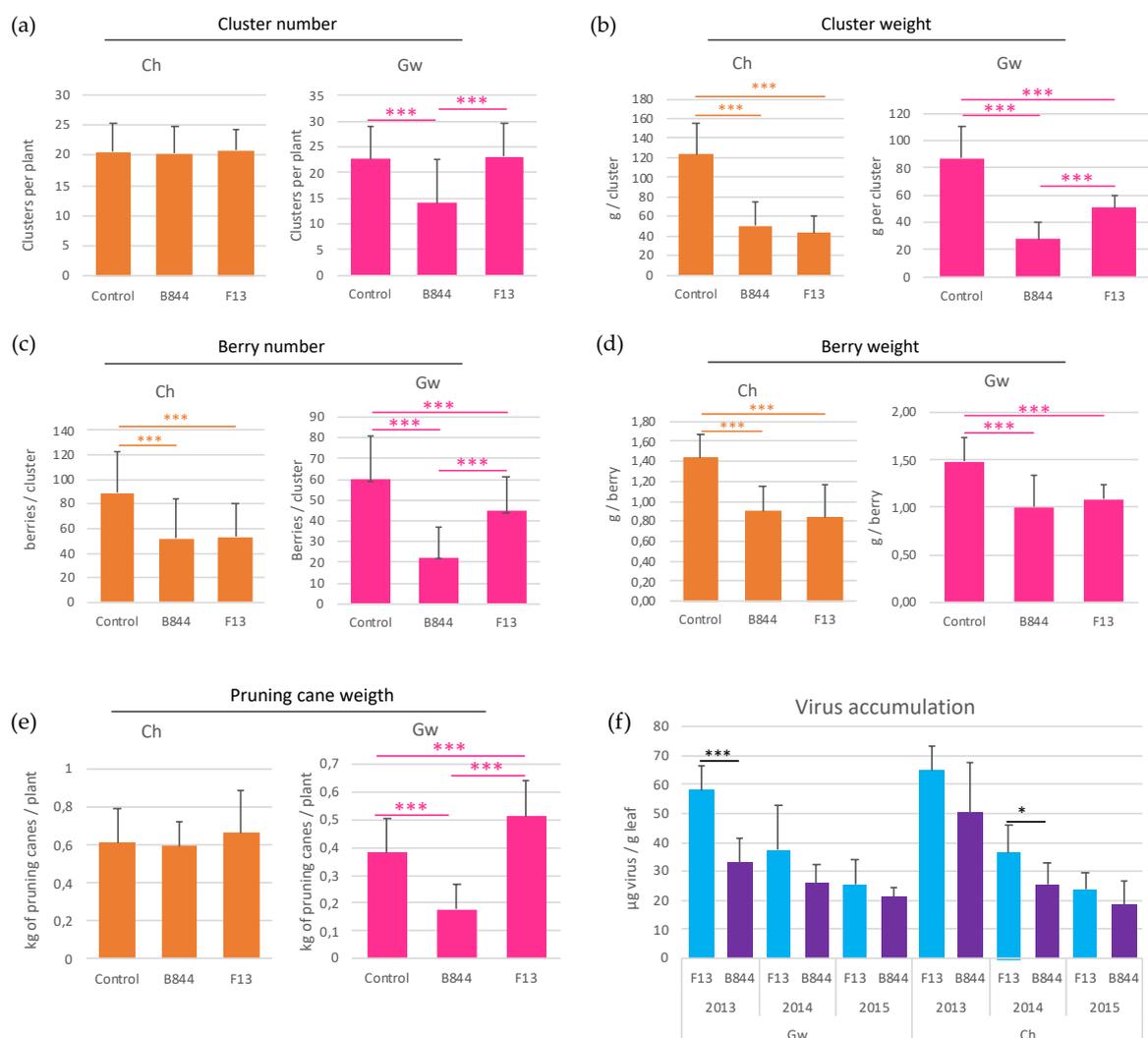
121

122

From 2012 on, in addition to visually scoring symptoms (Fig. 2), we tried to quantify somehow the differential phenotypes exhibited by vines infected by GFLV-F13 or GFLV-B844. Six to eight plants per plant-virus combination were monitored for at least 3 years. The results are presented as cumulative data in Fig. 3 (and in details according to years in Supplemental fig. 2). On Ch vines, both strains had an effect on the fruit production through the reduction of the mean cluster weight, the mean number of berries per cluster and the mean weight of the berries, but not by reducing the number of clusters on the vine (Fig. 3). Above all, no significant difference was reproducibly observed between the two strains. On the contrary, strains F13 and B844 caused contrasted phenotypes on Gw vines. Strain F13 had fairly the same effects than on Ch vines whereas B844 caused a more pronounced reduction on the mean cluster weight and the number of berries in a cluster. In addition, it occasioned a diminution of the mean number of clusters per plant (Fig. 3). In winter we weighted the pruning wood as an indication of the vine vigor [13, 14]. This also revealed a contrasted effect of

123 the two strains: while GFLV-B844 induced a 50 % reduction compared to uninfected vines, GFLV-  
 124 F13 increased the wood weight by a factor of 1,2 to 1,3 (Fig. 3). Thus, with the exception of the mean  
 125 berry weight, all tested parameters showed a more drastic effect of strain B844 than strain F13 on Gw  
 126 vines.

127 To test whether symptom severity was related to virus titer, we estimated the level of virus  
 128 accumulation by semi-quantitative DAS-ELISA [8] in young leaves of Ch and Gw scions (Fig. 3).  
 129 Control scions grafted onto uninoculated rootstocks always tested negative for GFLV. Over the years,  
 130 virus titer was quite variable but was generally not significantly different between the two strains  
 131 (although GFLV-B844 always accumulated less than GFLV-F13) suggesting that virus accumulation  
 132 is not responsible for the severity of the symptoms. Altogether this experimental set-up allowed us  
 133 to identify B844 and F13 as severe/aggressive and milder strains of GFLV on Gw grapevines.



134

135

136

137

138

139

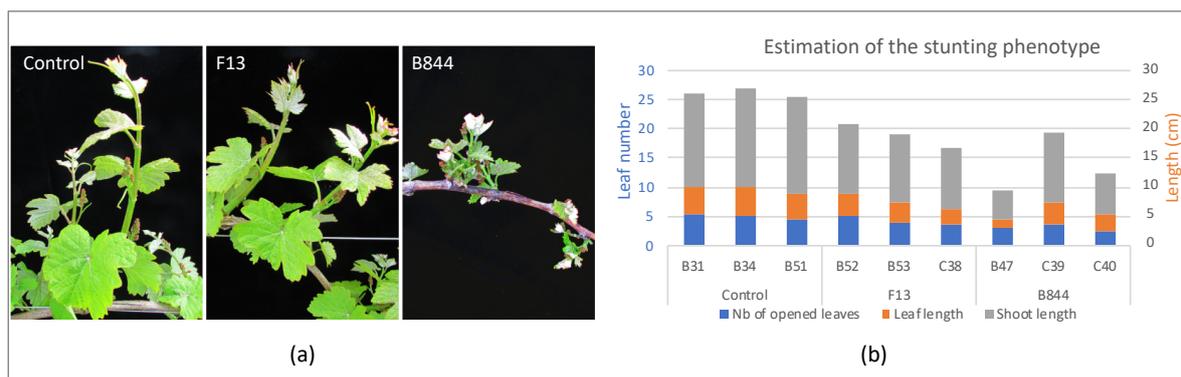
140

141 **Figure 3:** Comparison of F13- and B844-infected grapevines. Gw (pink) and Ch (orange) vines  
 142 infected with GFLV strains F13 and B844 were monitored, for cluster number (a) and mean  
 143 weight (b), for berry number (c) and weight (d) and for pruning wood weight (e) from 2012,  
 144 2013 to 2014. The virus accumulation was estimated by semi-quantitative DAS-ELISA from 2013  
 145 to 2015 (f). Error bars = standard deviation. Statistically significant differences (Student's *t*-test)  
 146 are indicated with asterisks (\*:  $P \leq 0.05$ , \*\*\* $P \leq 0.005$ ).

147 2.2. RNA-Seq sequencing and mapping reads on virus and grapevine genomes.

148 To shed light on the processes behind the onset of mild or aggressive symptoms we used the  
 149 high throughput sequencing (HTS) technique RNA-Seq to compare the transcriptomes of F13- and

150 B844-infected Gw grapevines to uninfected Gw controls. We sampled leaves in spring, the 17<sup>th</sup> of May  
 151 2016 after budburst on similar shoots and at a similar phenological stage (clusters visible, 4 to 6  
 152 expanded leaves). Three conditions were tested: non-inoculated Gw scions (control), GFLV-F13  
 153 infected Gw scions (F13) and GFLV-B844 infected Gw (B844) and 3 biological replicates (plants) were  
 154 analyzed per condition. Representative pictures of the 3 conditions are shown in Fig. 4a. To somehow  
 155 characterize the stunting symptoms of the analyzed plants, we counted their opened leaves and  
 156 measured the size of their leaves and shoots. Results (Fig. 4b) show that plants B47 and C40 infected  
 157 by GFLV-B844 developed less leaves and that these leaves and the shoot bearing them were shorter  
 158 compared to non-inoculated material (Fig. 4b). Noteworthy, plants inoculated with strain B844,  
 159 exhibited variable phenotypes.



160

161 **Figure 4:** Phenotype of the plants subjected to RNA-Seq analysis. **(a)** Photographs showing leaves of  
 162 representative non-inoculated (control, plant B33), GFLV-F13 inoculated (F13, plant B52) and GFLV-  
 163 B844 inoculated (B844, plant B47) scions were taken at the same phenological stage. **(b)** The stunting  
 164 phenotype of the plants used for transcriptomic analyses was assessed by counting the number of  
 165 opened leaves and measuring the size of the leaves and shoots.

166

167 Total RNA was extracted from entire leaves (N-2 on the secondary shoots n° 7 and 8) and  
 168 subjected to Illumina RNA Sequencing. For each replicate 52 to 85 million paired-end reads of 150  
 169 nucleotides were obtained, with the exception of plant B47 (B844-inoculated) for which we obtained  
 170 165 million reads and is thus over-amplified (Table 1 and Supplemental table 1).

171

### 172 2.2.1. Sanitary status of the plant samples

173 After trimming (which removed 0.21 to 1.84 % of the total reads, see Supplemental table 1), the  
 174 reads were aligned against all known grapevine infecting virus and virus-like sequences [1] to  
 175 establish the sanitary status of the vines (*i.e.* the virome). The vast majority of the retrieved viral  
 176 sequences aligned to GFLV strains F13 and B844 (Fig. 5). As expected no GFLV sequence was  
 177 observed in the control plants and only F13 or B844 GFLV sequences were present in the F13-  
 178 inoculated and B844-inoculated plants, respectively, indicating that no superinfection had occurred.

179

180

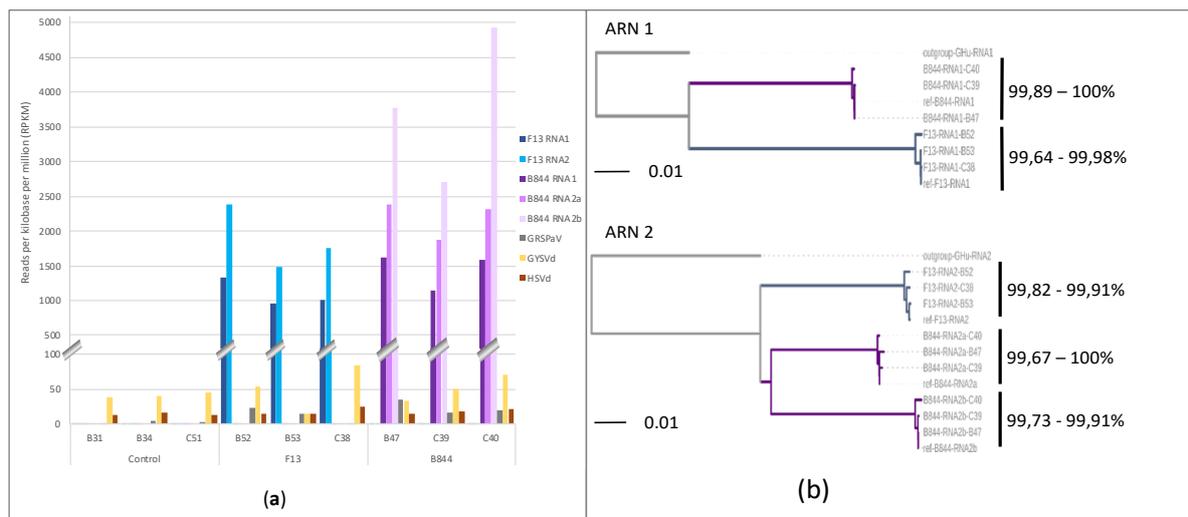
181

182

183

184

185



186 **Figure 5:** Analysis of viral and viroidal sequences retrieved from non-inoculated (control),  
 187 GFLV-F13 (F13) or GFLV-B844 (B844) inoculated Gw scions. **(a)** Distribution of reads matching  
 188 grapevine virus or viroids. The number of reads were normalized to the depth of sequencing  
 189 and the length of the viral/viroidal genomes. A break was inserted in the vertical axis for a better  
 190 visibility of the results. **(b)** Phylogenetic relationships of GFLV genomes assembled from  
 191 sequences obtained from leaf samples of infected scions. Alignments based on the maximum  
 192 likelihood of the coding sequence of RNA1 and 2 (excluding the 5' and 3' UTRs) were performed  
 193 using CLC Workbench. Strain GHu of GFLV serves as an outgroup.

194

195 To further check the identity of the GFLV sequences, the reads matching GFLV genome were  
 196 subjected to several rounds of alignments and *de novo* assembly and alignments. The resulting  
 197 contigs, corresponding to viral genomic sequences, were named after the identification of the plant  
 198 they originated from. Phylogenetic trees were then built by comparing RNA1 and RNA2 coding  
 199 sequences. 5' and 3' UTRs were excluded because, like for other nepoviruses they contain sequences  
 200 shared by the two RNAs [3, 15]. Results presented in Fig. 5b show that sequences retrieved from  
 201 plants (B52, B53 and C38) inoculated with GFLV-F13 cluster together and share more than 99.6 %  
 202 of identity with GFLV-F13, whatever the RNA is considered. The same results were obtained with  
 203 sequences from plants (B47, C39 and C40) inoculated with GFLV-B844 and the corresponding  
 204 reference B844 (Fig. 5b). Thus, the reads mapping to GFLV sequences indicate a perfect correlation  
 205 with the inoculated strain and a genome diversity within the range observed earlier in the CP and  
 206 polyprotein coding sequences [16, 17] and therefore attributable to the quasi-species nature of the  
 207 viruses.

208 In addition to GFLV, reads mapped to grapevine rupestris stem pitting-associated virus  
 209 (GRSPaV), a *Foveavirus* that has been shown to be ubiquitous worldwide [18], to grapevine yellow  
 210 speckle viroid (GYSVd) and to hop stunt viroid (HSVd), although with much lower RPKM values  
 211 (Fig. 5a). It has to be noted that these widely spread grapevine pathogens are similarly present in our  
 212 three conditions, most probably due to their propagation in the plant cuttings. Altogether these  
 213 results show that the analyzed samples followed the experimental set-up and that no superinfection  
 214 took place during the course of the experiment, demonstrating the controlled environment of this  
 215 field trial.

## 216 2.2.2. Grapevine transcriptome analysis

### 217 • Mapping.

218

219 50 to 165 million paired end reads of 150 nts were aligned against the Pinot Noir PN40024  
 220 transcriptome [19, 20]. 42,7 to 139,7 million reads (82 to 88 % of total reads) mapped to the grapevine  
 221 genome (Table 1 and Sup table 2) and 42,1 to 137 million reads (91 to 86 % of total reads)  
 222 corresponded to uniquely mapped reads thereof 40 to 130 million reads (77 to 82 % of total reads)  
 223 were assigned to a PN40024 gene.

224

225 **Table 1.** Summary of Illumina sequencing and read mapping to the grapevine reference genome.

Condition <sup>a</sup>	Replicate <sup>b</sup>	Total reads <sup>c</sup>	Mapped reads <sup>d</sup>	% <sup>e</sup>	Unique reads <sup>f</sup>	% <sup>e</sup>	Reads assigned to a gene <sup>g</sup>	% <sup>e</sup>
Control	B31	51,964,098	42,741,560	82	42,153,543	81	40,248,531	77
	B34	59,910,092	52,451,408	88	51,647,516	86	49,130,979	82
	C51	65,724,896	56,105,085	85	55,354,647	84	52,784,724	80
F13	B52	69,714,014	59,901,468	86	58,981,711	85	56,246,251	81
	B53	75,771,722	66,064,642	87	65,065,605	86	62,069,793	82
	C38	85,633,030	74,306,333	87	73,166,998	85	70,037,177	82
B844	B47	165,443,500	139,722,683	84	137,021,434	83	129,811,616	78
	C39	54,436,852	46,539,167	85	45,791,912	84	43,348,284	80
	C40	58,344,878	49,214,165	84	48,446,050	83	46,189,830	79

226

227 a Gw grapevine leaves of non-inoculated (control), GFLV-F13 inoculated (F13) or GFLV-B844  
 228 inoculated plants (B844).

229 b Individual plants are considered biological replicates.

230 c Total number of reads

231 d Reads mapping to the PN40024 Vitis reference genome

232 e Percentage are calculated of total reads

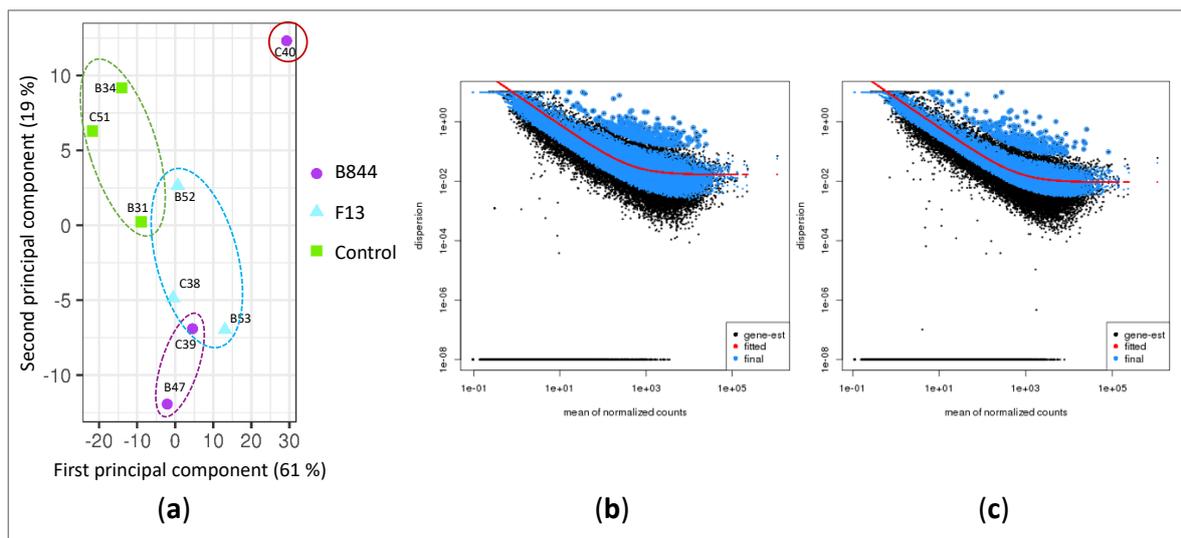
233 f Reads mapping to a unique position on the PN40024 genome

234 g Reads assigned to a PN40024 gene

235

236 • Global analysis of the data.

237 Globally, reads were obtained for 25,255 genes, representing about 80 % of the total (31,842)  
 238 annotated genes of the reference grapevine genome. With the exception of plant C40 (GFLV-B844  
 239 inoculated), the samples grouped according to the experimental condition as seen by the principal  
 240 component analysis based on the read counts after variance-stabilized transformation (VST) with  
 241 DESeq2 R/Bioconductor package (Fig 6). Variability was observed within a given condition, between  
 242 biological replicates but conditions were more discriminant that between replicates. It is also  
 243 noteworthy that the difference was more prominent between control and inoculated vines that  
 244 between vines inoculated by two different virus strains. Because sample C40 did not behave  
 245 according to these observations, we decided to exclude it from further analyses. The DeSeq2  
 246 estimation of dispersion shows that no information was lost by eliminating this sample (Fig 6b-c).



247

248

249

250

251

252

253

**Figure 6:** Global analysis of the RNA-Seq results. (a) Principal component analysis of total expressed genes after VST showing the good grouping of 8 samples with 2 components explaining 80 % of variability) and the erratic behavior of sample C40 (GFLV-B844 inoculated Gw scion). (c) and (d) Dispersion estimates of reads before (b) and after (c) removal of sample C40.

- Grapevine genes differentially expressed during GFLV-F13 versus GFLV-B844 infection.

254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

265

266

267

To better understand the processes underlying the specific stunted phenotype of vines infected with GFLV-B844, we analyzed differentially expressed genes (DEGs) in GFLV-F13 and GFLV-B844 infected vines with respect to control vines, using DESeq package. On the 31,842 annotated genes of grapevine PN40024, 25,255 were expressed in all eight considered plants (80 %). Low counts represented 4,407 genes that were filtered out by DESeq2. A total of 3,981 genes were differentially expressed (with a false discovery rate below 5%,  $FDR \leq 0.05$ ). Fig 7 presents the Venn diagram of these genes: 1,458 genes (representing 4.6 % of the annotated PN40024 genes) are deregulated by both virus strains and thus correspond to the transcriptomic changes due to GFLV infection. 2,481 and 2,958 genes are deregulated by GFLV-B844 and GFLV-F13, respectively. Whereas genes up and down regulated are almost in even proportion following GFLV-F13 treatment (48.2 % up vs 51.8 % down-regulated), a greater bias was observed toward down regulated genes after GFLV-B844 inoculation (40.4 % up vs 59.6 % down-regulated). It has to be noted that most of the changes (around 77 %) are contained in a -1 and +1  $\text{Log}_2\text{FC}$  range.

268

269

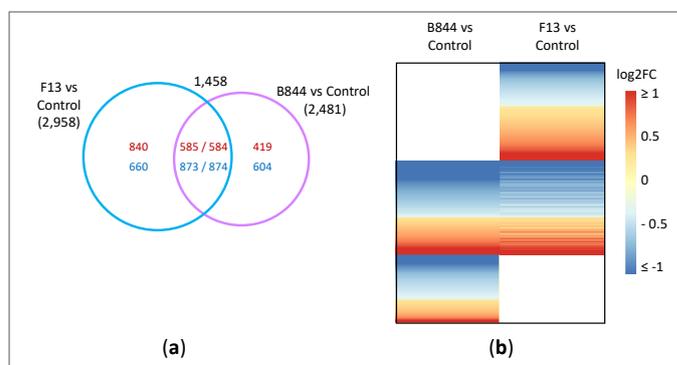
270

271

272

273

274



275

276

277

278

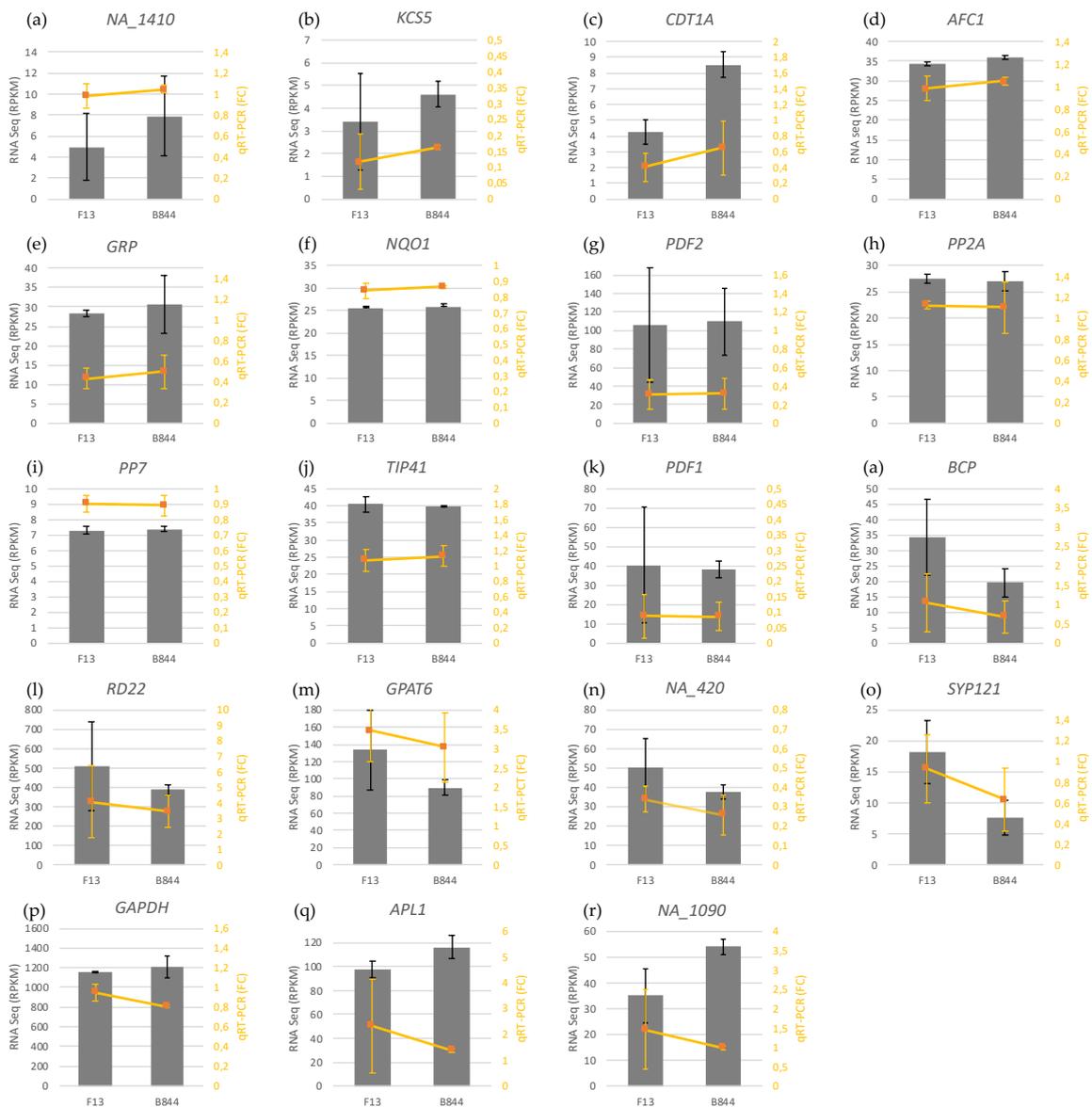
279

**Figure 7:** Grapevine genes differentially expressed during GFLV infection. (a) Venn diagram displaying the distribution of 3,981 differentially expressed genes in GFLV-F13 (F13) and GFLV-B844 (B844) infected vines compared to control plants. Number of up and down deregulated genes are represented in red and blue respectively. (b) Heatmap of the DEGs shown in (a). The color code indicates the fold change values in  $\text{Log}_2$  scale ( $\text{Log}_2\text{FC}$ ).

280 Noteworthy, from the 1,458 common genes only a single gene was deregulated in opposite  
 281 direction: VIT\_208s0007g01690 was upregulated in F13-infected samples whereas it was  
 282 downregulated in B844-infected samples.

283 • Validation of the RNA-Seq differential genes expression by qRT-PCR assay

284 To validate the RNA-Seq results, we randomly chose 20 genes to analyze their expression levels  
 285 by reverse transcription and real time quantitative PCR (qRT-PCR). We selected genes with different  
 286 expression levels and different regulation profiles and performed a relative quantification using  
 287 control samples as calibrators. Among the assessed genes, seven (NEMFI, GAPDH, PP2A, NQO1,  
 288 TIP41, AFC1, PP7) were tested as potential reference genes using geNorm and Normfinder  
 289 algorithms [21, 22] to calculate their stability across all samples. All seven genes indeed had an  
 290 expression stability measure (*M*) below 1.5, as recommended by geNorm, *TIP41* and *NEMFI* being  
 291 the most stable across our eight samples (with an *M* value below 0.08). As already described in other  
 292 virus-host pathosystems [23-25], *GAPDH* that is commonly used as reference, did not perform well  
 293 in our experimental set up. The qRT-PCR results of 19 genes were then analyzed using *NEMFI* as  
 294 reference gene. The results summarized in Fig 8 show that although the degree of modulation may  
 295 differ between the two techniques, the overall expression profiles obtained by RT-qPCR were  
 296 consistent with the RNA-Seq data (Fig 8a-o). The results were contradictory only for three genes (Fig  
 297 8p-r). These differences could be due to a much higher variability of the qRT-PCR results observed  
 298 for the F13 condition compared to the B844 condition for these genes.

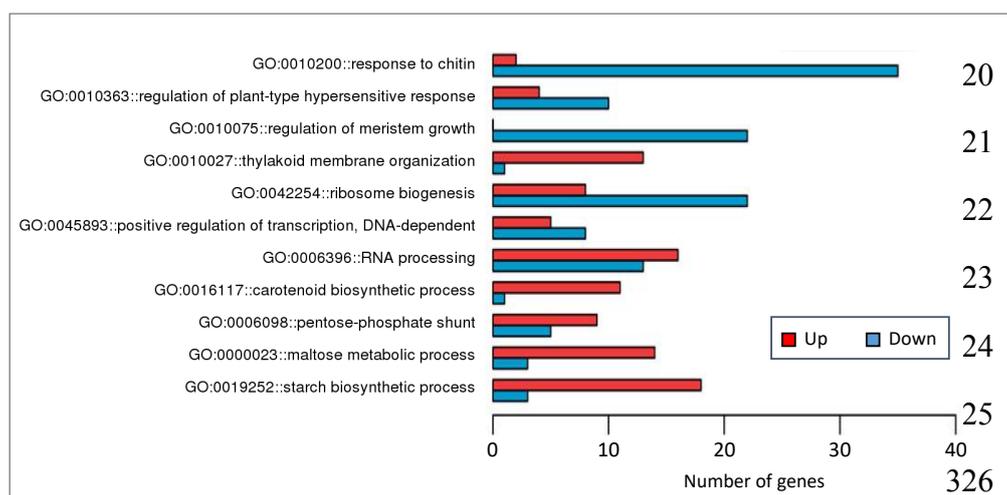


300  
 301  
 302  
 303  
 304  
 305  
 306  
 307  
 308  
 309  
 310  
 311  
 312  
 313  
 314  
 315  
 316  
 317  
 318  
 319

**Figure 8:** Comparison of RNA-Seq and qRT-PCR analyses. Expression profiles of 19 randomly chosen genes determined by RNA-Seq (histograms) and qRT-PCR (lines) are represented as means and standard errors of 3 (F13) or 2 (B844) biological replicates. Normalization for qRT-PCR used *NEMFI* as reference gene and control plants as calibrators.

- Analysis of DEGs

Because we were interested in identifying pathways differently affected by the two GFLV strains, we further analyzed the DEGs with a special focus on the 1,500 and 1,023 genes specifically deregulated in the F13 and B844 conditions, respectively. We performed a Gene ontology (GO) enrichment analysis using TopGO [26]. Whereas the biological processes GO "translation", "ribosome biogenesis", "cell proliferation", "nucleosome assembly", "starch biosynthetic process", "regulation of meristem growth", "maltose metabolic process" and "DNA replication initiation" shared DEGs for both F13 and B844 conditions (Supplemental fig 3), B844 specifically deregulated genes grouped in GOs "response to chitin", "regulation of plant-type hypersensitive response" "carotenoid biosynthetic process", "thylakoid membrane organization", "positive regulation of transcription, DNA-dependent", and "RNA processing" in addition to the shared GOs "regulation of meristem growth", "ribosome biogenesis", "pentose phosphate shunt", "maltose metabolic process" and "starch biosynthetic process" (Fig 9).



327  
 328  
 329

**Figure 9:** Distribution of genes specifically deregulated in Gw grapevines infected with strain B844 of GFLV. Numbers of induced (red) and repressed (blue) grapevine genes in the 11 top GO categories are shown. ( $P \leq 0.05$ )

330  
 331  
 332  
 333  
 334  
 335

It has to be noted that GOs most contributing to the bias of B844 specific DEGs toward repression are "ribosome biogenesis" (with 22 repressed genes on the 25 DEGs) and "regulation of meristem growth" (with all 23 DEGs down regulated), in the super GO "Thylakoid membrane" as well as "response to chitin" (with 35 repressed genes on 37 DEGs) and "regulation of plant-type hypersensitive response" (with 10 repressed genes on 14 DEGs) both forming the super GO "Regulation of plant-type hypersensitive response".

336

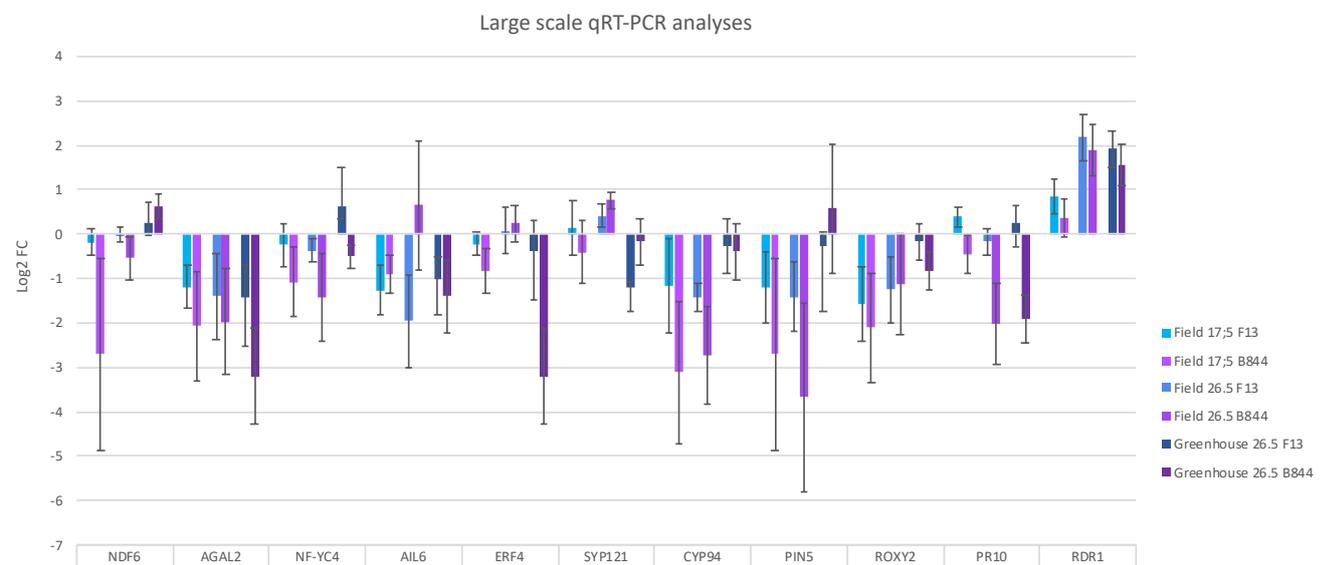
### 2.2.3. Expression analysis of candidate genes

337  
 338  
 339  
 340  
 341  
 342

To strengthen our conclusions on the specific deregulation of all these pathways by GFLV-B844, we extended our study to samples collected the same day (17<sup>th</sup> May 2016) on additional plants from the same field trial. And to test other time points of the infection process we also collected samples 9 days later, the 26<sup>th</sup> May which represents a later phenological stage. A similar set-up with non-inoculated control plants and GFLV-F13 or GFLV-B844 graft-inoculated Gw plants was available which had been established in a greenhouse in 2014. This assay represents an independent

343 experiment with different environmental conditions and a different timing. Symptoms developing  
 344 on these plants in the greenhouse were consistent with our previous observations on plants grown  
 345 in field conditions. Leaf samples were collected from this greenhouse assay the 26<sup>th</sup> of May 2016  
 346 (phenological stage: separate flower buds). In total our sampling included 9 samples from the  
 347 greenhouse (from 3 plants / condition) and 36 samples from the field trial (6 plants / condition at two  
 348 dates including samples from the plants analyzed by RNA-Seq). RNA was extracted from the leaves  
 349 of these plants and subjected to qRT-PCR assays. Candidate genes were selected to belong to the  
 350 enriched GOs, with the highest induction or repression rates. They include *NDF6*  
 351 (VIT\_200s1596g00010), *AGAL2* (VIT\_210s0071g01130), *NF-YC4* (VIT\_214s0006g02320), *AIL6*  
 352 (VIT\_200s1291g00010), *ERF4* (VIT\_219s0014g02240), *SYP121* (VIT\_208s0032g01150) and *CYP94*  
 353 (VIT\_217s0000g01490) as representatives of genes found specifically deregulated by GFLV-B844 at  
 354 the first time point. In addition to these genes we chose some additional genes namely *PIN5*  
 355 (VIT\_204s0023g00320) and *ROXY2* (VIT\_201s0146g00220) which are deregulated by the two virus  
 356 strains, but stronger by B844 than by F13 and finally we chose *PR10* (VIT\_205s0077g01670) and *RDR1*  
 357 (VIT\_201s0011g05870) two genes that appeared in our transcriptomic analysis, with a low induction  
 358 for both viruses that we thought interesting because of their involvement in defense mechanisms.

359



360

361 **Figure 10:** Large scale qRT-PCR analysis. The expression of 11 genes was monitored in samples  
 362 of vines grown in field or greenhouse conditions and collected at different phenological stages.

363 This larger scale survey confirms our previous results on the plants from the same field trial.  
 364 Because it also included samples from different time points and trials, it also shows that  
 365 environmental conditions and the phenological stage of the vines greatly affect gene expression.  
 366 *NDF6*, for example is down regulated in infected vines collected from the field the 17<sup>th</sup> or 26<sup>th</sup>  
 367 of May whereas it is overexpressed in vines kept in the greenhouse and collected the 26<sup>th</sup> of May.  
 368 However, there still subsist differences in gene expression that are virus strain specific: this is true for  
 369 genes that appeared specifically deregulated by B844 (*NDF6*, *AGAL2*, *NF-YC4*, *AIL6*, *ERF4*, *SYP121*  
 370 and *CYP94*) as well as for *PIN5* and *PR10* whereas *ROXY2* and *RDR1* do not allow to discriminate  
 371 between F13 and B844. As expected from the RNA-Seq results, *RDR1* was equally induced by the two  
 372 strains during viral infection. Altogether these results illustrate that a few genes are sufficient to  
 373 discriminate plants infected with GFLV-F13 from plants infected with GFLV-B844, although this set  
 374 of genes could slightly vary depending on the experimental conditions and time points. The  
 375 fluctuation of the expression of these genes thus seem to characterize the type of infection.

376 **3. Discussion**

377 GFLV infection was described to cause variable symptoms in the vineyard, depending on the  
378 virus and vine genotypes and on environmental conditions. The study of symptomatology is further  
379 complicated by the frequency of multiple infections in this perennial crop. In this work we describe  
380 a unique experimental set-up where two grapevine genotypes were graft-inoculated with five  
381 distinct GFLV strains and followed for several seasons. This work allowed us to distinguish four  
382 strains with comparable fruit yields (including strain F13), from strain B844 which caused a more  
383 drastic yield reduction in Gw grapevines. A careful monitoring of agronomical traits over more than  
384 three seasons further enabled a clear characterization of strains F13 and B844 and the symptoms they  
385 cause on Gw and Ch cultivars. From these observations we could conclude that strain B844 of GFLV  
386 can be considered hyper-aggressive on Gw scions whereas F13 is a milder strain. The virus titer did  
387 not reproducibly and significantly vary with the viral strain, showing that the virus concentration  
388 cannot explain the severity of the GFLV-B844 induced symptoms.

389 We took advantage of this unique material to compare the transcriptomic changes induced by  
390 these two contrasting viral strains. This was achieved by HTS because (i) it allows a powerful  
391 unbiased approach to quantify gene expression and (ii) it allows to determine the sanitary status of  
392 our grapevines. Indeed, apart from some GRSPaV, GYSVd and HSVd reads, we did not retrieve  
393 sequences from virus or viroid origin, confirming the controlled conditions in which our plants were  
394 grown. Thus, although we cannot completely rule out the possibility that these virus/viroids have a  
395 synergistic effect on GFLV symptoms, it is very likely that the GFLV-B844 is responsible for the more  
396 severe symptoms. By comparing the transcriptomic changes caused by this hyper-aggressive strain  
397 to the changes due to the milder strain we identified 2,481 deregulated unigenes, 1,458 of which were  
398 shared by the two strains and 1,023 were specifically modulated by the severe strain (419 induced  
399 and 604 repressed genes). The RNA-Seq results could be confirmed by qRT-PCR on 16 genes out of  
400 the 19 randomly chosen targets.

401 Among the GOs of deregulated genes found in this work, some are often found in  
402 transcriptomic profiling concerning viral infection. This is the case for photosynthetic processes,  
403 ribosome biogenesis, sugar metabolisms and translation for example [27-29]. Photosynthesis was  
404 already described perturbed and chloroplasts affected upon GFLV infection [30, 31]. It is also  
405 consistent with the observed stunting symptoms that strain B844 specifically represses genes  
406 implicated in the regulation of meristem growth. The two top GOs of B844-DEGs that stand out of  
407 our study (with 43 DEGs) are related to plant defense and more precisely to the hypersensitive-type  
408 response. This is of particular interest because it leads to the attractive hypothesis that an HR might  
409 have taken place in GFLV-B844 infected Gewurztraminer vines. HR occurs when the product of a  
410 cellular resistance gene (R) interacts with a pathogenic Avr. This interaction generally leads to cell  
411 death and a limitation of the virus spread within the plant [32-35]. However, cell death and virus  
412 restriction represent separate processes that have been temporally, spatially or genetically uncoupled  
413 for a few plant-virus pathosystems [36-41]. It has been suggested that the efficiency of the resistance  
414 is correlated with the speed and the intensity of the host response. A rapid reaction of the plant would  
415 thus promote an efficient restriction of the virus without severe necrosis whereas a slower reaction  
416 would be unable to stop the virus spread and this may increase the intensity of the reaction and result  
417 in systemic HR. Cell death could therefore be regarded as a side effect of a delayed defense  
418 response [39]. Timing and R-Avr interaction (affinity or quantity) are predicted to determine the  
419 outcome of the plant-virus confrontation in a continuum of possible responses ranging from extreme  
420 resistance to systemic HR. Hence the setting up of an HR and its downstream regulation is not  
421 contradicted by the systemic infection observed in our experiment.

422 An HR response to GFLV, only partially capable of restricting the virus has been shown to occur  
423 in *Nicotiana occidentalis* when inoculated with strain F13 [9]. In this herbaceous model plant, molecular  
424 markers of the HR were detected from three days post inoculation. Due to the inoculation procedure  
425 of grapevine that requires *in vitro* heterologous grafting of the rootstock on an infected *C. quinoa* stem,  
426 followed by the herbaceous grafting of the cultivar on the infected rootstock, experiments are

427 conducted at late time points. This may explain why our transcriptomic analysis did not show an  
428 induction of characteristic genes of HR (like homologs of *HSR203J*, *NDR1* or *EDS1* for example) as  
429 these genes have been described to be expressed at early time points after pathogen challenging [42].  
430 To test the hypothesis suggested by the present work that GFLV-B844 induces an HR in *V. vinifera* cv  
431 Gewurztraminer, a model of this pathosystem allowing a direct inoculation of the virus needs to be  
432 developed. Agro-inoculation of infectious clones was successfully used to infect *Vitis vinifera* with  
433 grapevine red blotch virus [43] but failed to inoculate GFLV-F13. In addition, this method needs  
434 infectious clones that have to be developed for strain B844. Protoplast preparation and inoculation  
435 represents an interesting alternate system because it allows a synchronized inoculation of viral RNA  
436 and time course studies. Although it was suggested that HR does not take place in protoplasts and  
437 that HR-based resistance requires cell-to-cell contacts [36, 44, 45], recent work shows that *Vitis*  
438 suspension cells are able to produce ROS, phytoalexins and increase the expression of HR marker  
439 genes when treated with fungal proteins [45].

440 To conclude, our work has provided a unique experimental set-up of mono-infected vines that  
441 has allowed the identification of GFLV strains with contrasting symptoms in the cv Gewurztraminer.  
442 It has provided tools to compare the transcriptomes of plants infected by a severe (B844) vs a milder  
443 strain (F13) in order to shed light on the mechanisms underlying pathogenesis. From the specifically  
444 deregulated genes, we hypothesize that an HR-type reaction might be induced by the severe strain.  
445 We now need to develop a model system to question this view, by enabling time course experiments  
446 and analysis of early events. Such a model would also prove powerful to identify cellular and viral  
447 determinants of this reaction.

448

#### 449 **4. Materials and Methods**

##### 450 **Biological material and virus inoculation**

451 GFLV strains F13, GHu, B844 were isolated from *Vitis vinifera* cvs Muscat de Frontignan, Gloria  
452 Hungariae and Cabernet franc, respectively [8, 9, 11, 46] by multiple passages on *C. quinoa*. GFLV  
453 strains CO1(A17b) and CO2(A17d) were retrieved from a single Chardonnay plant and isolated on  
454 *Gomphrena globosa* and *C. quinoa* plants [10]. After multiple passages, these isolated GFLV-strains were  
455 subsequently transferred in the 90s to the certified rootstock Kober 5BB clone 259 (*Vitis berlandieri* X  
456 *Vitis riparia*), by *in vitro* heterologous grafting and are part of the Colmar GFLV-infected-Kober 5BB  
457 collection [11]. Briefly, *in vitro* heterologous grafting consists in the grafting of rootstock cuttings on  
458 a fragment of infected *C. quinoa* stem to allow the virus to spread into the grapevine. After a few days  
459 of contact, the *C. quinoa* stem is removed and the grapevine rootstock is further grown *in vitro* until  
460 roots are formed. It is then transferred in soil containing pots and kept in a greenhouse (Supplemental  
461 Fig. 1). Complete nucleotide sequences are available under Genebank accession numbers: NC\_003615  
462 and NC\_003623 for GFLV-F13 RNA1 and RNA2, respectively; JN391442 and EF426852 for GFLV-  
463 GHu RNA1 and RNA2, respectively; MF804979, MF182354 and MF182355 for GFLV-B844 RNA1,  
464 RNA2a and RNA2b, respectively; MH383240 and MH383241 for GFLV-CO1(A17b) RNA1 and RNA2,  
465 respectively, and MH383242 and MH383243 for GFLV-CO2(A17d) RNA1 and RNA2, respectively.

466 Cuttings of *V. vinifera* cv. Gewurztraminer (Certified clone 643) or *V. vinifera* cv. Chardonnay  
467 (clone 209) were grafted onto non-inoculated or GFLV-inoculated Kober 5BB rootstocks [47]. For each  
468 of the 6 treatments (inoculation with one of the 5 virus strains or mock inoculation), eight Gw vines  
469 and eight Ch vines were obtained and planted 1 m apart in groups of four vines within three rows.  
470 These plants were part of a large experimental vineyard of about 100 vines that was established in a  
471 X. index-free plot in 2006 in Colmar, France [48]. Vines were trained according to simple Guyot  
472 method.

##### 473 **Virus detection**

474 The passage of the virus from the rootstock to the cultivar was confirmed after grafting and  
475 followed over years, by Double Antibody Sandwich - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (DAS-  
476 ELISA on leaf samples [47], using GFLV specific serum (BIOREBA) as described previously [8]. The  
477 presence of GFLV RNAs was verified by Immunocapture - Reverse Transcription - Polymerase Chain  
478 Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism assay (IC-RT-PCR-RFLP) using *StyI*. The  
479 expected patterns were calculated based on viral sequences

480

## 481 RNA extraction and RNA-Sequencing

482 Total RNA was obtained from 200 mg of fresh leaf tissue, using RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen,  
483 Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions with the addition of DNase.

484 All library preparations, RNA treatments and RNA sequencing steps were performed on total  
485 RNA extracted from the leaf samples by the GetPlaGe platform at the INRA of Toulouse using TruSeq  
486 Stranded mRNA sample prep kit (Illumina). Using poly(A) selection, the mRNAs were isolated,  
487 fragmented and then reverse-transcribed. Experiments were performed on an Illumina HiSeq 3000  
488 (Illumina, San Diego, CA, USA) using a paired-end read length of 2 × 150 basepairs with the Illumina  
489 HiSeq3000/4000 SBS sequencing kits.

## 490 Sample sanitary status and diversity

491 Analyses of data sets were performed using CLC Genomics Workbench 11.0 software (Qiagen).  
492 After trimming procedure and quality check [18] only reads above 70 nucleotides were kept.  
493 Commonly, for sanitary status examination and variant detection a direct mapping was performed  
494 with a curated set of references based on the grapevine infecting viruses [1]. In order to detect a  
495 maximum diversity of the viral populations, loose parameters were used, with length fraction of 0.5  
496 and similarity of 0.7.

497 To study the genetic diversity, 'de novo assembly tool' from the CLC Workbench software was  
498 used and the list of contigs obtained was then mapped against RNA1 and RNA2 complete GFLV  
499 genomes, allowing the identification of GFLV contigs. Multiple rounds of mapping and assembly  
500 were implemented until complete genome was obtained.

501 Alignment analysis of the nucleic acid sequences and tentative Neighbor Joining-based  
502 phylogenetic trees were performed using CLC Workbench software with bootstrapping analyses of  
503 1000 replicates. For this, GFLV-GHu sequences were used as outgroup.

## 504 Differential Gene Expression analysis: infected vs control

505 Raw reads were aligned, using TopHat2 (v.2.0.11) and Bowtie2 (v.2.2.1) against *Vitis vinifera*  
506 PN40024 (V2) reference genome [49]. The gene expression quantification was performed with HTSeq-  
507 count (v.6.0.0), the counts normalization and detection of differentially expressed genes was done  
508 using R (v.3.3.2), and the DESeq2 package. Differential gene expression of the replicates for each  
509 condition (GFLV-B844 or GFLV-F13 inoculated) compared to the control replicates were analyzed.  
510 As recommended the resulting p-value were adjusted. Genes were considered differentially  
511 expressed when the FDR was below 0.05 ( $FDR \leq 0.05$ )

512 The gene categorization was performed by an enrichment of Gene Ontologies (GO) on the  
513 DEGs using topGo tool. We tested two functional annotation versions of PN40024 genes (PN12XV2).  
514 One annotation generated in 2013 by the CRIBI (which is in charge of the reference genome  
515 PN12XV2). One annotation created by ourselves with the Blast2GO software (v.5 pro), giving us  
516 functional annotations less complete than version generated by the CRIBI. Therefore we choose to

517 work with the CRIBI-2013 version. Revigo online specific tools were used to hierarchize enriched  
518 GOs, providing a more suitable representation.

### 519 **Validation of the RNA-Seq variations by quantitative RT-PCR**

520 Specific primers (Supp table 4.) were designed from the RNA-Seq gene sequences. The reverse  
521 transcription was performed on 1 µg of total RNA using Superscript III enzyme (Invitrogen,  
522 Carlsbad, California, USA) and oligod(T). Real time quantitative PCRs were carried out on a  
523 LightCycler480 thermocycler (Roche, Basel, Switzerland) using LightCycler 480 SYBR Green I Master  
524 (Roche, Basel, Switzerland). Thermal cycling conditions were: 5 min at 95 °C, followed by 55 cycles  
525 of 10 s at 95 °C, 15 s at 60 °C and 15 s at 72 °C and ended by one cycle of 30 s at 40 °C. Primers  
526 specificity was check by adding a melting curve at the end of each cycle. The results were normalized  
527 to the expression of the more stable gene defined using geNorm [21] and Norm Finder [22] softwares,  
528 namely NEMFI. The primer efficiency was determined by LinRegPCR software version 2017.0 [50].  
529 We used the Pfaffl method [51] to calculate the relative expression, using the control samples as  
530 calibrator.

### 531 **Abbreviations**

AFC1	Serine/threonine-protein kinase afc1
AGAL2	Alpha galactosidase
AIL6	Ap2-like ethylene-responsive transcription factor ail6
APL1	ADP-glucose pyrophosphorylase large subunit
BCP	Blue copper protein
CDT1A	cdt1-like protein chloroplastic-like
Ch	Chardonnay
CYP94B3	cytochrome p450 CYP94B3
ERF4	Ethylene Response Factor 4
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFLV	Grapevine fanleaf virus
GPTA6	Glycerol-3-phosphate acyltransferase 6
GRP	Glycine rich protein
GRSPaV	Grapevine rupestris stem pitting-associated virus
Gw	Gewurztraminer
GYSVd	Grapevine yellow speckle viroid
HR	Hypersensitive reaction
HSVd	Hop stunt viroid
HTS	High throughput sequencing
KCS5	3-ketoacyl- synthase
NA	Not annotated
NDF6	NAD(P)H dehydrogenase complex
NEMFI	Nuclear export mediator factor nemf-like
NFYC4	Nuclear transcription factor y subunit c-4
NQO1	Quinone oxidoreductase 1
PDF1	Protodermal factor
PDF2	Defensin-like protein 6-like
PIN5	Auxin efflux carrier component
PP2A	Serine/threonine protein phosphatase 2A (PP2A) 65 KDa regulatory subunit A
PP7	Serine/threonine-protein phosphatase 7
PR10	Pathogenesis related protein 10
RD22	Dehydration-responsive protein rd22
RDR1	RNA polymerase RNA dependante
ROXY2	Glutaredoxines ROXY2
SYP121	Syntaxin-related protein nt-syr1
TIP41	Tip41-like protein

VST Variance-stabilized transformation

## 532 References

533

534 1. Martelli, G. P., An overview on grapevine viruses, viroids, and the diseases they cause. In  
535 Grapevine viruses: Molecular biology, diagnostics and management, Meng, B.; Martelli, G. P.;  
536 Golino, D. A.; Fuchs, M., Eds. Springer: Cham, Switzerland, 2017; pp 31-46. DOI: 10.1007/978-3-  
537 319-57706-7\_2.

538 2. Vuittenez, A., Variation des symptômes de la dégénérescence infectieuse de la vigne.  
539 Interprétation d'expériences de transmission de la maladie par greffage. Comptes Rendus de  
540 l'Academie des Sciences 1956, 243, 515-517.

541 3. Schmitt-Keichinger, C.; Hemmer, C.; Berthold, F.; Ritzenthaler, C., Molecular, cellular and  
542 structural biology of grapevine fanleaf virus. In Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics  
543 and management, Meng, B.; Martelli, G. P.; Golino, D. A.; Fuchs, M., Eds. Springer: Cham,  
544 Switzerland, 2017; pp 83-107. DOI: 10.1007/978-3-319-57706-7.

545 4. Digiario, M.; Elbeaino, T.; Martelli, G. P., Grapevine fanleaf virus and other old world nepoviruses.  
546 In Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management, Meng, B.; Martelli, G. P.;  
547 Golino, D. A.; Fuchs, M., Eds. Springer: Cham, Switzerland, 2017; pp 47-82. DOI: 10.1007/978-3-  
548 319-57706-7\_3.

549 5. Elbeaino, T.; Kiyi, H.; Boutarfa, R.; Minafra, A.; Martelli, G.; Digiario, M., Phylogenetic and  
550 recombination analysis of the homing protein domain of grapevine fanleaf virus (GFLV) isolates  
551 associated with 'yellow mosaic' and 'infectious malformation' syndromes in grapevine. Arch Virol  
552 2014, 159, 2757-2764. DOI: 10.1007/s00705-014-2138-8.

553 6. Horváth, J.; Tóbiás, I.; Hunyadi, K., New natural herbaceous hosts of grapevine fanleaf nepovirus.  
554 Horticultural Science 1994, 26, 31-32.

555 7. Izadpanah, K.; Zaki-Aghl, M.; Zhang, Y. P.; Daubert, S. D.; Rowhani, A., Bermuda grass as a  
556 potential reservoir host for Grapevine fanleaf virus. Plant Disease 2003, 87, 1179-1182

557 8. Vigne, E.; Gottula, J.; Schmitt-Keichinger, C.; Komar, V.; Ackerer, L.; Belval, L.; Rakotomalala, L.;  
558 Lemaire, O.; Ritzenthaler, C.; Fuchs, M., A strain-specific segment of the RNA-dependent RNA  
559 polymerase of *Grapevine fanleaf virus* determines symptoms in *Nicotiana* species. *J Gen Virol* **2013**,  
560 94, 2803-2813. DOI: 10.1099/vir.0.057646-0.

561 9. Martin, I. R.; Vigne, E.; Berthold, F.; Komar, V.; Lemaire, O.; Fuchs, M.; Schmitt-Keichinger, C.,  
562 The 50 distal amino acids of the 2A<sup>HP</sup> homing protein of *Grapevine fanleaf virus* elicit a  
563 hypersensitive reaction on *Nicotiana occidentalis*. *Mol Plant Pathol* **2018**, 19, 731-743. DOI:  
564 10.1111/mpp.12558.

565 10. Vigne, E.; Demangeat, G.; Komar, V.; Fuchs, M., Characterization of a naturally occurring  
566 recombinant isolate of *Grapevine fanleaf virus*. *Arch Virol* **2005**, 150, 2241-2255.

567 11. Legin, R.; Bass, P.; Etienne, L.; Fuchs, M., Selection of mild virus strains of fanleaf degeneration by  
568 comparative field performance of infected grapevines. *Vitis* **1993**, 32, 103-110.

569 12. Belin, C.; Schmitt, C.; Demangeat, G.; Komar, V.; Pinck, L.; Fuchs, M., Involvement of RNA2-  
570 encoded proteins in the specific transmission of *Grapevine fanleaf virus* by its nematode vector  
571 *Xiphinema index*. *Virology* **2001**, 291, 161-171.

- 572 13. Komar, V.; Vigne, E.; Demangeat, G.; Fuchs, M., Beneficial effect of selective virus elimination on  
573 the performance of *Vitis vinifera* cv. Chardonnay. *American Journal of Enology and Viticulture* **2007**,  
574 58, 202-210.
- 575 14. Komar, V.; Vigne, E.; Demangeat, G.; Lemaire, O.; Fuchs, M., Comparative performance of virus-  
576 infected *Vitis vinifera* cv. Savagnin rose grafted onto three rootstocks. *American Journal of Enology*  
577 *and Viticulture* **2010**, 61, 68.
- 578 15. Fuchs, M.; Schmitt-Keichinger, C.; Sanfaçon, H., A renaissance in nepovirus research provides  
579 new insights into their molecular interface with hosts and vectors. In *Advances in Virus Research*,  
580 Academic Press: 2017; Vol. 97, pp 61-105. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.aivir.2016.08.009>.
- 581 16. Vigne, E.; Bergdoll, M.; Guyader, S.; Fuchs, M., Population structure and genetic variability within  
582 isolates of *Grapevine fanleaf virus* from a naturally infected vineyard in France: evidence for mixed  
583 infection and recombination. *J Gen Virol* **2004**, 85, 2435-2445. DOI: 10.1099/vir.0.79904-0.
- 584 17. Hily, J. M.; Demaneche, S.; Poulicard, N.; Tannieres, M.; Djennane, S.; Beuve, M.; Vigne, E.;  
585 Demangeat, G.; Komar, V.; Gertz, C.; Marmonier, A.; Hemmer, C.; Vigneron, S.; Marais, A.;  
586 Candresse, T.; Simonet, P.; Lemaire, O., Metagenomic-based impact study of transgenic grapevine  
587 rootstock on its associated virome and soil bacteriome. *Plant Biotechnol J* **2018**, 16, 208-220. DOI:  
588 10.1111/pbi.12761.
- 589 18. Hily, J.-M.; Beuve, M.; Vigne, E.; Demangeat, G.; Candresse, T.; Lemaire, O., A genome-wide  
590 diversity study of grapevine rupestris stem pitting-associated virus. *Arch Virol* **2018**. DOI:  
591 10.1007/s00705-018-3945-0.
- 592 19. The French–Italian public consortium for grapevine genome characterization, The grapevine  
593 genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **2007**,  
594 449, 463. DOI: 10.1038/nature06148.
- 595 20. Perazzolli, M.; Moretto, M.; Fontana, P.; Ferrarini, A.; Velasco, R.; Moser, C.; Delledonne, M.;  
596 Pertot, I., Downy mildew resistance induced by *Trichoderma harzianum* T39 in susceptible  
597 grapevines partially mimics transcriptional changes of resistant genotypes. *BMC Genomics* **2012**,  
598 13, 660-678. DOI: 10.1186/1471-2164-13-660.
- 599 21. Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F.,  
600 Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple  
601 internal control genes. *Genome Biology* **2002**, 3. DOI: 10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
- 602 22. Andersen, C. L.; Ledet-Jensen, J.; Ørntoft, T., Normalization of real-time quantitative RT-PCR  
603 data: a model based variance estimation approach to identify genes suited for normalization -  
604 applied to bladder- and colon-cancer data-sets. *Cancer Research* **2004**, 64, 5245-5250.
- 605 23. Lilly, S. T.; Drummond, R. S. M.; Pearson, M. N.; MacDiarmid, R. M., Identification and validation  
606 of reference genes for normalization of transcripts from virus-infected *Arabidopsis thaliana*.  
607 *Molecular Plant-Microbe Interactions* **2010**, 24, 294-304. DOI: 10.1094/MPMI-10-10-0236.
- 608 24. Liu, D.; Shi, L.; Han, C.; Yu, J.; Li, D.; Zhang, Y., Validation of reference genes for gene expression  
609 studies in virus-infected *Nicotiana benthamiana* using quantitative real-time PCR. *PLOS ONE* **2012**,  
610 7, e46451. DOI: 10.1371/journal.pone.0046451.
- 611 25. Zhang, K.; Niu, S.; Di, D.; Shi, L.; Liu, D.; Cao, X.; Miao, H.; Wang, X.; Han, C.; Yu, J.; Li, D.; Zhang,  
612 Y., Selection of reference genes for gene expression studies in virus-infected monocots using  
613 quantitative real-time PCR. *Journal of Biotechnology* **2013**, 168, 7-14. DOI:  
614 <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2013.08.008>.

- 615 26. Alexa A; Rahnenfuhrer, J., topGO: Enrichment Analysis for Gene Ontology. R package version  
616 2.32.0. . 2016.
- 617 27. Geng, C.; Wang, H.-Y.; Liu, J.; Yan, Z.-Y.; Tian, Y.-P.; Yuan, X.-F.; Gao, R.; Li, X.-D., Transcriptomic  
618 changes in *Nicotiana benthamiana* plants inoculated with the wild-type or an attenuated mutant of  
619 *Tobacco vein banding mosaic virus*. *Mol Plant Pathol* **2016**. DOI: 10.1111/mpp.12471.
- 620 28. Gómez-Aix, C.; Pascual, L.; Cañizares, J.; Sánchez-Pina, M. A.; Aranda, M. A., Transcriptomic  
621 profiling of Melon necrotic spot virus-infected melon plants revealed virus strain and plant  
622 cultivar-specific alterations. *BMC Genomics* **2016**, 17, 429. DOI: 10.1186/s12864-016-2772-5.
- 623 29. Sun, X.; Wang, Z.; Gu, Q.; Li, H.; Han, W.; Shi, Y., Transcriptome analysis of *Cucumis sativus*  
624 infected by *Cucurbit chlorotic yellows virus*. *Virology Journal* **2017**, 14, 18. DOI: 10.1186/s12985-017-  
625 0690-z.
- 626 30. Sgherri, C.; Ranieri, A.; Quartacci, M. F., Antioxidative responses in *Vitis vinifera* infected by  
627 grapevine fanleaf virus. *Journal of Plant Physiology* **2013**, 170, 121-128. DOI:  
628 <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2012.09.016>.
- 629 31. Abracheva, P., The chlorophyll content of vine leaves as influenced by the Court-noué. *Hort. Vitic.*  
630 *Sci* **1977**, 14, 102-106.
- 631 32. Jones, J. D. G.; Dangl, J. L., The plant immune system. *Nature* **2006**, 444, 323-329.
- 632 33. Moffett, P.; Gad, L.; John, P. C., Mechanisms of recognition in dominant R gene mediated  
633 resistance. *Advances in Virus Research* **2009**, 75, 1-33.
- 634 34. Soosaar, J. L. M.; Burch-Smith, T. M.; Dinesh-Kumar, S. P., Mechanisms of plant resistance to  
635 viruses. *Nature Reviews Microbiology* **2005**, 3, 789-798.
- 636 35. Morel, J.-B.; Dangl, J. L., The hypersensitive response and the induction of cell death in plants. *Cell*  
637 *Death And Differentiation* **1997**, 4, 671. DOI: 10.1038/sj.cdd.4400309.
- 638 36. Bendahmane, A.; Kanyuka, K.; Baulcombe, D. C., The Rx gene from potato controls separate virus  
639 resistance and cell death responses. *The Plant Cell* **1999**, 11, 781-791. DOI: 10.2307/3870814.
- 640 37. Lukan, T.; Baebler, Š.; Pompe-Novak, M.; Guček, K.; Zagorščak, M.; Coll, A.; Gruden, K., Cell  
641 death is not sufficient for the restriction of potato virus y spread in hypersensitive response-  
642 conferred resistance in potato. *Frontiers in Plant Science* **2018**, 9. DOI: 10.3389/fpls.2018.00168.
- 643 38. Cole, A. B.; Király, L.; Ross, K.; Schoelz, J. E., Uncoupling resistance from cell death in the  
644 hypersensitive response of *Nicotiana* species to cauliflower mosaic virus Infection. *Molecular Plant-  
645 Microbe Interactions* **2001**, 14, 31-41. DOI: 10.1094/MPMI.2001.14.1.31.
- 646 39. Künstler, A.; Bacsó, R.; Gullner, G.; Hafez, Y. M.; Király, L., Staying alive – is cell death dispensable  
647 for plant disease resistance during the hypersensitive response? *Physiological and Molecular Plant  
648 Pathology* **2016**, 93, 75-84. DOI: 10.1016/j.pmpp.2016.01.003.
- 649 40. Chu, M.; Desvoyes, B.; Turina, M.; Noad, R.; Scholthof, H. B., Genetic dissection of tomato bushy  
650 stunt virus P19-protein-mediated host-dependent symptom induction and systemic invasion.  
651 *Virology* **2000**, 266, 79-87. DOI: <http://dx.doi.org/10.1006/viro.1999.0071>.
- 652 41. Sekine, K.-T.; Ishihara, T.; Hase, S.; Kusano, T.; Shah, J.; Takahashi, H., Single amino acid  
653 alterations in *Arabidopsis thaliana* RCY1 compromise resistance to cucumber mosaic virus, but  
654 differentially suppress hypersensitive response-like cell death. *Plant Molecular Biology* **2006**, 62,  
655 669-682. DOI: 10.1007/s11103-006-9048-4.

- 656 42. Chong, J.; Le Henanff, G.; Bertsch, C.; Walter, B., Identification, expression analysis and  
657 characterization of defense and signaling genes in *Vitis vinifera*. *Plant Physiology and Biochemistry*  
658 **2008**, *46*, 469-481. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.09.010>.
- 659 43. Yepes, L. M.; Cieniewicz, E.; Krenz, B.; McLane, H.; Thompson, J. R.; Perry, K. L.; Fuchs, M.,  
660 Causative role of grapevined blotch virus in red blotch disease. *Phytopathology* **2018**, *108*, 902-  
661 909. DOI: 10.1094/PHYTO-12-17-0419-R.
- 662 44. Adams, S. E.; Jones, R. A. C.; Coutts, R., Expression of potato virus X resistance gene Rx in potato  
663 leaf protoplasts. *J Gen Virol* **1986**, *67*, 2341-2345.
- 664 45. Stempien, E.; Goddard, M.-L.; Leva, Y.; Bénard-Gellon, M.; Laloue, H.; Farine, S.; Kieffer-Mazet,  
665 F.; Tarnus, C.; Bertsch, C.; Chong, J., Secreted proteins produced by fungi associated with  
666 *Botryosphaeria dieback* trigger distinct defense responses in *Vitis vinifera* and *Vitis rupestris* cells.  
667 *Protoplasma* **2018**, *255*, 613-628. DOI: 10.1007/s00709-017-1175-z.
- 668 46. Vigne, E.; Marmonier, A.; Fuchs, M., Multiple interspecies recombination events within RNA2 of  
669 *Grapevine fanleaf virus* and *Arabidopsis mosaic virus*. *Arch Virol* **2008**, *153*, 1771-1776.
- 670 47. Komar, V.; Vigne, E.; Demangeat, G.; Lemaire, O.; Fuchs, M., Cross-protection as control strategy  
671 against Grapevine fanleaf virus in naturally infected vineyards. *Plant Disease* **2008**, *92*, 1689-1694.  
672 DOI: 10.1094/PDIS-92-12-1689.
- 673 48. Vigne, E.; Komar, V.; Tannières, M.; Demangeat, G.; Duchêne, E.; Steyer, D.; Lemarquis, G.;  
674 Ritzenthaler, C.; Lemaire, O. In *Comparative pathogenic effects of distinct grapevine fanleaf virus strains*  
675 *on Vitis vinifera cvs Gewurztraminer and Chardonnay* 18th congress of the International Council for  
676 the study of virus and virus-like diseases of the grapevine (ICVG), Ankara, Turkey, 7-11  
677 September 2015, 2015; Ankara, Turkey, 2015; pp 236-237.
- 678 49. The French–Italian Public Consortium for Grapevine Genome, C.; Jaillon, O.; Aury, J.-M.; Noel,  
679 B.; Policriti, A.; Clepet, C.; Casagrande, A.; Choisne, N.; Aubourg, S.; Vitulo, N.; Jubin, C.; Vezzi,  
680 A.; Legeai, F.; Hugueney, P.; Dasilva, C.; Horner, D.; Mica, E.; Jublot, D.; Poulain, J.; Bruyère, C.;  
681 Billault, A.; Segurens, B.; Gouyvenoux, M.; Ugarte, E.; Cattonaro, F.; Anthouard, V.; Vico, V.; Del  
682 Fabbro, C.; Alaux, M.; Di Gaspero, G.; Dumas, V.; Felice, N.; Paillard, S.; Juman, I.; Moroldo, M.;  
683 Scalabrin, S.; Canaguier, A.; Le Clainche, I.; Malacrida, G.; Durand, E.; Pesole, G.; Laucou, V.;  
684 Chatelet, P.; Merdinoglu, D.; Delledonne, M.; Pezzotti, M.; Lecharny, A.; Scarpelli, C.;  
685 Artiguenave, F.; Pè, M. E.; Valle, G.; Morgante, M.; Caboche, M.; Adam-Blondon, A.-F.;  
686 Weissenbach, J.; Quétier, F.; Wincker, P., The grapevine genome sequence suggests ancestral  
687 hexaploidization in major angiosperm phyla. *Nature* **2007**, *449*, 463. DOI: 10.1038/nature06148.
- 688 50. Ruijter, J., M.; Ramakers, C.; Hoogaars, W.; Bakker, O.; van den Hoff, M., J.,B; Karlen, Y.;  
689 Moorman, A., F.,M, Amplification efficiency: linking baseline and bias in the analysis of  
690 quantitative PCR data. *Nucleic Acids Research* **2009**, *37*. DOI: 10.1093/nar/gkp045.
- 691 51. Pfaffl, M. W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. . *Nucleic*  
692 *Acids Research* **2001**, *29*.
- 693  
694  
695

696 Supplemental Tables and Figures

697

698

699 Supplemental table1: Reads mapping to virus and viroid sequences

700

701

		GFLV											GRSPaV (8626 nts)	GYSVd1 (366 nts)	HSVd (298 nts)							
		RNA1			RNA2																	
		F13 (6855 nts)		B844 (6855 nts)	F13 (3330 nts)		B844a (3330 nts)		B844b (3330 nts)													
Total reads	Reads after trimming	% trimmed	% trimmed out	Per million	Reads	RPKM	Reads	RPKM	Reads	RPKM	Reads	RPKM	Reads	RPKM	Reads	RPKM	Reads	RPKM				
Control	B31	51964098	51763261	99,6135082	0,38649184	51,763261	132	0	180	1	81	0	208	1	129	1	974	2	734	39	199	13
	B34	59910092	59634773	99,5404464	0,45955363	59,634773	131	0	264	1	131	1	302	2	135	1	2380	5	887	41	284	16
	C51	65724896	64517902	98,1635665	1,83643349	64,517902	186	0	298	1	144	1	358	2	205	1	1457	3	1096	46	273	14
F13	B52	69714014	69456694	99,630892	0,369108	69,456694	630075	1323	405	1	551102	2383	510	2	321	1	13636	23	1378	54	295	14
	B53	75771722	75505827	99,6490841	0,35091587	75,505827	493923	954	349	1	374808	1491	359	1	214	1	9498	15	435	16	321	14
	C38	85633030	84887355	99,1292203	0,87077965	84,887355	587505	1010	329	1	495102	1751	396	1	306	1	1193	2	2628	85	623	25
B844	B47	165443500	165093906	99,7886928	0,21130718	165,093906	748	1	1830440	1617	925	2	1313263	2389	2076494	3777	50211	35	2089	35	702	14
	C39	54436852	54164094	99,498946	0,50105396	54,164094	199	1	423373	1140	249	1	337605	1872	488525	2709	7659	16	1014	51	300	19
	C40	58344878	57990583	99,3927573	0,60724268	57,990583	174	0	627791	1579	327	2	445851	2309	952166	4931	9711	19	1509	71	392	23

702

703

704 **Supplemental table 2:** Details on excluded reads.

	Condition <sup>a</sup>	Replicate <sup>b</sup>	Total reads	Multi reads <sup>c</sup>	% <sup>d</sup>	Reads in intergenic regions <sup>e</sup>	% <sup>d</sup>	Ambiguous reads <sup>f</sup>	% <sup>d</sup>
705	Control	B31	51,964,098	588,017	1,13	1,695,315	3,26	149,572	0,0029
706		B34	59,910,092	803,892	1,34	2,266,239	3,78	189,755	0,0032
		C51	65,724,896	750,438	1,14	2,277,150	3,46	208,182	0,0032
707	F13	B52	69,714,014	919,757	1,32	2,456,488	3,52	218,806	0,0031
708		B53	75,771,722	999,037	1,32	2,691,969	3,55	243,005	0,0032
		C38	85,633,030	1,139,335	1,33	2,782,668	3,25	269,039	0,0031
709	B844	B47	165,443,500	2,701,249	1,63	6,639,193	4,01	523,014	0,0032
		C39	54,436,852	747,255	1,37	2,222,209	4,08	167,357	0,0031
		C40	58,344,878	768,115	1,32	1,989,740	3,41	190,967	0,0033

710 <sup>a</sup>Gw grapevine leaves of non-inoculated (control), GFLV-F13 inoculated (F13) or GFLV-B844  
711 inoculated plants (B844).

712 <sup>b</sup>Individual plants are considered biological replicates.

713 <sup>c</sup> Reads mapping to several locations on the grapevine genome

714 <sup>d</sup>Percentage are calculated of total reads

715 <sup>e</sup>Reads assigned to intergenic regions

716 <sup>f</sup>Ambiguous mapping (union mode of HTseq)

717

718

719 Supplemental table 3: List of DEGs in response to GLFV-B844 infection of Gw vines

GO	Associated Sub-GO	Total DEG number	Up	Down	Row.names	gene-name in NCBI and description	Log2FC B844 vs Control	Adjusted p-value					
Starch biosynthesis	GO:0000023 Maltose metabolic process	17	14	3	VIT_200s1596g00010	NDF6 (ndh dependent flow 6 protein)	2.555379835	3.77E-05					
					VIT_217s0000g04030	INT1, putative inositol transporter (carbon catabolite repressor protein 4-like 3)	0.709898432	6.23E-06					
					VIT_214s0060g01030	probable NHL repeat-containing protein 2 (haloacid dehalogenase-like hydrolase domain)	0.663106237	0.006918547					
					VIT_219s0085g00380	probable phosphoglycerate kinase, chloroplastic-like	0.577265052	0.035266762					
					VIT_212s0035g01750	hypothetical protein	0.501512068	0.014632916					
					VIT_207s0104g00370	DBE1 (isoamylase 2)	0.468708588	0.031022763					
					VIT_203s0063g02040	CCS1 probable cytochrome c biogenesis protein chloroplastic-like	0.467248856	0.029177543					
					VIT_204s0044g00320	hypothetical protein	0.458403607	0.037513486					
					VIT_219s0090g01210	TIG, probable trigger factor-like protein, chloroplastic	0.454611289	0.038083098					
					VIT_204s0023g00080	CYP97A3, cytochrome p450 protein lutein deficient chloroplastic-like	0.446872651	0.007564202					
					VIT_217s0000g02430	XPL1 (phosphoethanolamine n-methyltransferase)	0.446358009	0.021057254					
					VIT_207s0031g01540	DPE1 (4-alpha-chloroplastic amyloplastic-like)	0.399801696	0.029744843					
					VIT_214s0066g01200	LSF1 (protein kinase serine threonine-protein kinase afc2)	0.311439512	0.040431057					
					VIT_217s0000g09500	FC2 (protein kinase serine threonine-protein kinase afc2)	0.274677098	0.010293552					
					VIT_201s0011g05210	probable phosphoglucomutase-like	-0.579026315	0.031588583					
					VIT_201s0010g00330	BAM3 (receptor protein kinase clavata1)	-0.587530444	0.001985125					
					VIT_210s0071g01130	AGAL2 (alpha-galactosidase 2)	-4.733342344	0.000105169					
					GO:0006098	Pentose-phosphate shunt	14	9	5	VIT_200s1596g00010	NDF6 (ndh dependent flow 6 protein)	2.555379835	3.77E-05
										VIT_205s0020g02880	APL1 (adp-glucose pyrophosphorylase large subunit)	0.646899448	0.00543055
										VIT_219s0085g00380	probable phosphoglycerate kinase, chloroplastic-like	0.577265052	0.035266762
										VIT_216s0013g01140	PFK4 (6-phosphofruktokinase 4)	0.469789359	0.044242363
										VIT_210s0116g01910	ABC1 (putative ABC transporter)	0.430795681	0.026705778
										VIT_215s0046g02390	ANTR2 (probable anion transporter chloroplastic-like sodium-dependent phosphate transporter)	0.382151319	0.034142968
VIT_202s0025g03970	s1_rna-binding domain-containing protein	0.379924697	0.035097272										
VIT_207s0031g03050	gtp-binding protein	0.354557474	0.046960615										
VIT_217s0000g09500	FC2 (protein kinase serine threonine-protein kinase afc2)	0.274677098	0.010293552										
VIT_211s0016g03100	3-hydroxyisobutyrate dehydrogenase-like 1, mitochondrial	-0.348711671	0.030018972										
VIT_216s0115g00080	probable 50S ribosomal protein L35, chloroplastic	-0.548508741	0.0410536										
VIT_201s0011g05210	probable phosphoglucomutase-like	-0.579026315	0.031588583										
VIT_214s0066g01410	fructokinase 3	-0.588379819	1.15E-05										
VIT_214s0108g00560	ankyrin repeat-containing	-0.912167903	0.007694999										
GO:0006396	RNA processing	29	16	13						VIT_200s1596g00010	NDF6 (ndh dependent flow 6 protein)	2.555379835	3.77E-05
										VIT_217s0000g03700	probable kinesin-like protein KIN-14P	0.962115938	0.009890543
										VIT_218s0001g10550	LHCAS (light-harvesting complex protein)	0.678055816	0.039508186
										VIT_205s0020g02880	APL1 (adp-glucose pyrophosphorylase large subunit)	0.605543055	0.00543055
										VIT_213s0064g00650	ATAB2 (tab2 protein)	0.597844235	0.008536685
										VIT_215s0107g00400	OTP82 (pentatricopeptide repeat-containing)	0.568652808	0.035243034
										VIT_208s0007g08290	GATA9 (elongation factor family protein)	0.497502255	0.040357947
										VIT_215s0021g01850	fbp-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 6 protein-tyrosine phosphatase mitochondrial	0.496481115	0.031022763
										VIT_212s0035g01420	probable uncharacterized protein At5g08430-like	0.447087338	0.045285113
					VIT_210s0116g01910	ABC1 (putative ABC transporter)	0.430795681	0.026705778					
					VIT_200s0179g00220	OTP86 (pentatricopeptide repeat-containing protein)	0.368977811	0.02270813					
					VIT_207s0031g03050	gtp-binding protein	0.354557474	0.046960615					
					VIT_217s0000g09500	FC2 (protein kinase serine threonine-protein kinase afc2)	0.274677098	0.010293552					
					VIT_205s0077g01010	HCF107 (protein high chlorophyll fluorescent 107)	0.259132743	0.040399172					
					VIT_207s0104g01590	CUL1 (cullin 1)	0.240313534	0.041109678					
					VIT_214s0171g00270	COP13 (cop9 signalosome complex subunit 3)	0.231738664	0.04999968					
					VIT_211s0016g01910	DWA1 (wd-40 repeat protein)	-0.287228443	0.035266762					
					VIT_207s0005g04550	probable ribosome biogenesis protein BRX1	-0.292788858	0.039233175					
					VIT_218s0072g00410	sphingomyelin synthetase family protein	-0.304031978	0.015356013					
					VIT_208s0007g01690	probable sugar phosphate/phosphate translocator At3g11320-like	-0.320195619	0.045445574					
					VIT_201s0026g00250	SRZ-22	-0.377565241	0.020287761					
					VIT_211s0016g00960	probable subtilisin-like protease SBT1.8	-0.437536452	0.001508225					
					VIT_217s0000g03640	probable cleavage stimulating factor 64 (proline-rich protein)	-0.447304673	0.00968475					
VIT_211s0206g00100	uncharacterized protein	-0.461633134	0.000390493										
VIT_213s0019g03610	probable RNA-binding protein ARP1	-0.740141519	0.000404829										
VIT_211s0037g00960	probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g30520 (SARK)-like	-0.740320146	0.001201477										
VIT_216s0115g00200	NRP1B2 (dna-directed rna polymerases and iii subunit rpabc4-like)	-1.006188563	0.029288391										
VIT_208s0007g07390	methyltransferase-related protein	-1.352674391	0.000148165										
VIT_201s0026g00950	FHS (actin binding)	-1.406634754	0.000436316										
GO:0016117	Carotenoid biosynthetic process	12	11	1	VIT_214s0060g01030	probable NHL repeat-containing protein 2 (haloacid dehalogenase-like hydrolase domain)	0.663106237	0.006918547					
					VIT_209s0018g01270	ribulose biphosphate carboxylase oxygenase chloroplastic-like	0.6031571	0.003146379					
					VIT_211s0016g04690	soul heme-binding protein	0.468724142	0.020624232					
					VIT_203s0063g02040	probable cytochrome c biogenesis protein CCS1, chloroplastic	0.467248856	0.029177543					
					VIT_219s0090g01210	probable trigger factor-like protein TIG, Chloroplastic	0.454611289	0.038083098					
					VIT_208s0032g00050	long-chain-fatty-acid ligase	0.449649431	0.009757367					
					VIT_204s0023g00080	CYP97A3 (cytochrome p450 protein lutein deficient chloroplastic-like)	0.446872651	0.007564202					
					VIT_210s0116g01910	ABC1 (putative ABC transporter)	0.430795681	0.026705778					
					VIT_203s0038g00320	uncharacterized protein	0.386360208	0.027975232					
					VIT_202s0025g03970	s1_rna-binding domain-containing protein	0.379924697	0.035097272					
					VIT_217s0000g09500	FC2 (protein kinase serine threonine-protein kinase afc2)	0.274677098	0.010293552					
					VIT_211s0016g00600	FAB1 (beta-ketoacyl-acyl synthase II)	0.322239096	0.017492582					
					GO:0019252	Starch biosynthetic process	21	18	3	VIT_200s1596g00010	NDF6 (ndh dependent flow 6 protein)	2.555379835	3.77E-05
										VIT_203s0038g04570	APL3, APL4 (adp-glucose pyrophosphorylase large subunit)	1.04177486	0.007651405
										VIT_217s0000g04030	INT1, putative inositol transporter (carbon catabolite repressor protein 4-like 3)	0.709898432	6.23E-06
										VIT_214s0060g01030	probable NHL repeat-containing protein 2 (haloacid dehalogenase-like hydrolase domain)	0.663106237	0.006918547
										VIT_205s0020g02880	APL1 (adp-glucose pyrophosphorylase large subunit)	0.646899448	0.00543055
										VIT_219s0085g00380	probable phosphoglycerate kinase, chloroplastic-like	0.577265052	0.035266762
										VIT_212s0035g01750	hypothetical protein	0.501512068	0.014632916
										VIT_207s0104g00370	DBE1 (isoamylase 2)	0.468708588	0.031022763
										VIT_203s0063g02040	probable cytochrome c biogenesis protein CCS1, chloroplastic	0.467248856	0.029177543
										VIT_204s0044g00320	hypothetical protein	0.458403607	0.037513486
										VIT_219s0090g01210	probable trigger factor-like protein TIG, Chloroplastic	0.454611289	0.038083098
VIT_208s0032g00050	long-chain-fatty-acid ligase	0.449649431	0.009757367										
VIT_204s0023g00080	CYP97A3 (cytochrome p450 protein lutein deficient chloroplastic-like)	0.446872651	0.007564202										
VIT_217s0000g02430	XPL1 (phosphoethanolamine n-methyltransferase)	0.446358009	0.021057254										
VIT_202s0025g03970	s1_rna-binding domain-containing protein	0.379924697	0.035097272										
VIT_218s0001g06620	ISA3 (isoamylase chloroplastic-like)	0.332132709	0.012975925										
VIT_214s0066g01200	LSF1 (protein like sex4 1)	0.311439512	0.040431057										
VIT_217s0000g09500	FC2 (protein kinase serine threonine-protein kinase afc2)	0.274677098	0.010293552										
VIT_217s0000g01240	GAMMA	-0.292203741	0.004758599										
VIT_201s0011g05210	probable phosphoglucomutase-like	-0.579026315	0.031588583										
VIT_210s0071g01130	AGAL2 (alpha-galactosidase 2)	-4.733342344	0.000105169										
GO:0045893	Positive regulation of transcription, DNA-templated	13	5	8						VIT_213s0064g00650	ATAB2 (tab2 protein)	0.597844235	0.008536685
										VIT_215s0021g01850	fbp-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 6 protein-tyrosine phosphatase mitochondrial	0.449648115	0.031022763
					VIT_211s0016g01390	RPA1A (replication factor a1)	0.31536172	0.042740677					
					VIT_205s0077g01010	HCF107 (protein high chlorophyll fluorescent 107)	0.259132743	0.040399172					
					VIT_214s0171g00270	COP13 (cop9 signalosome complex subunit 3)	0.231738664	0.04999968					
					VIT_210s0033g03910	TCP2 (transcription factor tcp2-like)	-0.27642933	0.034944732					
					VIT_204s0008g07340	COL4 (constans-like protein)	-0.510583296	0.003215313					
					VIT_210s0033g00330	HSL1 (leucine-rich repeat receptor-like protein kinase)	-0.51064	0.000353629					
					VIT_203s0038g00490	GATA5 (gata domain class transcription factor gata transcription factor)	-0.535327126	0.019553911					
					VIT_215s0021g02510	GATA2 (gata transcription factor 2)	-0.60432995	0.020370962					
					VIT_209s0002g03750	gata transcription factor	-0.73853811	0.001103298					
					VIT_219s0014g01780	BZIP34, BZIP61 (transcription factor rf2b)	-1.106720289	0.002348004					
					VIT_214s0066g02320	NF-YC4 (nuclear transcription factor y subunit c-4)	-1.251136078	0.005332628					

722 continued

Thylakoid membrane	GO:0010027	Thylakoid membrane organization	12	11	1				
						VIT_214s0060g01030	probable NHL repeat-containing protein 2	0.663106237	0.006918547
						VIT_205s0020g02880	APL1 (adp-glucose pyrophosphorylase large subunit)	0.646899448	0.005543055
						VIT_209s0018g01270	ribulose biphosphate carboxylase oxygenase chloroplastic-like	0.60315171	0.003146379
						VIT_213s0064g00650	ATAB2 (tab2 protein)	0.597844235	0.008536685
						VIT_219s0085g00380	probable phosphoglycerate kinase, chloroplastic-like	0.577265052	0.035266762
						VIT_203s0063g02040	probable cytochrome c biogenesis protein CCS1, chloroplastic	0.462748956	0.029177543
						VIT_219s0090g01210	probable trigger factor-like protein TIG, Chloroplastic	0.454611289	0.038083098
						VIT_210s0116g01910	ABC1 (putative ABC transporter)	0.430795681	0.026705778
						VIT_202s0025g03970	s1 rna-binding domain-containing protein	0.379924697	0.035092772
						VIT_207s0031g03050	gtp-binding protein	0.354557474	0.046960615
						VIT_205s0077g01010	HCF107 (protein high chlorophyll fluorescent 107)	0.259132743	0.040399172
						VIT_210s0116g00680	PDF2 (homeobox-leucine zipper protein meristem L1)	-0.341972445	0.032323175
	GO:0042254	Ribosome biogenesis	25	3	22	VIT_200s1596g00010	NDF6 (ndh dependent flow 6 protein)	2.555379835	3.77E-05
						VIT_218s0001g10550	LHCAS (light-harvesting complex protein)	0.678055816	0.039508186
						VIT_215s0021g01850	Rbp-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 6 protein-tyrosine phosphatase mitochc	0.449648115	0.031022763
						VIT_214s0006g01080	RKL1 (atp binding)	-0.271087467	0.044062654
						VIT_217s0000g00980	probable 60S ribosomal protein L7a-1	-0.2898666	0.045898703
						VIT_207s0141g00710	probable 40S ribosomal protein S15	-0.290351381	0.037115991
						VIT_207s0005g04550	probable ribosome biogenesis protein BRX1	-0.292788858	0.039233175
						VIT_208s0007g01690	probable sugar phosphate/phosphate translocator At3g11320-like	-0.320195619	0.045445574
						VIT_205s0077g01840	probable 60S ribosomal protein L19-like	-0.321717401	0.039233175
						VIT_215s0048g00670	RPS13A (40S ribosomal protein S13)	-0.323547932	0.045005652
						VIT_200s0225g00020	probable 60S ribosomal protein L27a-3-like	-0.324539684	0.027188057
						VIT_206s0004g02090	probable nucleolar GTP-binding protein 1-like	-0.325422938	0.012578475
						VIT_201s0011g02095	probable 60S ribosomal protein L44	-0.334291776	0.027732833
						VIT_208s0007g03620	probable 60S acidic ribosomal protein P2	-0.344970966	0.026857875
						VIT_213s0019g00250	RPL23A8 (60S ribosomal protein L23a-like)	-0.369297167	0.005200205
						VIT_207s0005g06490	probable 60S ribosomal protein L13a-4 (blast 100% sur 30% de la séquence)	-0.40476317	0.016465494
						VIT_207s0005g00560	probable 60S ribosomal protein L22-2 (blast 100% sur 45% de la séquence)	-0.40572509	0.049146893
						VIT_205s0077g01220	probable 60S ribosomal protein L29 (blast 100% sur 50% de la séquence)	-0.437591438	0.049949968
						VIT_216s0098g01190	UBQ1	-0.443873931	0.033361459
						VIT_201s0011g01450	probable 50S ribosomal protein L7/L12	-0.470870894	0.025188509
						VIT_207s0005g04150	emb2171 (60S ribosomal protein I23)	-0.489919323	0.015231638
						VIT_206s0004g03410	probable 40S ribosomal protein S23	-0.532093832	0.032548999
						VIT_213s0073g00120	probable 40S ribosomal protein S17-like	-0.534661253	0.039829644
						VIT_216s0115g00080	probable 50S ribosomal protein L35, chloroplastic	-0.548508741	0.0410536
						VIT_201s0011g05580	RLK902 (inactive receptor kinase)	-0.660661329	0.0366988
	GO:0010075	Regulation of meristem growth	23	0	23	VIT_214s0006g01080	RKL1 (atp binding)	-0.271087467	0.044062654
						VIT_208s0058g01340	probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase IRK	-0.333559894	0.038517542
						VIT_210s0116g00680	PDF2 (homeobox-leucine zipper protein meristem L1)	-0.341972445	0.032323175
						VIT_204s0008g00750	uncharacterized protein	-0.341979477	0.017492582
						VIT_201s0127g00850	probable polygalacturonase 1 beta-like protein 3 (probable non-catalytic subunit jp6	-0.377483821	0.048533495
						VIT_214s0083g00620	NIK1 (nsp-interacting kinase 1)	-0.412121854	0.000174186
						VIT_218s0001g14040	endo- beta-glucanase	-0.412887925	0.007651473
						VIT_211s0016g00960	probable subtilisin-like protease SBT1.8	-0.437536452	0.001508225
						VIT_208s0040g00060	probable inactive receptor kinase At5g58300-like	-0.486611477	0.000320071
						VIT_201s0011g06410	BRL2 (serine threonine-protein kinase bri1-like 2)	-0.497825526	0.037317386
						VIT_210s0003g00330	HSL1 (leucine-rich repeat receptor-like protein kinase)	-0.51064	0.000353629
						VIT_212s0035g00990	probable leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine-protein kinase BAM1	-0.523347604	1.89E-05
						VIT_204s0008g03250	probable homeobox-leucine zipper protein ATHB-15	-0.552051592	0.008263313
						VIT_201s0010g00330	probable leucine-rich repeat receptor-like serine/threonine-protein kinase BAM3	-0.587530444	0.001985125
						VIT_218s0001g11300	probable lysine histidine transporter-like 8	-0.625071916	0.11557609
						VIT_211s0016g04570	probable inactive receptor kinase At2g26730-like	-0.628472766	1.35E-06
						VIT_201s0011g05580	RLK902 (inactive receptor kinase)	-0.660661329	0.0366988
						VIT_208s0007g04180	probable stress response protein NST1 (sequence-specific DNA binding transcription f	-0.66991351	0.004475543
						VIT_211s0037g00960	probable LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase At4g30520-like	-0.740362146	0.001201477
						VIT_218s0001g14490	probable endoglucanase 10 (thaumatin-like)	-1.165132922	0.010896679
						VIT_200s1291g00010	AIL6 (AP2-like ethylene-responsive transcription factor)	-1.899087897	0.021075547
						VIT_207s0031g02250	ATL8 (ring-H2 finger protein)	-1.950622226	0.012511252

723

724

725 continued

Regulation of hypersensitive response	GO:0010200	Response to chitin	37	2	35	VIT_207s0031g02160	PP2C, probable protein phosphatase 2C 47	1,27994739	0,020487925
						VIT_203s0038g00410	probable protein detoxification 46, chloroplastic (DNA-damage-inducible protein, en	0,411794535	0,047352866
						VIT_218s0001g00290	OPCL1 (OPC-8:0 CoA ligase1)	-0,28930153	0,023829758
						VIT_207s0129g00180	ACA2 (ca2+-transporting ATPase, plasma membrane-type)	-0,316322689	0,037115991
						VIT_213s0019g01100	uncharacterized protein	-0,322466776	0,047490535
						VIT_213s0019g04070	ML012 (ML06-like)	-0,348455005	0,013614169
						VIT_206s0004g07440	EXO70B1 (exocyst complex component)	-0,352374124	0,015900119
						VIT_208s0007g01510	probable phosphatidylinositol:ceramide inositolphosphotransferase 1	-0,3953006	0,046894313
						VIT_207s0031g00670	HSF4 (heat shock transcription factor )	-0,406820843	0,023829758
						VIT_219s0014g02490	probable VQ motif-containing protein 4	-0,409449356	0,020676293
						VIT_210s0003g02030	CAD1 (membrane attack complex /perforin domain containing protein)	-0,466427367	0,01010683
						VIT_205s0020g01400	SRC2 (hypothetical protein)	-0,473152332	0,006210698
						VIT_206s0004g05090	E3 ubiquitin-protein ligase RDU1 (ring1-like)	-0,5127779	0,04414111
						VIT_204s0069g00920	WRKY11 (wrky transcription factor)	-0,564484469	0,009650838
						VIT_218s0001g10030	WRKY7 (wrky transcription factor)	-0,580406379	0,002196182
						VIT_204s0008g05760	WRKY40 (wrky transcription factor, hypothetical protein)	-0,602334394	0,037705753
						VIT_204s0008g01070	probable IQ domain-containing protein IQM1 (calmodulin-binding protein)	-0,616826231	0,014918415
						VIT_214s0108g00830	MYB94	-0,620487644	0,000174186
						VIT_200s0527g00020	vq motif-containing protein	-0,633628564	0,008093375
						VIT_213s0067g02600	HSPRO2 (nematode-resistance protein)	-0,783296777	0,036401149
						VIT_215s0046g02190	WRKY22 (wrky transcription factor)	-0,785630581	0,030746786
						VIT_207s0031g00080	WRKY7 (wrky transcription factor)	-0,804832023	0,003185909
						VIT_203s0063g00180	PUB25 (u-box domain-containing protein)	-0,825353698	0,000230915
						VIT_207s0129g00240	ZF1 (zinc finger protein zat10-like)	-0,925277725	0,031040516
						VIT_218s0166g00190	U-box domain-containing protein 27	-0,938573213	0,028247045
						VIT_208s0007g08520	hypothetical protein	-0,958519069	0,008447593
						VIT_218s0001g09850	MYB1 (r2r3-myb transcription factor)	-0,962708877	1,33E-06
						VIT_206s0008g01090	CCR4-associated factor 1 homolog 9	-1,110611532	0,001010203
						VIT_219s0014g02240	ERF4 (ethylene-responsive transcription)	-1,134945245	1,41E-06
						VIT_208s0032g01150	SYP121 (syntaxin-related protein Nt-Syr1)	-1,152225721	0,003541135
						VIT_208s0007g07390	methyltransferase-related protein	-1,352674391	0,000148165
						VIT_201s0026g000950	probable formin-like protein 4 (actin binding)	-1,406634754	0,000436316
						VIT_206s0008g00780	NAC090 (nac domain-containing protein 90-like)	-1,414537232	0,000237688
						VIT_217s0000g04460	probable calcium-binding protein CML15	-1,44555336	0,027770089
						VIT_208s0105g00180	PUB23 (E3 ubiquitin-protein ligase)	-1,912736415	0,008359743
						VIT_207s0031g02250	ATL8 (ring-H2 finger protein)	-1,950622226	0,012511252
						VIT_217s0000g01490	CYP94B3 (cytochrome P450 94A1-like)	-3,679369842	0,003192151
						Regulation of plant-type hypersensitive response	GO:0010363	Regulation of plant-type hypersensitive response	14
VIT_200s0283g00030	CNX1 (calnexin homolog)	0,315992395	0,018579834						
VIT_217s0000g06180	alpha beta-hydrolase-like protein	0,310698838	0,044979475						
VIT_215s0046g03730	DGD2 digalactosyldiacylglycerol synthase)	0,293076174	0,047352866						
VIT_207s0129g00180	ACA2 (ca2+-transporting ATPase, plasma membrane-type)	-0,316322689	0,037115991						
VIT_206s0004g07440	EXO70B1 (exocyst complex component)	-0,352374124	0,015900119						
VIT_209s0018g01190	probable shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase	-0,372158295	0,032556936						
VIT_208s0007g01510	probable phosphatidylinositol:ceramide inositolphosphotransferase 1	-0,3953006	0,046894313						
VIT_210s0003g02030	CAD1 (membrane attack complex /perforin domain containing protein)	-0,466427367	0,01010683						
VIT_205s0020g01400	SRC2 (hypothetical protein)	-0,473152332	0,006210698						
Establishment of protein localization to organelles	GO:0072594	Establishment of protein localization to organelle	7	2	5	VIT_216s0039g02670	TOC34 (translocase of chloroplast 34)	0,36482864	0,03153771
						VIT_217s0000g07280	HDA05 (histone deacetylase)	0,301793819	0,03700504
						VIT_203s0180g00160	TIC21 (translocon at inner membrane of chloroplasts 21)	-0,294195046	0,018472502
						VIT_204s0008g00750	uncharacterized protein	-0,341979477	0,017492582
						VIT_205s0020g01400	SRC2 (hypothetical protein)	-0,473152332	0,006210698
						VIT_214s0171g00430	PHB3 (prohibitin)	-0,487273296	0,000636813
						VIT_208s0032g01150	SYP121 (syntaxin-related protein Nt-Syr1)	-1,152225721	0,003541135
						VIT_202s0025g01055	CRF2 (AP2/ERF domain-containing transcription factor)	-0,823426741	8,84E-05

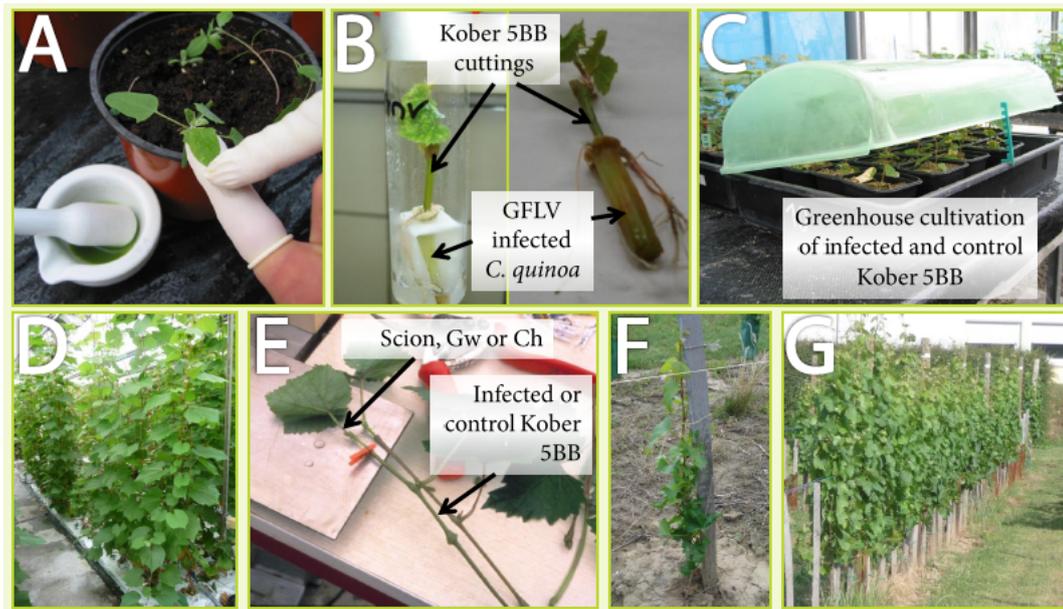
726

727

728 **Supplemental table 4:** Primers used in qRT-PCR analyses

Primer number	Primer name	Gene reference	Gene description	5'-3' Sequence	amplicon size (bp)
54	NQO1_Fwd-1	VIT_209s0002g08480	quinone oxidoreductase 1	GATGGTAATGGTACTGGATCTG	150
55	NQO1_Rev-1			TGAGATTACTCTGGCAATGGG	
58	GAPDH_Fwd-1	VIT_217s0000g10430	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	CAATGAAGGACTGGAGAGGT	129
59	GAPDH_Rev-1			GCCATTCCAGTCAATTTCCC	
62	PP2A_Fwd-1	VIT_201s0011g03280	Serine/threonine protein phosphatase 2A (PP2A) 65 kDa regulatory subunit A	GCAGCATCACGAATGGAGTAAA	150
63	PP2A_Rev-1			GCAGAGGATAGACATTGGAG	
66	TIP41_Fwd-1	VIT_203s0091g00270	tip41-like protein	CATCCAGTTAGAGCATCAAAAGC	148
67	TIP41_Rev-1			TCAACTCTCCAACTCCAAC	
72	AFC1_Fwd-2	VIT_208s0040g02640	serine threonine-protein kinase afc1	GAAAGCATGAGAGCAGTTTGG	123
73	AFC1_Rev-2			TCCGCTGGTTCATATCTTAG	
74	NEMFI_Fwd-1	VIT_205s0077g00460	nuclear export mediator factor nemf-like	CAGGCAAAGGAATGAAACCAG	148
75	NEMFI_Rev-1			GCCGATCTTCAACTCCATTAG	
78	PP7_Fwd-1	VIT_204s0044g01770	serine threonine-protein phosphatase 7	GGAGATTATGTCGATAGAGGC	141
79	PP7_Rev-1			CTAAAACCATATACAGACGTGC	
86	NA_1410_Fwd	VIT_212s0059g01410	NA_1410	CCATGGCTCATTTGGTTGATG	104
87	NA_1410_Rev			CTATCACACCCTTCGTCCTTTC	
88	CDT1A_Fwd	VIT_207s0005g03090	cdt1-like protein chloroplastic-like	ACTGAATGGCTTGGAAAGTG	149
89	CDT1A_Rev			CCTGGATGTTGATGGGATAGAG	
90	PDF2_Fwd	VIT_207s0130g00030	defensin-like protein 6-like	TCTCATCCTCTTGGCTTCTC	102
91	PDF2_Rev			ACAGTTGTGGTCTCCCATG	
94	GPAT6_Fwd	VIT_208s0007g02000	glycerol-3-phosphate acyltransferase 6	GTGGCTCACATTTGTCTTGG	139
95	GPAT6_Rev			GAACATAAGAAAGCGGAGTGG	
96	KCS5_Fwd	VIT_216s0022g02190	3-ketoacyl- synthase	CGTCCATGTTGCCATTCTTG	146
97	KCS5_Rev			CACTGATCTCCCTGAAGTTGG	
98	RD22_Fwd	VIT_204s0008g03950	dehydration-responsive protein rd22	TCAGAGATGTTTTACGGCCAG	130
99	RD22_Rev			CCTTTGCCAACCAACATTG	
100	NA_0420_Fwd	VIT_203s0091g00420	NA_0420	TAGATCACAGGCTCAGTG	140
101	NA_0420_Rev			GATCTCAGGCGGAATCTCA	
102	GRP_Fwd	VIT_200s0301g00040	glycine-rich protein	TTCCCTTTGACGGCCTTG	109
103	GRP_Rev			TCGCCACTCTTTTCTCTTG	
104	PDF1_Fwd	VIT_212s0142g00240	protodermal factor	CCAAATGCTCCACCCAGAG	103
105	PDF1_Rev			ATCCAAACTCACCTTCACTG	
106	SYP121-Fwd	VIT_208s0032g01150	syntaxin-related protein nt-syr1	TCCATCCGCAATCAAATCTC	150
107	SYP121-Rev			CTCTTGGATCGCCTTCTGAAG	
110	APL1_Fwd	VIT_205s0020g02880	adp-glucose pyrophosphorylase large subunit	ATTCTTTAGCTGAGGCAGGG	148
111	APL1_Rev			TCAAGGGAAGAGGCAGAAAAG	
112	BCB_Fwd	VIT_211s0016g05530	blue copper protein	GTGCTCCGGTTGTGAAATGG	114
113	BCB_Rev			ACTCTTTGGTTGGACTGTTTC	
114	NA_1090_Fwd	VIT_218s0072g01090	NA_1090	CAAGGATTTTCATGGCCCTTG	150
115	NA_1090_Rev			CCTCTATTCCATTATCCCAA	
IM114	PIN5_Fwd-1	VIT_204s0023g00320	auxin efflux carrier component	ACAAAACCCTAACTCCTACGC	158
IM115	PIN5-Rev-1			CCATGAAGAGCCCCATACTAAC	
IM116	NDF6_Fwd-1	VIT_200s1596g00010	NAD(P)H dehydrogenase complexe	TATTTCCGCCAGCTTCTTC	170
IM117	NDF6_Rev-1			GAGCAGTATAGGAAAGATGGAG	
IM118	NFYC4_Fwd-1	VIT_214s0006g02320	nuclear transcription factor y subunit c-4	CCAAACCATCAAGAGCTTTTAC	175
IM119	NFYC4_Rev-1			TGTGGCAAATGACGAAGTAC	
IM120	CYP94B3_Fwd-1	VIT_217s0000g01490	cytochrome p450 CYP94B3	GGTGAAGGATATGGTGATAAGC	149
IM121	CYP94B3_Rev-1			CGAGTGGGTTTCTGTAGAGTG	
IM122	ROXY2_Fwd-1	VIT_201s0146g00220	glutaredoxines ROXY2	ACCAGAGTCCCATTGATATGTG	135
IM123	ROXY2_Rev-1			CAGAGGGAAGGAGATTGAGC	
IM124	ERF4_Fwd-1	VIT_219s0014g02240	Ethylene Response Factor 4	CCACCGGATATGTTGCGATT	155
IM125	ERF4_Rev-1			GATGGTTGAGATCGAGATTGAG	
IM126	AGAL2_Fwd-1	VIT_210s0071g01130	alpha galactosidase	CTGGGAGAGTATGACATCGC	148
IM127	AGAL2_Rev-1			GCCCAGATGCTAAAGTGAGAG	
IM128	PR10_Fwd-1	VIT_205s0077g01670	pathogenesis related protein 10	CTGTCCATCAAAGCATACC	175
IM129	PR10_Rev-1			GGCCATTAAGATCGAAACAG	
IM130	RDR1_Fwd-1	VIT_201s0011g05870	RNA polymerase RNA dependante	CTGAGGAGTACAAGCTTGAG	110
IM131	RDR1_Rev-1			TCTGTGGAGCATCAAGTAACTG	
IM132	AIL6_Fwd-1	VIT_200s1291g00010	ap2-like ethylene-responsive transcription factor ail6	CAGGGAATTTGGTAGTTGACG	167
IM133	AIL6_Rev-1			GTGGACGGGTAGATATGAAGC	

730

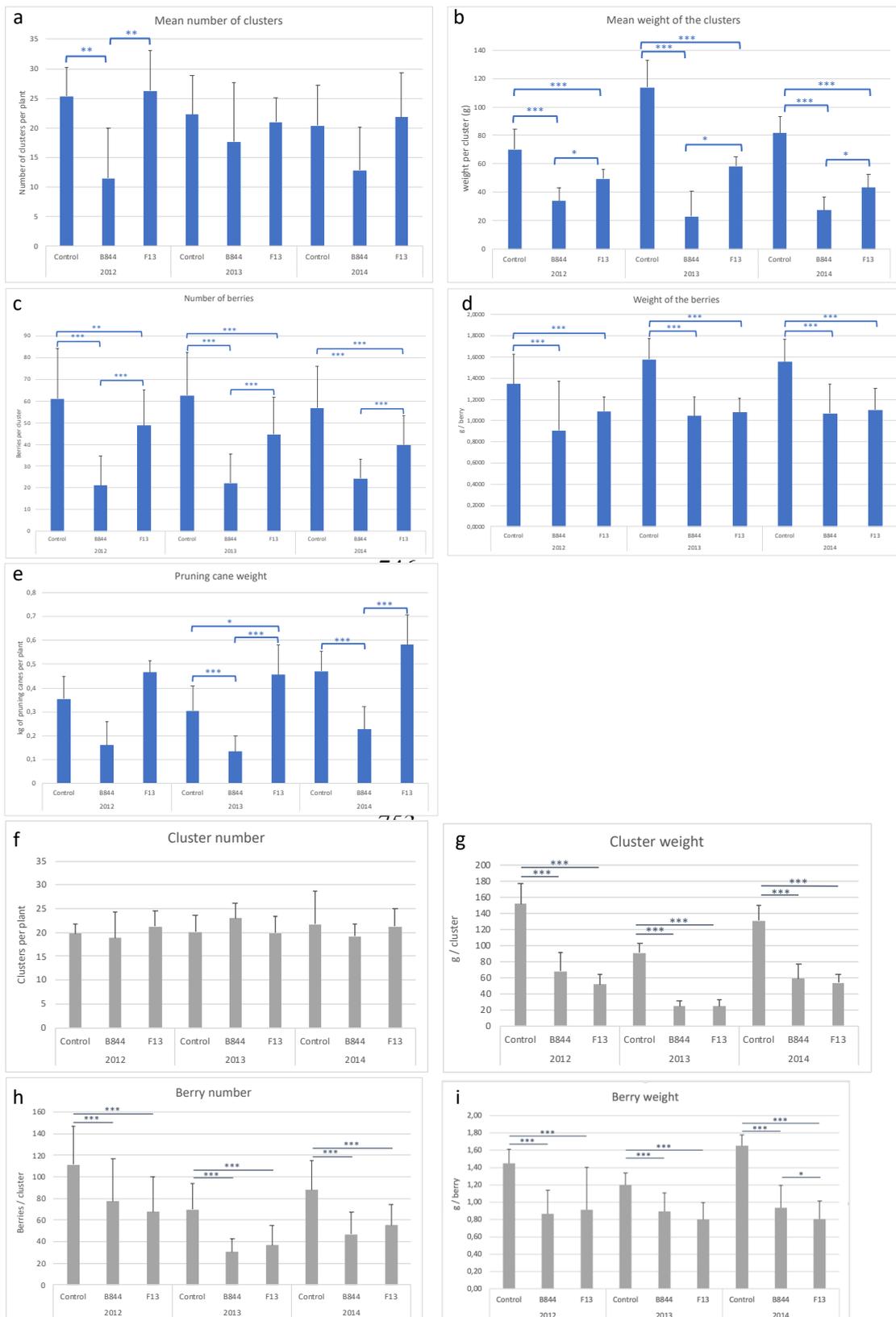


731 **Supplemental figure 1:** Establishment of an experimental plot of grapevines infected with a single  
732 GFLV strain.

733 A: mechanical inoculation of *C. quinoa* seedlings. B: *in vitro* heterologous grafting. C: acclimation of the  
734 infected rootstock. D: in liana cultivation of grapevine genotypes. E: herbaceous grafting of the  
735 grapevine cultivar on the rootstock. F: The grafted grapevine is transplanted in the plot. G: A row of  
736 the established assay.

737

738



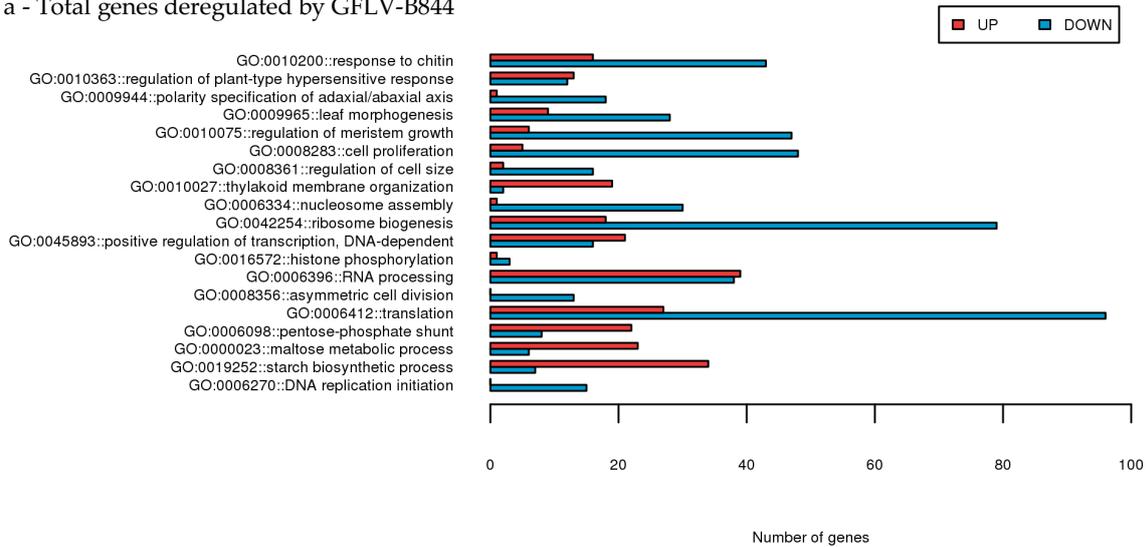
739  
740  
741  
742  
743  
744  
745

754  
755  
756  
757  
758  
759  
760  
761  
762  
763  
764  
765  
766

767 **Supplemental figure 2:** Annual comparison of F13- and B844-infected grapevines. Gw (a to g) and  
768 Ch (h to k) vines infected with GFLV strains F13 and B844 were monitored for flowering time (a), for  
769 ripening time (b), for cluster number (c, h) and mean weight (d, i), for berry number (e, j) and weight  
770 (f, k) and for pruning wood weight (g). Error bars = standard deviation. Statistically significant  
771 differences (Student's t-test) are indicated with asterisks (\*:  $P \leq 0.05$ , \*\*:  $P \leq 0.01$  \*\*\* $P \leq 0.005$ ).

772

a - Total genes deregulated by GFLV-B844

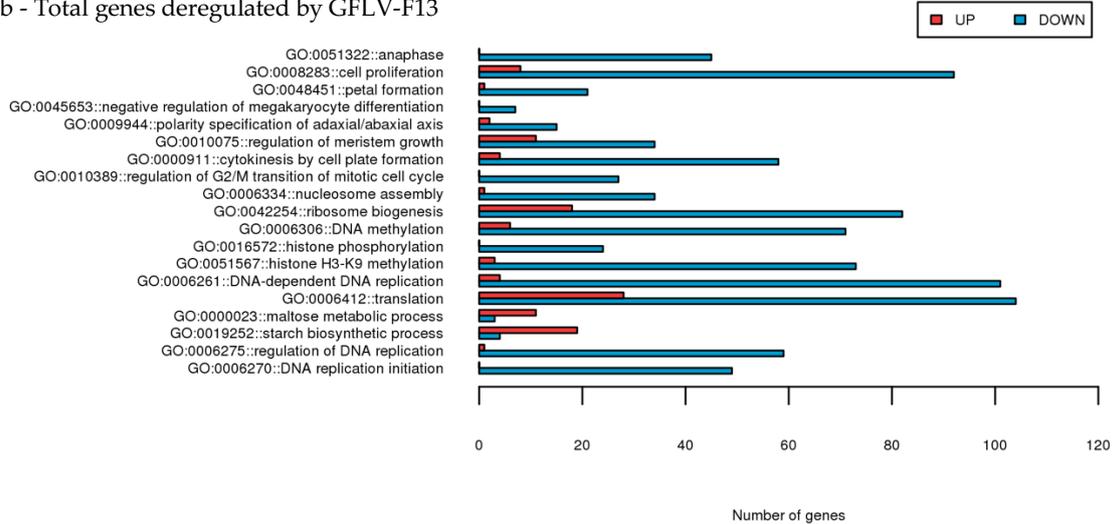


773

774

775

b - Total genes deregulated by GFLV-F13



783

784

785

786

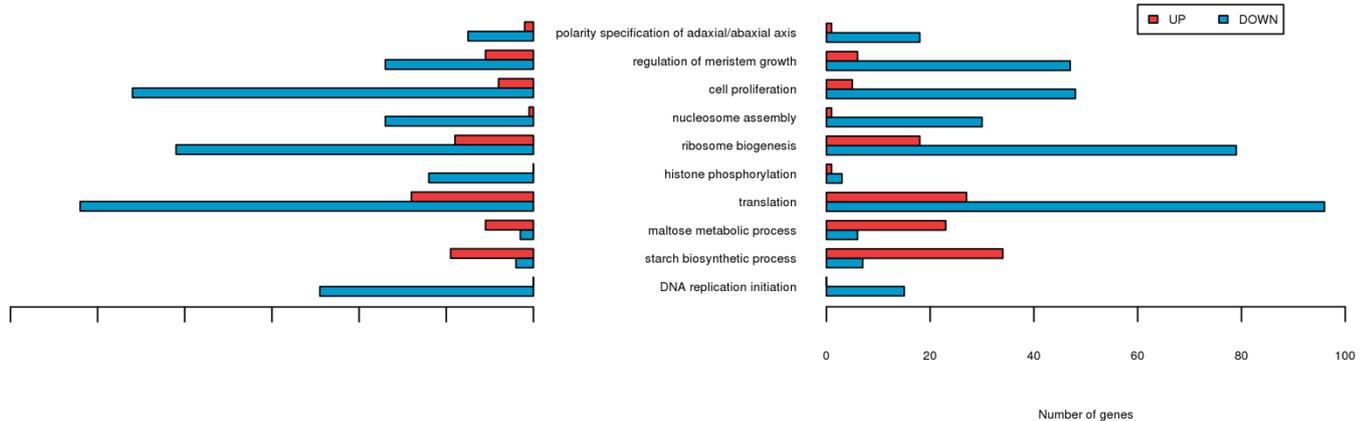
787

788

c - Commun genes

Strain F13

Strain B844



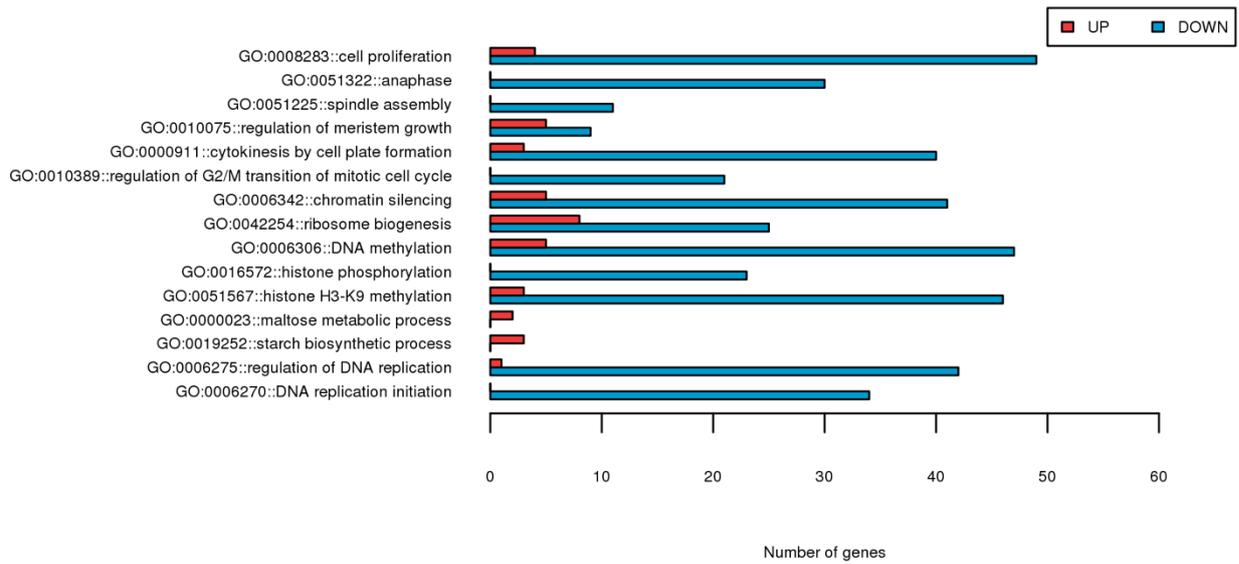
798

799

800

801  
802  
803  
804  
805  
806  
807  
808  
809  
810  
811  
812  
813  
814  
815  
816  
817  
818  
819

d - Genes specifically deregulated by GFLV-F13



**Supplemental figure 3:** GO enrichment of genes deregulated by GFLV-B844 (a), GFLV-F13 (b), GFLV-B844 and -F13 (c) and GFLV-F13 but not GFLV-B844 (d). Numbers of induced (red) and repressed (blue) grapevine genes in the 11 top GO categories are shown. ( $P \leq 0.05$ )

**Tableau 6 : Echantillons et détails des prélèvements des plantes analysées par LC-MS**

Dispositif	Virus	Dates des prélèvements de feuilles							
		17/05/16	26/05/16	09/06/16	05/08/16	07/09/16	12/04/17	03/05/17	06/06/17
Parcelle	F13	6	6	6					
vignes	B844	6	6	6					
2006	Non inoculé	6	6	6					
Serre	F13		3	3				3	
série	B844		3	3				3	
14427	Non inoculé		3	3				3	
Serre	F13				3	3	3		3
série	B844				3	3	3		3
16417	Non inoculé				3	3	3		3
								Total	117

36 vignes appartenant à la parcelle (greffées en 2006) et aux dispositifs en serre (greffées en 2014 et 2016) ont été prélevées à différentes dates. Au total 117 échantillons de feuilles ont été congelés dans l'attente d'être analysés par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse.

### III. Caractérisation de la réaction induite par la souche B844 chez Gw

Le rabougrissement induit par la souche B844 est caractérisé par la dérégulation de gènes appartenant à des voies impliquées dans la régulation de réactions de type HR (Martin *et al.*, soumission prévue pour décembre 2018 au journal « *International Journal of Molecular Sciences*»). Cette conclusion ouvre plusieurs questions dont une majeure : sommes-nous vraiment en présence d'une HR induite par un virus, dans la vigne ? L'approche par RNA Seq n'a pas permis de mettre en évidence le gène marqueur le plus reconnu de cette réaction (le transcrite *hsr203J*), peut-être parce que les analyses n'ont pas été réalisées à des temps précoces suivant l'infection du virus. Afin de conforter notre hypothèse et les différentes voies dérégulées spécifiquement par la souche B844, nous avons décidé de doser plusieurs métabolites pouvant être impliqués dans la réponse de la plante et intervenir dans le phénotype de rabougrissement. Nous avons également recherché, à l'image de ce que nous avons observé dans notre modèle herbacé, si cette réaction HR potentielle pouvait être, dans certains pieds, suffisamment efficace pour bloquer la multiplication du GFLV-B844.

#### 1. Les métabolites secondaires dans les feuilles de Gw infectés par la souche B844

Certains gènes et voies spécifiquement dérégulés par la souche B844 sont liés à la fluctuation de métabolites secondaires. De plus différents types de composés comme des molécules anti-oxydantes (glutathion), des phytohormones (acide abscissique, auxines), des composés de défense des plantes (acide salicylique, acide jasmonique) et des phytoalexines (resvératrol et ses dérivés) sont connus pour être impliqués dans des voies de défense chez les plantes, voire au sein de réaction HR (Cf. chapitre I). C'est pourquoi dans le but de poursuivre la comparaison de la réaction induite par le GFLV-B844 par rapport à celle induite par le GFLV-F13, des dosages de métabolites secondaires ont été réalisés. Pour cela nous avons mis à profit deux dispositifs expérimentaux établis en serre en 2014 et 2016 et la parcelle implantée en 2006. Ainsi au total 12 vignes Gw clone 643 inoculées par la souche F13, 12 inoculées par la souche B844 et 12 vignes non-inoculées étaient disponibles. Dans les deux dispositifs en serre, le symptôme de rabougrissement induit par B844 a pu être aussi constaté de façon similaire à ce qui était observé en parcelle. Des feuilles ont été prélevées sur les 36 vignes à différentes dates pour un nombre total de 117 échantillons (Tableau 6). Ces échantillons ont été congelés à -80°C.

Après broyage des feuilles dans l'azote liquide, les métabolites secondaires de ces 117 échantillons ont été extraits à l'aide de méthanol. Ces extraits ont ensuite été analysés par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse (LC-MS, annexe). L'analyse des résultats n'en n'est qu'à ses prémices mais des premières données semblent indiquer qu'on retrouve une réponse différentielle entre F13 et B844 sur certains de ces métabolites comme le resvératrol par exemple. Ce composé est la phytoalexine majoritaire de la vigne, et est impliqué dans de nombreuses réponses contre des pathogènes,

Tableau 7 : Détection du GFLV dans le bois du porte-greffe et dans les feuilles du greffon

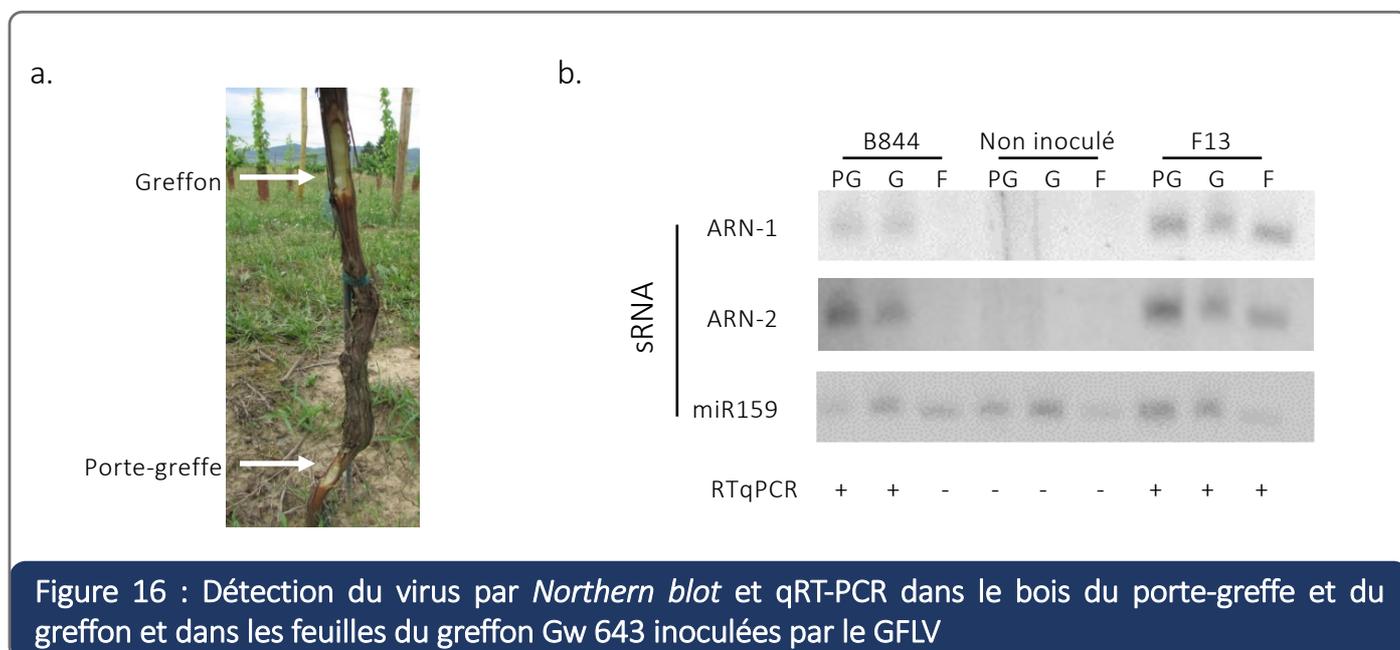
Clone de Gw	Souche de GFLV	N <sup>(a)</sup>	Rabougrissement <sup>(b)</sup>	Présence du virus dans le greffon <sup>(c)</sup>	Présence du virus dans le porte-greffe <sup>(d)</sup>
Gw 47	Non inoculé	8	-	-	-
	F13	3	-	+	+
	B844	8	+	+*	+
Gw 643	Non inoculé	8	-	-	-
	F13	7	-	+	+
	B844	3	+	+*	+
		5	-	-	+
Gw 1075	Non inoculé	8	-	-	-
	F13	6	-	+	+
	B844	6	+	+**	+
		2	-	-	+

(a) Nombre de plantes testées

(b) L'absence (-) ou la présence (+) de rabougrissement est notée d'après les observations réalisées de 2015 à 2018. Pour les vignes Gw 643 et Gw 1075 inoculées avec du GFLV-B844 on distingue des plantes rabougriées et des plantes non rabougriées.

(c) Le GFLV a été détecté par DAS-ELISA dans les feuilles du greffon chaque année en juin de 2014 à 2018. L'absence (-) ou la présence (+) du virus s'est révélée stable d'une année à l'autre sauf pour quelques plantes inoculées avec du GFLV-B844 pour lesquelles la détection du virus fluctuait d'une année à l'autre\*. Dans une plante\*\* le virus n'était pas détecté de 2014 à 2016 mais il est détecté à partir de 2017.

(d) Détection par DAS-ELISA sur des copeaux de bois du porte-greffe prélevés au mois de mai 2017 (voir figure ci-dessous). En rouge présence du virus dans le porte-greffe mais pas dans le greffon.



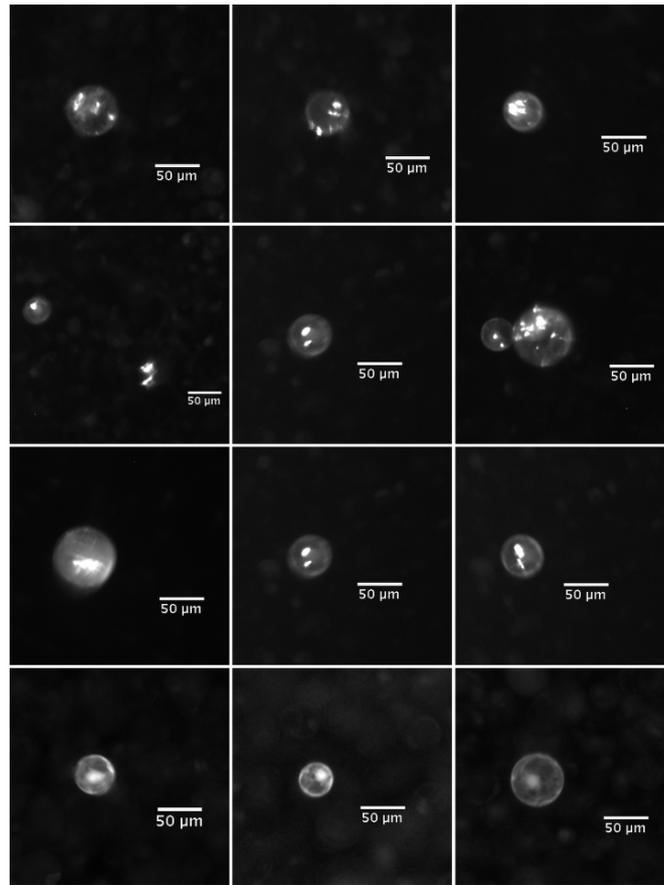
a. Photo montrant les endroits des prélèvements des copeaux de bois du porte-greffe (PG) et du greffon (G) de part et d'autre du point de greffe, ayant servi de source avec les feuilles (F) pour les analyses. En b. Exemple de *Northern blot* montrant la détection de petits ARN de 21-22 nt provenant de l'ARN-1 et de l'ARN-2 du GFLV. Les ARN totaux ont été séparés sur un gel dénaturant à 17 % de polyacrylamide. L'hybridation a été réalisée avec des sondes marquées au <sup>32</sup>P. La détection du miR159 sert de témoin de charge. Les résultats d'analyses par qRT-PCR sont indiqués pour chaque échantillon : (+) : présence, (-) : absence

incluant la HR. Il est à noter que ces résultats présentent, à l'instar de ce qui a été obtenu dans les analyses par qRT-PCR (Cf. Publication n°2), une grande variabilité en fonction des conditions de culture. Il n'est donc pas possible de comparer des plantes cultivées depuis 2006 à l'extérieur avec celles des dispositifs expérimentaux des serres.

## 2. La restriction du GFLV-B844

En plus des différents dispositifs expérimentaux obtenus en 2006, 2014 et 2016, composés de vignes Gw clone 643 greffées sur Kober-5BB clone 259 décrites dans le précédent chapitre l'équipe a aussi mis en place en 2013 de nouvelles vignes dans la parcelle. Afin de savoir si le phénotype de rabougrissement induit par la souche B844 pouvait être modulé par différents génotypes de gewurztraminer, différents clones de Gw (clones 47, 643, 1075) ont été greffés sur les porte-greffes Kober-5BB clone 259 infectés (par du GFLV-F13 ou -B844) ou non-infectés (Tableau 7). Lors du suivi de ces plantes par DAS-ELISA (sur des échantillons de feuilles collectées aux printemps de 2014 à 2018), le virus n'a pas été détecté dans les vignes contrôles non-inoculées alors qu'il a toujours été détecté dans tous les génotypes inoculés par le GFLV-F13 (Tableau 7). Par contre la détection du GFLV-B844 a varié suivant les années, les génotypes de Gw et les plantes (Tableau 7). Ainsi, dans les Gw 643 et 1075, deux catégories de plantes se distinguent : (i) des plantes (trois de Gw 643 et six de Gw 1075) qui présentent un phénotype de rabougrissement et dans lesquelles le virus est présent, malgré des fluctuations d'une année à l'autre et (ii) des plantes (cinq de Gw 643 et deux de Gw 1075) qui ne présentent pas de rabougrissement et dans lesquelles le virus n'est pas détecté. En revanche pour le clone 47, le GFLV-B844 est toujours détecté et cause un rabougrissement systématique. Ces résultats semblent indiquer une restriction partielle spécifique du GFLV-B844 dépendant du génotype de la vigne.

Afin de vérifier la présence du virus dans le porte-greffe, des fragments de bois sous l'écorce du porte-greffe ont été prélevés (Fig. 16). Pour les sept vignes dans lesquelles le virus n'était pas détecté dans les feuilles, le virus a été facilement détecté par ELISA dans le porte-greffe (Tableau 7). Par des analyses moléculaires complémentaires (IC-RT-PCR-RFLP) l'identité de la souche de GFLV-B844 a été vérifiée. Dans un deuxième temps, afin de détecter les ARN viraux et leur produit de dégradation (siRNA de 21 et 22 nt), de nouveaux prélèvements ont été réalisés sur le bois des porte-greffes et des greffons, et sur les feuilles du greffon (Fig. 16) pour trois vignes Gw inoculées par le GFLV-B844 (et pour lesquelles le virus n'était pas détecté par ELISA dans les feuilles du greffon) ainsi que pour des vignes témoins non-inoculées ou inoculées avec du GFLV-F13. Comme on peut le voir sur le *northern blot* présenté comme exemple dans la Fig. 16, des vsiRNA provenant des ARN1 et ARN2 du GFLV sont détectés dans le bois du porte-greffe et du greffon juste au-dessus du point de greffe, alors qu'ils ne sont pas détectés dans les feuilles du greffon Gw. Par ailleurs ce résultat est corroboré par des analyses des mêmes échantillons par qRT-PCR qui montrent la détection du



**Figure 17 : Expérience préliminaire de transfection de protoplastes de Gw par le GFPV**

Des protoplastes obtenus à partir de cellules de vigne Gw 643 ont été transfectés avec un GFPV recombinant codant pour une protéine fluorescente (G1F2-2A:TagRFP) par électroporation. Les cellules ont été photographiées environ 68 heures après, avec un microscope stéréoscopique Zeiss Axiozoom V16 équipé d'un filtre d'excitation de 538-562 nm et d'un filtre d'émission de 570-640 nm. L'observation des protoplastes transfectés a mis en évidence la réussite de l'infection virale et une localisation de la protéine 2A:TagRFP conforme à ce qui a été observée précédemment au laboratoire.

GFLV-B844 dans les bois du porte-greffe et du greffon et son absence dans les feuilles du greffon (Fig. 16).

L'ensemble de ces résultats nous montre donc que la propagation du GFLV-B844 est bloquée dans certains plants de Gw. Dans ces vignes le virus est détectable dans le porte-greffe et au niveau du tronc du greffon (au-dessus du point de greffe), indiquant que le virus se multiplie dans le porte-greffe d'où il diffuse dans le greffon. Dans les feuilles c'est-à-dire les parties apicales, loin du point d'entrée du virus dans le greffon Gw, le virus est indétectable et ceci quelle que soit la méthode de détection utilisée (DAS-ELISA, qRT-PCR, *northern blot* pour la détection de vsRNA de 21-22 nt). Ces méthodes sont tout à fait sensibles et fiables pour détecter le virus (Vigne *et al.*, 2018) suggérant que le virus est effectivement absent des parties apicales du greffon.

Le nouveau dispositif expérimental implanté dans la parcelle en 2013, nous fournit une corrélation directe entre le phénotype de rabougrissement et la présence du GFLV-B844 dans trois génotypes de vigne, puisque sur 24 plantes inoculées par cette souche, 17 plantes sont rabougries et infectées de façon systémique par le virus tandis que sept plantes ne sont pas rabougries et ne contiennent pas de virus dans leurs feuilles. Dans ces sept vignes, le virus est détectable immédiatement au-dessus du point de greffe mais il ne se propage pas à l'ensemble de la plante, il est donc restreint à son point d'entrée. Cette restriction est spécifique du génotype viral et de l'hôte puisqu'elle n'est pas observée avec la souche F13 du GFLV, et avec le clone Gw 47 (Tableau 7), elle s'inscrit donc dans une relation gène pour gène en accord avec une HR.

À ce jour nous ne disposons pas d'explications précises pour cette restriction partielle observée dans le dispositif mis en place en 2013 alors que pour les autres dispositifs incluant du Gw 643, aucune restriction virale n'a été observée. Il est possible que les conditions environnementales aient été différentes au moment du greffage et dans les semaines suivant le greffage.

#### IV. Conclusion

Sur vigne, l'élucidation des mécanismes à l'origine des symptômes est complexe. Au cours de ce travail nous avons pu établir un lien entre un phénotype très marqué de rabougrissement et un génotype viral sur l'hôte *V. vinifera* cv Gw. En parallèle, des clones infectieux de ce génotype viral, le GFLV-B844, ont été obtenus au laboratoire. Ceci va maintenant permettre d'aborder l'identification du déterminant viral de ce phénotype, en commençant par tester l'ARN-1 de cette souche avec chacun des deux ARN-2, puis d'utiliser des recombinants entre les deux ARN-2 de cette souche ou entre cette souche et la souche F13.

L'identification de des souches de GFLV présentant des phénotypes contrastés sur Gw a permis de comparer sans *a priori*, les transcriptomes des vignes infectées par ces souches hyper-agressive et plus modérée afin d'en dégager des voies potentiellement à l'origine du rabougrissement. Parmi les voies révélées par cette approche, la régulation de la croissance des méristèmes est tout à fait cohérente avec le défaut de croissance observé, et la régulation de la HR semble constituer un bon mécanisme candidat.

D'autre part, les premiers résultats obtenus au laboratoire sur le dosage de métabolites secondaires semblent indiquer une accumulation différentielle de la phytoalexine majoritaire de la vigne dans les Gw inoculés avec les deux souches de GFLV. Enfin, les expériences de détection du virus dans les assemblages de porte-greffes infectés avec trois clones de Gw, ont permis de suggérer une réaction gène pour gène de restriction partielle du virus.

L'ensemble de ces résultats nous permet de proposer qu'une HR pourrait être à l'origine des symptômes de rabougrissement spécifiquement induits par la souche B844 sur Gw, à l'instar des symptômes induits par le GFLV-F13 sur l'hôte herbacé *N. occidentalis*. Cette hypothèse nécessite maintenant d'être vérifiée. Néanmoins, l'utilisation de vignes soumises aux conditions extérieures et infectées depuis plusieurs années (5 à 10 ans) ne correspond sans doute pas au meilleur matériel végétal pour tester cette hypothèse d'une HR, au temps précoce de l'infection. Il faut donc maintenant développer un modèle d'étude de ce pathosystème, permettant une inoculation plus directe du virus. Bien que l'agro-inoculation de la vigne se soit avérée efficace à inoculer le GRBV (Yepes *et al.*, 2018), elle n'a pas été couronnée de succès pour le GFLV. C'est pourquoi l'inoculation de protoplastes représente une alternative intéressante. Nous avons récemment obtenu des cellules de génotype Gw 643 en culture, qui se sont montrées compétentes à induire des réactions de défense (Stempien *et al.*, 2018). Dans une première expérience (Fig. 17), nous avons montré qu'il était possible de transférer par électroporation un GFLV recombinant, codant pour la protéine fluorescente TagRFP (Merzlyak *et al.*, 2007).

S'il est possible d'induire une HR dans des protoplastes, en les transfectant avec des virus, il deviendra possible de caractériser la relation Gw 643 / GFLV-B844, par une étude cinétique des marqueurs classiques de HR (accumulation de transcrits hsr203J, ROS, protéines PR) et ce dès les temps précoces de l'infection. Il sera aussi possible d'identifier plus rapidement que dans des vignes entières, le déterminant de la réaction.

## CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les infections par différents pathogènes ne portent préjudice qu'à partir du moment où elles sont symptomatiques, en effet la présence d'un virus n'est pas tant problématique que les effets qu'il induit sur son hôte. C'est pourquoi l'une des thématiques développées au sein de l'unité mixte de recherche "Santé de la vigne et qualité du vin" porte sur la compréhension des interactions virus / hôte en lien avec la pathogenèse. Le GFLV qui cause la maladie du court-noué de la vigne, s'inscrit parfaitement dans cette problématique en raison de la variabilité des symptômes qu'il induit.

Au vignoble les symptômes de la maladie sont variés et dépendent du cépage infecté, de la souche virale présente, des itinéraires culturaux, et des conditions environnementales. Ces facteurs multiples se manifestent par un panel très large de situations, allant de pieds infectés présentant des symptômes très sévères jusqu'à des ceps peu symptomatiques et tous leurs intermédiaires. Les vignes peu touchées sont particulièrement intéressantes car bien qu'elles soient infectées, cette manifestation de la maladie est acceptable au vignoble car elle associée à peu de pertes. Une méthode de lutte alternative contre le GFLV, la prémunition est testée par l'équipe qui travaille actuellement à identifier des souches prémunisantes peu symptomatiques capables de conférer une résistance vis-à-vis de souches hyper-agressives au vignoble. À une approche empirique basée sur la recherche d'isolats dans des pieds de vigne présentant peu de symptômes à proximité ou dans des ronds de court noué, il faudrait associer une approche raisonnée, basée sur la compréhension de la relation entre le génotype des variants viraux et leurs phénotypes et sur la connaissance des mécanismes de la pathogenèse. À mon arrivée au laboratoire l'étude du déterminisme des symptômes avait déjà permis d'identifier le déterminant viral des symptômes de mosaïque et de chlorose causés par le GFLV-GHu dans les hôtes *N. benthamiana* et *N. clevelandii* au cours d'une réaction compatible (Vigne *et al.*, 2013). Sur *N. occidentalis*, l'observation de symptômes nécrotiques et d'une inconstance dans l'établissement de l'infection systémique avait mené à l'hypothèse d'une réaction incompatible induite par le GFLV-F13.

### I. L'étude de la symptomatologie du GFLV chez *N. occidentalis*

Par la recherche de marqueurs moléculaires, j'ai pu démontrer que le GFLV-F13 est effectivement responsable sur *N. occidentalis* d'une réaction d'hypersensibilité. Grâce à une approche de génétique inverse j'ai pu en identifier le déterminant viral dans les 50 derniers acides aminés de la protéine 2A<sup>HP</sup>. La caractérisation de cette HR a mis en évidence une restriction partielle (ou totale, sur certaines plantes) du virus. La poursuite de la cartographie de l'Avr, l'étude d'une collection de protéines 2A<sup>HP</sup> de différentes souches de GFLV et l'obtention de deux variants naturels ont permis de réduire la zone déterminant la nécrose à

## CONCLUSION

la région s'étendant des résidus 220 à 231 (comprenant un motif de huit résidus en 220-227), et de souligner l'importance des acides aminés 222-223. Ces travaux ont également révélé que l'acide aminé 234 pourrait jouer un rôle dans l'établissement de la HR. Le *stretch* 220-227, qui diffère entre les souches provoquant différents symptômes, pourrait être impliqué directement dans la reconnaissance du produit du gène R ou de son co-facteur tandis que le résidu 234 qui est conservé pourrait avoir un rôle indirect soit dans cette reconnaissance soit dans la transduction du signal. Il serait intéressant d'obtenir la structure tertiaire de la protéine 2A<sup>HP</sup> afin de visualiser les résidus exposés à la surface et ceux qui pourraient être importants pour la structure de la protéine. Il serait alors possible de cibler ces résidus pour les muter et en tester l'effet sur la perte de fonction.

Ce travail a également mis à jour un découplage des différents aspects de la réponse sur *N. occidentalis* : induction de nécrose, production de phytoalexines et restriction virale, illustrant ainsi le concept de gradation de la résistance en fonction du timing et de la vitesse de réponse de la plante (Künstler *et al.*, 2016). Si l'on considère les résultats obtenus sur d'autres espèces du genre *Nicotiana* (Tableau 2 ; Gottula *et al.*, 2014 ; Vigne *et al.*, 2013) avec l'ensemble de nos 7 souches virales (B844, CH8673, CO1, CO2, CO4, F13 et GHu), on voit que *N. occidentalis* est la seule espèce à produire les symptômes de nécrose qui nous ont orientés vers l'hypothèse d'une réaction incompatible. Cependant, dans d'autres couples hôte / souche virale on observe une efficacité variable du virus à établir une infection systémique (c'est le cas pour le GFLV-CO1 et le GFLV-CH8673 sur *N. benthamiana* et pour le GFLV-GHu sur *N. glutinosa* et *N. debneyi*) voire une absence d'infection systémique (c'est le cas pour le GFLV-GHu sur *N. tabacum* cv. xanthi et le GFLV-F13 sur *N. debneyi*). S'il s'avérait que ces situations correspondent à une restriction du virus dans le cadre d'une réaction incompatible, nous aurions alors sur *Nicotiana* une gamme de réponses allant de la réaction incompatible efficace à restreindre le virus sans causer de nécrose, jusqu'à la réaction compatible en passant par différentes situations intermédiaires. Cette collection de génotypes de plantes et de virus constituerait alors un formidable outil pour essayer de comprendre ce qui conditionne la restriction efficace du virus.

L'identification des interactants du facteur d'Avr de F13 paraît une étape importante dans la compréhension de la pathogenèse. Ceci pourrait être réalisé par co-immunoprécipitation. La purification de la protéine 2A<sup>HP</sup> est en cours au laboratoire dans le but d'obtenir des anticorps anti-2A<sup>HP</sup> et des clones infectieux recombinants codant une protéine 2A<sup>HP</sup> étiquetée à son extrémité C-ter sont d'ores et déjà disponibles, ce qui devrait permettre de co-immunoprécipiter les facteurs viraux et cellulaires de cette protéine virale. L'identification des protéines obtenues pourra être réalisée par spectrométrie de masse. L'étude des interactants de la 2A<sup>HP</sup> devrait permettre d'identifier le produit du gène R (et de son éventuel co-facteur) puis d'étudier conjointement les partenaires de cette interaction à l'origine de la HR et/ou des réactions de défenses. En utilisant des protéines 2A<sup>HP</sup> de différentes origines et/ou en utilisant différents hôtes il sera possible de comparer les complexes qui se forment en fonction de la réponse pathogénique. Cette étude pourrait

également permettre d'aborder de façon plus générale l'étude du rôle de la protéine 2A<sup>HP</sup> qui n'est pas encore très bien connu.

## II. L'étude de la symptomatologie du GFLV sur vigne

Le second axe de ma recherche a consisté à aborder l'étude de la symptomatologie du GFLV sur l'hôte d'intérêt agronomique. Par une approche sans *a priori* d'analyse de transcriptome, j'ai pu montrer que le rabougrissement induit par la souche B844 sur Gw est associé à des dérèglements spécifiques de gènes impliqués dans la croissance et la défense de la plante. Certaines voies étaient déjà décrites pour être touchées lors de l'infection de la vigne par le GFLV, mais d'autres comme la régulation de la HR ne l'étaient pas. Des travaux parallèles réalisés par l'équipe ont mis en évidence que dans certaines plantes de Gw le GFLV-B844 pouvait être bloqué dans le greffon juste au-dessus du point de greffe. De la même façon que la souche F13 sur *N. occidentalis*, la souche B844 n'est donc pas toujours capable de déclencher une infection systémique sur Gw. Ces résultats m'amènent à proposer l'hypothèse d'une réaction incompatible qui limiterait plus ou moins efficacement la multiplication et la propagation du virus. Dans les plantes où la HR serait peu efficace, les symptômes seraient plus sévères, à l'image d'une HR systémique. Cette hypothèse d'une HR déclenchée par le GFLV-B844 dans *V. vinifera* cv. Gw doit maintenant être testée et son lien avec les symptômes de rabougrissement établi. Cette voie de défense n'a jamais été décrite dans la vigne en réponse à un pathogène viral (Armijo *et al.*, 2016).

Pour étudier la réaction induite par le GFLV-B844, de nouvelles expériences sont en cours. Des cellules de *Vitis vinifera* cv. Gw sont disponibles au laboratoire. Dans une expérience préliminaire nous avons vérifié qu'il était possible de transférer ces protoplastes de vigne avec un GFLV recombinant, codant pour une protéine 2A<sup>HP</sup> fluorescente (Fig. 17). L'inoculation de protoplastes permet une synchronisation de l'inoculation et un suivi de l'infection aux temps précoces. L'induction de la HR pourra ainsi être testée, par des marqueurs biochimiques et moléculaires. La souche GFLV-F13 servira de contrôle.

Les clones infectieux de la souche GFLV-B844 ont récemment été obtenus dans l'équipe. L'obtention de ré-assortants et de recombinants entre les souches B844 et F13 permettra dans un deuxième temps d'identifier le déterminant viral de cette réaction sur Gw. En raison de nos travaux sur *N. occidentalis* et de la variabilité de la protéine 2A<sup>HP</sup> (Elbeaino *et al.*, 2014) notre meilleur candidat à la détermination de cette réaction est, bien entendu la protéine 2A<sup>HP</sup>. Pour identifier les interactants de ce déterminant viral, des expériences de co-immunoprécipitation pourront être menées. La découverte du produit du gène R ouvrirait ensuite la voie vers son évolution dirigée pour améliorer la réaction de défense ou vers la recherche d'homologues naturels, que l'on pourrait envisager de transférer ou d'introduire dans des porte-greffes ou des cépages agronomiquement intéressants.

### III. Remarques finales

Ce travail de thèse a été abordé sur deux hôtes très différents, l'un herbacé servant de modèle de laboratoire, facile et rapide à manipuler, l'autre d'intérêt agronomique, ligneux, plus long et complexe à manipuler, avec l'idée que les résultats ne seraient pas aisément transférables entre les deux. Pourtant, le travail mené sur la vigne semble suggérer que les mécanismes à l'origine de la symptomatologie pourraient être communs aux deux hôtes. Il est frappant de constater que ce travail se termine en posant, pour la vigne, la même hypothèse qui était posée à mon arrivée pour *N. occidentalis* et que j'ai pu vérifier. S'il s'avérait que cette hypothèse mécanistique soit exacte, des comparaisons entre les pathosystèmes seraient alors justifiées et permettraient de progresser, en parallèle sur les deux systèmes. L'utilisation de protoplastes de vigne pourrait aider à mener des études de front sur les deux types d'hôtes. En effet les mêmes questions se posent dans ces hôtes : Quels sont les facteurs cellulaires déclenchant ces réactions de défenses ? Comment les interactions entre les facteurs viraux et les facteurs cellulaires déclenchent ces réactions ? Quels sont les mécanismes de la restriction virale et qu'est-ce qui diffère entre les plantes où le virus est efficacement restreint et les plantes où le virus se propage ?

## RÉFÉRENCES

Cette liste de références bibliographiques reprend les publications citées dans le texte du manuscrit.

- Al Rwahnih, M., Dave, A., Anderson, M.M., Rowhani, A., Uyemoto, J.K., & Sudarshana, M.R. 2013, Association of a DNA virus with grapevines affected by red blotch disease in California. *Phytopathology*, **103**, 1069-1076.
- Al Rwahnih, M., Dolja, V.V., Daubert, S., Koonin, E.V., & Rowhani, A. 2012, Genomic and biological analysis of *Grapevine leafroll-associated virus 7* reveals a possible new genus within the family *Closteroviridae*. *Virus research*, **163**, 302-309.
- Alliaume, A., Reinbold, C., Erhardt, M., Beuve, M., Hily, J.M., Lemaire, O., & Herrbach, E. 2018, Virus preparations from the mixed-infected P70 Pinot Noir accession exhibit GLRaV-1/GVA 'end-to-end' particles. *Archives of virology*. **163**, 3149-3154.
- Amari, K., Boutant, E., Hofmann, C., Schmitt-Keichinger, C., Fernandez-Calvino, L., Didier, P., Lerich, A., Mutterer, J., Thomas, C.L., Heinlein, M., Mely, Y., Maule, A.J., & Ritzenthaler, C. 2010, A family of plasmodesmal proteins with receptor-like properties for plant viral movement proteins. *PLoS pathogens*, **6**, e1001119.
- Amari, K., Lerich, A., Schmitt-Keichinger, C., Dolja, V.V., & Ritzenthaler, C. 2011, Tubule-guided cell-to-cell movement of a plant virus requires class XI myosin motors. *PLoS pathogens*, **7**, e1002327.
- Andret-Link, P., Laporte, C., Valat, L., Ritzenthaler, C., Demangeat, G., Vigne, E., Laval, V., Pfeiffer, P., Stussi-Garaud, C., & Fuchs, M. 2004a, *Grapevine fanleaf virus*: Still a major threat to the grapevine industry. *Journal of Plant Pathology*, **86**, 183-195.
- Andret-Link, P., Schmitt-Keichinger, C., Demangeat, G., Komar, V., & Fuchs, M. 2004b, The specific transmission of *Grapevine fanleaf virus* by its nematode vector *Xiphinema index* is solely determined by the viral coat protein. *Virology*, **320**, 12-22.
- Armijo, G., Schlechter, R., Agurto, M., Munoz, D., Nunez, C., and Arce-Johnson, P. 2016, Grapevine pathogenic microorganisms: Understanding infection strategies and host response scenarios. *Frontiers in plant science* **7**, 382.
- Atallah, S.S., Gomez, M.I., Fuchs, M.F., & Martinson, T.E. 2011, Economic impact of grapevine Leafroll disease on *Vitis vinifera* cv. Cabernet franc in Finger Lakes vineyards of New York. *American Journal of Enology and Viticulture*, **63**, 73-79.
- Aurand, J.-M. 2017, in OIV statistical report on world vitiviniculture (International Organisation of Vine and Wine).
- Barba, M., Czosnek, H., & Hadidi, A. 2014, Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses*, **6**, 106-136.
- Basso, M.F., Fajardo, T.V.M., & Saldarelli, P. 2017, Grapevine virus diseases: Economic impact and current advances in viral prospection and management. *Revista Brasileira de Fruticultura*, **39**.
- Beaumard, E., & Gerbod, C. 2018, *Le Vin pour les Nuls* (First).
- Belin, C., Schmitt, C., Demangeat, G., Komar, V., Pinck, L., & Fuchs, M. 2001, Involvement of RNA2-encoded proteins in the specific transmission of *Grapevine fanleaf virus* by its nematode vector *Xiphinema index*. *Virology*, **291**, 161-171.
- Belin, C., Schmitt, C., Gaire, F., Walter, B., Demangeat, G., & Pinck, L. 1999, The nine C-terminal residues of the grapevine fanleaf nepovirus movement protein are critical for systemic virus spread. *Journal of General Virology* **80**, 1347-1356.
- Belval, L., Hemmer, C., Sauter, C., Reinbold, C., Fauny, J.D., Berthold, F., Ackerer, L., Schmitt-Keichinger, C., Lemaire, O., Demangeat, G., & Ritzenthaler, C. 2016, Display of whole proteins on inner and outer surfaces of grapevine fanleaf virus-like particles. *Plant biotechnology journal*, **14**, 2288-2299.
- Bendahmane, A., Kanyuka, K., & Baulcombe, D.C. 1999, The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *The Plant Cell Online*, **11**, 781-791.

## REFERENCES

- Bertioli, D., Harris, R., Edwards, M., Cooper, J., & Hawes, W. 1991, Transgenic plants and insect cells expressing the coat protein of *Arabis mosaic virus* produce empty virus-like particles. *J Gen Virol* **72**, 1801-1809.
- Bianchi, G.L., De Amicis, F., De Sabbata, L., Di Bernardo, N., Governatori, G., Nonino, F., Prete, G., Marrazzo, T., Versolatto, S., & Frausin, C. 2015, Occurrence of *Grapevine Pinot gris virus* in Friuli Venezia Giulia (Italy): field monitoring and virus quantification by real-time RT-PCR. *EPPO Bulletin*, **45**, 22-32.
- Bienz, K., Egger, D., Pfister, T., & Troxler, M. 1992, Structural and functional characterization of the poliovirus replication complex. *J Virol Methods*, **66**, 2740-2747.
- Boscia, D., Savino, V., Martelli, G.P., & Castellano, M.A. 1991. in Proceedings 10th meeting of ICVG, Association of a phloem-limited non mechanically transmissible isometric virus with grapevine fleck disease (Volos, Greece), 173-174.
- Bovey, R. 1970, The economic importance of vines viruses. *Bulletin OIV*, **43**, 124-138.
- Boyland-Pett, W., Ramsdell, D.C., Hoopingarner, R.A., & Hancock, J.F. 1991, Honeybee foreaging behavior, inhive survival of infectious, pollen-borne *Blueberry leaf mottle virus* and transmission of the virus in highbush blueberry. *Phytopathology*, **81**, 1407-1412.
- Brown, D.J.F., Halbrendt, J.M., James, A.T., Vrain, T.C., & Robbins, R.T. 1994, Transmission of three North American nepoviruses by populations of four distinct species of the *Xiphinema americanum* group. *Phytopathology*, **84**, 646-649.
- Burger, J.T., Maree, H.J., Gouveia, P., & Naidu, R.A. 2017, in *Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management*, eds. Meng, B., Martelli, G.P., Golino, D.A., & Fuchs, M.E. (Springer).
- Cadman, C.H. 1963, Biology of soil-borne viruses. *Annu Rev Phytopathol* **1**, 143-172.
- Cadman, C.H., Dias, H.F., & Harrison, B.D. 1960, Sap-transmissible viruses associated with diseases of grapevines in Europe and North America. *Nature*, **187**, 577-579.
- Calvi, B.L. 2011, in (University of California, Davis, CA).
- Cazalis-Allut, L.C. 1865, De la dégénération des vignes. *Ouvres Agricoles*, 57-61.
- Chandrasekaran, J., Brumin, M., Wolf, D., Leibman, D., Klap, C., Pearlsman, M., Sherman, A., Arazi, T., & Gal-On, A. 2016, Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Molecular plant pathology*, **17**, 1140-1153.
- Chare, E.R., & Holmes, E.C. 2006, A phylogenic survey of recombination frequency in plant RNA viruses. *Archives of virology*, **151**, 933-946.
- Chiumenti, M., Giampetruzzi, A., Pirolo, C., Morelli, M., Saldarelli, P., Minafra, A., Bottalico, G., La Notte, P., Campanale, A., Savino, V., & Martelli, G.P. 2012. *In Proceedings of the 17th congress of ICVG, Approaches of Next Generation Sequencing to Investigate Grapevine Diseases of Unknown Aetiology* (Davis, California, USA), 116-117.
- Chu, M., Desvoyes, B., Turina, M., Noad, R., & Scholthof, H.B. 2000, Genetic dissection of Tomato bushy stunt virus p19-protein-mediated host-dependent symptom induction and systemic Invasion. *Virology*, **266**, 79-87.
- Cieniewicz, E., Perry, K., & Fuchs, M. 2017a, in *Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management*, eds. Meng, B., Martelli, G.P., Golino, D.A., & Fuchs, M.E. (Springer).
- Cieniewicz, E.J., Pethybridge, S.J., Gorny, A., Madden, L.V., McLane, H., Perry, K.L., & Fuchs, M. 2017b, Spatiotemporal spread of *Grapevine red blotch-associated virus* in a California vineyard. *Virus research*, **241**, 156-162.
- Cieniewicz, E.J., Pethybridge, S.J., Loeb, G., Perry, K., & Fuchs, M. 2018, Insights into the ecology of *Grapevine red blotch virus* in a diseased vineyard. *Phytopathology*, **108**, 94-102.
- Cole, A.B., Király, L., Ross, K., & Schoelz, J.E. 2001, Uncoupling resistance from cell death in the hypersensitive response of *Nicotiana* species to cauliflower mosaic virus infection. *Mol Plant Microbe Interact*, **14**, 31-41.
- Conti, G., Rodriguez, M.C., Manacorda, C.A., & Asurmendi, S. 2012, Transgenic expression of tobacco mosaic virus capsid and movement proteins modulate plant basal defense and biotic stress responses in *Nicotiana tabacum*. *Mol Plant Microbe Interact*, **25**, 1360-1384.

- Csorba, T., Kontra, L., & Burgyan, J. 2015, viral silencing suppressors: Tools forged to fine-tune host-pathogen coexistence. *Virology*, **479-480**, 85-103.
- Culver, J.N., & Padmanabhan, M.S. 2007, Virus-induced disease: altering host physiology one interaction at a time. *Annu Rev Phytopathol*, **45**, 221-243.
- Debat, H.J., Zavallo, D., Brisbane, R.S., Voncina, D., Almeida, R.P.P., Blouin, A.G., Al Rwahnih, M., Gomez-Talquenca, S., & Asurmendi, S. 2018, *Grapevine virus L*: a novel *Vitivirus* in grapevine. *BioRxiv*.
- Demangeat, G. 2007, Transmission des *Nepovirus* par les nématodes *Longidoridae*. *Virologie*, **11**, 309-321.
- Demangeat, G., Esmenjaud, D., Voisin, R., Bidault, J.M., Grenan, S., & M., C. 2005, Le court-noué de la vigne. I- Etat des connaissances sur cette maladie lors de la journée « Alternative » Phytoma - La défense des végétaux, **587**, 38-42.
- Dias, H.F. 1963, Host range and properties of *Grapevine fanleaf* and *Grapevine yellow mosaic viruses*. *Annals of Applied Biology*, **51**, 85-95.
- Digiario, M., Elbeaino, T., & Martelli, G.P. 2017, *In Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management*, eds. Meng, B., Martelli, G.P., Golino, D.A., & Fuchs, M.E. (Springer).
- Digiario, M., Yahyaoui, E., Martelli, G.P., & Elbeaino, T. 2015, The sequencing of the complete genome of a *Tomato black ring virus* (TBRV) and of the RNA2 of three grapevine chrome mosaic virus (GCMV) isolates from grapevine reveals the possible recombinant origin of GCMV. *Virus genes*, **50**, 165-171.
- Eastwell, K.C., Mekuria, T.A., & Druffel, K.L. 2012, Complete nucleotide sequences and genome organization of a cherry isolate of *Cherry leaf roll virus*. *Archives of virology*, **157**, 761-764.
- Elbeaino, T., Kiyi, H., Boutarfa, R., Minafra, A., Martelli, G.P., & Digiario, M. 2014, Phylogenetic and recombination analysis of the homing protein domain of grapevine fanleaf virus (GFLV) isolates associated with 'yellow mosaic' and 'infectious malformation' syndromes in grapevine. *Archives of virology*, **159**, 2757-2764.
- Espach, Y., Maree, H.J., & Burger, J.T. 2012, Complete genome of a novel endornavirus assembled from next-generation sequence data. *Journal of virology*, **86**, 13142.
- Fernandez, I., Candresse, T., Le Gall, O., & Dunez, J. 1999, The 5' noncoding region of grapevine chrome mosaic nepovirus RNA-2 triggers a necrotic response on three *Nicotiana* spp. . *Mol Plant Microbe Interact*, **12**, 337-344.
- FranceAgriMer. 2017, Les chiffres de la filière viti-vinicole : données statistiques 2006/2016.
- Fromme, F.D., Wingard, S.A., & Priode, C.N. 1927, Ringspot of tobacco, an infectious disease of unknown cause. *Phytopathology*, **17**, 321-328.
- Fuchs, M. 2008, Les plantes transgéniques et la lutte contre les virus phytopathogènes : état de l'art et perspectives. *Virologie*, **12**, 27-37.
- Fuchs, M., Pinck, M., Serghini, M.A., Ravelonandro, M., Walter, B., & L., P. 1989, The nucleotide sequence of satellite RNA in *Grapevine fanleaf virus*, strain F13. *Journal of General Virology*, **70**, 955-962.
- Fuchs, M., Schmitt-Keichinger, C., & Sanfacon, H. 2017, A renaissance in Nepovirus research provides new insights into their molecular interface with hosts and vectors. *Advances in virus research*, **97**, 61-105.
- Fulton, R.W. 1980, Biological significance of multicomponent viruses. *Annu Rev Phytopathol*, **18**, 131-146.
- Gaire, F., Schmitt, C., Stussi-Garaud, C., Pinck, L., Ritzenthaler, C., & Fuchs, M. 1999, Protein 2A of grapevine fanleaf nepovirus is implicated in RNA2 replication and colocalizes to the replication site. *Virology*, **264**, 25-36.
- Gal-On, A., Fuchs, M., & Gray, S. 2017, Generation of novel resistance genes using mutation and targeted gene editing. *Current opinion in virology*, **26**, 98-103.
- Gal-On, A., & Shibolet, Y.M. 2006, Cross-protection. 261-288.
- Galet, P. 2000, *General Viticulture* (Collection Avenir Oenologie. Oenoplurimedia ed.: Oenoplurimedia, Chaintré, France)

## REFERENCES

- Gallet, P. 2015, in Dictionnaire encyclopédique des cépages, ed. Solidaire, L., 1199.
- Gambino, G., Bondaz, J., & Gribaudo, I. 2006, Detection and elimination of viruses in callus, somatic embryos and regenerated plantlets of grapevine. *European Journal of Plant Pathology*, **114**, 397-404.
- Garcia, J.A., & Pallas, V. 2015, Viral factors involved in plant pathogenesis. *Current opinion in virology*, **11**, 21-30.
- Gasparro, M., Caputo, A.R., Forleo, L.R., Perniola, R., Alba, V., Milella, R.A., & Antonacci, D. 2017, Evidence of non-seed transmission of viruses in grapevine breeding material. *Vitis*, **56**, 11-13.
- Ghoshal, B., & Sanfacon, H. 2014, Temperature-dependent symptom recovery in *Nicotiana benthamiana* plants infected with tomato ringspot virus is associated with reduced translation of viral RNA2 and requires ARGONAUTE 1. *Virology*, **456-457**, 188-197.
- Ghoshal, B., & Sanfaçon, H. 2015, Symptom recovery in virus-infected plants: Revisiting the role of RNA silencing mechanisms. *Virology*, **479-480**, 167-179.
- Giampetruzzi, A., Roumi, V., Roberto, R., Malossini, U., Yoshikawa, N., La Notte, P., Terlizzi, F., Credi, R., & Saldarelli, P. 2012, A new grapevine virus discovered by deep sequencing of virus- and viroid-derived small RNAs in cv. Pinot gris. *Virus research*, **163**, 262-268.
- Golino, D.A., Fuchs, M., Sim, S., Farrar, K., & Martelli, G.P. 2017, in *Grapevine viruses: Molecular biology, diagnostics and management*. eds. Meng, B., Martelli, G.P., Golino, D.A., & Fuchs, M.E. (Springer).
- Golino, D.A., Sim, S., & Rowhani, A. 2000, Identification of the latent viruses associated with young vine decline in California. *In* Extended abstracts of the 13th meeting of ICVG, Adelaide, Australia, 85-86.
- Gottula, J., Lewis, R., Saito, S., & Fuchs, M. 2014, Allopolyploidy and the evolution of plant virus resistance. *BMC Evolutionary Biology*, **14**.
- Gouveia, B.C., Calil, I.P., Machado, J.P.B, Santos, A.A, Fontes, E.P.B. 2017, Immune receptors and coreceptors in antiviral innate immunity in plants. *Frontiers in microbiology*, **7**: 2139.
- Graniti, A., & Martelli, G.P. 1965, Further investigations on legno riccio (rugose wood), a graft-transmissible stem-pitting of grapevine. *In* Proceedings international conference on virus and vector on perennial hosts with special reference to vitis, 168-179.
- Greif, C., Garau, R., Boscia, D., Prota, V.A., Fiori, M., Bass, P., Walter, B., & Prota, U. 1995, The relationship of grapevine leafroll-associated closterovirus 2 with a graft-incompatibility condition of grapevines. *Phytopathologia Mediterranea*, **34**, 167-173.
- Hans, F., Fuchs, M., & Pinck, L. 1992, Replication of grapevine fanleaf virus satellite RNA transcripts in *Chenopodium quinoa* protoplasts. *Journal of General Virology*, **73**, 2517-2523.
- Harmon, F.N., & Snyder, E. 1946. *In* Proceedings of the American Society of Horticultural Science, Investigations of the occurrence, transmission, spread, and effect of "white" fruit color in the Emperor grape., 190-194.
- Harrison, B.D., Murant, A.F., Mayo, M.A., & Roberts, I.M. 1974, Distribution of determinants for symptoms production, host range and nematode transmissibility between the two RNA components of *Raspberry ringspot virus*. *J Gen Virol*, **22**, 233-247.
- Hashimoto, M., Komatsu, K., Iwai, R., Keima, T., Maejima, K., Shiraishi, T., Ishikawa, K., Yoshida, T., Kitazawa, Y., Okano, Y., Yamaji, Y., & Namba, S. 2015, Cell death triggered by a putative amphipathic helix of radish mosaic virus helicase protein is tightly correlated with host membrane modification. *Mol Plant-Microbe Interac*, **28**, 675-688.
- Hatta, T., & Francki, R. 1984, Differences in the morphology of isometric particles of some plant viruses stained with uranyl acetate as an aid to their identification. *J Virol Methods* **9**, 237-247.
- Havelda, Z., Várallyay, E., Válóczy, A., & Burgyán, J. 2008, Plant virus infection-induced persistent host gene downregulation in systemically infected leaves. *The Plant Journal*, **55**, 278-288.
- Hemmer, C., Djennane, S., Ackerer, L., Hleibieh, K., Marmonier, A., Gersch, S., Garcia, S., Vigne, E., Komar, V., Perrin, M., Gertz, C., Belval, L., Berthold, F., Monsion, B., Schmitt-Keichinger, C., Lemaire, O., Lorber, B., Gutierrez, C., Muyldermans, S., Demangeat, G., & Ritzenthaler, C. 2018,

- Nanobody-mediated resistance to *Grapevine fanleaf virus* in plants. *Plant biotechnology journal*, **16**, 660-671.
- Hewitt, B., Raski, D.J., & Goheen, A.C. 1958, Nematode vector of soil-borne fanleaf virus of grapevines. *Phytopathology*, 586-595.
- Hewitt, W.B., Goheen, A.C., Raski, D.J., & Gooding, G.V. 1962, Studies on virus diseases of the grapevine in California. *Vitis*, **3**, 57-83.
- Hily, J.-M., Candresse, T., Garcia, S., Vigne, E., Tannière, M., Komar, V., Barnabé, G., Alliaume, A., Gilg, S., Hommay, G., Beuve, M., Marais, A., & Lemaire, O. 2018a, High-throughput sequencing and the viromic study of grapevine leaves: from the detection of grapevine-infecting viruses to the description of a new environmental tymovirales member. *Frontiers in microbiol.*
- Hily, J.M., Beuve, M., Vigne, E., Demangeat, G., Candresse, T., & Lemaire, O. 2018b, A genome-wide diversity study of *Grapevine rupestris stem pitting-associated virus*. *Archives of virology*.
- Hily, J.M., Demaneche, S., Poulicard, N., Tannieres, M., Djennane, S., Beuve, M., Vigne, E., Demangeat, G., Komar, V., Gertz, C., Marmonier, A., Hemmer, C., Vigneron, S., Marais, A., Candresse, T., Simonet, P., & Lemaire, O. 2018c, Metagenomic-based impact study of transgenic grapevine rootstock on its associated virome and soil bacteriome. *Plant biotechnology journal*, **16**, 208-220.
- Horváth, J., Tóbiás, I., & Hunyadi, K. 1994, New natural herbaceous hosts of grapevine fanleaf nepovirus. *Horticultural Science*, **26**, 31-32.
- Hull, R. 2014, in *Plant virology*, eds. Minihane, C., & Mullane, C. (Elsevier).
- Ito, T., & Nakaune, R. 2016 Molecular characterization of a novel putative ampelovirus tentatively named grapevine leafroll-associated virus 13. *Archives of virology*, **161**, 2555-2559.
- Izadpanah, K., Zaki-Aghl, M., Zhang, Y.P., Daubert, S.D., & Rowhani, A. 2003, Bermuda grass as a potential reservoir host for *Grapevine fanleaf virus*. *Plant Dis*, **87**, 1179-1182.
- Jafarpour, B., & Sanfacon, H. 2009, Insertion of large amino acid repeats and point mutations contribute to a high degree of sequence diversity in the X4 protein of tomato ringspot virus (genus *Nepovirus*). *Archives of virology*, **154**, 1713-1717.
- Jarugula, S., Gowda, S., Dawson, W.O., & Naidu, R.A. 2018, Development of infectious cDNA clones of *Grapevine leafroll-associated virus 3* and analyses of the 5' non-translated region for replication and virion formation. *Virology*, **523**, 89-99.
- Jeong, J.-j., Ju, H.-j., & Noh, J. 2014, A review of detection methods for the plant viruses. *Res Plant Dis*, **20**, 173-181.
- Johansen, E., Edwards, M.C., & Hampton, R.O. 1994, Seed transmission of viruses: current perspectives. *Annu Rev Phytopathol* **32**, 363-386.
- Jones, J.D., & Dangl, J.L. 2006, The plant immune system. *Nature*, **444**, 323-329.
- Jovel, J., Walker, M., & Sanfacon, H. 2007, Recovery of *Nicotiana benthamiana* plants from a necrotic response induced by a *Nepovirus* is associated with RNA silencing but not with reduced virus titer. *Journal of virology*, **81**, 12285-12297.
- Jovel, J., Walker, M., & Sanfaçon, H. 2011, Salicylic acid-dependent restriction of tomato ringspot virus spread in tobacco is accompanied by a hypersensitive response, local RNA silencing, and moderate systemic resistance. *Mol Plant-Microbe Interac*, **24**, 706-718.
- Komar, V., Vigne, E., Demangeat, G., Lemaire, O., & Fuchs, M. 2008, Cross-protection as control strategy against *Grapevine fanleaf virus* in naturally infected vineyards. *Plant Disease*, **92**, 1689-1694.
- Komar, V., Vigne, E., Demangeat, G., Lemaire, O., & Fuchs, M. 2010, Comparative performance analysis of virus-infected *Vitis vinifera* cv. Savagnin rose grafted onto three rootstocks. *Am J Enol Vitic*, **61**, 68-73.
- Krenz, B., Thompson, J.R., Fuchs, M., & Perry, K.L. 2012, Complete genome sequence of a new circular DNA virus from grapevine. *Journal of virology*, **86**, 7715.
- Künstler, A., Bacsó, R., Gullner, G., Hafez, Y.M., & Király, L. 2016, Staying alive - is cell death dispensable for plant disease resistance during the hypersensitive response? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, **93**, 75-84.

## REFERENCES

- Lai-Kee-Him, J., Schellenberger, P., Dumas, C., Richard, E., Trapani, S., Komar, V., Demangeat, G., Ritzenthaler, C., & Bron, P. 2013, The backbone model of the *Arabidopsis mosaic virus* reveals new insights into functional domains of nepovirus capsid. *Journal of structural biology*, **182**, 1-9.
- Laporte, C. 2003, Involvement of the secretory pathway and the cytoskeleton in intracellular targeting and tubule assembly of grapevine fanleaf virus movement protein in tobacco BY-2 cells. *The Plant Cell Online*, **15**, 2058-2075.
- Lazar, J., Kölber, M., & Lehoczy, J. 1990, Detection of some nepoviruses (GFV, GFV-YM, GCMV, ArMV) in the seeds and seedlings of grapevines by ELISA. *Kertgazdasag*, **22**, 58-72.
- Legin, R. 1972, Expérimentation pour étudier l'effet des principales viroses sur la végétation et la production de la vigne. *Ann Phytopat*, **Hors-série**, 49-57.
- Legin, R., Bass, P., Etienne, L., & Fuchs, M. 1993, Selection of mild virus strains of fanleaf degeneration by comparative field performance of infected grapevines. *Vitis*, **32**, 103-110.
- Liu, Z., Scorza, R., Hily, J.-M., Scott, S.W., & James, D. 2007, Engineering resistance to multiple prunus fruit viruses through expression of chimeric hairpins. *J Am Soc Hortic Sci*, **132**, 407-414.
- Loudes, A.-M., Ritzenthaler, C., Pinck, M., Serghini, M.A. & Pinck, L. 1995, The 119 kDa and 124 kDa polyproteins of *Arabidopsis mosaic nepovirus* (isolate S) are encoded by two distinct RNA2 species. *J Gen Virol* **76**, 899-906.
- Lukan, T., Baebler, S., Pompe-Novak, M., Gucek, K., Zagorscak, M., Coll, A., & Gruden, K. 2018, Cell death is not sufficient for the restriction of potato virus Y spread in hypersensitive response-conferred resistance in potato. *Frontiers in plant science*, **9**, 168.
- Malagnini, V., de Lillo, E., Saldarelli, P., Beber, R., Duso, C., Raiola, A., Zanotelli, L., Valenzano, D., Giampetruzzi, A., Morelli, M., Ratti, C., Causin, R., & Gualandri, V. 2016, Transmission of *Grapevine Pinot gris virus* by *Colomerus vitis* (Acari: *Eriophyidae*) to grapevine. *Archives of virology*, **161**, 2595-2599.
- Maliogka, V.I., Martelli, G.P., Fuchs, M., & Katis, N.I. 2015, Control of viruses infecting grapevine. *Advances in virus research*, **91**, 175-227.
- Mandadi, K.K., & Scholthof, K.B. 2013, Plant immune responses against viruses: how does a virus cause disease? *The Plant cell*, **25**, 1489-1505.
- Mannini, F., Cuozzo, D., Gambino, G., Boccacci, P., Gribaudo, I., & Tragni, R. 2015. *In Proceedings 18th ICVG meeting, Effect of latent GVB infection on agronomic and enological performances of wine cultivar Albarossa (Vitis vinifera L.)* (Ankara, Turkey), 100-101.
- Mannini, F., & Digiario, M. 2017, in *Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management*, eds. Meng, B., Martelli, G.P., Golino, D.A., & Fuchs, M.E. (Springer).
- Margis, R., & Pinck, L. 1992, Effects of site-directed mutagenesis on the presumed catalytic triad and substrate-binding pocket of grapevine fanleaf nepovirus 24-kDa proteinase. *Virology*, **190**, 884-888.
- Margis, R., Viry, M., Pinck, M., Bardonnet, N., & Pinck, L. 1994, Differential proteolytic activities of precursor and mature forms of the 24K proteinase of grapevine fanleaf nepovirus *Virology*, **200**, 79-86.
- Martelli, G.P. 1993. in *International Council for the Study of Viruses and Virus Diseases of the Grapevine (ICVG), Graft-transmissible diseases of grapevines. Handbook for detection and diagnosis*. (Rome, Italy).
- Martelli, G.P. 2014, Directory of virus and virus-like diseases of the grapevine and their agents. *Journal of Plant Pathology*, **96**, 123-128.
- Martelli, G.P. 2017, in *Grapevine viruses: Molecular biology, diagnostics and management*, eds. Meng, B., Martelli, G.P., Golino, D.A., & Fuchs, M.E. (Springer).
- Martelli, G.P., & Boudon-Padieu, E. 2006, Directory of infectious diseases of grapevines and viroses and virus-like diseases of the grapevine: bibliographic report 1998-2004 (Bari: CIHEAM)
- Martelli, G.P., Minafra, A., & Saldarelli, P. 1997, *Vitivirus*, a new genus of plant viruses. *Archives of virology*, **142**, 1929-1932.
- Martelli, G.P., Rowhani, A., & Sabanadzovic, S. 2015, in *Compendium of grape diseases*, eds. Wilcox, W.F., Gubler, W.D., & Uyemoto, J.K.e. (APS Press).

- Martelli, G.P., Sabanadzovic, S., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N., & Saldarelli, P. 2002, *Maculavirus*, a new genus of plant viruses. Archives of virology, **147**, 1847-1853.
- Martelli, G.P., & Savino, V. 1988, in In Compendium of grape diseases, eds. Pearson, R.C., & Goheen, A.C. (St. Paul: APS Press.), 48-49.
- Mayo, M.A., Taliansky, M.E., & Fritsch, C. 1999, Large satellite RNA: molecular parasitism or molecular symbiosis. . Curr Top Microbiol Immunol **239**, 65-79.
- Meng, B., Venkataraman, S., Li, C., Wang, W., Dayan-Glick, C., & Mawassi, M. 2013, Construction and biological activities of the first infectious cDNA clones of the genus *Foveavirus*. Virology, **435**, 453-462.
- Merzlyak, E.M., Goedhart, J., Shcherbo, D., Bulina, M.E., Shcheglov, A.S., Fradkov, A.F., Gaintzeva, A., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S., Gadella, T.W. & Chudakov, D.M. 2007, Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. Nature methods **4**, 555-557.
- Milne, R.G., Conti, M., Lesemann, D.E., Stellmach, G., Tanne, E., & J., C. 1984, Closterovirus-like particles of two types associated with diseased grapevines. Phytopathologische Zeitschrift, **11**, 360-368.
- Moffett, P. (2016). Using decoys to detect pathogens: An integrated approach. Trends in plant science **21**, 369-370.
- Mudge, K., Janick, J., Scofield, S., & Goldschmidt, E.E. 2009, A history of grafting. Horticultural Reviews, **35**, 437-493.
- Nagy, P.D., & Pogany, J. 2011, The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. Nature reviews Microbiology, **10**, 137-149.
- Naidu, R.A., Rowhani, A., Fuchs, M., Golino, D.A., & Martelli, G.P. 2014, Grapevine leafroll: A complex viral disease affecting a high-value fruit crop. Plant Disease, **98**, 1172-1185.
- Namba, S., Yamashita, S., Doi, Y., Yora, K., Terai, Y., & Yano, R. 1979, *Grapevine leafroll virus*, a possible member of closteroviruses. Annals of the Phytopathological Society of Japan, **45** 497-502.
- Nicaise, V. 2014, Crop immunity against viruses: outcomes and future challenges. Frontiers in plant science, **5**, 660.
- Nölke, G., Cobanov, P., Uhde-Holzem, K., Reustle, G., Fischer, R., & Schillberg, S. 2009, Grapevine fanleaf virus (GFLV)-specific antibodies confer GFLV and arabis mosaic virus (ArMV) resistance in *Nicotiana benthamiana*. Molecular plant pathology, **10**, 41-49.
- Nourinejad Zarghani, S., Hily, J.M., Glasa, M., Marais, A., Wetzel, T., Faure, C., Vigne, E., Velt, A., Lemaire, O., Boursiquot, J.M., Okic, A., Ruiz-Garcia, A.B., Olmos, A., Lacombe, T., & Candresse, T. 2018, Grapevine virus T diversity as revealed by full-length genome sequences assembled from high-throughput sequence data. Plos one, **accepted**.
- Nourinejad Zarghani, S., Shams-Bakhsh, M., Bashir, N.S., & Wetzel, T. 2013, Molecular characterization of whole genomic RNA2 from Iranian isolates of *Grapevine fanleaf virus*. Journal of Phytopathology, **161**, 419-425.
- Oliver, J.E., & Fuchs, M. 2011, Tolerance and resistance to viruses and their vectors in *Vitis* spp.: A virologist's perspective of the literature. Am J Enol Vitic, **62**, 438-451.
- Pallas, V., & García, J.A. 2011, How do plant viruses induce disease? Interactions and interference with host components. Journal of General Virology, **92**, 2691-2705.
- Petri, L. 1929, Sulle cause dell'arricciamento della vite. Bollettino della Regia Stazione di Patologia Vegetale, **9**.
- Pietersen, G., Spreeth, N., Oosthuizen, T., van Rensburg, A., van Rensburg, M., Lottering, D., Rossouw, N., & Tooth, D. 2013, Control of grapevine leafroll disease spread at a commercial wine estate in South Africa: A case study. American Journal of Enology and Viticulture, **64**, 296-305.
- Quacquarelli, A., Gallitelli, D., Savino, V., & Martelli, G.P. 1976, Properties of *Grapevine fanleaf virus*. Journal of General Virology, **32**, 349-360.
- Ramsdell, D.C., Gillett, J.M., & Bird, G.W. 1995, Susceptibility of American grapevine scion cultivars and French hybrid rootstock and scion cultivars to infection by Peach rosette mosaic nepovirus. Plant Disease, **79**, 154-157.

## REFERENCES

- Ratcliff, F., Harrison, B.D., & Baulcombe, D.C. 1997, A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science*, **276**, 1558-1560.
- Reynard, J.S., Schneeberger, P.H., Frey, J.E., & Schaerer, S. 2015, Biological, serological, and molecular characterization of a highly divergent strain of *Grapevine leafroll-associated virus 4* causing grapevine leafroll disease. *Phytopathology*, **105**, 1262-1269.
- Reynolds, A.G. 2017, *In Grapevine viruses: Molecular biology, diagnostics and management*, eds. Meng, B., Martelli, G.P., Golino, D.A., & Fuchs, M.E. (Springer).
- Ritzenthaler, C., Laporte, C., Gaire, F., Dunoyer, P., Schmitt, C., Duval, S., Piequet, A., Loudes, A.M., Rohfritsch, O., Stussi-Garaud, C., & Pfeiffer, P. 2002, Grapevine fanleaf virus replication occurs on endoplasmic reticulum-derived membranes. *Journal of virology*, **76**, 8808-8819.
- Ritzenthaler, C., Pinck, M., & Pinck, L. 1995, Grapevine fanleaf nepovirus P38 putative movement protein is not transiently expressed and is a stable final maturation product *in vivo*. *Journal of General Virology*, **76**, 907-915.
- Robertson, W.M., & Henry, C.E. 1986, An association of carbohydrates with particles of arabis mosaic virus retained within *Xiphinema diversicaudatum*. *Ann Appl Biol*, **109**, 299-305.
- Robinson, J. 1997, in *The Oxford Companion to Wine*, Oxford University Press 1994, ed. Arcache, J., 1088.
- Roossinck, M.J. 2015, A new look at plant viruses and their potential beneficial roles in crops. *Molecular plant pathology*, **16**, 331-333.
- Roossinck, M.J. 2017, Deep sequencing for discovery and evolutionary analysis of plant viruses. *Virus research*, **239**, 82-86.
- Rowhani, A., Daubert, S.D., Uyemoto, J.K., Al Rwahnih, M., & Fuchs, M. 2017, *In Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management*, eds. Meng, B., Martelli, G.P., Golino, D.A., & Fuchs, M.E. (Springer).
- Rudel, M. 1985, Grapevine damage induces by particular virus-vector combinations. *Phytopathologia Mediterranea*, **24**, 183-185.
- Sabanadzovic, S., Aboughanem-Sabanadzovic, N., & Martelli, G.P. 2017, *In Grapevine viruses: Molecular biology, diagnostics and Management*, eds. Meng, B., Martelli, G.P., Golino, D.A., & Fuchs, M.E. (Springer).
- Saldarelli, P., Dell'Orco, M., & Minafra, A. 2000, Infectious cDNA clones of two grapevine viruses. *Archives of virology*, **145**, 397-405.
- Saldarelli, P., Giampetruzzi, A., Maree, H.J., & Al Rwahnih, M. 2017a, *In Grapevine viruses: Molecular biology, diagnostics and management*, eds. Meng, B., Martelli, G.P., Golino, D.A., & Fuchs, M.E. (Springer).
- Saldarelli, P., Giampetruzzi, A., Morelli, M., Malossini, U., Pirolo, C., Bianchedi, P., & Gualandri, V. 2015, Genetic variability of Grapevine Pinot gris virus and its association with grapevine leaf mottling and deformation. *Phytopathology*, **105**, 555-563.
- Saldarelli, P., Gualandri, V., Malossini, U., & Glasa, M. 2017b, *In Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management*. eds. Meng, B., Martelli, G.P., Golino, D.A., & Fuchs, M.E. (Springer).
- Sanfaçon, H. 2008, in *Encyclopedia of Virology*, eds. Mahy, B.W.J., & Van Regenmortel, M.H.E. (Oxford: Elsevier), pp. 405-413.
- Sanfaçon, H. 2015, in *Encyclopedia of Life Sciences* (John Wiley & Sons).
- Sanfaçon, H., Wellink, J., Le Gall, O., Karasev, A., van der Vlugt, R., & Wetzels, T. 2009, *Secoviridae*: a proposed family of plant viruses within the order *Picornavirales* that combines the families *Sequiviridae* and *Comoviridae*, the unassigned genera *Cheravirus* and *Sadwavirus*, and the proposed genus *Torradovirus*. *Archives of virology*, **154**, 899-907.
- Santovito, E., Mascia, T., Siddiqui, S.A., Minutillo, S.A., Valkonen, J.P.T., & Gallitelli, D. 2014, Infection cycle of *Artichoke Italian latent virus* in tobacco plants: Meristem invasion and recovery from disease symptoms. *Plos one*, **9**.
- Šarić, A., & Wrischer, M. 1975, Fine structure changes in different host plants induced by grapevine fanleaf virus. *J Phytopathol*, **84**, 97-104.

- Savino, V., Boscia, D., & Martelli, G.P. 1987. in In Proceedings 9th meeting of ICVG, Rugose wood complex of grapevine: Can grafting to *Vitis* indicators discriminate between diseases? .
- Schellenberger, P., Andret-Link, P., Schmitt-Keichinger, C., Bergdoll, M., Marmonier, A., Vigne, E., Lemaire, O., Fuchs, M., Demangeat, G., & Ritzenthaler, C. 2010, A stretch of 11 amino acids in the  $\beta$ B- $\beta$ C loop of the coat protein of *Grapevine fanleaf virus* is essential for transmission by the nematode *Xiphinema index*. *Journal of virology*, **84**, 7924-7933.
- Schellenberger, P., Demangeat, G., Lemaire, O., Ritzenthaler, C., Bergdoll, M., Olieric, V., Sauter, C., & Lorber, B. 2011a, Strategies for the crystallization of viruses: using phase diagrams and gels to produce 3D crystals of *Grapevine fanleaf virus*. *Journal of structural biology*, **174**, 344-351.
- Schellenberger, P., Sauter, C., Lorber, B., Bron, P., Trapani, S., Bergdoll, M., Marmonier, A., Schmitt-Keichinger, C., Lemaire, O., Demangeat, G., & Ritzenthaler, C. 2011b, Structural insights into viral determinants of nematode mediated grapevine fanleaf virus transmission. *PLoS pathogens*, **7**, e1002034.
- Schmitt-Keichinger, C., Hemmer, C., Berthold, F., & Ritzenthaler, C. 2017, in *Grapevine viruses: molecular biology, diagnostics and management*, eds. Meng, B., Martelli, G.P., Golino, D.A., & Fuchs, M.E. (Springer).
- Seguin, J., Rajeswaran, R., Malpica-Lopez, N., Martin, R.R., Kasschau, K., Dolja, V.V., Otten, P., Farinelli, L., & Pooggin, M.M. 2014, De novo reconstruction of consensus master genomes of plant RNA and DNA viruses from siRNAs. *PLoS One*, **9**, e88513.
- Seitsonen, J.J., Susi, P., Lemmetty, A., & Butcher, S.J. 2008, Structure of the mite-transmitted Blackcurrant reversion nepovirus using electron cryo-microscopy. *Virology*, **378**, 162-168.
- Sekine, K.-T., Ishihara, T., Hase, S., Kusano, T., Shah, J., & Takahashi, H. 2006, Single amino acid alterations in *Arabidopsis thaliana* RCY1 compromise resistance to Cucumber mosaic virus, but differentially suppress hypersensitive response-like cell death. *Plant molecular biology*, **62**, 669-682.
- Serghini, M.A., Fuchs, M., Pinck, M., Reinbolt, J., Walter, B., & Pinck, L. 1990, RNA2 of grapevine fanleaf virus: sequence analysis and coat protein cistron location. *Journal of General Virology*, **71**, 1433-1441.
- Sgherri, C., Ranieri, A., & Quartacci, M.F. 2013, Antioxidative responses in *Vitis vinifera* infected by grapevine fanleaf virus. *Journal of plant physiology*, **170**, 121-128.
- Shapiro, L.R., Salvaudon, L., Mauck, K.E., Pulido, H., De Moraes, C.M., Stephenson, A.G., & Mescher, M.C. 2013, Disease interactions in a shared host plant: effects of pre-existing viral infection on cucurbit plant defense responses and resistance to bacterial wilt disease. *Plos one*, **8**.
- Shimura, H., Pantaleo, V., Ishihara, T., Myojo, N., Inaba, J.-i., Sueda, K., Burguán, J., & Masuta, C. 2011, A viral satellite RNA induces yellow symptoms on tobacco by targeting a gene involved in chlorophyll biosynthesis using the RNA silencing machinery. *Plos one*, **7**.
- Singh, S., Rothnagel, R., Prasad, B.V.V., & Buckley, B. 1995, Expression of tobacco ringspot virus capsid protein and satellite RNA in insect cells and three-dimensional structure of tobacco ringspot virus-like particles. *Virology*, **213**, 472-481.
- Smith, N.A., Eamens, A.L., & Wang, M.-B. 2011, Viral small interfering RNAs target host genes to mediate disease symptoms in plants. *Plos one*, **7**.
- Stempien, E., Goddard, M.L., Leva, Y., Benard-Gellon, M., Laloue, H., Farine, S., Kieffer-Mazet, F., Tarnus, C., Bertsch, C. & Chong, J. 2018, Secreted proteins produced by fungi associated with *Botryosphaeria dieback* trigger distinct defense responses in *Vitis vinifera* and *Vitis rupestris* cells. *Protoplasma* **255**, 613-628.
- Stussi-Garaud, C., Haeberle, A.-M., Ritzenthaler, C., Rohfritsch, O., & Lebourier, G. 1994, Electron microscopy of plant viruses. *Biology of the Cell*, **80**, 147-153.
- Sudarshana, M.R., Perry, K.L., & Fuchs, M.F. 2015, Grapevine Red Blotch-Associated Virus, an emerging threat to the grapevine industry. *Phytopathology*, **105**, 1026-1032.
- Taylor, C.E., & Robertson, W.E. 1970, Site of virus retention in the alimentary tract of the nematode vector *Xiphinema diversicaudatum* (Micol.) and *X. index* (thorne and Allen). *Annals of applied biology*, **66**, 375-380.

## REFERENCES

- Terral, J.F., Tabard, E., Bouby, L., Ivorra, S., Pastor, T., Figueiral, I., Picq, S., Chevance, J.B., Jung, C., Fabre, L., Tardy, C., Compan, M., Bacilieri, R., Lacombe, T., & This, P. 2010, Evolution and history of grapevine (*Vitis vinifera*) under domestication: new morphometric perspectives to understand seed domestication syndrome and reveal origins of ancient European cultivars. *Annals of botany*, **105**, 443-455.
- Thompson, J.R., Dasgupta, I., Fuchs, M., Iwanami, T., Karasev, A.V., Petrzik, K., Sanfacon, H., Tzanetakis, I., van der Vlugt, R., Wetzels, T., Yoshikawa, N., & ICTV Report, C. 2017, ICTV Virus Taxonomy Profile: *Secoviridae*. *The Journal of general virology*, **98**, 529-531.
- Thompson, J.R., Kamath, N., & Perry, K.L. 2014, An evolutionary analysis of the *Secoviridae* family of viruses. *Plos one*, **9**.
- Uyemoto, J.K. 1975, Severe outbreak of virus-induced grapevine decline in Cascade grapevine in New York. *Plant Disease Report*, **59**, 98-101.
- Valat, L., Fuchs, M., & Burrus, M. 2006, Transgenic grapevine rootstock clones expressing the coat protein or movement protein genes of *Grapevine fanleaf virus*: Characterization and reaction to virus infection upon protoplast electroporation. *Plant Science*, **170**, 739-747.
- van Molken, T., de Caluwe, H., Hordijk, C.A., Leon-Reyes, A., Snoeren, T.A., van Dam, N.M., & Stuefer, J.F. 2012, Virus infection decreases the attractiveness of white clover plants for a non-vectoring herbivore. *Oecologia*, **170**, 433-444.
- Van Zyl, S., Vivier, M.A., & Walker, M.A. 2016, *Xiphinema index* and its relationship to grapevines: A review. *South African Journal of Enology & Viticulture*, **33**.
- Vigne, E., Bergdoll, M., Guyader, S., & Fuchs, M. 2004, Population structure and genetic variability within isolates of *Grapevine fanleaf virus* from a naturally infected vineyard in France: evidence for mixed infection and recombination. *The Journal of general virology*, **85**, 2435-2445.
- Vigne, E., Demangeat, G., Komar, V., and Fuchs, M. (2005). Characterization of a naturally occurring recombinant isolate of *Grapevine fanleaf virus*. *Archives of virology* **150**, 2241-2255.
- Vigne, E., Garcia, S., Komar, V., Lemaire, O., & J.M., H. 2018, Comparison of serological and molecular methods with high-throughput sequencing for the detection and quantification of *Grapevine fanleaf virus* (GFLV) in vineyard samples. *Frontiers in microbiology*, **9**: 2726.
- Vigne, E., Gottula, J., Schmitt-Keichinger, C., Komar, V., Ackerer, L., Belval, L., Rakotomalala, L., Lemaire, O., Ritzenthaler, C., & Fuchs, M. 2013, A strain-specific segment of the RNA-dependent RNA polymerase of *Grapevine fanleaf virus* determines symptoms in *Nicotiana* species. *Journal of General Virology*, **94**, 2803-2813.
- Vigne, E., Komar, V., Tannières, M., Demangeat, G., Duchêne, E., Steyer, D., Lemarquis, G., Ritzenthaler, C., & Lemaire, O. 2015. in *In Proceedings 18th ICVG meeting, Comparative pathogenic effects of distinct grapevine fanleaf virus strains on Vitis vinifera cvs. Gewurztraminer and Chardonnay (Ankara, Turkey)*, 236-237.
- Vigne, E., Marmonier, A., & Fuchs, M. 2008, Multiple interspecies recombination events within RNA2 of *Grapevine fanleaf virus* and *Arabidopsis mosaic virus*. *Archives of virology*, **153**, 1771-1776.
- Villate, L., Fievet, V., Hanse, B., Delemarre, F., Plantard, O., Esmenjaud, D., & van Helden, M. 2008, Spatial distribution of the dagger nematode *Xiphinema index* and its associated *Grapevine fanleaf virus* in French vineyard. *Phytopathology*, **98**, 942-948.
- Viry, M., Serghini, M.A., Hans, F., Ritzenthaler, C., Pinck, M., & Pinck, L. 1993, Biologically active transcripts from cloned cDNA of genomic grapevine fanleaf nepovirus RNAs. *Journal of General Virology*, **74** 169-174.
- Vuittenez, A. 1956, Variation des symptômes de la dégénérescence infectieuse de la vigne. Interprétation d'expériences de transmission de la maladie par greffage. *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*, **243**, 515-517.
- Vuittenez, A., Legin, R., & Kuszala, J. 1969, Les viroses de la vigne.
- Vuittenez, A., Munck, M.C., & Kuszala, J. 1964, Souches de virus à haute agressivité isolées de vignes atteintes de dégénérescence infectieuse. *Virol Appl.*

- Walker, M., Chisholm, J., Wei, T., Ghoshal, B., Saeed, H., Rott, M., & Sanfaçon, H. 2015, Complete genome sequence of three tomato ringspot virus isolates: evidence for reassortment and recombination. *Archives of virology*, **160**, 543-547.
- Walker, M.A., Wolpert, J.A., & Weber, E. 1994, Viticultural characteristics of VR hybrid rootstocks in a vineyard site infected with *Grapevine fanleaf virus*. *Vitis* **33**, 19-23.
- Walter, B. 1988, Some examples of the physiological reaction of the vine in the presence of virus. *Bulletin de l'OIV*, **61**, 383-390.
- Walter, B., Bass, P., Cornuet, P., Legin, R., & Fuchs, M. 1990. in In Proceedings 10th ICVG meeting, Interaction between arabis mosaic virus and grapevine fanleaf virus isolates (Volos, Greece), 120-128.
- Walter, B., & Martelli, G.P. 1996, Sélection clonale de la vigne : sélection sanitaire et sélection pomologique Influence des viroses et qualité. *Bulletin OIV*, 947-971.
- Wang, A., & Sanfaçon, H. 2000, Proteolytic processing at a novel cleavage site in the N-terminal region of the tomato ringspot nepovirus RNA-1-encoded polyprotein *in vitro*. *Journal of General Virology*, **81**, 2771-2781.
- Wetzel, T., Chisholm, J., Bassler, A., & Sanfaçon, H. 2008, Characterization of proteinase cleavage sites in the N-terminal region of the RNA1-encoded polyprotein from *Arabis mosaic virus* (subgroup A nepovirus). *Virology*, **375**, 159-169.
- Wetzel, T., Fuchs, M., Bobko, M., & Krczal, G. 2002, Size and sequence variability of the arabis mosaic virus protein 2A. *Archives of virology*, **147**, 1643-1653.
- Wieczorek, A., & Sanfaçon, H. 1993, Characterization and subcellular localization of tomato ringspot nepovirus putative movement protein. *Virology*, **194**, 734-742.
- Wingard, S.A. 1928, Hosts and symptoms of ring spot, a virus disease of plants. *J Agric Res*, **37**, 127-153.
- Wyss. 2000, Maintenance of human, animal and plant pathogen vector (Science Publisher Inc.)
- Xiao, H., Shabanian, M., Moore, C., Li, C., & Meng, B. 2018, Survey for major viruses in commercial *Vitis vinifera* wine grapes in Ontario. *Virology journal*, **15**, 127.
- Xu, P., Chen, F., Mannas, J.P., Feldman, T., Sumner, L.W., & Roossinck, M.J. 2008, Virus infection improves drought tolerance. *The New phytologist*, **180**, 911-921.
- Yang, A.F., & Hamilton, R.I. 1974, The mechanism of seed transmission of *Tobacco ringspot virus* in soybean. *Virology*, **62**, 26-37.
- Yang, M., Xu, Z., Zhao, W., Liu, Q., Li, Q., Lu, L., Liu, R., Zhang, X., & Cui, F. 2018, Rice stripe virus-derived siRNAs play different regulatory roles in rice and in the insect vector *Laodelphax striatellus*. *BMC plant biology*, **18**, 219.
- Yepes, L.M., Cieniewicz, E., Krenz, B., McLane, H., Thompson, J.R., Perry, K.L., & Fuchs, M. 2018, Causative role of *Grapevine red blotch virus* in red blotch disease. *Phytopathology*, **108**, 902-909.
- Zhang, G., & Sanfaçon, H. 2006, Characterization of membrane association domains within the tomato ringspot nepovirus X2 protein, an endoplasmic reticulum-targeted polytopic membrane protein. *Journal of virology*, **80**, 10847-10857.
- Zhang, Y., Singh, K., Kaur, R., & Qiu, W. 2011, Association of a novel DNA virus with the grapevine vein-clearing and vine decline syndrome. *Phytopathology*, **101**, 1081-1090.
- Zhao, F., Hwang, U.S., Lim, S., Yoo, R.H., Igori, D., Lee, S.-H., Lim, H.-S., & Moon, J.S. 2015, Complete genome sequence and construction of infectious full-length cDNA clones of tobacco ringspot nepovirus, a viral pathogen causing bud blight in soybean. *Virus genes*, **51**, 163-166.
- Ziebell, H., & Carr, J.P. 2010, Cross-protection. *Adv Virus Res*, **76**, 211-264.

## ANNEXE-I PROTOCOLES ADDITIONNELS

Les protocoles additionnels reprennent les protocoles d'expériences présentées dans ce manuscrit et qui ne sont pas compris dans l'une des deux publications présentées. Tous les protocoles des autres résultats apparaissent dans les sections matériels et méthodes de leur article respectif.

### 1. Diagnostic des porte-greffes et des greffons

Les échantillons de feuilles et de copeaux de bois provenant des porte-greffes et des greffons ont été collectés au printemps.

#### 1.1 Mesure de l'accumulation virale par DAS-ELISA

L'accumulation virale a été mesurée par DAS-ELISA semi-quantitatif réalisé à l'aide du kit commercial et du broyeur à billes (Bioreba AG, Reinach, Suisse). Pour chaque échantillon 0,5 g de tissus ont été broyés en présence de 5 ml de tampon d'extraction vigne.

#### 1.2 Détection des vsiRNA par *northern blot*

L'ARN total a été extrait à partir de 0,1 g de tissu congelé dans de l'azote liquide, grâce au réactif *Concert Plant RNA* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) en suivant les recommandations du fabricant. Les RNA de petit poids moléculaire ont été analysés à partir de 30 µg d'ARN total et séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PAGE) puis transférés sur membranes HybondN+ (GE Healthcare, Piscataway, NJ, USA). Après le *crosslink* chimique effectué par traitement EDC, différentes sondes à ADN radiomarquées amplifiées à partir de différent GFLV ont été utilisées pour l'hybridation. Selon nos données de siRNA-Seq, ces sondes ciblent des régions *hot spot* de siRNA sur les ARN-1 et ARN-2 ; elles sont marquées au  $\alpha$ -32P dCTP (Hartmann, Braunschweig, Germany) et ont été obtenues en utilisant la technologie *Prime-a-Gene® labeling system* (Promega, Madison, WI, USA) avec les amorces 5'-TGA-CGA-GAC-AYC-AAG-CCC-TGG-C-3' et 5'-GTT-CYC-CAA-CAA-AGA-ATC-TCG-CC-3' pour la sonde de l'ARN-1 et les amorces 5'-ACR-CTD-GAT-TTT-AGG-CTC-AAT-GG-3' et 5'-ATD-GCR-TGD-CCA-CAC-AAT-TCT-CC-3'. L'hybridation est poursuivie sur la nuit à 42°C dans le réactif PerfectHyb™ plus buffer (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). Chaque lavage a été répété trois fois pendant 10 min à 50°C dans une solution 2X SSC et 2 % de SDS, puis les membranes ont été exposées au *phosphorimager* FX de Biorad (Biorad, Hercules, CA, USA). Le contrôle de charge a été hybridé avec une sonde ciblant miR159 de la vigne, Vv-miR159c. La limite de détection des vsiRNA a été mesurée, en utilisant des fragments d'ARN de 21 et 24 nt spécifiques des ARN-1 et ARN-2 et en établissant des dilutions en série pour tester le niveau de détection de chacun d'entre eux.

### 1.3 Détection du virus par qRT-PCR

La détection du GFLV et sa quantification absolue ont été exécutées par qRT-PCR. L'étape de transcription inverse a été réalisée à partir de 20 ng d'ARN total quantifié par *Nanodrop*<sup>TM</sup>, grâce à la *Superscript III reverse transcriptase* (Invitrogen, Carlsbad, USA) en utilisant des oligo(dT). L'ARN-1 et -2 du GFLV ont été ciblés par des *primers* spécifiques. Ces *primers* dégénérés ont été conçus dans les régions les plus conservés des génomes des 32 GFLV disponibles (NCBI, database du laboratoire). La chimie *Eva Green qPCR mix* (Biorad) et le thermocycleur (*Biorad CFX96TM real-time system*) ont été utilisés pour l'amplification des cibles en plaques 96 puits selon les paramètres suivants : 30 s à 95°C, 40 cycles de dénaturation de 5 s à 95°C, hybridation et élongation de 5 s à 65°C. Chaque échantillon a été traité en triplicatas et une *melting curve* de vérification a été ajouté en fin de cycle pour confirmer la spécificité de nos *primers*.

### 2. Dosage de métabolites secondaires par LC-MS

Au total 12 Gw clone 643 inoculés par la souche F13, 12 plantes inoculées par la souche B844 et 12 plantes non-inoculées appartenant à deux dispositifs expérimentaux établis en serre en 2014 et 2016 et la parcelle implantée en 2006 ont été analysés. Des feuilles ont été prélevées sur ces 36 vignes à différentes dates pour un nombre total de 117 échantillons (Tableau 6). Ces échantillons ont été congelés et broyés dans de l'azote liquide. L'extraction a été réalisée à partir de 50 mg de tissu congelé dans 750 µL de méthanol pur. Après sonication 20 min et centrifugation à 15 000 g pendant 10 min, on récupère 200 µL dont 1 µL est injecté. Les extraits ont été analysés par UHPLC (*Dionex Ultimate 3000 ; Thermo Fisher Scientific*, San Jose, CA, USA). Le système de chromatographie liquide était couplé à un spectromètre de masse *Exactive Orbitrap* (*Thermo Fisher Scientific*) pour une recherche ciblée de différents composants listés après : le glutathion, l'auxine, les acides abscissique, jasmonique et salicylique, le resvératrol et ses dérivés.

### 3. Obtention et transfection de protoplastes de cellules de vigne

Des cellules de *V. vinifera* cv Gw 643 (Stempien *et al.*, 2018) âgées de 8 jours ont été centrifugées à 70 g pendant 5 min et le culot remis en suspension dans 20 mL de solution de plasmolyse (solution 1 : 0,5 M de mannitol ; 34 mM de MES, pH 5,5) additionné de cellulase [R-10, Onozuka] à 2 % et de macérozyme [R-10, Onozuka] à 1 % pour digérer les parois cellulaires, pendant une vingtaine d'heures à température ambiante et à l'abri de la lumière. Les protoplastes ont été filtrés (réticulation 100 µm) puis centrifugés 5 min à 70 g. Le culot a été remis en suspension et lavé 3 fois dans la solution 1. Les protoplastes ont été dénombrés à l'aide d'une cellule de Fuchs-Rosenthal *bright lines* et ajustés à une concentration de

## ANNEXES

$10^6$  cellules / mL dans la solution 2 (solution 1 additionnée de  $\text{CaCl}_2$  à 14 mM). Après 1 h à  $4^\circ\text{C}$ , 500 000 protoplastes ont été transfectés avec 2  $\mu\text{g}$  de virus purifié, par électroporation à 200 V, 150  $\mu\text{F}$  et 100  $\Omega$  dans des cuvettes de 4 mm de large. Les protoplastes ont ensuite été additionnés de 2 volumes de solution 2, incubés dans la glace pendant 30 min, puis centrifugés à 70 g pendant 5 min. Les protoplastes ont été remis en suspension dans 1,5 mL de solution 3 (0,5 M mannitol dans *Murashige & Skoog* avec vitamines et MES (*Duchefa*)), déposés dans une petite boîte de Petri (diamètre de 30 mm) sur un fond d'agarose à 1 % préparé dans la solution 3. L'incubation a été réalisée à l'abri de la lumière et à température ambiante, durant environ 3 jours.

## ANNEXE-II TABLEAUX SUPPLÉMENTAIRES

**Tableau supplémentaire 1 : Origine des souches virales utilisées**

Norms des souches virales	Autres noms	Clone infectieux	Origine des vignes							Isolement	
			Parcelle	Ville	Pays	Cépage	Nom vigne	Symptômes	Année	Hôte herbacés	
F13		F1F2	Lapeyrade (Cayrol)	Frontignan	France	Muscat blanc à petits grains	rang F pied 13	Rabougrissement, déformation foliaire	1960	<i>C. quinoa</i>	
GHu	GH	G1G2	Collection INRA	Colmar	France/Hongrie ?	Gloria Hungariae	nd	nd	1980	<i>C. quinoa</i>	
B844	CB844	B1B2aB2b	Collection INRA	Colmar	France/Bulgarie ?	Cabernet franc	nd	nd	1980	<i>C. quinoa</i>	
CO1(A17b)	CO1 ou A17b		Les Corraies	Mesnil sur Oger	France	Chardonnay	A17	Rabougrissement, déformation foliaire	2000	<i>G. globosa</i> , <i>C. quinoa</i>	
CO2(A17d)	CO2 ou A17d		Les Corraies	Mesnil sur Oger	France	Chardonnay	A17	Rabougrissement, déformation foliaire	2000	<i>G. globosa</i> , <i>C. quinoa</i>	
CO4			Les Corraies	Mesnil sur Oger	France	Chardonnay	boutures A17	Rabougrissement, déformation foliaire	2005	<i>N. benthamiana</i> , <i>C. quinoa</i>	
CH8673	CH		Collection Agroscope	Changins	Suisse ?	Chardonnay	N°8673	Panachure	2013	<i>C. quinoa</i>	

Tableau supplémentaire 2 : détails des clonages, PCR et primers utilisés

Clone	Obtention	Matrice utilisée	Couple de primer
2A <sub>CO1</sub>	PCR : GFLV_2ACO1	cDNA_EVC60'	E38 / E40
2A <sub>CO2</sub>	PCR : GFLV_2ACO2	cDNA_EVC56'	E39 / E41
2A <sub>CO4</sub>	PCR : GFLV_2ACO4	cDNA_CO4	E35 / IM.16
2A <sub>B844a</sub>	PCR : GFLV_2ABa	cDNA_EV42'	E35 / E36
2A <sub>B844b</sub>	PCR : GFLV_2ABb	cDNA_EV47'	E35 / E37
2A <sub>CH8673</sub>	PCR : GFLV_2ACH8673	cDNA_CH8673	IM.17 / IM.18
2A <sub>Ta</sub>	PCR : GFLV_2ATa	cDNA_Tanat	E52 / E53
2A <sub>SU</sub>	PCR : GFLV_2ASU	plasmide cDNA2-ArMV-SU	E54 / E55
pG2-2ACO1	PCR 1 : GFLV-CO1 2AHP	pDZ_2ACO1	IM.26 / E46
	PCR 2 : GFLV-GHu RNA2-5'UTR	pG2	IM.27 / G78
	PCR 3 : pG2(2ACO1)	products PCR1 + 2	IM.26 / G78
pG2-2ACO2	PCR 1 : GFLV-CO2 2AHP	pDZ_2ACO2	IM.28 / IM.29
	PCR 2 : GFLV-GHu RNA2-5'UTR	pG2	IM.30 / G78
	PCR 3 : pG2(2ACO2)	products PCR1 + 2	IM.28 / G78
pG2-2ACO4	PCR 1 : GFLV-CO4 2AHP	pDZ_2ACO4	IM.26 / IM.31
	PCR 2 : GFLV-GHu RNA2-5'UTR	pG2	IM.27 / G78
	PCR 3 : pG2(2ACO4)	products PCR1 + 2	IM.26 / G78
pG2-2AB844a	PCR 1 : GFLV-2ABa 2AHP	pDZ_2ABa	IM.26 / IM.32
	PCR 2 : GFLV-GHu RNA2-5'UTR	pG2	IM.27 / G78
	PCR 3 : pG2(2ABa)	products PCR1 + 2	IM.26 / G78
pG2-2AB844b	PCR 1 : GFLV-2ABb 2AHP	pDZ_2ABb	IM.26 / IM.33
	PCR 2 : GFLV-GHu RNA2-5'UTR	pG2	IM.27 / G78
	PCR 3 : pG2(2ABb)	products PCR1 + 2	IM.26 / G78
pG2-2ACH8673	PCR 1 : GFLV-2ACH8673 2AHP	pDZ_2ACH8673	G80 / IM.33
	PCR 2 : GFLV-GHu RNA2-5'UTR	pG2	G82 / G78
	PCR 3 : pG2(2ACH8673)	products PCR1 + 2	G80 / G78
pG2-2ASU	PCR 1 : ArMV-2ASU 2AHP	pDZ_2ASU	E63 / E64
	PCR 2 : GFLV-GHu RNA2-5'UTR	pG2	E65 / G78
	PCR 3 : pG2(2ASU)	products PCR1 + 2	E64 / G78
pG2-2ATa	PCR 1 : ArMV-2ATa 2AHP	pDZ_2ATa	E66 / E67
	PCR 2 : GFLV-GHu RNA2-5'UTR	pG2	E68 / G78
	PCR 3 : pG2(2ATa)	products PCR1 + 2	E67 / G78
2A <sub>F209G</sub>	PCR 1 : F209	pF2	E31 / E34
	PCR 2 : 209G	pG2	E33 / E29
	PCR 3 : 2AF_209G	products PCR1 + 2	CK1 / CK4
2A <sub>G209F</sub>	PCR 1 : G209	pG2	E30 / E34
	PCR 2 : 209F	pF2	E33 / E32
	PCR 3 : 2A_G209F	products PCR1 + 2	CK2 / CK3
2A <sub>F243G</sub>	PCR 1 : F233	pF2	E31 / IM.19
	PCR 2 : 233G	pG2	E29 / IM.20
	PCR 3 : 2A_F233G	products PCR1 + 2	CK1 / CK4
2A <sub>G243F</sub>	PCR 1 : G233	pG2	E30 / IM.21
	PCR 2 : 233F	pF2	E32 / IM.22
	PCR 3 : 2A_G233F	products PCR1 + 2	CK2 / CK3
2AF <sub>G220-231F</sub>	PCR 1 : 3' 2AF_LQ	pDZ_2AG233F	IM.34/ E32
	PCR 2 : 5' 2AF_LQ	pF2	IM.35 / E31
	PCR 3 : 2AF_LQ	products PCR1 + 2	CK1 / CK2
2AG <sub>F220-231G</sub>	PCR 1 : 3' 2AG_VR	pDZ_2AF233G	E29 / IM.36
	PCR 2 : 5' 2AG_VR	pG2	IM.37 / E30
	PCR 3 : 2AG_VR	products PCR1 + 2	CK3 / CK4
2AF <sub>G234A</sub>	2AF_G234A	pDZ_2AF_FC	IM.44 / IM.45
2AF <sub>A222T</sub>	2AF_A222T	pDZ_2AF_FC	IM.46 / IM.47

Tableau supplémentaire 3 : Séquences des *primers* utilisés pour le clonage

Code	Name	Sequence 5'-3'
IM.16	2ACO4_R_attB2	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcgcagcacacagaagtact
IM.17	2ACH8673_S_attB1	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcaaggagatagaacctgggcaattttatttccaac
IM.18	2ACH8673_R_attB2	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcacagcatacgggaagtactggggat
IM.19	2AF_R_233	gatgtttctaggcgcaagccttggcgag
IM.20	2AG_S_233	ctttccctagaacatcactaggcctta
IM.21	2AG_R_233	ggaggttccaaggcaaaagccttagcacagg
IM.22	2AF_S_233	ctttgcttggaaacctccctag
IM.26	G_2ACO1_S	gcctaattgggcaagttttattactc
IM.27	GH(2ACO1)_Rev	gagtaataaaaactgcccattagggc
IM.28	G_2ACO2G_S	gcctaattgggcaattttactattcc
IM.29	G_2ACO2_Rev	ttgccaccggtagttcgccatccgcacacacagaagtgtgggg
IM.30	GH(2ACO2)_Rev	gaatagtaaaattgcccattagggc
IM.31	G_2ACO4_Rev	ttgccaccggtagttcgccatccgcagcacacagaagtactgggg
IM.32	G_2ABa_Rev	ttgccaccggtagttcgccatccgcacagcacaggaagtgttggg
IM.33	G_2ABb_Rev	ttgccaccggtagttcgccatccgcacagcatacgggaagtactggg
IM.34	2AF_S_LQ	ctcctcctccaggagagctgagccgcttatctag
IM.35	2AF_Rev_LQ	ctagataaaggcctgagcctctcctggaaggaggag
IM.36	2AG_S_VR	ctttctttggagagaggggtgagggagtttgcaggatg
IM.37	2AG_Rev_VR	catcctgcaaaaactcctcacctctctccaaaagaaag
IM.44	2AF_Fw_G700A	gcgccaaggcttcacctggaaacctc
IM.45	2AF_Rev_G700A	gaggttccaaggtaaaccttggcg
IM.46	2AF_Fw_A666T	gagagggtgaggggttttgcaggatg
IM.47	2AF_Rev_A666T	catcctgcaaaaacacctcacctctc
E29	2AG_R_774	acagcacacagaagtgttggg
E30	2AG_F_1	atgggcaagttttatttccaac
E31	2AF_F_1	atgggcaattttatttccaacag
E32	2AF_R_774	acagcacacagaagtactgggga
E33	FG2A_S_602	gtccttctctctcccctcc
E34	FG2A_R_623	ggagggggaggaagacaaggac
E35	2ABab_S_attB1	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcaaggagatagaacctgggcaattttacttccaac
E36	2ABa_R_attB2	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcacagcacacggaagtgttgggatg
E37	2ABb_R_attB2	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcacagcatacgggaagtactgggaatg
E38	2ACO1_S_attB1	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcaaggagatagaacctgggcaattttacttccagc
E39	2ACO2_S_attB1	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcaaggagatagaacctgggcaattttacttccaac
E40	2ACO1_R_attB2	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcacagcacacagaagtactggggat
E41	2ACO2_R_attB2	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcacacacacagaagtgttgggat
E46	2A2BF_R_Age	ccccccaccggtagttcgccatccgcacagcacacagaagtactgggg
E52	2Aata-F-attB1	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcaaggagatagaacctgggcaattttacttccaac
E53	2Aata-R-attB2	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcacacaga-agaagtgttgggaatg
E54	2Aasu-F-attB1	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcaaggagatagaacctgggcaattttattatagtaac
E55	2Aasu-R-attB2	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcacagcacacagactgttgggatg
E63	G2AASU-1S	ctttccctttattgccctaattgggcaagttttattatag
E64	G2AASU-1R	ttgccaccggtagttcgccatccgcacagcacacagactgttgg
E65	G2AASU-2R	ctataataaaaactgcccattagggcaataaagggaag
E66	G2AATa-1S	ctttccctttattgccctaattgggcaattttactattc
E67	G2AATa-1R	ttgccaccggtagttcgccatccgcacacagatagaagtgttgg
E68	G2AATa-2R	gaatagtaaaattgcccattagggcaataaagggaag
G78	pUC	tcgctctgctaactctgttac
G80	2AF_F	cctaattgggcaattttatttccaac
G82	5UTR2A_R	gttgaataataaaattgcccattagg
CK1 (m36)	2AF_F_attB1	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcaaggagatagaacctgggcaattttatttccaac
CK2 (m44)	2AF_R_attB2	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcacagcacacagaagtactggggatg
CK3 (104)	2AG_F_attB1	ggggacaagttgtacaaaaagcaggcttcaaggagatagaacctgggcaattttatttcc
CK4 (105)	2AG_R_attB2	ggggaccactttgtacaagaaagctgggtcacagcacacagaagtgttgg







## Isabelle R. MARTIN

# Étude du déterminisme moléculaire des Interactions compatibles et incompatibles *Vitis vinifera* / *Nepovirus* / *Nicotiana occidentalis* (InViNNo)

### Résumé

Le Grapevine fanleaf virus (genre *Nepovirus*) est l'agent principal du court-noué de la vigne. Il induit des symptômes très variables. Ce travail présente une étude mécanistique de la symptomatologie du GFLV sur un hôte herbacé et sur l'hôte d'intérêt agronomique.

Par détection de marqueurs biochimiques et moléculaires j'ai montré que le GFLV-F13 induit une réponse hypersensible (HR) sur *N. occidentalis* et une restriction partielle du virus. J'ai identifié puis cartographié le déterminant viral de cette HR en utilisant des réassortants, des recombinants et des variants naturels du virus.

Sur vigne, sur un dispositif expérimental unique en son genre, j'ai mené une approche sans *a priori* d'étude transcriptomique par RNA-Seq. J'ai comparé des vignes du cépage gewurztraminer mono-infectées par une souche sévère induisant des symptômes de rabougrissement et par une souche plus modérée. 1 023 gènes sont spécifiquement dérégulés par la souche sévère parmi lesquels des gènes impliqués dans la régulation de la HR. Ce résultat permet de proposer pour la première fois qu'une HR pourrait être mise en place dans la vigne en réponse à une infection virale.

**Mots clés** : Restriction virale, Gène-pour-gène, Pathogénèse, Symptômes, *Vitis vinifera*, Interaction, Résistance, GFLV, Séquençage à haut débit

### Abstract

*Grapevine fanleaf virus* (genus *Nepovirus*) the causative agent of fanleaf degeneration, induces variable symptoms. This manuscript presents a mechanistic study of GFLV symptomatology on both an herbaceous model plant and an agronomically important crop plant.

On *N. occidentalis*, I demonstrated that GFLV-F13 induces a reaction exhibiting hallmarks of a hypersensitive response (HR), partially restricting virus spread. Using reassortants, recombinants and natural variants of the virus, I could identify and map the viral determinant of this HR.

On grapevine, I took advantage of a unique experimental set-up and used RNA-Seq to compare the transcriptoms of Gewurztraminer plants infected with two different GFLV strains, one of which induced stunting symptoms and the other mild symptoms. 1,023 genes among which genes involved in the regulation of HR, were specifically regulated by the more severe strain This is the first hint of a HR taking place in grapevine in response to a virus infection.

**Keywords**: Viral restriction, Gene-for-gene, Pathogenesis, Symptoms, *Vitis vinifera*, Interaction, Resistance, GFLV, High throughput sequencing.