



HAL
open science

Influence de la diversité génétique du virus et de l'hôte sur le contournement d'une résistance au virus Y de la pomme de terre chez le piment

Ludovic Saint-Félix

► To cite this version:

Ludovic Saint-Félix. Influence de la diversité génétique du virus et de l'hôte sur le contournement d'une résistance au virus Y de la pomme de terre chez le piment. [Stage] Université Montpellier 2 (Sciences et Techniques) (UM2), Montpellier, FRA. 2011, 48 p. hal-02811163

HAL Id: hal-02811163

<https://hal.inrae.fr/hal-02811163>

Submitted on 6 Jun 2020

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 Montpellier 2

Master 2 mention BGAE spécialité BIMP
parcours Systèmes Microbiens
UE FMOM409 : Stage de recherche



INRA Avignon

Unité de Pathologie Végétale
Unité de Génétique et Amélioration des
Fruits et Légumes (GAFL)

Rapport de stage de Master 2

Stage réalisé du 10/01/2011 au 20/06/2011

Influence de la diversité génétique du virus et de l'hôte sur le contournement d'une résistance au virus Y de la pomme de terre chez le piment

Présenté par

Ludovic SAINT-FELIX

Stage encadré par :

Alain PALLOIX (Directeur de recherche)	alain.palloix@avignon.inra.fr
Benoit MOURY (Directeur de recherche)	benoit.moury@avignon.inra.fr
Julie QUENOUILLE (Doctorante)	julie.quenouille@avignon.inra.fr



Influence de la diversité génétique du virus et de l'hôte sur le contournement d'une résistance au virus Y de la pomme de terre chez le piment de SAINT-FELIX Ludovic est mis à disposition selon les termes de la [licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/).



Influence de la diversité génétique du virus et de l'hôte sur le contournement d'une résistance au virus Y de la pomme de terre chez le piment de SAINT-FELIX Ludovic est mis à disposition selon les termes de la [licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France](#).

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier mesdames Cindy Morris, directrice de l'unité de Pathologie Végétale, et Mathilde Causse, directrice de l'unité de Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire durant ces six mois de stage.

Je témoigne également ma reconnaissance envers mes maîtres de stage, Alain Palloix et Benoit Moury, pour m'avoir permis de réaliser ce stage dans leurs équipes respectives. Merci, Alain, pour tes connaissances sur les plantes, les virus et leurs interactions et ton goût à les transmettre. Merci, Benoit, pour ton incroyable culture générale et scientifique, ta perpétuelle inspiration et ton optimisme face à tous les problèmes, ta patience et ta disponibilité, qui m'ont motivé pendant toute la durée de ce stage et poussé à toujours vouloir en savoir plus.

J'adresse des remerciements particuliers à « Julie-sensei » pour sa patience, sa disponibilité et sa bonne humeur (presque) permanente. En plus de ton humour, tes chansons et ta curiosité scientifique, tu es un excellent professeur doublé d'un excellent chercheur. Je te souhaite bon courage pour la suite de ta thèse, que tu réussiras, j'en suis sûr, avec brio.

Je remercie également les techniciens, Ghislaine, Pascale, Bruno et Guillaume, côté GAFL, Karine et Vincent, côté Pathologie, pour leur aide indispensable durant les longues journées d'expériences. Merci également au personnel des serres de prendre si bien soin de nos précieuses plantes.

Merci à Hana, ma voisine de bureau, pour sa discrétion. Merci à nos pâtisseries du lundi, à l'équipe de volley et à tous les autres stagiaires et thésards à qui je souhaite bonne continuation.

Enfin, merci à toute l'équipe de Pathologie Végétale, du GAFL et du Laboratoire de biologie moléculaire, pour cette ambiance de travail si agréable et propice au travail de recherche.



Influence de la diversité génétique du virus et de l'hôte sur le contournement d'une résistance au virus Y de la pomme de terre chez le piment de SAINT-FELIX Ludovic est mis à disposition selon les termes de la [licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France](#).



Influence de la diversité génétique du virus et de l'hôte sur le contournement d'une résistance au virus Y de la pomme de terre chez le piment de SAINT-FELIX Ludovic est mis à disposition selon les termes de la [licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France](#).

Sommaire

Liste des abréviations	1
Introduction	2
I – Généralités	2
1 – Importance des résistances génétiques contre les phytovirus	2
2 – Durabilité de la résistance	2
II – Le pathosystème Potato virus Y – Piment	3
1 – Le Potato virus Y	3
2 – Le piment et les sources de résistance au PVY	4
3 – Interaction <i>pvr2</i> /VPg	4
4 – Implication du fond génétique dans le contournement de la résistance	5
III – Problématique et objectifs	5
Matériel et méthodes	6
I – Matériel végétal et viral	6
1 – Matériel végétal	6
2 – Matériel viral	7
II – Influence du fond génétique du piment sur le contournement de la résistance	7
1 – Mesure des fréquences de contournement	7
2 – Mesure de l'efficacité de la résistance	8
3 – Analyses statistiques	8
III – Influence du fond génétique du PVY sur le contournement de la résistance	8
1 – Construction de virus recombinants	8
2 – Mesure du taux de contournement	9
Résultats	9
I – Influence du fond génétique du piment sur le taux de contournement	9
1 – Effet du fond génétique sur la durabilité de la résistance et la nature des mutations permettant le contournement chez le PVY	9
2 – Effets du fond génétique du piment sur la concentration virale et l'intensité des symptômes	11
3 – Corrélation entre les caractères : concentration, durabilité et symptômes	11
II – Influence du fond génétique du PVY sur le contournement du gène <i>pvr2</i> ³	12
1 – Construction de virus recombinants	12
2 – Capacités de contournement des virus	12
Discussion	13
Conclusion et perspectives	17
Références bibliographiques	18



Influence de la diversité génétique du virus et de l'hôte sur le contournement d'une résistance au virus Y de la pomme de terre chez le piment de SAINT-FELIX Ludovic est mis à disposition selon les termes de la [licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/).



[Licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France.](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/)

Liste des abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : ARN messenger

AUDPC : Area Under Disease Progress Curve (Aire sous la courbe de progression de la maladie)

CI : Cylindrical Inclusion (Protéine d'Inclusion Cylindrique)

eIF4E : Facteur d'Initiation de la Traduction 4E

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay

HD : Haploïde Double

LMV : Lettuce mosaic virus (virus de la mosaïque de la laitue)

ORF : Open Reading Frame

PCR : Polymerase Chain Reaction

PVY : Potato virus Y (virus Y de la pomme de terre)

QTL : Quantitative Trait Loci

RT-PCR : Reverse Transcription - PCR

VPg : Viral Protein linked to genome (Protéine Virale liée au génome)

YW : Yolo Wonder





[Licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France.](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/)

Introduction

I – Généralités

1 – Importance des résistances génétiques contre les phytovirus

Dans les agrosystèmes, les phytovirus ont un impact biologique important, en causant une réduction de croissance des plantes ou des symptômes sur les parties consommées (mosaïques, nécroses, déformations) voire la mort des végétaux. Il en résulte d'importantes pertes de rendement aboutissant également à des pertes économiques.

Différents types de lutte directe contre les virus végétaux existent : la lutte chimique, la lutte prophylactique et la lutte génétique. La lutte chimique, via l'utilisation d'antiviraux est difficilement applicable à l'échelle d'une culture. La lutte prophylactique (culture de plants sains, élimination des adventices réservoirs et des plantes malades, lutte contre les vecteurs par des moyens biologiques ou chimiques) est appliquée mais n'apporte pas de résultats suffisants pour assurer une protection complète contre les phytovirus. La lutte génétique est, elle, utilisée depuis plusieurs décennies car elle se révèle la moins coûteuse et la plus efficace tout en respectant l'environnement et la santé humaine. La sélection a permis la création et la culture de variétés possédant des gènes de résistance aux pathogènes.

Des mutations spécifiques dans certains gènes végétaux modifient l'interaction entre l'agent pathogène et son hôte végétal, et peuvent empêcher ou limiter l'infection et le développement d'une maladie. Ces gènes, dont les séquences sont modulées par la co-évolution entre les végétaux et les agents pathogènes, sont appelés gènes de résistance. Face aux phytovirus, la résistance peut intervenir à différentes phases du cycle viral, en empêchant la multiplication, le mouvement dans l'hôte ou la transmission par les vecteurs.

Les résistances envers les agents pathogènes peuvent être dominantes ou récessives. Les gènes de résistance dominants codent pour des protéines capables de reconnaître des signaux de l'agent pathogène et d'initier une cascade de signalisation conduisant à la mise en place de mécanismes de défense. La résistance récessive est le résultat de l'absence d'ajustement entre l'hôte et l'agent pathogène, celui-ci ne pouvant pas exploiter les facteurs de l'hôte nécessaires à son développement (Moury et al., 2010).

2 – Durabilité de la résistance

Les virus possèdent cependant une capacité de contournement des résistances qui consiste à rétablir l'interaction compatible entre les facteurs du virus et de l'hôte dans le cas des résistances récessives ou à



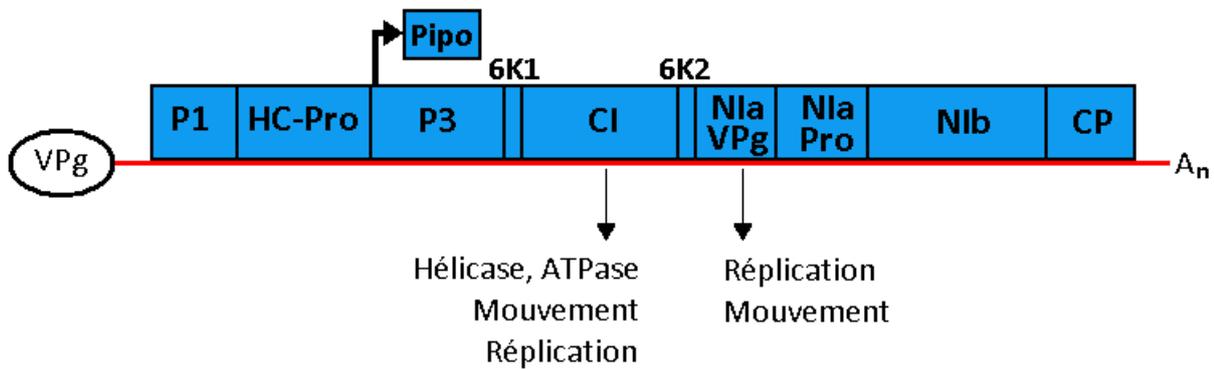


Figure 1 : Organisation du génome du PVY et fonction des protéines étudiées.

L'ARN viral lié à la protéine VPg est représenté en rouge, A_n représente la queue poly-A. La polyprotéine codée est représentée en bleu et sera clivée en 10 protéines fonctionnelles par des protéases virales. La protéine PIPO est produite par un saut de cadre de lecture dans la protéine P3 (Chung et al., 2008). Les fonctions des deux protéines étudiées ici (CI et VPg) sont précisées (Wei et al., 2010).

empêcher la reconnaissance par les gènes de résistance ou l'action des effecteurs de défense de l'hôte, dans le cas des résistances dominantes. Le contournement des résistances est un phénomène potentiellement rapide et lié au fort taux de mutation du génome viral lors du cycle infectieux du virus.

La durabilité d'une résistance a été définie comme la persistance de la résistance après culture d'une variété durant une longue période, sur de grandes surfaces et en présence de l'agent pathogène (Johnson, 1979)(Johnson, 1981). La définition même de la durabilité est une notion *a posteriori*. L'étude des mécanismes de résistance et de contournement pourrait permettre de déterminer des critères de durabilité *a priori*, aboutissant au choix des gènes de résistance les plus favorables et à la création de nouvelles variétés pouvant être cultivées tout en évitant l'émergence de souches virales contournant les résistances.

II – Le pathosystème *Potato virus Y* – Piment

1 – Le *Potato virus Y*

Le *Potato virus Y* (PVY) ou virus Y de la pomme de terre est le virus type de la famille des *Potyviridae* et du genre *Potyvirus*, genre de phytovirus comportant le plus d'espèces décrites (une centaine). Le PVY est un agent pathogène des Solanacées, famille botanique comprenant 90 genres et près de 3000 espèces, majoritairement sauvages mais comptant également quelques cultures d'importance économique (pomme de terre, 5^{ème} production agricole mondiale, tomate, tabac et piment). C'est l'un des principaux virus ayant un impact sur le rendement de pommes de terre, piment et tabac. Il existe plusieurs groupes au sein de l'espèce PVY, différenciés par leur génome, leur gamme d'hôtes et leur symptomatologie. Le groupe C infecte les piments (*Capsicum annuum*), provoquant des mosaïques ou des nécroses, alors que les groupes N et O sont pathogènes de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*). D'autres groupes de PVY existent (Groupes NTN, Wilga (W)) et sont issus de recombinaisons entre des isolats de différents groupes, ce qui leur confère des propriétés de pouvoir pathogène différentes (Glais et al., 2002). La majorité des isolats de PVY ont la capacité d'infecter de nombreuses espèces du genre *Nicotiana* (tabac et apparentés).

Le PVY est un virus filamenteux non enveloppé de 700 à 900nm de long et 11 à 15 de large. Son génome est un ARN simple brin positif d'environ 10 kilobases ayant une région 5' non traduite liée à la protéine virale VPg, et une queue poly-adenylée en 3'. Cet ARN ne comporte qu'une ORF (Open Reading Frame), traduite en une polyprotéine de 3063 acides aminés qui sera clivée en dix protéines fonctionnelles par des protéases virales (Riechmann et al., 1992) (Figure 1). Cependant, une onzième protéine, nommée



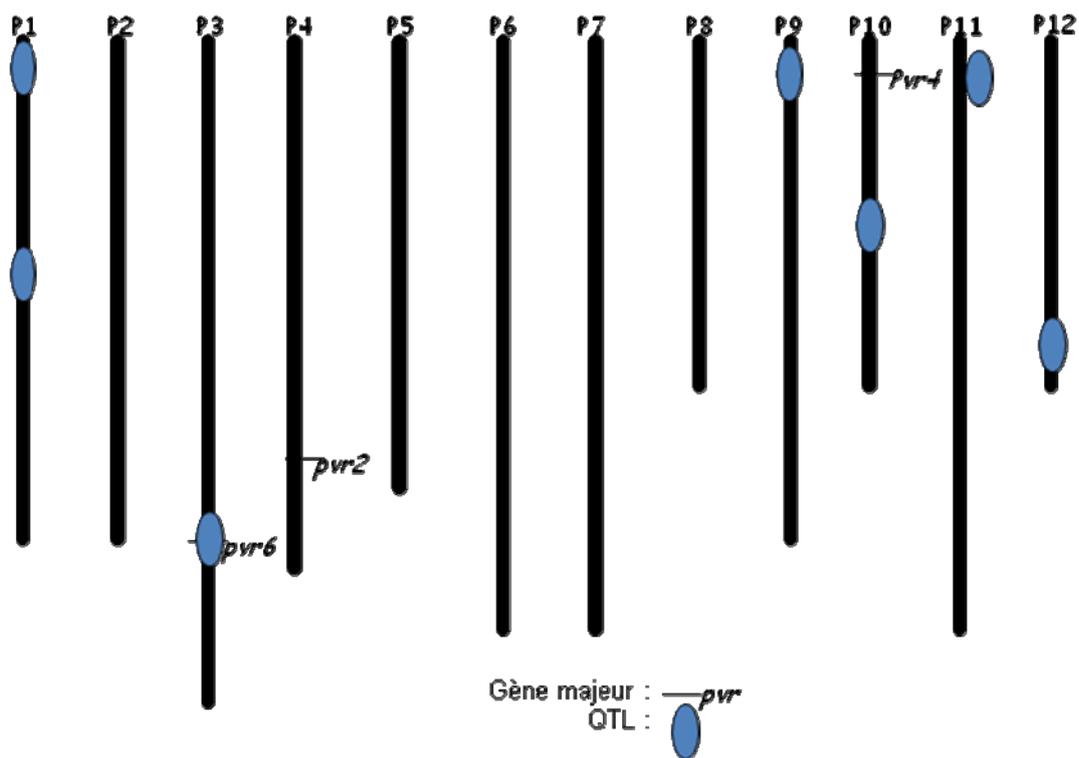


Figure 2 : Représentation du génome du piment et localisation des gènes majeurs (*pvr2*, *pvr6* et *Pvr4*) et des QTLs de résistance aux potyvirus sur les chromosomes (A. Palloix, communication personnelle)

PIPO, codée par un changement d'ORF lors de la traduction, a été découverte récemment (Chung et al., 2008).

Le PVY est transmis par de nombreuses espèces de pucerons, selon le mode non-persistant, c'est-à-dire que l'acquisition et la transmission par le vecteur sont très rapides (quelques secondes) et la rétention du virus par le vecteur est courte (moins d'une journée).

2 – Le piment et les sources de résistance au PVY

Le piment est une plante appartenant au genre *Capsicum* et à la famille des *Solanaceae*. La principale espèce cultivée est *C. annuum*, mais quatre autres espèces, sur les 25 reconnues, sont domestiquées. Les espèces du genre *Capsicum* possèdent 12 paires de chromosomes. Divers gènes majeurs de résistance aux potyvirus ont été cartographiés dans le génome du piment (Figure 2) et exploités commercialement, dont des gènes de résistance dominants (*Pvr4*) ou récessifs (*pvr2*, *pvr6*) (Kyle et Palloix, 1997).

Par ailleurs, il existe des QTL conférant une résistance partielle au virus. Ces QTL peuvent induire une diminution de la concentration virale ou une réduction du mouvement du virus dans la plante sans toutefois empêcher l'infection. La combinaison de plusieurs QTL peut conférer un niveau élevé de résistance comparable à l'effet de gènes majeurs de résistance (Palloix et Ordon, 2011). Ainsi, pour la variété de piment Perennial, plusieurs QTL de résistance partielle ont été localisés (Figure 2) (Caranta et al., 1997). Il existe de plus des variétés tolérantes, c'est-à-dire pouvant être infectées par le virus mais exprimant peu de symptômes et pas de dégâts importants.

3 – Interaction *pvr2* / VPg

La traduction de l'ARN viral en polyprotéine est essentielle pour le cycle infectieux du PVY. La protéine VPg, liée à l'extrémité 5' du génome viral, joue un rôle similaire à celui de la coiffe de l'extrémité 5' des ARNm eucaryotes, et interagit avec la protéine eIF4E (Facteur d'Initiation de la traduction eucaryote 4E) de la plante hôte entraînant la formation du complexe d'initiation de la traduction et le recrutement du ribosome. L'interaction entre VPg et eIF4E est donc essentielle pour le cycle infectieux du PVY. Le gène de résistance *pvr2* code pour la protéine eIF4E. Certaines mutations de ce gène empêchent l'interaction physique entre la VPg et eIF4E, conférant ainsi la résistance au virus. Le gène du virus codant pour la VPg est donc le





[Licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/)

gène d'avirulence. Certaines mutations de la VPg peuvent à leur tour rétablir l'interaction avec la protéine l'eIF4E et le pouvoir pathogène du virus conduisant au contournement de la résistance (Ruffel et al., 2002). Plusieurs allèles du gène *pvr2* existent et confèrent des résistances plus ou moins spécifiques vis-à-vis du PVY (Ayme et al., 2006). L'allèle *pvr2*⁺ de sensibilité est dominant. L'allèle *pvr2*² est le plus durable des allèles du gène *pvr2* connu, exploité en sélection depuis les années 1950, il n'a pour l'instant jamais été contourné par le PVY. L'allèle *pvr2*³ contrôle une résistance envers certains isolats de PVY, mais est contourné indépendamment par de nombreuses mutations (au moins 9) dans la VPg (Moury et al., 2004). Par ailleurs, l'allèle *pvr2*⁴ possède la même spécificité que *pvr2*³. Les facteurs eIF4E codés par ces différents allèles de résistance ou sensibilité ne diffèrent que de quelques substitutions d'acides aminés.

4 – Implication du fond génétique dans le contournement de la résistance

Il est démontré que la protéine VPg est directement responsable des capacités de contournement du PVY vis-à-vis des allèles de résistance au locus *pvr2*. Cependant, la protéine CI joue un rôle indirect dans la capacité à contourner la résistance conférée par *pvr2*³. En effet, l'échange du gène codant pour cette protéine a multiplié par six la fréquence de contournement (Montarry et al., sous presse). La protéine CI ne présentant pas de mutation après contournement, il ne s'agit pas d'un facteur additionnel de pouvoir infectieux, mais elle jouerait un rôle en accélérant la sélection des variants adaptés de PVY porteurs de mutations dans la protéine VPg. Il apparaît donc que le fond génétique viral joue un rôle dans les capacités de contournement du PVY.

Par ailleurs, il est apparu que des lignées de piment apparentées, possédant toutes l'allèle de résistance *pvr2*³ mais des fonds génétiques différents, ne sont pas contournées avec la même fréquence par un isolat de PVY donné. Ce taux de contournement peut varier de 0 à 100%, ce qui indique la présence dans le fond génétique, de facteurs génétiques influant sur la durabilité de la résistance conférée par un gène majeur de résistance (Palloix et al., 2009).

III - Problématiques et objectifs

Il apparaît que la durabilité de la résistance du piment au PVY dépend de plusieurs facteurs de l'hôte et de l'agent pathogène. Chez la plante hôte, la fréquence de contournement dépend des allèles du gène majeur *pvr2* mais également de facteurs du fond génétique qui modulent la durabilité de la résistance





[Licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/)

conférée par le gène majeur. Chez le virus, de façon parallèle, les capacités de contournement de la résistance par le PVY dépendent de la nature et l'occurrence des mutations dans le gène d'avirulence codant pour la VPg, mais également du fond génétique dont fait partie le gène codant la protéine CI.

L'objectif du stage est de déterminer si les modifications de la durabilité de la résistance peuvent être associées à des facteurs de résistance partielle présents dans le fond génétique et si de tels facteurs sont répandus dans les ressources génétiques du piment. D'autre part, nous chercherons à identifier les mutations de la protéine CI du PVY favorisant le contournement de la résistance conférée par *pvr2*³.

Les problématiques de recherche auxquelles nous tenterons de répondre sont :

- 1- Les fonds génétiques favorisant la durabilité des gènes majeurs de résistance sont-ils diversifiés et disponibles dans les ressources génétiques du piment ? Existe-t-il une corrélation entre la durabilité de la résistance et d'autres caractères liés à l'infection ?
- 2- Quelles sont les mutations de la protéine CI favorisant le contournement de la résistance par le PVY ?

Pour répondre aux premières questions, la stratégie mise en œuvre passera par la mesure de la durabilité de la résistance, d'une part, et de l'efficacité de la résistance partielle due au fond génétique d'autre part, chez un ensemble de lignées de piment peu apparentées mais porteuses des mêmes allèles majeurs de résistance *pvr2*³ ou *pvr2*⁴. L'analyse de la corrélation entre ces deux facteurs indiquera si des facteurs génétiques communs interviennent dans le niveau de résistance et dans sa durabilité.

La stratégie mise en œuvre pour répondre à la deuxième question passera par la construction de virus recombinants dans le gène codant pour la protéine CI et l'analyse de la capacité de contournement de ces virus.

Matériel et méthodes

I – Matériel végétal et viral

1 – Matériel végétal

Différentes lignées de piment (*Capsicum annuum* L.) ont été utilisées pour la réalisation des expériences. La lignée homozygote Yolo Wonder (YW) est une variété à gros fruits doux (poivrons) porteuse de l'allèle *pvr2*⁺ et donc sensible à tous les isolats de PVY. La variété Perennial est une variété à petits fruits brûlants porteuse de l'allèle *pvr2*³. HD285 et HD2435 sont deux lignées « haploïdes doublées » (HD) de



PM	Nom	Origine	Espèce	Allèle pvr2	PM	Nom	Origine	Espèce	Allèle pvr2
659	Perennial	Inde	<i>C. annuum</i>	pvr2 ³	1430	Pikuti	Népal	<i>C. annuum</i>	pvr2 ³
828	AC 1534	Corée	<i>C. annuum</i>	pvr2 ³	1487	Souman	Burkina	<i>C. annuum</i>	pvr2 ³
834	AC 1448	Corée	<i>C. annuum</i>	pvr2 ³	Boucoule 3				
836	PI 369 940	Corée	<i>C. annuum</i>	pvr2 ³	1491	Copoya	Mexique	<i>C. annuum</i>	pvr2 ³
933	Chilipequin	Amérique du nord	<i>C. annuum</i>	pvr2 ³	1525	Ubud Bali 2	Bali	<i>C. annuum</i>	pvr2 ³
1014	Bouso 2	Tchad	<i>C. annuum</i>	pvr2 ³	1612	Jaipur	Rajasthan	<i>C. annuum</i>	pvr2 ³
1021	Bouso 8	Tchad	<i>C. annuum</i>	pvr2 ³	1614	C69	Mexique	<i>C. annuum</i>	pvr2 ³
1060	PI 123 474	Taiwan	<i>C. annuum</i>	pvr2 ³	HD285				
1067	Huixtan	Mexique	<i>C. annuum</i>	pvr2 ³	687	PI 322 719	Inde	<i>C. annuum</i>	pvr2 ⁴
1123	276F	Corée	<i>C. annuum</i>	pvr2 ³	1220	Thamel	Népal	<i>C. chinense</i>	pvr2 ⁴
1237	Piment de Thaïlande	Thaïlande	<i>C. annuum</i>	pvr2 ³	1243	G4	Inde	<i>C. annuum</i>	pvr2 ⁴
1238	Piment Ile Maurice	Maurice	<i>C. annuum</i>	pvr2 ³	1400	P 709	Taiwan	<i>C. annuum</i>	pvr2 ⁴
1242	G1	Inde	<i>C. annuum</i>	pvr2 ³	1564	Beijin	Chine	<i>C. annuum</i>	pvr2 ⁴
					31	Yolo Wonder	USA	<i>C. annuum</i>	pvr2 ⁺

Tableau 1 : Liste des variétés de piment choisies pour la collection, avec indication de l'origine, l'espèce. Ces variétés ont été choisies pour cette collection car elles portent les allèles *pvr2*³ ou *pvr2*⁴. La variété Yolo Wonder (YW) sert de témoin sensible au PVY. Le PM est le numéro d'accèsion de chaque variété.

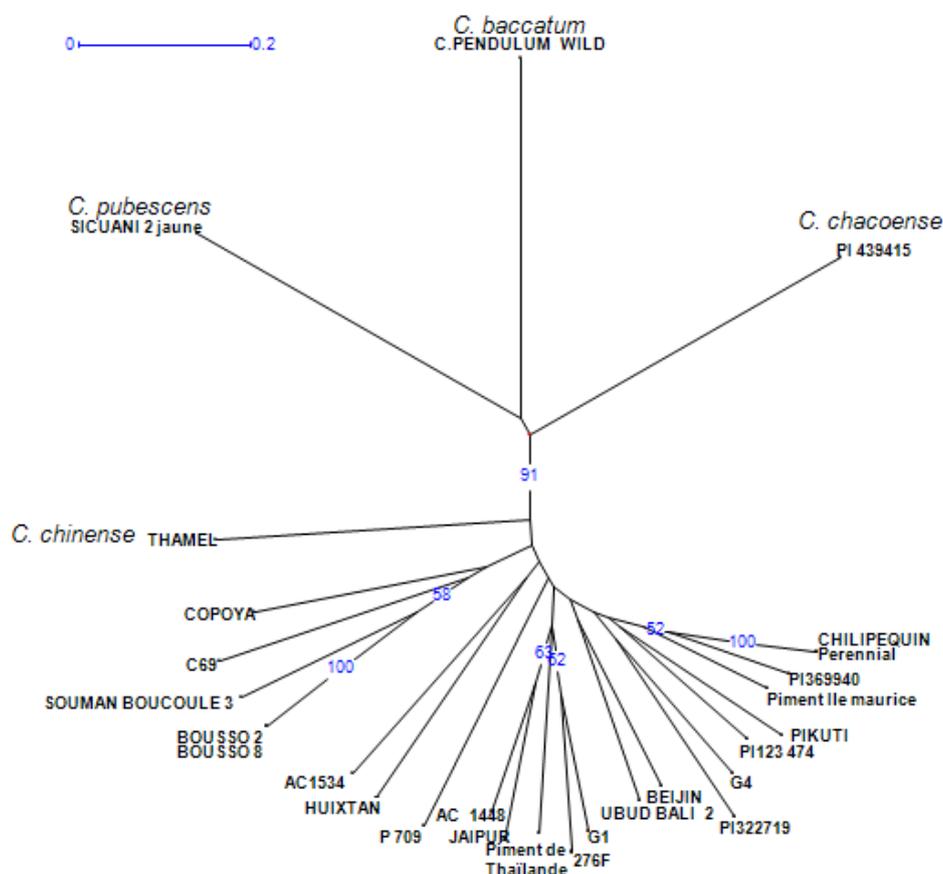


Figure 3 : Arbre de distances basé sur 28 loci microsatellites des 24 variétés de la collection, enraciné sur 3 espèces éloignées (*C. pubescens*, *C. baccatum*, *C. Chacoense*)



référence, issues de l'hybride F₁ entre YW et Perennial, portant l'allèle *pvr2*³ associé à des fonds génétiques sensible (HD285) à très sensible (HD2435). Une collection de 24 lignées de piments (*C. annuum* et *C. chinense*), de différentes origines géographiques et types variétaux mais toutes porteuses des allèles *pvr2*³ ou *pvr2*⁴ a été utilisée (Tableau 1). Le génotypage de cette collection par marqueurs microsatellites répartis sur les différents chromosomes atteste de la diversité des fonds génétiques de ces lignées (Figure 3). Le tabac (*Nicotiana tabacum* L. var. Xanthi nc) et *N. benthamiana* sont utilisés pour la préparation des inocula. *N. clevelandii* ou *N. benthamiana* sont utilisés pour les bombardements à partir d'ADN plasmidique contenant le génome de PVY recombinants sous forme d'ADN complémentaire à l'ARN viral.

2 – Matériel viral

Différents isolats de PVY ont été utilisés pour la réalisation des expériences. SON41p est un isolat contrôlé par les allèles *pvr2*³ et *pvr2*⁴, ayant un taux de contournement de ces allèles généralement faible. Le PVY recombinant nommé « Chimère CI » est issu de l'échange du gène CI entre SON41p et un autre isolat, nommé LYE84.2. Ce recombinant possède ainsi le gène CI de LYE84.2 et le fond génétique de SON41p. Cette chimère CI est également contrôlée par les allèles *pvr2*³ et *pvr2*⁴, mais avec un taux de contournement six fois plus important que celui de SON41p (Montarry et al., sous presse).

Le recombinant « Chimère CI – VPg D₁₁₉N » a un génome identique à celui de la chimère CI, excepté l'unique substitution D₁₁₉N dans le gène codant pour la VPg, mutation suffisant au contournement de la résistance conférée par *pvr2*³ et *pvr2*⁴.

II – Influence du fond génétique du piment sur le contournement de la résistance

1 – Mesure des fréquences de contournement

La chimère CI, initialement non infectieuse sur les plantes possédant *pvr2*³ ou *pvr2*⁴, a été inoculée manuellement à 60 plantes de chaque variété de la collection au stade cotylédonaire (3 semaines après semis). Cinq semaines après inoculation, trois feuilles apicales de chaque plante ont été prélevées et broyées dans 4mL de tampon phosphate-DIECA. Un test ELISA de détection du PVY a été réalisé sur ces échantillons en prenant un seuil de positivité de 3 fois la valeur d'absorbance d'un témoin non infecté.

Pour les plantes apparues positives lors du test ELISA, les ARN totaux ont été extraits avec le kit TriReagent.

Pour chaque échantillon, le gène VPg a été amplifié par RT-PCR avec les amorces SON41-Mil et VPg-





[Licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/)

SON3bis (Annexe 1). Les ADNc obtenus ont été digérés par l'enzyme de restriction *StyI* pour détecter la mutation D₁₁₉N, qui modifie le site de restriction et empêche la digestion. Les ADNc ne montrant pas la présence de la mutation D₁₁₉N par l'enzyme de restriction ont été séquencés en utilisant l'amorce VPg-SON3bis pour identifier les mutations présentes dans la VPg.

2 – Mesure de l'efficacité de la résistance

La chimère CI – VPg D₁₁₉N, infectieuse sur les plantes possédant *pvr2*³ ou *pvr2*⁴, a été inoculée manuellement à 20 plantes de chaque variété de la collection au stade cotylédonaire (3 semaines après semis). L'intensité des symptômes a été notée 2, 3, 4 et 5 semaines après inoculation sur une échelle de quatre classes d'intensité (1 = absence de symptômes, 2 = nécrose ou mosaïque faible, 3 = nécrose ou mosaïque forte, 4 = plante morte), permettant de calculer l'AUDPC (Aire sous la courbe de progression de la maladie), selon la formule $AUDPC = \sum [(n_i + n_{i+1}) \cdot (t_{i+1} - t_i) / 2]$, n étant la classe de symptôme et t la date de notation, en jours.

Pour 10 plantes de chaque variété, 0,5 gramme de feuilles apicales symptomatiques ont été prélevés et broyés dans 2mL de tampon phosphate-DIECA. Un test ELISA semi-quantitatif a permis d'estimer la concentration relative en PVY de chaque plante par rapport au témoin infecté YW.

3 – Analyses statistiques

Les analyses statistiques des résultats de fréquences de contournement et d'efficacité de la résistance (test de Kruskal-Wallis, test de corrélation de Spearman, test de corrélation de Pearson, test de Shapiro-Wilk, comparaison multiples) ont été réalisées à l'aide du logiciel R version 2.8.1.

III – Influence du fond génétique du PVY sur le contournement de la résistance

1 – Construction de virus recombinants

Les virus recombinants ont été obtenus par recombinaison homologue de fragments d'ADN dans des vecteurs plasmidiques chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* souche YPH501 et amplification du plasmide chez la bactérie *Escherichia coli* souche DH5α. Les fragments d'ADN ont été obtenus par RT-PCR à partir de l'ARN de l'isolat de PVY LYE84.2 avec les couples d'amorces SON LYE-CI 5397 FwNew + SON-CI LYE-6K2 et SON 6K1-LYE + LYE84-1/3 CI, et par PCR à partir de l'ARN de l'isolat de PVY



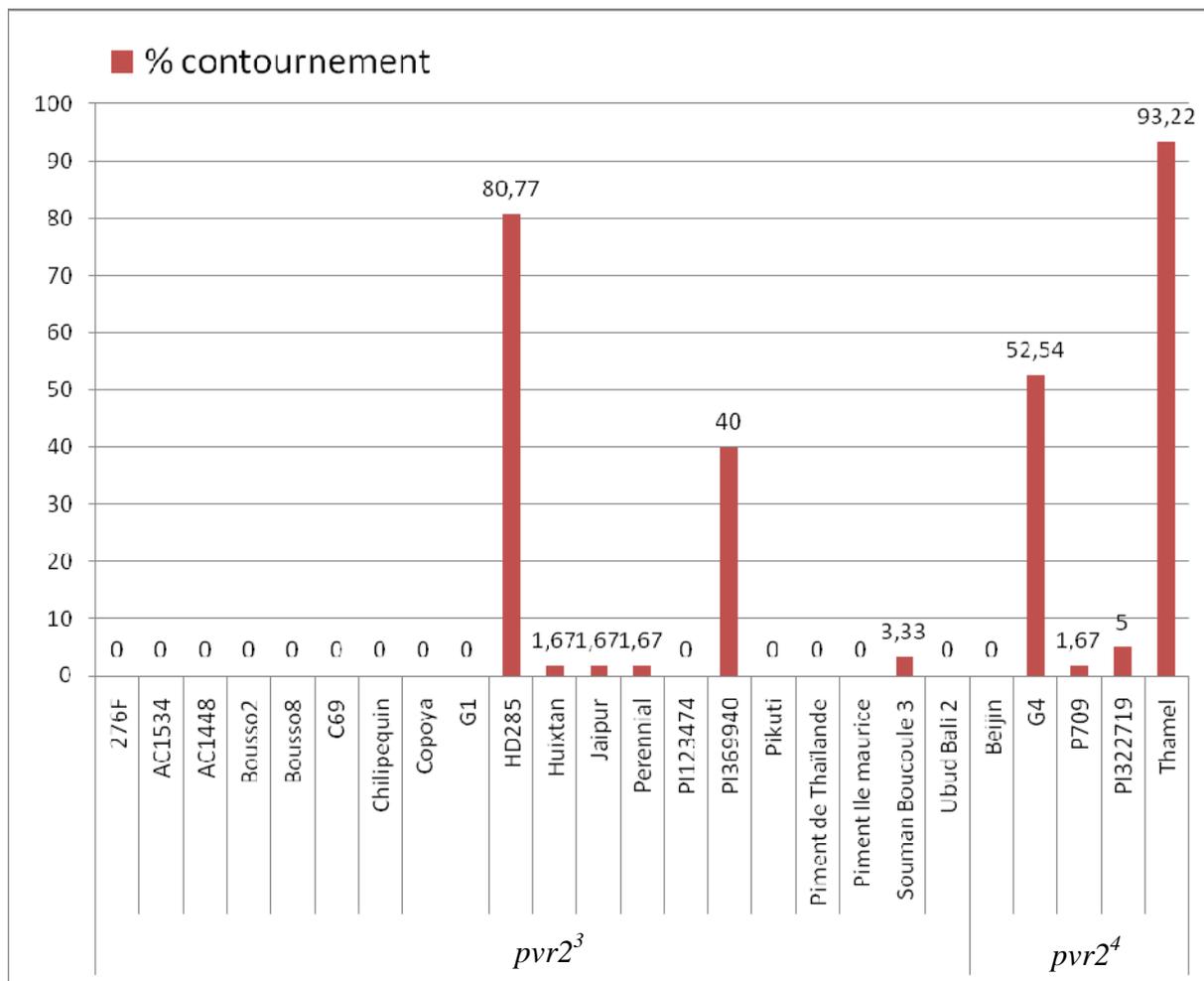


Figure 4 : Taux de contournement observés pour chaque variété de la collection de piment après inoculation de 60 plantes par variété avec la Chimère CI

Variété de piment	Mutations observées dans la VPg				p-value Test exact de Fisher
	D ₁₁₉ N	Autre	Mélange	Total	
G4	8	11	7	26	0,04
PI369940	4	12	0	16	0,001
HD285	13	9	2	24	0,48
Test durabilité					
HD285					
Montarry <i>et al</i>, sous presse	132	64	0	196	

Tableau 2 : Nombre de plantes infectées après inoculation par la chimère CI, où ont été observés, après séquençage, la mutation D119N dans la VPg, d'autres substitutions d'acides aminés dans la VPg ou un mélange de différentes mutations. La p-value obtenue en comparant les proportions de mutants D119N – autres par test exact de Fisher est indiquée.



SON41p avec les couples d'amorces PVY216 + SON LYE CI 5428 Rv, SON41p-1/3CI + SON CI LYE 6K2 et S4 + SON CI LYE 6K2 (Annexe 1). Les vecteurs contenant l'ADNc du génome de l'isolat SON41p ont été digérés par différentes enzymes de restriction pour éliminer la région du gène CI à recombinaison. Les mutations issues lors de la recombinaison ont été identifiées par séquençage avec les amorces SON LYE-CI 5397 FwNew ou S4 et SON-CI LYE-6K2 (Annexe 1). Les plasmides recombinants ont été purifiés puis bombardés à des plants de *Nicotiana clevelandii* de 4 semaines après avoir été adsorbés sur des particules de tungstène.

2 – Mesure du taux de contournement

La capacité de contournement de la résistance conférée par le gène *pvr2³* des virus recombinants « 4mut » et « 2 mut » a été comparée à celles de SON41p et de la chimère CI. Les lignées utilisées sont HD285 et HD 2435 présentant respectivement un taux de contournement de 20 à 50% et de 70 à 73% par la chimère CI. Chacun des virus a été inoculé manuellement à 150 plantes (au stade cotylédonnaire, 3 semaines après semis) de chacune des deux lignées. Les plantes étaient réparties dans six terrines de 25 plantes, disposées en serre selon un dispositif expérimental en blocs.

Pour la lignée HD285, les plantes infectées ont été identifiées par notation des symptômes de nécrose, 5 semaines après inoculation. Pour la lignée HD2435, les symptômes étant plus difficiles à évaluer (mosaïques foliaires plus ou moins fortes), la présence d'une infection virale a été évaluée par test ELISA comme décrit précédemment, 5 semaines après inoculation.

Résultats

I – Influence du fond génétique du piment sur le taux de contournement

1 – Effet du fond génétique sur la durabilité de la résistance et la nature des mutations permettant le contournement chez le PVY

La détection par test ELISA a permis d'estimer le taux d'infection pour chaque variété de la collection (Figure 4). Par ailleurs, Montarry *et al* (sous presse) ont montré que l'infection systémique de plantes porteuses de *pvr2³* est associée dans 99% des cas à un contournement de la résistance (sélection d'un isolat de PVY muté dans la partie centrale de la VPg). Parmi les 25 variétés de la collection, des différences significatives de taux de contournement (X^2 de Pearson : $p < 2,2e^{-16}$) sont observées et deux catégories de



Tableau A		
AUDPC		
Lignée	Moyenne	Groupe
p709	35	A
Perennial	40,6	B
Chilipequin	42,35	B
Pikuti	43,4	B
Ubud Bali	43,4	B
C69	54,25	C
Piment de Thaïlande	54,95	CD
Beijin	60,9	CD
AC1448	67,375	DE
PI123474	69,3	DE
Bouso2	69,825	DE
Souman Boucoule 3	70,7	E
Piment Ile Maurice	71,925	EF
PI322719	73,5	EF
PI369940	73,5	EF
G4	75,425	EF
Bouso8	77,175	F
G1	78,225	FG
276F	84,875	GH
Jaipur	87,85	GH
Huixtan	90,475	H
Copoya	95,2	H
HD285	100,45	I

Tableau B		
Concentration		
Lignée	Moyenne	Groupe
Piment de Thaïlande	0	A
276F	0,00975	AB
P709	0,0241	BC
C69	0,0294	BCD
AC1448	0,0465	CD
Copoya	0,0906	DE
Bouso2	0,116	DE
Bouso8	0,1298	DE
Ubud Bali 2	0,134	DEF
G1	0,1526	DEF
Jaipur	0,1665	DEF
Huixtan	0,197	EF
PI123474	0,2114	EF
Pikuti	0,2126	EF
Perennial	0,231	EFG
Piment Ile Maurice	0,2444	EFG
Souman Boucoule 3	0,2498	EFG
Beijin	0,3714	EFG
Chilipequin	0,4785	EFG
PI322719	0,5643	EFG
PI369940	1,054222	FG
G4	1,115333	G
HD285	NA	

Tableau 3 : Résultat des comparaisons multiples des moyennes d'AUDPC (Tableau A) et des moyennes de concentration relative de PVY (Tableau B) pour les différentes variétés de la collection. A l'issue du test de comparaison, pour chaque caractère (AUDPC ou concentration en PVY), différents groupes de variétés ont été établis. Les groupes possédant une lettre en commun ne sont pas significativement différents au seuil $\alpha = 5\%$.

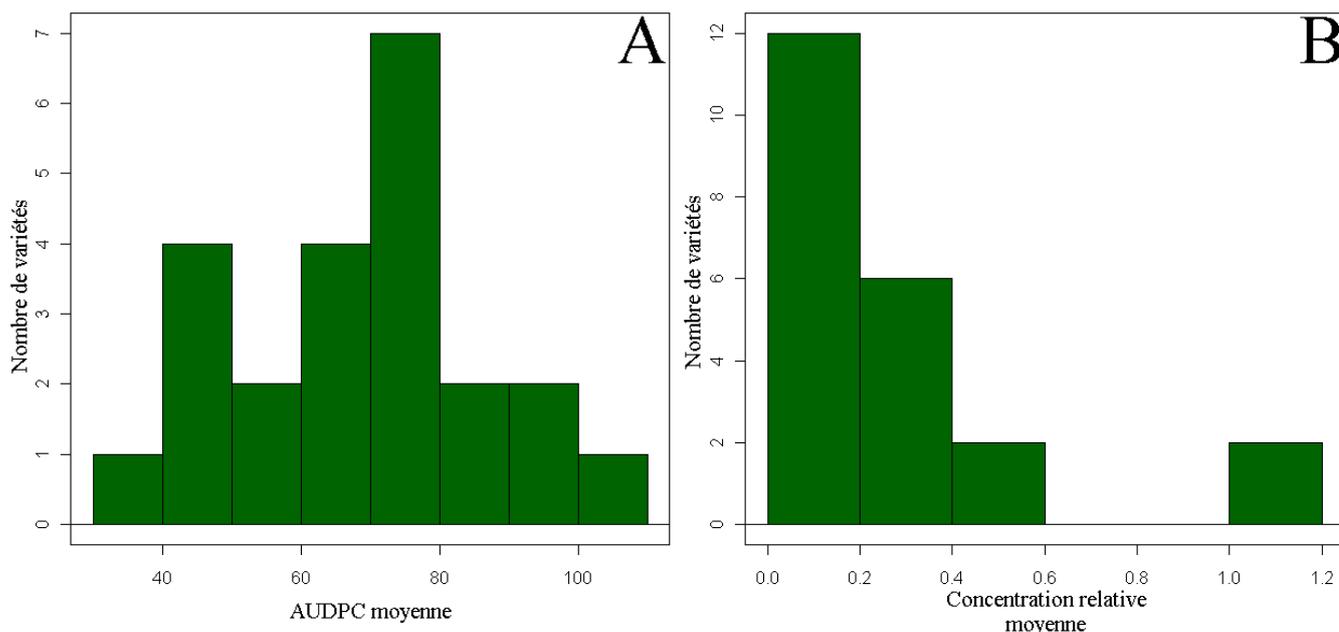


Figure 5 : Distribution du nombre de variétés en fonction de l'AUDPC moyenne de la variété (figure A) et de la concentration relative moyenne de PVY de la variété (figure B)

La variété HD285 n'apparaît pas dans la figure B car les plantes sont mortes suite à l'infection virale.



variétés peuvent être distinguées : 21 variétés parmi les 25 de la collection ne sont pas ou peu contournées (moins de 5% de contournement) tandis que quatre variétés (G4, HD285, PI369940 et Thamel) sont plus contournées que les autres (de 40 à 93,22% de contournement) (Figure 4). Les catégories « peu contournée » ou « très contournée » regroupent des variétés portant l'un ou l'autre des deux allèles du gène majeur de résistance ($pvr2^3$ ou $pvr2^4$). La durabilité de la résistance est donc indépendante de ces allèles de $pvr2$.

Chez la lignée HD285, les mutants de VPg D₁₁₉N sont majoritairement retrouvés (70% des cas) dans les plantes contournées (Montarry et al., sous presse) (Tableau 2). Pour les 4 variétés fortement contournées (G4, HD285, PI369940 et Thamel), les mutations de la protéine VPg ont été recherchées pour déterminer s'il s'agit des mêmes mutations que pour le témoin HD285 contourné par la chimère CI de tests précédents. Les mutations D₁₁₉N ont été observées dans les variétés G4, HD285 et PI369940. D'autres mutations, déjà observées sont également retrouvées dans ce test : S₁₀₁G, T₁₁₅K, D₁₁₉N, S₁₂₀C (Ayme et al., 2006), D₁₁₉G, S₁₂₀I et T₁₂₂K (Montarry et al., sous presse). Seule la mutation D₁₁₉E a été observée uniquement dans ce test et est une nouvelle substitution candidate pour le contournement de $pvr2^3$ ou $pvr2^4$. Par ailleurs, 7 plantes de la variété G4 et 2 plantes de la variété HD285 contenaient un mélange de deux virus mutants ou d'un virus mutant et de la chimère CI. Ces échantillons comprenant deux virus différents n'ont pas été pris en compte pour les analyses statistiques postérieures car ils ne constituent pas des données indépendantes.

Chez la variété Thamel, parmi les 35 plantes analysées, une seule contenait un mélange de la chimère CI et du mutant VPg D₁₁₉N, les autres étant infectées par des virus ayant une séquence identique à celle de la chimère CI. Nous avons supposé que la variété Thamel n'est pas fixée au niveau de l'allèle $pvr2^3$ et serait composée de plantes sensibles au PVY dans une large proportion, ce qui est cohérent avec le fort taux d'infection (93 % : figure 4). Elle a donc été retirée des analyses statistiques postérieures.

Tous les mutants « non D₁₁₉N » n'ont pas pu être séquencés et ont été regroupés sous le terme « autres », par opposition aux mutants « D₁₁₉N ».

Des différences significatives dans les répartitions des mutants pour deux lignées sont déterminées en réalisant un test exact de Fisher avec un seuil de 5% ($p = 0,05$) mais après correction de Bonferroni, le seuil est réévalué à 1,6% ($p = 0,016$). La répartition entre les proportions de mutants D₁₁₉N et autres pour la lignée HD285 est la même (Test exact de Fisher : $p = 0,48$) dans le test de durabilité et le test de Montarry *et al.*, ce qui indique que le test est reproductible. Il n'y a pas de différence significative dans la répartition des mutants entre les variétés G4 et HD285 témoin (Fisher : $p = 0,04$). A l'opposé, il y a une différence



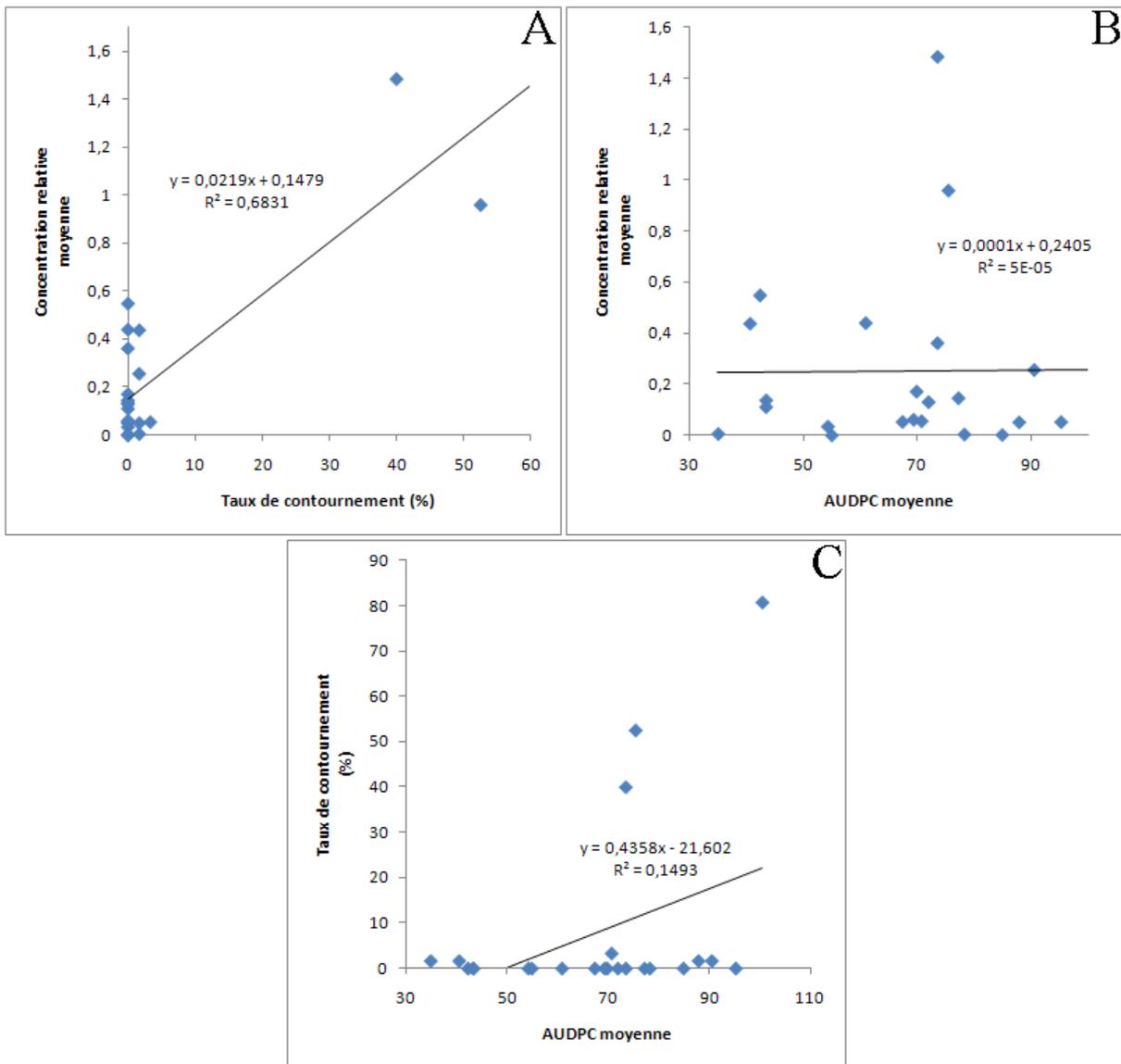


Figure 6 : Courbes de régression linéaire entre la concentration virale et le taux de contournement du gène majeur *pvr2³* ou *pvr2⁴* (A), entre la concentration virale et l’AUDPC (B) et entre le taux de contournement et l’AUDPC (C) chez les différentes variétés de piment.

Le point correspondant à la variété HD285 est absent des courbes (A) et (B) car la concentration virale n’a pas pu être déterminée en raison de la mort des plantes cette variété après inoculation de la chimère CI VPg D₁₁₉N.

significative entre les variétés PI369940 et HD285 du témoin ($p = 0,001$).

2 – Effets du fond génétique du piment sur la concentration virale et l'intensité des symptômes

Pour toutes les variétés de piment inoculées avec la chimère CI VPg D₁₁₉N, contournant les gènes *pvr2*³ et *pvr2*⁴, nous avons observé une infection de 100% des plantes, exceptée la variété AC1534 qui présentait une absence totale de symptômes et une absence de détection de PVY par ELISA. Il a été supposé pour cette variété la présence d'un autre gène majeur de résistance au PVY, en plus du gène *pvr2*³. Cette variété n'a donc pas été prise en compte lors des analyses ultérieures.

Les valeurs d'AUDPC moyenne pour les 20 plantes de chaque variété ont été déterminées, et l'histogramme de distribution des moyennes d'AUDPC a été tracé (Figure 5-A). Les valeurs se distribuent selon une loi normale (Test de Shapiro-Wilk : $p = 0,40$). Les effectifs de ce test étant petits (inférieurs à 30), seuls des tests non-paramétriques peuvent être réalisés. Les valeurs d'AUDPC pour chaque plante sont comprises entre 35 (absence totale de symptômes au cours de l'expérience) et 119 (mort de la plante dès la 2^{ème} semaine post-inoculation). Un test de Kruskal-Wallis met en évidence des différences significatives entre lignées ($p < 2,2e^{-16}$). La comparaison multiple des moyennes d'AUDPC des lignées a permis la répartition des lignées dans douze groupes (Tableau 3-A).

La concentration moyenne de chaque lignée a été calculée et l'histogramme de distribution des moyennes de concentration a été tracé (Figure 5-B). La distribution de valeurs de concentration relative s'écarte d'une loi normale (Test de Shapiro-Wilk : $p = 6,4e^{-5}$). Les effectifs de ce test étant également inférieurs à 30, il est possible de réaliser des tests non-paramétriques. On observe des différences significatives de concentration entre les différentes variétés (Test de Kruskal-Wallis : $p = 2,3e^{-12}$). La comparaison multiple des concentrations moyennes des lignées a permis la répartition des lignées dans onze groupes (Tableau 3-B). Ces lignées partageant le même gène majeur de résistance, d'autres facteurs du fond génétique interviennent dans le contrôle de la concentration virale.

3 – Corrélation entre les caractères : concentration virale, durabilité et symptômes

Les moyennes d'AUDPC ne sont corrélées ni à la concentration virale, ni au taux de contournement de la résistance (Test de corrélation de Spearman réalisé avec les valeurs moyennes pour chaque variété : $p =$



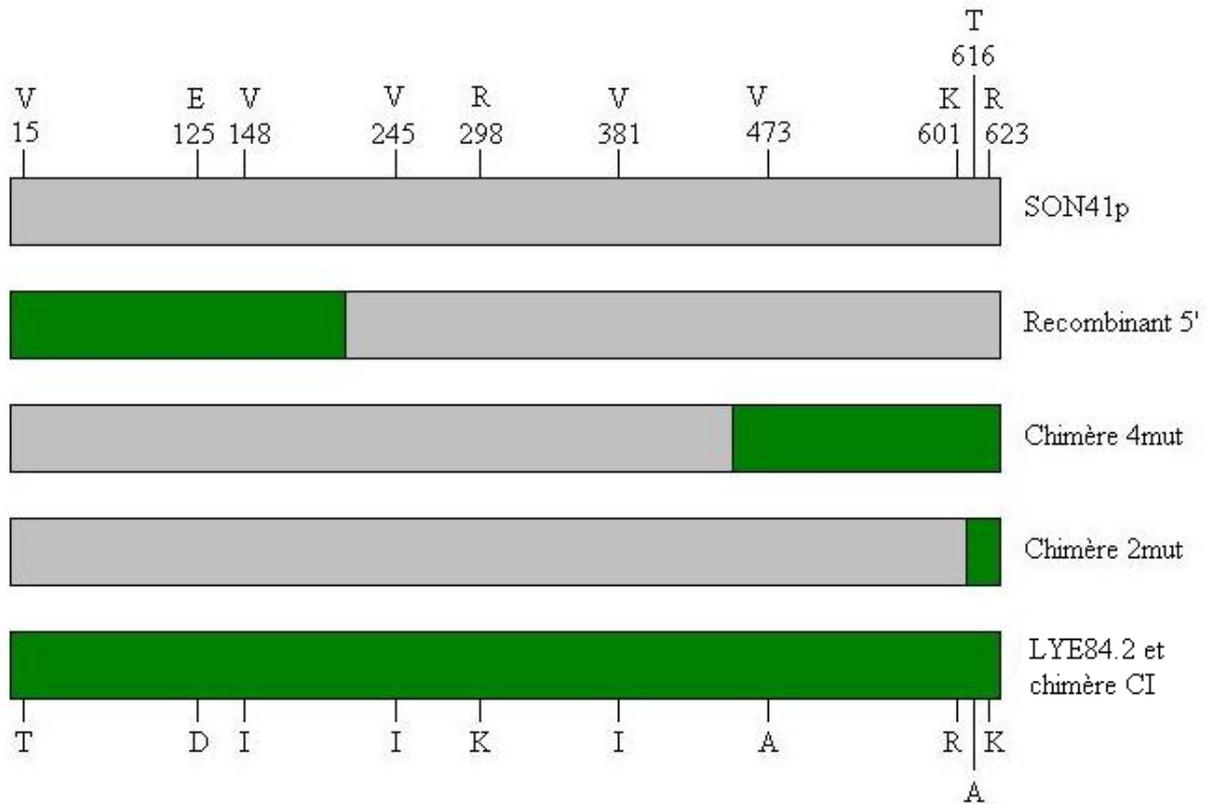


Figure 7 : Représentation de la protéine CI de SON41p, LYE84.2 et des recombinants construits ainsi que les positions des acides aminés substitués entre SON41p et LYE84.2

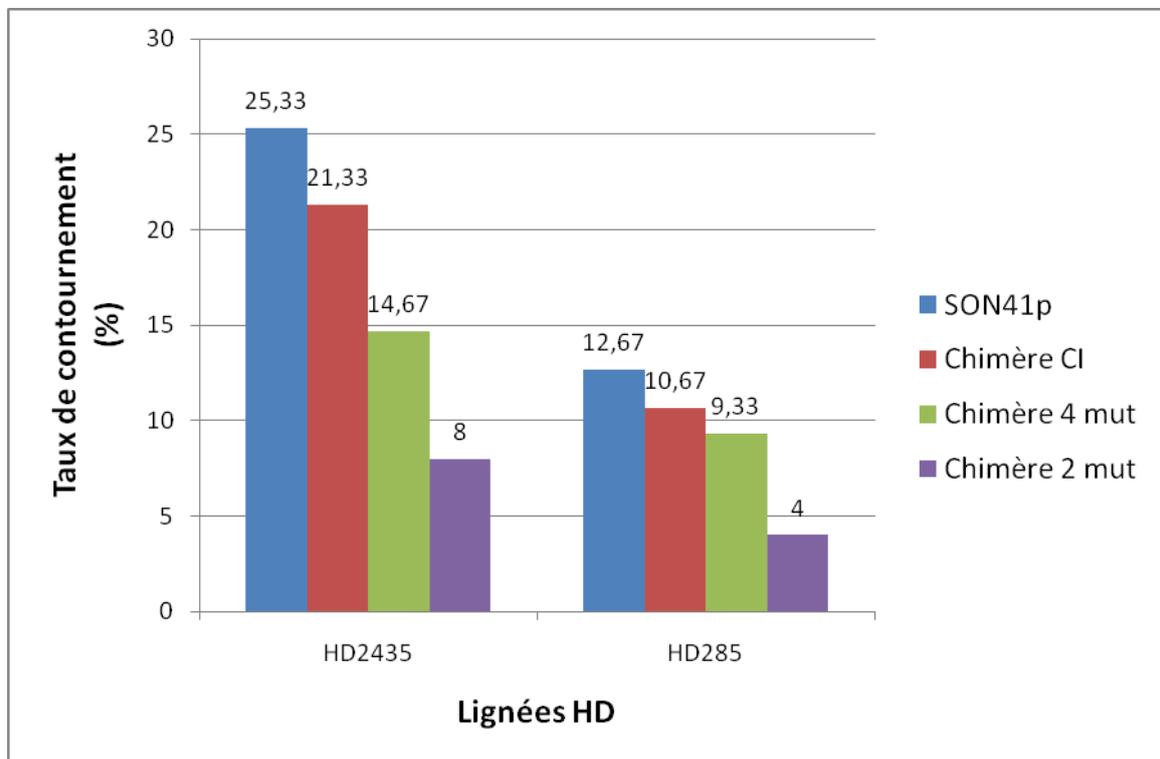


Figure 8 : Pourcentage de contournement des lignées HD2435 et HD285 parmi 150 plantes de chaque lignée inoculées avec les différents virus.

0,89 et $p = 0,25$, respectivement). A l'inverse, il existe une corrélation significative entre la concentration virale et le taux de contournement (Spearman : $p = 0,01$) (Figure 6).

II – Influence du fond génétique du PVY sur le contournement du gène *pvr2*³

1 – Construction de virus recombinants

Différentes stratégies de recombinaison ont été mises en œuvre, aboutissant à la création de trois virus recombinants. Le premier recombinant, possédant uniquement le tiers 5' (du nucléotide 1 au nucléotide 680) du gène CI de LYE84.2 dans le fond génétique de SON41p, s'est révélé non-infectieux sur *N.clevelandii* et *N.benthamiana* après bombardement et n'a pas pu être exploité. Le second virus recombinant, nommé chimère 4mut, possède le tiers 3' (du nucléotide 1340 au nucléotide 1902) du gène CI de LYE84.2 dans le fond génétique de SON41p et diffère de 4 substitutions d'acides aminés par rapport à la souche SON41p de référence : V₄₇₃A, K₆₀₁R, T₆₁₆A et R₆₂₃K (Figure 7). Le dernier virus recombinant, nommé chimère 2mut, possède l'extrémité 3' (du nucléotide 1820 au nucléotide 1902) du gène CI de LYE84.2 dans le fond génétique de SON41p et diffère uniquement de deux substitutions d'acides aminés par rapport à la souche SON41p : T₆₁₆A et R₆₂₃K (Figure 7). Ces deux dernières chimères se sont révélées infectieuses sur *N. clevelandii* et *N. benthamiana* et ont pu être utilisées lors des expériences suivantes.

2 – Capacités de contournement des virus

Nous avons estimé le pourcentage de contournement par une souche virale par le nombre de plantes infectées parmi 150 plantes inoculées pour chaque lignée HD porteuse de *pvr2*³. L'ordre du contournement par les souches virales est le même chez HD2435 et HD285, avec : SON41p (respectivement 25% et 13%), la chimère CI (21% et 11%), la chimère 4mut (15% et 9%) et la chimère 2mut (8% et 4%) (Figure 8). Ces données indiquent qu'il n'y a pas d'interaction significative entre génotype de virus et génotype de plante.

Lors de tous les tests réalisés précédemment (Montarry et al., sous presse), la chimère CI contournait toujours plus efficacement la résistance *pvr2*³ que SON41p (6 fois plus en moyenne). Ici, la chimère CI contourne moins efficacement la résistance que SON41p. Cependant, en faisant l'hypothèse que le résultat était erroné pour l'un des inocula (soit SON41p, soit la chimère CI), on peut interpréter nos résultats.

Si le résultat de SON41p était erroné et retiré de l'analyse, le taux de contournement de la chimère CI n'est pas significativement différent de celui de la chimère 4mut (Fisher : $p = 0,18$) mais est supérieur à celui de la





[Licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/)

chimère 2mut (Fisher : $p = 0,001$). Cela indiquerait que les deux substitutions (ou l'une des deux) présentes dans la chimère 4 mut et absentes de la chimère 2mut ($V_{473}A$ et $K_{601}R$) apporteraient un avantage dans le contournement de la résistance.

En considérant le résultat pour la chimère CI comme erroné, et en le retirant de l'analyse, les capacités de contournement de SON41p ne seraient pas différentes de celles de la chimère 4mut (Fisher : $p = 0,04$) mais seraient différentes de celles de la chimère 2mut ($0,0001$), ce qui indiquerait que les mutations de la chimère 2mut ($T_{616}A$ et $R_{623}K$) auraient un effet négatif sur le contournement de la résistance.

Discussion

Trois QTL de résistance partielle ont été mis en évidence et cartographiés dans la variété de piment Perennial (Caranta et al., 1997). De plus, il a été montré que la combinaison de $pvr2^3$ avec ces trois QTL conférerait une durabilité beaucoup plus forte que le gène majeur seul, prouvant ainsi l'implication du fond génétique dans la durabilité de la résistance due à un gène majeur (Palloix et al., 2009). Dans d'autres pathosystèmes, il a également été montré une action de facteurs du fond génétique dans la durabilité d'une résistance conférée par un gène majeur (Brun et al., 2010). L'existence d'autres facteurs augmentant la durabilité du gène majeur de résistance $pvr2^3$ est supposée, mais l'abondance de tels facteurs dans les ressources génétiques du piment est inconnue, ne permettant pas l'exploitation de ces facteurs dans les variétés cultivées.

Nous avons prouvé dans cette étude que des facteurs génétiques augmentant la durabilité du gène $pvr2^3$ sont largement répandus dans les ressources génétiques de l'espèce *Capsicum annuum*. En effet, 21 variétés de piment sur les 24 étudiées montrent une forte durabilité (taux de contournement inférieur à 5%, équivalent à celui observé chez Perennial) de la résistance due au gène $pvr2^3$, pourtant peu durable lorsqu'il est associé à un fond génétique sensible. Cela prouve que ces variétés portent des facteurs génétiques conditionnant la durabilité de $pvr2^3$ et $pvr2^4$ dont certains ont un effet fort, empêchant totalement le contournement de la résistance par un isolat de PVY. Cependant, le nombre et la nature des facteurs agissant sur la durabilité au sein d'une variété restent inconnus. Par ailleurs, il reste à déterminer si les mêmes facteurs interviennent dans l'ensemble des variétés ou s'il existe une diversité de facteurs augmentant la durabilité de la résistance. L'accumulation de ces facteurs génétiques pourrait permettre la création de variétés ayant une forte durabilité de résistance face au PVY. Il reste cependant à démontrer qu'il n'existe pas





[Licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/)

une interaction spécifique entre ces facteurs génétiques et la souche virale utilisée. Cependant, les résultats obtenus lors du contournement des deux variétés HD par les chimères (Figure 8) suggèrent qu'il n'y a pas d'interaction génotype plante – génotype virus sur ce caractère, puisque l'ordre de contournement et les écarts observés entre virus sont les mêmes pour les deux variétés.

Nous avons démontré que des facteurs génétiques agissent sur la durabilité de la résistance conférée par *pvr2*³ et *pvr2*⁴. Cela n'indique en rien la nature de ces facteurs, ni les mécanismes sous-jacents aboutissant à l'amélioration de la durabilité. Pour obtenir des indices sur ces possibles mécanismes, nous avons cherché à associer la durabilité de la résistance avec d'autres caractères liés à l'infection du piment par le PVY.

La réduction de concentration virale observée pour certaines variétés pourrait être le résultat d'une réduction de la multiplication virale, du mouvement de cellule à cellule ou du mouvement systémique du virus. Nous avons montré une corrélation forte entre la concentration virale dans une variété et la durabilité des gènes majeurs *pvr2*³ et *pvr2*⁴ ce qui pourrait indiquer que des facteurs génétiques communs agiraient sur ces deux caractères. Il paraît possible que la diminution de la multiplication virale ou du nombre de cellules infectées réduise la probabilité d'apparition, dans le génome du PVY, de mutations permettant le contournement, ce qui augmenterait la durabilité de la résistance. Certains résultats expérimentaux suggèrent que même en présence du gène majeur de résistance *pvr2*³, le PVY serait capable de se multiplier faiblement (Montarry et al., sous presse), ce qui permettrait l'apparition de mutations permettant le contournement de la résistance au sein même de la plante résistante. Ces mutants seraient ensuite très vite sélectionnés par la plante où ils sont apparus, sans subir de goulot d'étranglement, fréquents lors de la transmission virale de plante à plante.

L'AUDPC est un caractère prenant en compte l'intensité et la cinétique des symptômes viraux chez les plantes. Il a été montré une absence de corrélation entre l'AUDPC et la durabilité de la résistance d'une part, et entre l'AUDPC et la concentration virale d'autre part. Cependant, il a été prouvé que plusieurs facteurs du fond génétique agissent sur l'expression des symptômes chez le piment, ces facteurs pouvant impliquer à la fois la résistance et la tolérance. L'hypothèse découlant de ces absences de corrélation est que des facteurs différents agiraient sur les symptômes d'une part et sur la concentration virale et la durabilité de





[Licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/)

la résistance d'autre part. Le principal critère de sélection est basé sur l'intensité des symptômes de la plante, les plantes asymptomatiques étant préférées en sélection par rapport aux plantes symptomatiques.

Ainsi les résultats obtenus lors de cette étude apportent un nouveau critère de sélection de variétés. En effet, la sélection sur la base de la concentration permettrait également une sélection *a priori* pour la durabilité. La sélection unique sur la base de l'intensité des symptômes serait, par contre, un mauvais critère de sélection pour la durabilité.

Nous avons observé l'apparition de mutants de PVY contournants portant des mutations différentes dans la protéine VPg. Les fréquences relatives des différents mutants variaient d'une variété de piment à l'autre. Alors que chez la variété HD285, le mutant VPg D₁₁₉N est largement majoritaire (70% des virus contournants) par rapport aux autres mutants, il ne représente plus que 40% des mutants observées chez la variété G4 et 25% chez la variété PI369940. Cependant, le mutant VPg D₁₁₉N reste le plus fréquent par rapport aux autres mutants pris séparément. Il semblerait que le fond génétique de la plante influence de façon différentielle la sélection de certains mutants de PVY. Nous avons émis l'hypothèse que des gènes, dont les produits interviendraient dans le complexe d'initiation de la traduction, pourraient être polymorphes et modifieraient l'interaction de la protéine eIF4E avec la VPg, sélectionnant alors préférentiellement certains mutants de PVY.

Nous avons prouvé que le fond génétique du piment, associé aux gènes majeurs de résistance, contrôlent certains caractères tels que la durabilité de la résistance et la concentration virale. En parallèle, nous avons cherché à démontrer que le fond génétique du virus intervient aussi sur ces caractères.

Le résultat le plus vraisemblable du test de contournement par les virus recombinants créés serait l'implication des substitutions V₄₇₃A et K₆₀₁R de la protéine CI de LYE84.2, ou de l'une d'elles, dans l'augmentation du taux de contournement de la résistance. Il est également possible mais peu vraisemblable que les mutations T₆₁₆A et R₆₂₃K de la protéine CI inhibent le contournement de la résistance, et que d'autres mutations présentes dans la protéine CI de LYE84.2 l'augmenteraient.

Cependant, on ne peut pas accepter définitivement la validité de ces résultats, en raison de l'absence de différence entre les taux de contournement de la chimère CI et de SON4Ip, probablement due à une



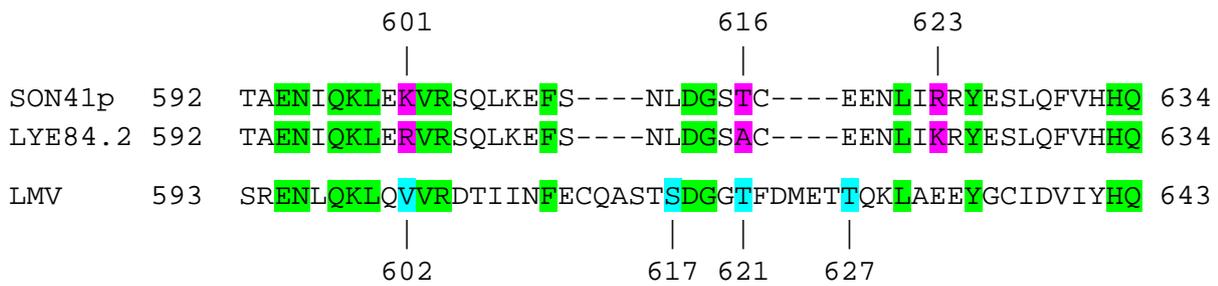


Figure 9 : Alignement d'acides aminés de l'extrémité C-terminale de la protéine CI de trois potyvirus : SON41p et LYE84.2, deux isolats de PVY et un isolat virulent de LMV.

Les acides aminés conservés entre les trois virus sont surlignés en vert. Les trois acides aminés mutés entre les isolats SON41p et LYE84.2 sont surlignés en rose et leurs positions indiquées. Les acides aminés impliqués dans les capacités de virulence et de contournement de la résistance du LMV sont surlignés en bleu et leurs positions indiquées.

différence de concentration virale dans les différents inocula. Globalement, un faible taux de contournement a été observé dans ce test, ce qui pourrait être le résultat d'effets environnementaux, la chaleur pouvant par exemple favoriser la croissance des plantes et réduire les capacités de contournement de résistance des virus. Il est également possible que la souche SON41p, après plusieurs passages successifs sur tabac, ait acquis des mutations favorisant le contournement de la résistance *pvr2*³. L'expérience de contournement par les chimères devra donc être répétée en utilisant une souche de SON41p plus récente, en équilibrant la concentration virale dans les différents inocula et réalisée en chambre climatique où les conditions environnementales sont mieux contrôlées.

L'absence de résultats probants quant à la nature des mutations de la protéine CI ayant un effet positif sur les capacités de contournement du PVY n'empêche pas d'émettre des hypothèses à ce propos. Nous avons donc cherché à appuyer ces hypothèses en comparant nos résultats à ceux observés dans un autre pathosystème.

Il a été démontré, dans le pathosystème LMV (Lettuce mosaic virus)/laitue, impliquant également un potyvirus, que la protéine CI est un facteur de pouvoir d'infection suffisant pour contourner la résistance conférée par le gène *mo1* codant pour la protéine eIF4E (Abdul-Razzak et al., 2009). Quatre substitutions d'acides aminés de l'extrémité C-terminale la protéine CI du LMV seraient impliquées dans la capacité d'infection (S₆₂₁T), ou dans l'amélioration du contournement (A₆₀₂V ; G₆₁₇S ; A₆₂₇T) (Sorel M., thèse en cours). Après alignement des séquences de l'extrémité C-terminale des protéines CI des isolats de PVY SON41p et LYE84.2 et de l'isolat virulent de LMV, deux acides aminés mutés entre les deux isolats de PVY correspondent à un acide aminé impliqué dans la capacité d'infection et un autre dans le contournement par le LMV (figure 9). Ainsi, les acides aminés 621 de la CI du LMV et 616 de la CI du PVY sont homologues, ce qui pourrait indiquer que les mutations à ce site auraient les mêmes fonctions. Cependant, chez le PVY aucune mutation de la protéine CI n'est suffisante au pouvoir d'infection. Les mutations de la protéine CI améliorant le contournement sont toujours associées à des mutations dans la protéine VPg conférant le pouvoir d'infection. La mutation T₆₁₆A de la CI du PVY aurait donc un rôle différent de la mutation S₆₂₁T de la CI du PVY.



[Licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/)

Les acides aminés 601 de la CI du PVY et 602 de la CI du LMV sont également homologues, ce qui pourrait révéler une fonction commune. La mutation A₆₀₂V dans la protéine CI du LMV, associée à S₁₂₁T, ne suffirait pas au pouvoir infectieux mais augmenterait les capacités de contournement du virus. On peut alors s'attendre à une fonction proche pour la mutation K₆₀₁R dans la protéine CI de LYE84.2, qui pourrait améliorer les capacités de contournement par le PVY, associée ou non à d'autres mutations. Appuyés par les résultats observés lors du contournement de la résistance *pvr2*³ par la chimère « 4mut », la mutation en position 601 pourrait donc être une bonne candidate pour expliquer l'amélioration des capacités de contournement conférée par la protéine CI.

Conclusion et perspectives

Nous avons mis en évidence une implication de facteurs du fond génétique responsables de la résistance partielle et l'augmentation de la durabilité du gène majeur. Ces facteurs génétiques apparaissent largement répandus dans les ressources génétiques. La cartographie comparée des QTL responsables de ces caractères devrait renforcer l'hypothèse du rôle favorable de la résistance partielle dans la durabilité des résistances et fournirait de nouveaux outils aux sélectionneurs. Nous avons déterminé qu'une faible concentration virale dans la plante après infection est un bon critère de sélection *a priori* pour le critère de durabilité de la résistance due aux gènes *pvr2*³ et *pvr2*⁴.

Concernant le rôle du fond génétique du virus sur la capacité à contourner la résistance de l'hôte, les expériences devront être répétées en conditions contrôlées (concentration des inocula, conditions environnementales) afin de délivrer des résultats cohérents avec les études précédentes. Les mutations du gène CI impliquées dans les capacités de contournement du PVY n'ont pas pu être déterminées, cependant, l'extrémité 3' du gène CI pourrait être impliquée dans ces capacités, par analogie avec d'autres pathosystèmes. L'acide aminé 601 de la protéine CI, en particulier, est un bon candidat pour expliquer l'amélioration du contournement. L'implication de cet acide aminé dans ce caractère pourra être confirmée ou infirmée par mutagenèse dirigée et mesure des capacités de contournement de la résistance par le mutant obtenu.



[Licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/)

Références bibliographiques

- Abdul-Razzak, A., Guiraud, T., Peypelut, M., Walter, J., Houvenaghel, M.C., Candresse, T., Le Gall, O., German-Retana, S., 2009. Involvement of the cylindrical inclusion (CI) protein in the overcoming of an eIF4E-mediated resistance against Lettuce mosaic potyvirus. *Molecular plant pathology*. 10(1), 109–113.
- Ayme, V., Souche, S., Caranta, C., Jacquemond, M., Chadoeuf, J., Palloix, A., Moury, B., 2006. Different mutations in the genome-linked protein VPg of Potato virus Y confer virulence on the pvr23 resistance in pepper. *Molecular plant-microbe interactions*. 19(5), 557–563.
- Brun, H., Chèvre, A.-M., Fitt, B.D., Powers, S., Besnard, A.-L., Ermel, M., Huteau, V., Marquer, B., Eber, F., Renard, M., Andrivon, D., 2010. Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist*. 185(1), 285-299.
- Caranta, C., Lefebvre, V., Palloix, A., 1997. Polygenic resistance of pepper to potyviruses consists of a combination of isolate-specific and broad-spectrum quantitative trait loci. *Molecular plant-microbe interactions*. 10(7), 872–878.
- Chung, B., Miller, A., Atkins, J., Firth, A., 2008. An overlapping essential gene in the Potyviridae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(15), 5897-5902.
- Glais, L., Tribodet, M., Kerlan, C., 2002. Genomic variability in Potato potyvirus Y (PVY): evidence that PVY-NW and PVY-NTN variants are single to multiple recombinants between PVY-O and PVY-N isolates. *Archives of virology*. 147(2), 363-378.
- Johnson, R., 1979. The concept of durable resistance. *The American Phytopathological Society*. 69(3), 198-199.
- Johnson, R., 1981. Durable resistance : definition of, genetic control, and attainment in plant breeding. *The American Phytopathological Society*. 71(6), 567-568.
- Kyle, M.M., Palloix, A., 1997. Proposed revision of nomenclature for potyvirus resistance genes in *Capsicum*. *Euphytica*. (97), 183-188.
- Montarry, J., Doumayrou, J., Simon, V., Moury, B., sous presse. Genetic background matters: a plant–virus gene-for-gene interaction is strongly influenced by genetic contexts.





[Licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/)

- Moury, B., Fabre, F., Montarry, J., Janzac, B., Ayme, V., Palloix, A., 2010. L'adaptation des virus de plantes aux résistances variétales. *Virologie*. 14(4), 227-239.
- Moury, B., Morel, C., Johansen, E., Guilbaud, L., Souche, S., Ayme, V., Caranta, C., Palloix, A., Jacquemond, M., 2004. Mutations in Potato virus Y genome-linked protein determine virulence toward recessive resistances in *Capsicum annuum* and *Lycopersicon hirsutum*. *Molecular plant-microbe interactions*. 17(3), 322–329.
- Palloix, A., Ayme, V., Moury, B., 2009. Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for breeding strategies. *New Phytologist*. 183(1), 190-199.
- Palloix, A., Ordon, F., 2011. Advance breeding for virus resistance in plants, Recent advances in plant virology. p. 195-218.
- Riechmann, J.L., Lain, S., Garcia, J.A., 1992. Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *Journal of General Virology*. 73(1), 1.
- Ruffel, S., Dussault, M.H., Palloix, A., Moury, B., Bendahmane, A., Robaglia, C., Caranta, C., 2002. A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E). *The Plant Journal*. 32(6), 1067–1075.
- Wei, T., Zhang, C., Hong, J., Xiong, R., Kasschau, K.D., Zhou, X., Carrington, J.C., Wang, A., 2010. Formation of Complexes at Plasmodesmata for Potyvirus Intercellular Movement Is Mediated by the Viral Protein P3N-PIPO. *PLoS Pathog*. 6(6), e1000962.





[Licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/)

Nom	Séquence 5' - 3'	Position dans le génome de SON41p	Orientation
LYE84 1/3 CI	AGTGTATCTTCTACTATTAGCTTGAC	4311-4336	Reverse
PVY 216	GGAGCTCATTGGATCACGAAGTTAGAC	3625-3651	Forward
S4	TGCCAGTGATGACAGGAGGT	4837-4856	Forward
SON 6K1 LYE CI	GAGCTCATTGGATCACGAAGTTAGACATCAGTCCTTG GATGATGT	3627-3670	Forward
SON CI LYE 6K2	GCATTAAGGTCTTTTGCAAGTGACGTCGTGGCTTGG	5555-5590	Reverse
SON LYE-CI 5397 FwNew	AACACTCTTAGAGCTAGATATGCAAAGGA	5397-5425	Forward
SON LYE-CI 5428 Rv	TAGTCCTTTGCATATCTAGGTGTAAGAGTG	5399-5428	Reverse
SON41-1/3CI	TACGACACAGCAGCCAGTCAAG	4295-4316	Forward
SON41-Mil	GGCACCACAGTTGGTATGGG	5856-5875	Forward
VPg-SON3bis	ATTTGCTATTATGTAAGCCCC	6390-6410	Reverse

Annexe 1 : Liste des amorces utilisées lors des PCR, RT-PCR et séquençages avec indication des séquences, de la position dans le génome de l'isolat SON41p de PVY et de l'orientation





[Licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/)



[Licence Creative Commons Paternité - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 2.0 France](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/)

Résumé

Les résistances génétiques permettent une lutte efficace contre les maladies des cultures mais sont limitées par les capacités de contournement des pathogènes. Chez le piment, le fond génétique peut améliorer la durabilité de la résistance au virus Y de la pomme de terre (PVY) due au gène majeur *pvr2*³ tandis que chez le PVY, le gène *CI* accentue ses capacités de contournement via les substitutions dans le gène d'aviorulence (*VPg*). Nous avons déterminé une corrélation entre durabilité et résistance quantitative contrôlée par le fond génétique chez des variétés de piment non apparentées, et montré que les fonds génétiques favorisant la durabilité de *pvr2*³ sont répandus dans la diversité génétique. Parallèlement, chez le PVY, nous avons recherché les mutations du gène *CI* impliquées dans l'amélioration du contournement, par création de virus recombinants. Deux acides aminés du tiers C-terminal de la protéine pourraient expliquer ces propriétés. La résistance partielle, mesurée par la concentration virale, apparaît comme un critère *a priori* de sélection pour la durabilité.

Mots-clés : contournement de la résistance, durabilité de résistance, fond génétique, Potato virus Y, piment.

Abstract

Genetic resistances have allowed an efficient struggle against crop diseases but are limited by pathogens resistance-breakdown abilities. In pepper (*Capsicum annuum*), the genetic background may improve the durability of resistance to Potato virus Y (PVY) given by the major resistance gene *pvr2*³ while the PVY gene *CI* may enhance its breakdown abilities through mutations in the avirulence gene (PVY). We determined a correlation between durability and quantitative resistance controlled by the genetic background in non-related pepper cultivars, and showed that genetic backgrounds promoting *pvr2*³ durability are widespread in the genetic diversity. At the same time, in PVY, we researched mutations in the gene *CI* involved in the breakdown improvement, creating recombinant viruses. Two amino acids in the C-terminus of the protein could explain this ability. Partial resistance, measured by viral concentration, appears as an *a priori* criterion for selection of durability.

Key words : genetic background, pepper, Potato virus Y, resistance breakdown, resistance durability.

