



HAL
open science

Caractérisation de mutants d'Arabidopsis pour les facteurs d'initiation de la traduction : impact sur la résistance aux Potyvirus

Marie Salvini

► **To cite this version:**

Marie Salvini. Caractérisation de mutants d'Arabidopsis pour les facteurs d'initiation de la traduction : impact sur la résistance aux Potyvirus. [Stage] Faculté des Sciences de Luminy. Université de la Méditerranée (Aix Marseille 2), Marseille, FRA. 2010, 30 p. hal-02814794

HAL Id: hal-02814794

<https://hal.inrae.fr/hal-02814794>

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.

Master 1
Mention Microbiologie, Biologie Végétale et Biotechnologies
Année universitaire 2009-2010

Caractérisation de mutants d'*Arabidopsis* pour les facteurs d'initiation de la traduction: impact sur la résistance aux *Potyvirus*.

Marie Salvini

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION

1-1 Pourquoi étudier les résistances aux virus chez les plantes ?	1
1-2 Les <i>Potyvirus</i>	1
1-3 Thématique du laboratoire d'accueil : la résistance des plantes aux potyvirus	1
1-3-1 Résistance aux potyvirus et facteurs du complexe d'initiation de la traduction.	1
1-4 Objectif du stage	2

2. MATERIELS ET METHODES

2-1 Matériel viral et protocole d'inoculation	3
2-2 Matériel végétal	3
2-2-1 Détermination du génotype des plantes	3
2-2-1-1 Extraction d'ARN et Reverse transcription	3
2-2-1-2 Polymerase Chain Reaction (PCR)	3
2-2-1-3 Extraction de l'ADN génomique et génotypage	4
2-2-1-4 Observation du TEV-GFP	4
2-2-2 Détection des particules virales dans les plantes par DAS-ELISA	4
2-3 Déroulement du stage	4

3. RESULTATS ET DISCUSSIONS

3-1 Bases génétiques du contournement de la résistance au TuMV chez <i>A.thaliana</i>	5
3-1-1 Présentation et résultats du test	5
3-1-1-1 Vérification des souches virales	5
3-1-1-2 Profil d'expression des gènes mutés	5
3-1-1-3 Génotypage des différents mutants	5
3-1-1-4 Réponses des différents mutants <i>A.thaliana</i> à l'inoculation par le TuMV	5
3-1-2 Discussion	6
3-2 Etude de l'infection d' <i>A.thaliana</i> par le TEV	7
3-2-1 Présentation et résultats du test	7
3-2-1-1 Génotypage des différentes populations	7
3-2-1-2 Réponses des différents mutants <i>A.thaliana</i> à l'inoculation par le TEV	8
3-2-1-3 Observation du TEV-GFP dans les différentes populations.	8
3-2-2 Discussion	9

4. CONCLUSION

5. BIBLIOGRAPHIE

6. ANNEXE

1-INTRODUCTION

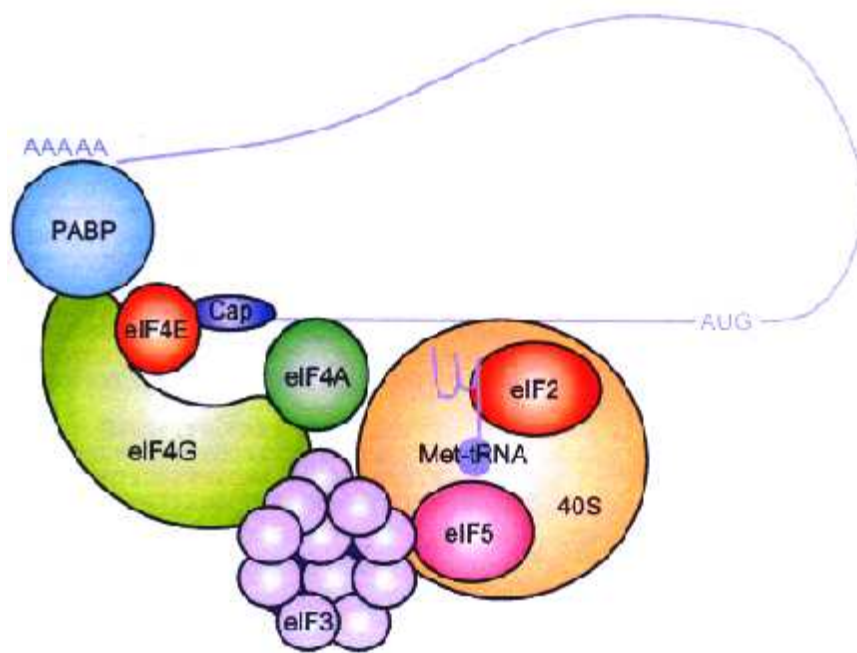


Figure 1: Le complexe d'initiation de la traduction eucaryotique. Les ARNs sont recrutés par le complexe eIF4F: on en distingue deux types chez les végétaux: eIF4F, composé de eIF4E (eIF4E1, eIF4E2 ou, eIF4E3) qui lie la coiffe des ARNm, et eIF4G qui joue le rôle de protéine d'échaffaudage pour les autres composants du complexe d'initiation de la traduction. Le deuxième complexe est eIFiso4F composé d'eIFiso4E (capable de lier la coiffe des ARNm) et eIFiso4G (eIFiso4G1 ou eIFiso4G2). Bien que les complexes eIF4F et eIFiso4F soient considérés comme équivalents pour la traduction *in vitro* d'ARNs, *in vivo*, ils semblent avoir des particularités fonctionnelles (spécificité pour certains ARNs). (D'après Caranta & Robaglia. 2005)

1-1 Pourquoi étudier les résistances aux virus chez les plantes ?

L'équipe de C. Caranta s'intéresse à la caractérisation des bases génétiques et moléculaires des résistances aux virus à ARN, qui représentent 90% des virus de plante et causent des dégâts importants aux cultures. L'enjeu est d'acquérir des connaissances et des outils pour promouvoir la lutte génétique. En effet, l'utilisation de variétés résistantes représente une alternative efficace à la lutte chimique, respectueuse de l'environnement et du consommateur, peu coûteuse pour l'agriculteur et facilement intégrable dans les systèmes de production. Un des modèles développés au laboratoire est le pathosystème *Arabidopsis thaliana* (*A.thaliana*)/potyvirus.

1-2 Les Potyvirus

Ils appartiennent à la famille des *Potyviridae*. Leur génome est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive codant pour une polyprotéine, possédant à son extrémité 3' une queue polyA et à son extrémité 5' une protéine virale appelée VPg (viral protein genome-linked) (Revers *et al.*, 1999). Les *Potyvirus* représentent un des plus grands groupes de virus phytopathogènes. Ils induisent la formation de mosaïques, de déformations des feuilles, des nécroses, et peuvent conduire à la mort des plantes. La transmission des potyvirus se fait par l'intermédiaire de pucerons.

1-3 Thématique du laboratoire d'accueil : la résistance des plantes aux potyvirus

1-3-1 Résistance aux potyvirus et facteurs du complexe d'initiation de la traduction.

Les virus sont des parasites intracellulaires obligatoires. A cause de leur petit génome codant relativement peu de protéines, ils sont dépendants de la machinerie cellulaire de la plante pour accomplir leur cycle infectieux. Aussi, si un facteur de la plante qui est nécessaire à l'accomplissement de leur cycle infectieux vient à manquer ou n'est plus disponible pour le virus, il s'ensuit que la plante devient résistante à ce virus. Des études ont montré que les facteurs eucaryotiques d'initiation de la traduction, et plus particulièrement eIF4E/eIFiso4E dont l'interaction avec la VPg du potyvirus est nécessaire à l'accomplissement de l'infection, et eIF4G/eIFiso4G, jouent un rôle déterminant dans la réussite de l'infection par le virus chez son hôte (Robaglia *et Caranta*, 2006). Les facteurs du complexe d'initiation de la traduction sont codés par de petites familles multigéniques (Figure 1) et il a été montré que les potyvirus utilisent sélectivement les différentes isoformes de la famille eIF4E et eIF4G. Par exemple, le *Turnip mosaic virus* (TuMV) utilise uniquement le complexe eIFiso4F chez *A.thaliana* puisque une mutation dans le gène *eIFiso4E* ou un double mutant *eifiso4g1 x eifiso4g2*, empêche son développement dans l'hôte (Nicaise *et al.*, 2007; Duprat *et al.*, 2002). La plante

mutante pour ces gènes devient résistante au virus. Cependant il a été noté que certaines plantes étaient tout de même infectées par le virus, dit alors contournant.

Ce contournement découle de mutations du virus, entraînant un changement d'acide aminé dans la protéine VPg (Gallois *et al.*, 2010). Chez le piment, il a été démontré que des contournements semblables entraînent la restauration d'une interaction entre la VPg et un facteur eIF4E (Charron *et al.*, 2008), mais un tel mécanisme n'a pu être mis en évidence dans le cas des souches contournantes du TuMV (Gallois *et al.*, 2010).

1-5 Objectif du stage

L'objectif du groupe est de comprendre comment les souches mutantes du TuMV peuvent contourner la résistance causée par la mutation *eifiso4e* chez *A.thaliana*. C'est une question très importante car les contournements de résistances constituent un frein à l'amélioration des plantes en limitant leur durabilité. Pour ce faire, il a été entrepris de combiner des mutations affectant des partenaires du complexe d'initiation de la traduction afin de voir si ces combinaisons pouvaient entraîner une résistance à la souche contournante. Dans le cadre de mon stage, je m'intéresserai à la combinaison des mutations affectant *eIFiso4E* et *eIF4G*. Il s'agira d'affecter simultanément les deux complexes eIF4F et eIFiso4F.

Un deuxième axe de recherche de l'équipe consiste à approfondir les connaissances sur les processus d'infection par un autre *Potyvirus*, le *Tobacco Etch Virus* (TEV) et plus particulièrement comment le virus s'adapte à un des facteurs d'initiation de la traduction, choix qui peut varier selon l'espèce infectée. En effet, le TEV utilise eIFiso4E chez *A.thaliana* et eIF4E1 chez le piment (Lellis *et al.*, 2002 ; Ruffel *et al.*, 2002). Des études vont être menées afin de voir si l'expression du facteur eIF4E1 du piment chez le mutant *eifiso4e* d'*A.thaliana* peut restaurer la sensibilité au TEV. Au laboratoire, la mutation *eifiso4e* n'est disponible qu'au sein de l'accession Columbia (Col). Or l'accession Col possède un allèle sauvage du gène *RTM1* (*Restricted TEV Movement*), qui empêche la progression systémique du virus dans la plante entière (Mahajan *et al.*, 1998), ce qui rend l'étude du virus difficile. Aussi, la mutation *eifiso4e* a été introgressée dans l'accession Landsberg *erecta* (*Ler*), mutante pour *rtm1*. Le stage aura pour but de caractériser et de vérifier le matériel végétal nécessaire à cette étude, de contrôler si nos conditions d'inoculation du TEV (souche sauvage ou virus marqué à la GFP) sur *A.thaliana* sont efficaces, et de vérifier que les plantes *rtm1 x eifiso4e* sont bien résistantes au TEV.

Les deux parties de cette étude étant indépendantes, les discussions seront traitées séparément.

2-MATERIELS ET METHODES

Tableau 1: Souches virales

Souche	abréviation	référence
TuMV CDN1 ¹	TuMV	Gallois et al., 2010
TuMV CDN1 contournant E116Q ¹	TumV cont	Gallois et al., 2010
TEV-HAT ²	TEV-HAT	Schaad et al., 1997
TEV HAT-GFP ²	TEV-GFP	Schaad et al., 1997

¹ Utilisés dans le cadre du premier axe de recherche

² Utilisés dans le cadre du deuxième axe de recherche

Tableau 2: Matériel végétal

Nom	lot de graine	génotype parents
Columbia (Col) ¹	JL.10.01.056	<i>eIFiso4E/ eIFiso4E ; eIF4G / eIF4G</i>
<i>eifiso4e</i> KO ¹	JL.10.01.060	<i>eifiso4e / eifiso4e ; eIF4G / eIF4G</i>
<i>eif4g</i> KO ¹	JL.10.01.047	<i>eIFiso4E / eIFiso4E ; eif4g / eif4g</i>
<i>eifiso4e X eif4g</i> KO ¹	JL.10.01.067 & 68	<i>eifiso4e / eifiso4e ; eif4g / eif4g</i>
Columbia (Col) ²	JL.10.01.006	<i>eIFiso4E/ eIFiso4E ; RTM1/ RTM1</i>
Landsberg <i>erecta</i> (Ler) ²	JL.10.01.007	<i>eIFiso4E/ eIFiso4E ; rtm1/ rtm1</i>
<i>eifiso4e</i> KO X <i>RTM1</i> ²	JL.10.01.008	<i>eifiso4e / eifiso4e ; RTM1 / RTM1</i>
<i>eifiso4e</i> KO X <i>rtm1</i> ²	JL.10.01.016	<i>eifiso4e / eifiso4e ; rtm1 / rtm1</i>
ségrégation <i>eifiso4e</i> KO dans <i>rtm1</i> ²	JL.10.01.017	<i>eifiso4e / eIFiso4E ; rtm1 / rtm1</i>
ségrégation <i>rtm1</i> dans <i>eifiso4e</i> ²	JL.10.01.012	<i>eifiso4e / eifiso4e ; rtm1 / RTM1</i>

¹ Utilisés dans le cadre du premier axe de recherche

² Utilisés dans le cadre du deuxième axe de recherche

Tableau 3: Origine des mutations *eifiso4e*, *eif4g* et *rtm1*

mutation	cause	référence
<i>eifiso4e</i>	insertion transposon dSpm	Duprat et al., 2003
<i>eif4g</i>	insertion T-DNA	SALK_112882 et SALK_080031 http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress
<i>rtm1</i>	variabilité naturelle	Chisholm et al., 1999

Tableau 4: Caractéristiques des amorces utilisées pour les PCR dans cette étude

cibles	nom amorce	Séquence 5' -> 3'	Fonction
<i>at-APT</i>	Z1734	TCCCAGAATCGCTAAGATTGCCTCTT	RT- PCR
<i>at-APT</i>	Z1735	CGCAAGCACATTCACAATCTTCACT	
<i>at eIFiso4E</i>	Z591F	GCCGTCTCAGAAGAAACTCAACTGCG	
<i>at eIFiso4E</i>	Z591R	CGGACCAAACAGTATCAC	
<i>at eIF4G</i>	Z2343	AAGTGCACAGAGATGCTGCA	
<i>at eIF4G</i>	Z2344	AGGACTGTTTACTGTAGCTGA	
Gènes ²	n° amorce	Séquence 5' -> 3'	Fonction
<i>at eIFiso4E</i>	Z2836	CTCATCTGCTTCATCAAATTGCTCT	PCR
<i>at eIFiso4E</i>	Z3835	AAGAAGAGTTAAATGCTCTGATGGAC	
Transposon bordure gauche	Z524	CTTATTTCAAGAGTGTGGGTTTTGG	vérification insertion transposon
<i>at eIF4G</i>	Z2342	AGGTTTCATGTTGATCAATGCC	PCR
<i>at eIF4G</i>	Z2341	GAACGCACCAGAGTGCTTATC	
T-DNA bordure gauche	Z358	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	vérification insertion T-DNA
<i>at-RTM1</i>	Z2322	ATCAGCAGAATAGAGTCGTATACAA	CAPS
<i>at-RTM1</i>	Z2323	AACTATCCGCATGAGTACATAAC	
TuMV VPg extrémité 5'	Z443F	AGAGAATTCGCAAAAAGGAAAAGAGCAAAGA	PCR, séquençage
TuMV VPg extrémité 3'	Z443R	AGACTCGAGTCACTCGTGGTCCACTGGGACGA	

¹ Utilisés pour le premier axe de recherche

² Utilisés pour le deuxième axe de recherche

2-1 Matériel viral et protocole d'inoculation

Deux membres de la famille des *Potyvirus* ont été utilisés pour cette étude. Ils sont décrits dans le tableau 1.

L'inoculum viral est préparé à partir d'un gramme de feuilles fraîches virosées (navet pour le TuMV ou tabac pour le TEV), broyé dans 4 mL de tampon de broyage (annexe) additionné d'abrasif (carborundum, 20 mg/mL) et de charbon actif (20 mg/mL). Le diéthylldithiocarbonate de sodium (DIECA) inhibe l'action des oxydases endogènes qui pourraient dénaturer le virus lors du broyage et le charbon actif neutralise les inhibiteurs d'infection. Dans le cas du TuMV, la totalité des feuilles d'*A.thaliana* sont inoculées. Dans le cas du TEV quatre feuilles, marquées à l'aide d'un feutre, sont enduites et frottées très légèrement avec cet inoculum, puis rincées à l'eau 5 minutes après l'inoculation.

2-2 Matériel végétal

Le récapitulatif des différentes plantes testées se trouve sur le tableau 2. L'origine des mutations se trouve sur le tableau 3.

2-2-1 Détermination du génotype des plantes

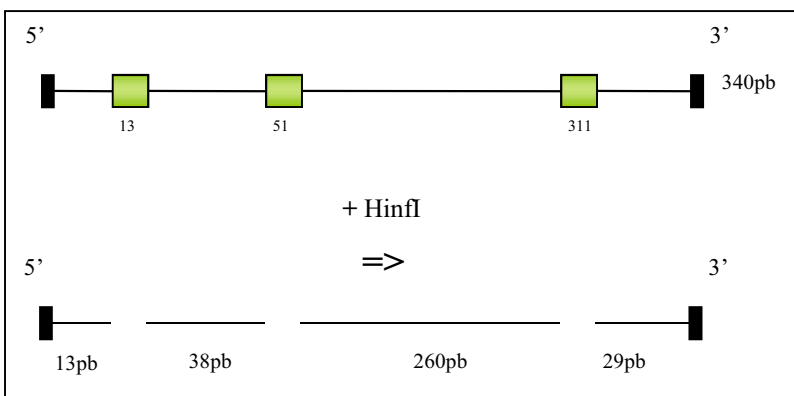
2-2-1-1 Extraction d'ARN et Réverse transcription

L'extraction des ARN totaux à partir des feuilles de plantes inoculées est effectuée selon le protocole Tri Reagent (Sigma Aldrich, St Louis, USA) (annexe). Les ADNc sont ensuite synthétisés à partir d'1 µg d'ARN estimé par spectrophotométrie NanoDrop à 260 nm. La réaction est conduite selon les instructions du fabricant (Promega, Madison, USA), en présence d'oligo-dT. Le mix utilisé contient des dNTP, un inhibiteur de RNase (RNasin, Promega), la reverse-transcriptase (AMV RT, Promega) et son tampon. Après dénaturation des ARNm à 70°C, la rétro-transcription (RT) se fait à 42°C pendant 1 heure.

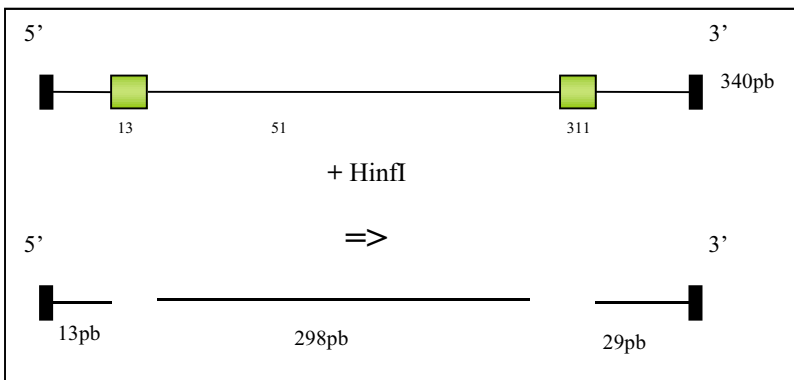
2-2-1-2 Polymerase Chain Reaction (PCR)

La réaction s'effectue dans un volume total de 20 µL contenant: 1 µL d'ADN, 2 µL de tampon 10X, 0,25 µM de dNTPs, 2,5 µM de MgCl₂, 0,75 µM d'amorce 5', 0,75 µM d'amorce 3', 1 unité d'enzyme Taq Polymérase (GoTaq DNA polymerase, Promega), le volume est ajusté avec de l'eau osmosée. Les couples d'amorces sont décrits sur le tableau 4. Le programme d'amplification utilisé est : 4 minutes à 94°C, suivies de 35 cycles de 30s à 94°C, 30s à température variable selon les amorces (T_m : 53-55°C), et 1min à 72°C; et enfin 10min à 72°C. Les fragments d'ADN sont séparés sur gel d'agarose à 1% contenant 0.02% de BEt. Le marqueur de poids moléculaire (1kb ladder, Biolabs) est utilisé pour distinguer la taille des différents fragments. La migration s'effectue à 130mV dans un tampon TAE 1% (Tris-Acetate, EDTA). Le gel est ensuite observé sous UV.

A. Col



B. Ler



C. Gel 3%:

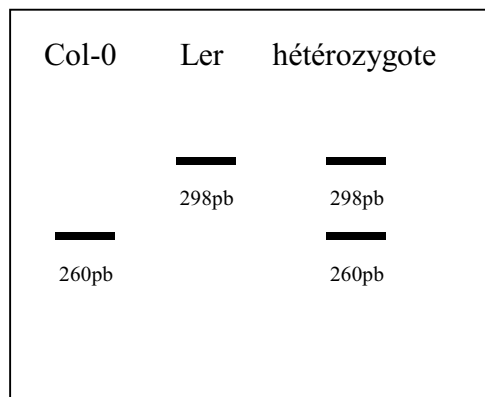


Figure 2: Méthode CAPS utilisée pour la caractérisation des plantes sauvages ou mutées pour *RTM1*:

Représentation de la séquence d'ADN du gène *RTM1* amplifiée avec les amorces Z2322 et Z2323. Les différents sites de coupure de l'enzyme de restriction *Hinfl* sont représentés par un carré vert. Le fragment amplifié à partir de l'allèle Col comporte trois sites de restriction (A) alors que pour Ler, le site situé à 51 pb est absent suite à une mutation (B) (substitution d'un G en T), il n'est par conséquent plus reconnu par l'enzyme. C: les plus grands fragments générés par la digestion sont séparables sur gel à 3% d'agarose.

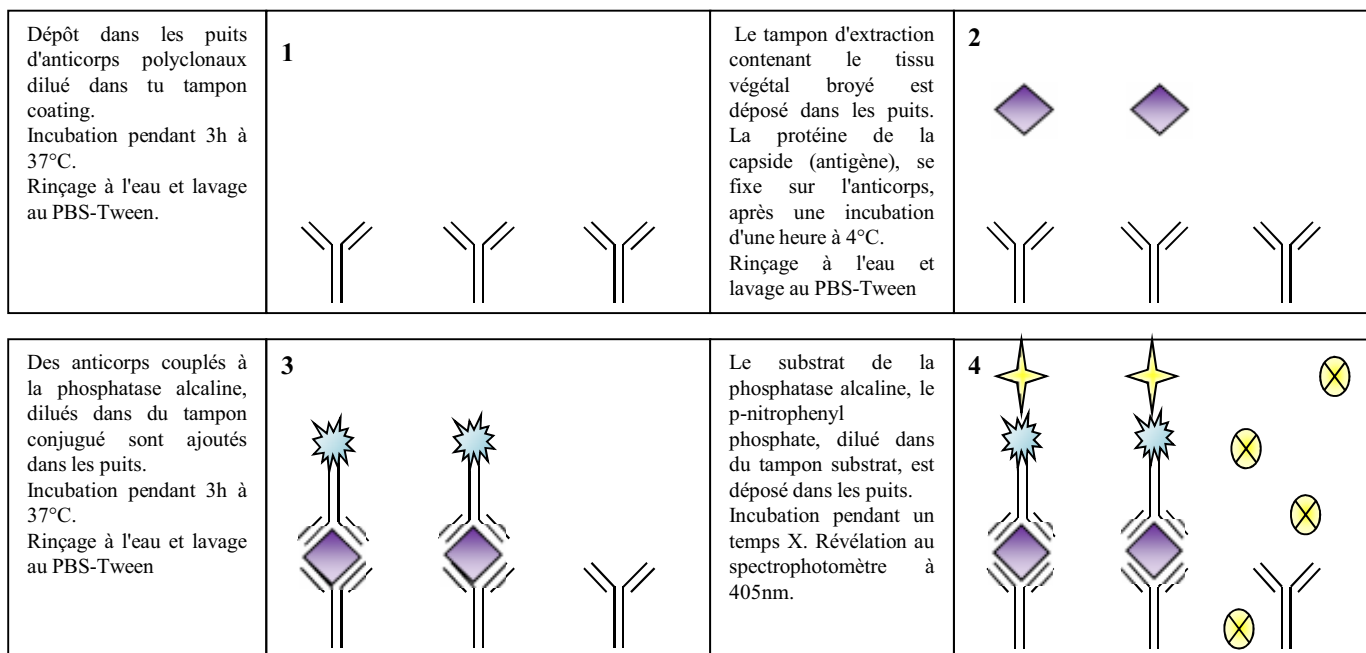


Figure 3: Déroulement du test DAS-ELISA utilisé pour la détection du TuMV: Les 4 principales étapes du test sont décrites ci-dessus.

2-2-1-3 Extraction de l'ADN génomique et génotypage

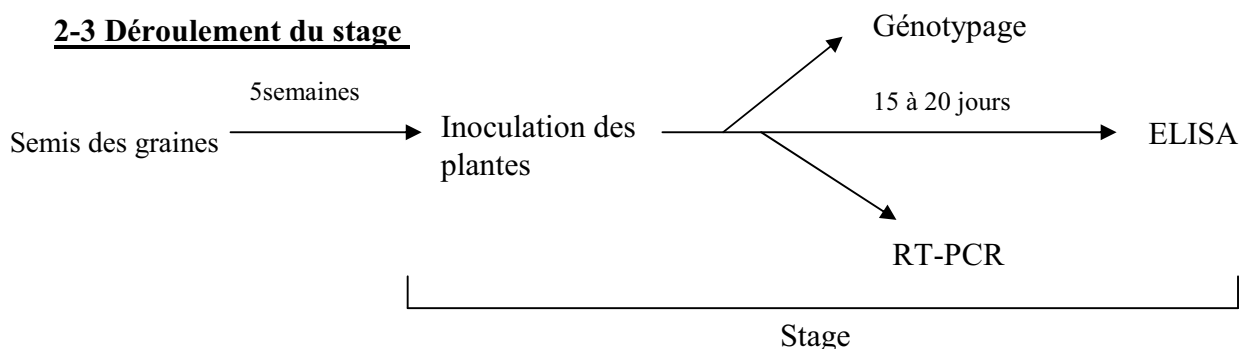
Des fragments de feuilles sont prélevés sur des plantes âgées de 5 semaines puis broyés à l'aide d'un pilon ou de billes de plombs dans un tampon d'extraction (annexe), l'ADN est ensuite précipité par ajout d'isopropanol. Les culots d'ADN sont rincés à l'éthanol à 75%. Enfin l'ADN est re-suspendu dans 100µL de tampon TE. Une PCR sera ensuite réalisée suivant le protocole vu en 2-2-2-2 avec les couples d'amorces décrites dans le tableau 4. La présence de la mutation *rtm1* est génotypée à l'aide de marqueurs CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) développés par le laboratoire de Frédéric Revers (INRA Bordeaux): un fragment du gène *RTM1* est amplifié par PCR et digéré par une enzyme de restriction *Hinfl*. Un polymorphisme pourra être mis évidence si une mutation au sein du fragment entraîne la disparition du site de restriction de l'enzyme. Le mécanisme est détaillé dans la figure 2 ci-contre.

2-2-1-4 Observation du TEV-GFP

L'observation de la progression de l'infection du TEV-GFP dans les plantes test et les plantes à caractériser, se fait sous lumière UV (DC 300 FX, Leica Microsystems, UK).

2-2-2 Détection des particules virales dans les plantes par DAS-ELISA

La résistance/sensibilité des différentes lignées au TuMV est évaluée à l'aide du test DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay). Ce test est une méthode immunochimique qui met en œuvre successivement deux anticorps pour détecter des antigènes, ici les protéines de la capsid du virus. La plante entière ou certaines feuilles (inoculées ou systémiques) sont broyées entre deux rouleaux en présence de tampon de broyage (Annexe). Les différentes étapes du test sont schématisées et expliquées sur la figure 3. La présence du virus dans le tissu végétal est révélée par l'apparition d'une coloration jaune dans les puits qui absorbe à 405nm. L'intensité de la coloration est examinée au spectrophotomètre. Dans le cas du TEV, c'est la méthode TAS-ELISA qui sera utilisée, elle met en jeu successivement trois anticorps : le premier permet la fixation des antigènes, le second permet la formation d'un complexe immun qui sera détecté par le troisième anticorps couplé à l'enzyme de révélation.



3-RESULTATS ET DISCUSSIONS

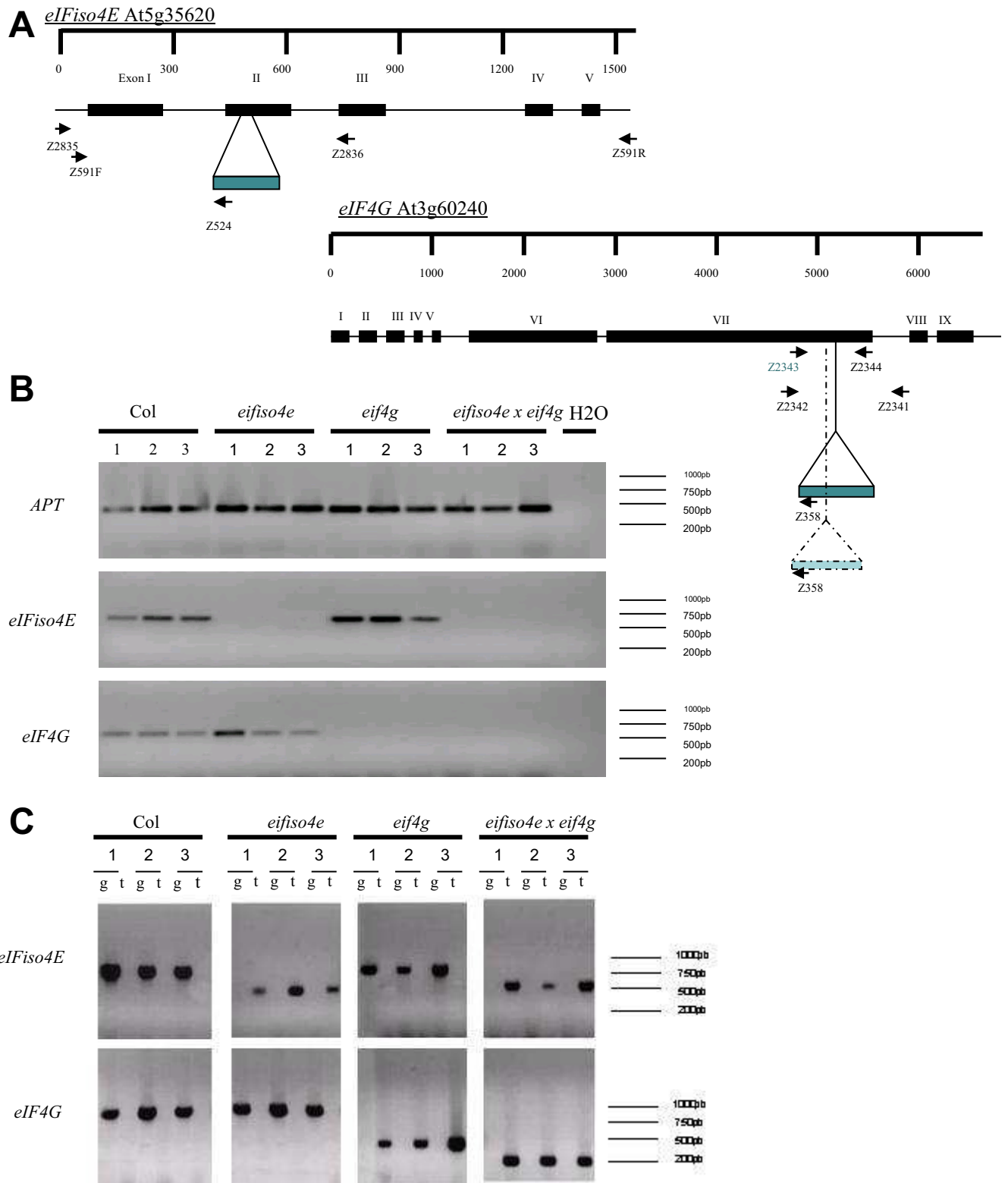


Figure 4. Génotypage des plantes Col sauvages et mutantes pour les gènes *eIFiso4E* et/ou *eIF4G*. A: Schémas illustrant les séquences génomiques des gènes *eIFiso4E* et *eIF4G*. Le transposon inséré dans la séquence de *eIFiso4E* et le T-DNA inséré dans la séquence de *eIF4G* sont représentés sous forme d'un triangle bleu. Le T-DNA qui figure en pointillé représente la construction utilisée pour le double mutant *eifiso4e x eif4g*, le T-DNA en trait plein montrant la construction utilisée pour le simple mutant *eif4g*. Les amorces décrites dans le tableau 4 sont représentées par des flèches. B: détection des mutations dans les gènes *eIFiso4E* et *eIF4G* par RT-PCR. 3 plantes sont testées pour chaque lignée mutante. Le gène *APT* est utilisé comme contrôle. Les ADNc *eIFiso4E* et *eIF4G* sont amplifiés avec les couples d'amorces Z91F/Z91R (695pb) et Z2343/Z2344 (580pb) respectivement. C: Vérification de l'insertion du T-DNA et du transposon dans les gènes d'intérêt. 3 plantes sont testées pour chaque lignée mutante. Pour chacune de ces plantes, la présence du gène (g) et la présence du T-DNA/Transposon (t) est vérifiée. Les couples d'amorces utilisés sont Z2836/Z2835 (*eIFiso4E*, 800pb), Z2835/Z524 (bordure gauche de transposon, 600pb); Z2342/2341 (*eIF4G*, 1100pb), Z2342/358 (bordure gauche du T-DNA, 600pb ou 300pb).

3-1 Bases génétique du contournement de la résistance au TuMV chez *A.thaliana*

3-1-1 Présentation et résultats du test:

Pour voir si le double mutant *eifiso4e X eif4g* est résistant à la souche contournante du TuMV, 4 populations de plantes (le double mutant, chacun des simples mutants et le sauvage) et deux souches virales, CDN1 (CDN1 ne contourne pas *eifiso4e*) et la contournante, vont être testées. La vérification du matériel génétique végétal est une étape préliminaire nécessaire, permettant la validation des résultats obtenus lors du test de résistance effectué en fin de chaîne. Deux contrôles vont être réalisés en parallèle : l'observation des profils d'expressions des gènes mutés et la vérification de l'insertion, dans les gènes d'intérêts, du transposon et du T-DNA (figure 4-A). Toutes les plantes utilisées dans ce test appartiennent à l'accession Columbia.

3-1-1-1 Vérification des souches virales

Dans un premier temps, les ADNc correspondant aux VPg du TuMV CDN1 et du TuMV Cont ont été amplifiés par RT-PCR à partir d'ARNm totaux extraits de tissus des navets infectés utilisés pour l'inoculation des *A.thaliana*. Les fragments amplifiés ont été séquencés (GATC, Allemagne). Les résultats confirment la présence d'une seule mutation entre les séquences codantes des deux VPg, confirmant que la mutation E116Q du TuMV Cont est bien présente (Gallois *et al.*, 2010).

3-1-1-2 Profil d'expression des gènes mutés

Des expériences de RT-PCR (figure 4-B) ont été effectuées afin de vérifier l'absence d'expression des ARNm pour les gènes mutés à l'état homozygote. Alors que le gène *APT*, utilisé comme contrôle, est bien exprimé pour toutes les plantes, il a bien été vérifié que les ARNm *eIFiso4E* et *eIF4G* ne sont pas exprimés chez les mutants *eifiso4e* et *eif4g*, respectivement. De même, le double mutant *eifiso4e X eif4g* ne présente aucune expression des cDNAs de *eIFiso4E* et *eIF4G*.

3-1-1-3 Génotypage des différents mutants

Par la suite, l'insertion du transposon et du T-DNA dans les gènes *eIFiso4e* et *eIF4G*, respectivement, a été vérifiée. Pour cela les lignées sauvages et mutantes ont été génotypées par PCR (figure 4-C). Ces résultats confirment que pour les plantes mutantes, les mutations sont présentes à l'état homozygote, puisque les séquences bordures des transgènes sont amplifiables, alors que les séquences génomiques des gènes mutés ne le sont pas, car interrompues par des transgènes de grande taille. On peut en outre remarquer une différence de taille entre l'amplicon du T-DNA des plantes *eif4g* et celui des plantes *eifiso4e x eif4g*, la construction utilisée n'étant pas la même, comme représenté sur la figure 4-A.

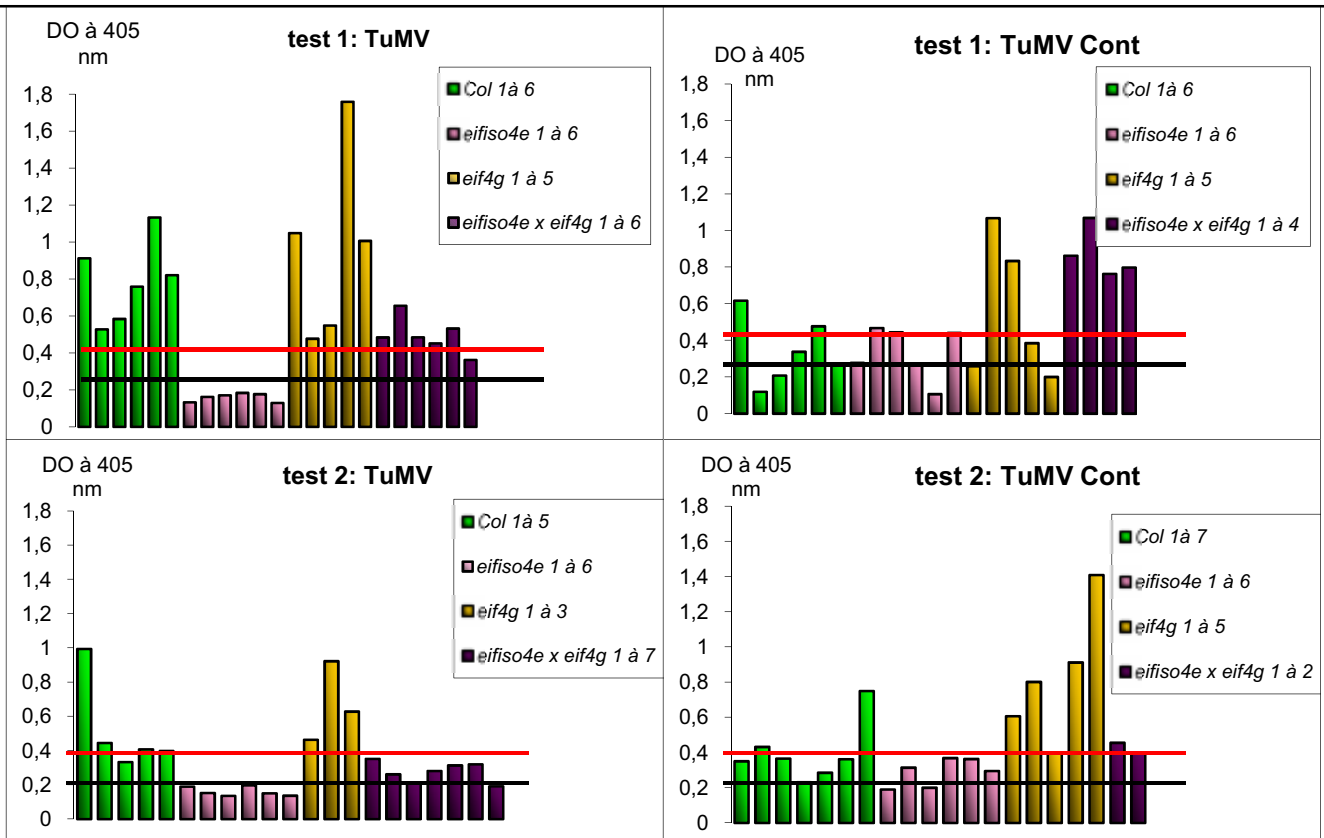


Figure 5: test de résistance au TuMV et TuMV Cont estimé par DAS-ELISA chez *A.thaliana* sauvage Col, chez les mutants *eifiso4e* et *eif4g*, et *eifiso4e x eif4g*. Chaque barre représente une plante testée, chaque couleur désigne un type de mutant. La ligne horizontale rouge montre le seuil de sensibilité, au dessus de laquelle les plantes sont considérées comme sensibles, elle correspond à trois fois la moyenne des témoins sains. La ligne horizontale noire représente le seuil potentiel de sensibilité, au dessus de laquelle les plantes sont considérées comme potentiellement sensibles, elle correspond à deux fois la moyenne des témoins sains.



Figure 6: Symptômes causés par le TuMV sur des plantes mutées pour *eIFiso4E* et/ou *eIF4G*. Observations faites 40 jours après inoculation. (Les étiquettes ont été renommées sous Photoshop pour une meilleure lisibilité). Seule la plante mutante pour *eIFiso4E* développe une hampe florale.

3-1-1-4 Réponses des différents mutants *A.thaliana* à l'inoculation par le TuMV

La détection du virus par DAS-ELISA a été faite sur plantes entières, le TuMV progressant librement au travers des tissus. Pour ce faire, deux répétitions du test ont été exécutées de façon indépendante et sont représentées sur la figure 5. L'accumulation du virus est très variable entre plantes appartenant à la même lignée. Pour cette raison, les résultats ne sont pas présentés sous forme de moyennes. Alors que certaines plantes sont totalement résistantes, d'autres présentent une forte probabilité d'infection, sans toutefois dépasser le seuil de sensibilité. Néanmoins, les profils de sensibilité/résistance sont quasiment identiques pour les plantes d'un même génotype inoculées par la même souche virale.

De plus, des différences de DO sont observées entre les tests 1 et 2. Ces différences dans la valeur de l'absorbance entre les deux tests peuvent s'expliquer par l'état de développement des plantes lors de l'inoculation. Dans le test 1 les plantes étant plus développées, avaient moins souffert du stress de l'inoculation et possédaient des feuilles en meilleur état que les plantes du test 2.

Les résultats du test du TuMV CDN1 montrent que les plantes Col et *eif4g* sont bien sensibles au virus alors que les mutants *eifiso4e* sont résistants, ce qui confirme les résultats connus de Duprat *et al.*, (2002) et Nicaise *et al.*, (2007). Mais étonnamment, le double mutant *eifiso4e x eif4g* semble être sensible au TuMV. Ce résultat est confirmé par l'analyse phénotypique des différentes plantes, 40 jours après inoculation du TuMV CDN1 (figure 6). Effectivement, seule la plante mutante pour le gène *eIFiso4E* ne semble pas affectée par le TuMV, puisqu'elle présente un développement normal, avec une hampe florale et des feuilles bien formées, les autres plantes montrant un développement stoppé, des feuilles incurvées et déformées pouvant être associés à des symptômes du virus.

Le contournement de la mutation *eifiso4e* du TuMV Cont est confirmé par le test ELISA, puisque les résultats représentés sur la figure 3-2 indiquent que toutes les lignées, sauvages ou mutantes, sont sensibles au virus.

3-1-2 Discussion

Les résultats du test de résistance des doubles mutants au TuMV Contournant montrent que celui-ci est capable de se développer sur des plantes ne possédant pas les facteurs d'initiation de la traduction eIFiso4E et eIF4G. Cette étude permet d'infirmier l'hypothèse selon laquelle le TuMV contournant pourrait recruter eIF4G de façon indépendante des différents isoformes eIF4E dans les mutants *eifiso4e* et *eifiso4g1 x eifiso4g2* (Gallois *et al.*, 2010). Ainsi, on peut penser que le facteur eIF4G n'est pas le candidat expliquant le contournement du TuMV Cont.

La sensibilité des plantes doubles mutantes *eifiso4e x eif4g* au TuMV CDN1 est un résultat inattendu, puisque le TuMV CDN1 ne peut se multiplier sur des plantes simples mutantes *eifiso4e*. Des tests ELISA plus tardifs doivent être effectués 30 à 40 jours après inoculation par le TuMV CDN1 (apparition des symptômes) afin que les valeurs de DO permettent de discriminer de manière moins ambiguë la présence du virus dans les plantes.

L'hypothèse qui peut être pour le moment avancée, consisterait en la formation d'un complexe hybride (eIF4F/eIFiso4F) qui permettrait d'une part au double mutant de survivre et d'autre part au TuMV et au TuMV Cont de pouvoir se multiplier sur des plantes sans facteur eIFiso4E ni eIF4G. Ceci suppose qu'une interaction existe entre les facteurs eIF4E et eIFiso4G. Cette hypothèse est donc appuyée par les résultats de double hybride réalisés par l'équipe (Séverine Lacombe, communication personnelle) montrant une interaction forte entre les facteurs eIFiso4G1 & eIFiso4G2 et eIF4E1 ainsi qu'une interaction avec les facteurs eIF4E2 et eIF4E3.

D'autre part, Duprat *et al.* (2002), ont montré que la mutation du facteur eIFiso4E entraîne une forte augmentation de la traduction du facteur eIF4E. Ces résultats peuvent être extrapolés: la mutation d'un facteur d'initiation de la traduction d'un complexe 4F, pourrait entraîner l'augmentation de la traduction de son isoforme dans le complexe 4F partenaire. Ainsi, la mutation des facteurs eIFiso4E et eIF4G, modifierait la balance de l'expression des facteurs eIF4E et eIFiso4G qui, en plus grande quantité, pourraient interagir et permettraient la multiplication du TuMV.

En outre, il est possible que la VPg du TuMV CDN1 puisse *in vivo* réagir avec eIF4E (1, 2 ou 3) dans ce contexte de mutation, même si aucune interaction n'a pu être démontrée entre la VPg du TuMV CDN1 et eIF4E jusqu'à présent (Gallois *et al.*, 2010). Enfin, on ne peut exclure l'hypothèse que la VPg puisse interagir avec un partenaire pour le moment inconnu (Gallois *et al.*, 2010).

3-2 Etude de l'infection d'*A.thaliana* par le TEV.

3-2-1 Présentation et résultats du test:

Dans le cadre de l'étude des mécanismes d'infection par le TEV chez *A.thaliana*, le matériel végétal *eifiso4e x rtm1* a été testé.

Afin de vérifier la résistance des plantes *eifiso4e x rtm1* au TEV, 4 populations de plantes vont être testées: Col (*eIFiso4E*, *RTM1* homozygote) et son mutant *eifiso4e* (*RTM1* homozygote), Ler (*eIFiso4E*, *rtm1* homozygote) et son mutant *eifiso4e* (*rtm1* homozygote). Dans ce dernier cas, afin de vérifier qu'il y aura corrélation entre le phénomène de résistance et la présence de la mutation *eifiso4e* à l'état homozygote, deux autres populations vont être

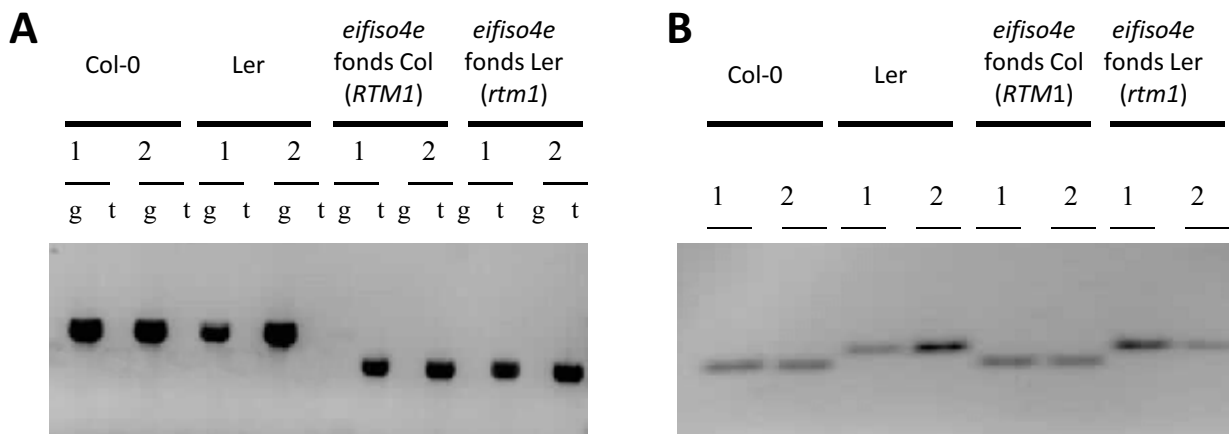


Figure 7: Génotypage des plantes mutées pour *RTM1* et/ou *eIFiso4E*. A: L'insertion du transposon dans le gène *eIFiso4E* (t) et l'allèle sauvage (g) sont testés par PCR chez deux plantes de chaque génotype testé (numérotés 1 et 2) à l'aide des couples d'oligos Z524Z2835 et Z2835-Z2836, respectivement. Le même test sera effectué pour la ségrégation *eIFiso4E* fonds *rtm1* (voir tableau 5). B: Génotypage des mêmes plantes à l'aide du marqueur CAPS RTM1 (CAPS, cf. Méthodes). Le même test sera effectué pour la ségrégation *RTM1* fonds *eifiso4e*.

Tableau 5 : Bilan du génotypage des plantes ségrégeant *eifiso4e* ou *rtm1*

	Génotype parents en F2	Génotype descendance F3	effectif total
Ségrégation <i>eifiso4e</i> fonds <i>rtm1</i>	<i>eifiso4e/eIFiso4E rtm1/rtm1</i>	28% <i>eifiso4e/eifiso4e rtm1/rtm1</i> 24% <i>eIFiso4E/eIFiso4E rtm1/rtm1</i> 48% <i>eifiso4e/eIFiso4E rtm1/rtm1</i>	21 plantes
Ségrégation <i>rtm1</i> fonds <i>eifiso4e</i>	<i>eifiso4e/eifiso4e rtm1/RTM1</i>	26% <i>eifiso4e/eifiso4e rtm1/rtm1</i> 13% <i>eifiso4e/eifiso4e RTM1/RTM1</i> 61% <i>eifiso4e/eifiso4e RTM1/rtm1</i>	23 plantes

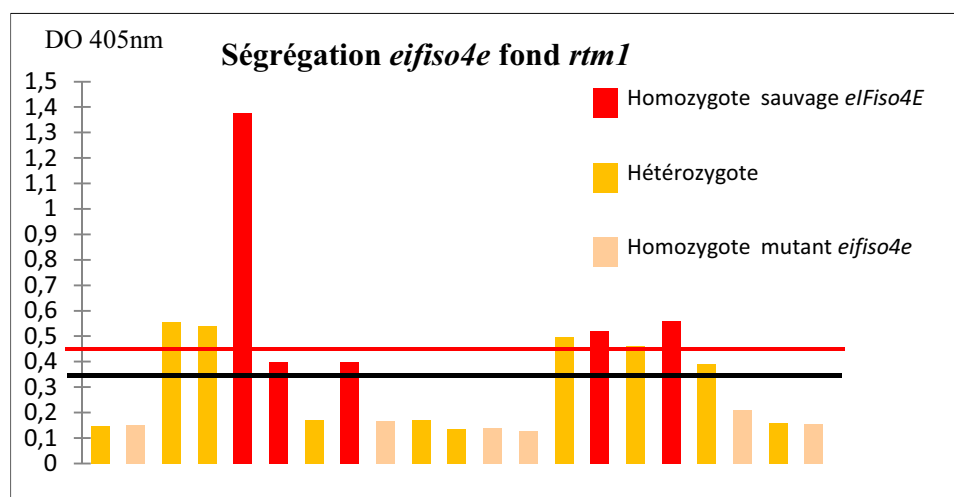


Figure 3-6: test de résistance au TEV estimé par DAS-ELISA chez *A.thaliana*, pour une population ségrégeant la mutation *eifiso4e*. Chaque barre représente une plante testée, chaque couleur désigne un génotype. La ligne horizontale rouge montre le seuil de sensibilité, au dessus de laquelle les plantes sont considérées comme sensibles, elle correspond à trois fois la moyenne des témoins sains. La ligne horizontale noire représente le seuil potentiel de sensibilité, au dessus de laquelle les plantes sont considérées comme potentiellement sensibles, elle correspond à deux fois la moyenne des témoins sains.

testées, l'une ségrégeant la mutation *rtm1* dans un fonds *eifiso4e/eifiso4e* et l'autre ségrégeant la mutation *eifiso4e* dans un fonds *Ler (rtm1/rtm1)*.

3-2-1-1 Génotypage des différentes populations

La combinaison des résultats du génotypage par PCR et par marqueur CAPS, figure 7-A et 7-B respectivement, nous permet de confirmer le génotype des plantes testées. En effet les plantes *eifiso4e* possèdent bien le transposon inséré dans la séquence du gène, mais ne montrent pas d'amplicons pour la séquence du gène *eIFiso4E*. La méthode CAPS permet de voir que les plantes *rtm1* possèdent un fragment de restriction d'environ 300pb alors que les plantes *RTM1* ont un fragment de restriction de 260pb.

Le bilan du génotypage des ségrégations figure sur la figure 3-5, les pourcentages indiqués sont en cohérence avec une ségrégation de type mendélienne. Les gènes mutés présents à l'état hétérozygote chez les parents ségrégent bien selon le rapport 1:2:1 (25% homozygote mutant: 50% hétérozygote: 25% homozygote sauvage) dans la descendance.

3-2-1-2 Réponses des différents génotypes mutants à l'inoculation par le TEV.

Un test ELISA a été effectué sur les 4 populations de plantes inoculées avec du TEV-HAT et sur la ségrégation *eifiso4e* fonds *rtm1* inoculée avec du TEV-GFP (la détection du TEV-GFP par la méthode ELISA nécessitant les mêmes réactifs que pour le TEV-HAT). Cependant, seul le test ELISA avec le TEV-GFP a été concluant (figure 8). Le test ELISA réalisé avec le TEV-HAT a montré des DO très faibles pour toutes les différentes populations testées sauf pour les témoins inoculés, le test n'a par conséquent pas été retenu ni pris en compte pour cette étude.

Les résultats du test ELISA avec TEV-GFP, même s'ils sont très faibles, sont partiellement exploitables. Comme ce test porte sur la ségrégation *eifiso4e* fonds *rtm1*, les résultats ont été analysés au regard des résultats du génotypage (tableau 5). On observe que toutes les plantes homozygotes mutantes *eifiso4e* sont résistantes au TEV, alors que les plantes homozygotes sauvages *eIFiso4E* sont sensibles ou potentiellement sensibles. Il est plus difficile de conclure quand aux plantes hétérozygotes *eIFiso4E/eifiso4e* : elles présentent des profils variés mais 50% des plantes sont sensibles ou potentiellement sensibles au TEV (n=10).

3-2-1-3 Observation du TEV-GFP dans les différentes populations.

La construction TEV-GFP utilisée est schématisée sur la figure 9. La figure 10 est une photo des deux tabacs témoins de l'expérience (inoculés en même temps que les *A.thaliana* au cours du test par le TEV-HAT et le TEV-GFP, respectivement). La présence du TEV-GFP est

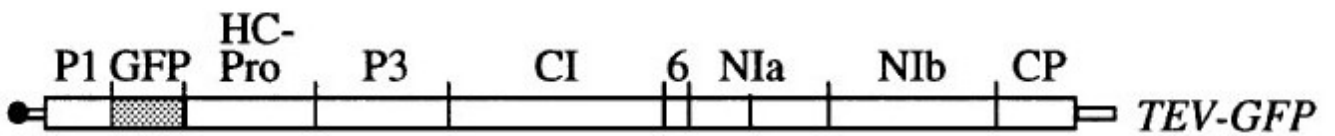


Figure 9: Diagramme schématique du génome du TEV-GFP. La séquence codante de la GFP est insérée entre les régions codantes P1 et HC-Pro. (D'après Schaad et al., 1997)

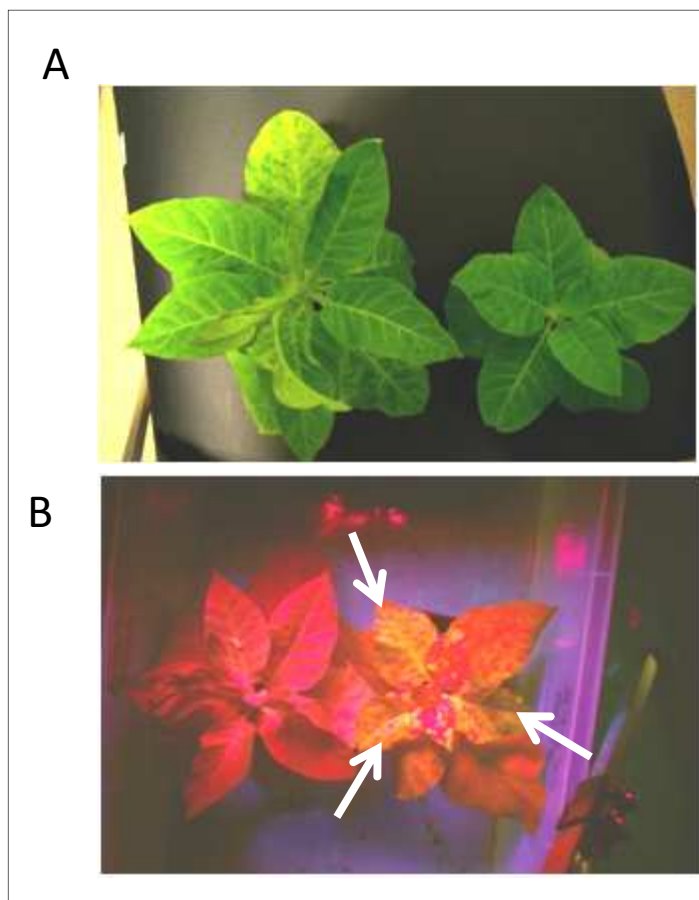


Figure 10: Détection du TEV-GFP dans du tabac. Les photos sont prises 16 jours après inoculation par du TEV-HAT (à gauche) et TEV-GFP (à droite). A: vue en lumière naturelle. B: vue sous lumière UV. A et B: à gauche: tabac infecté par du TEV-HAT, à droite: tabac infecté par du TEV-GFP. L'auto-fluorescence de la chlorophylle est révélée en rouge, la GFP en vert/jaune.

clairement visualisable par la couleur verte de la GFP qui masque l'auto-fluorescence de la chlorophylle en rouge. Néanmoins, bien qu'observable sur le tabac, la propagation en systémique du virus n'a pu être observée sur aucune plante d'*A.thaliana*, même au bout de vingt jours.

3-2-2 Discussion

L'ensemble des tests menés sur arabidopsis avec le TEV n'a pas été concluant. Les fortes valeurs de DO des contrôles positifs du test ELISA (plants de Tabac inoculés par le TEV) permettent d'écarter un problème lié au test ELISA. Il est donc probable que l'échec du test d'infection avec le TEV soit dû à la souche de TEV utilisée (souche HAT, choisie car correspondant à la construction TEV-GFP utilisée), qui ne se multiplie pas assez bien sur arabidopsis. Un nouveau test sera réalisé sur les mêmes géotypes, avec une autre souche de TEV, la souche TEV-69S, supposée mieux infecter arabidopsis. Il sera envisageable aussi de mener une double inoculation des plantes à quelques jours d'intervalles.

Cependant, à partir du test mené sur la ségrégation *eifiso4e* fonds *rtm1* inoculée avec du TEV-GFP, nous pouvons conclure d'une part que le TEV infecte les plantes sauvages *eIFiso4E/eIFiso4E* en systémique dans un fond muté *rtm1*. D'autre part, les résultats de ce test permettent de confirmer que les plantes *eifiso4e x rtm1* semblent bien résistantes au TEV. Bien qu'il faille confirmer ces résultats, il semble que ce matériel végétal pourra bien être utilisé dans la perspective d'y introduire le facteur *eIF4E1* de piment.

L'utilisation du TEV-GFP dans le but d'observer la propagation en systémique du virus est à révéifier. En effet, le virus est détectable par méthode ELISA mais pas par GFP. Il est possible que le seuil de détection de la GFP soit trop faible pour l'œil nu, mais que la GFP soit observable sous loupe binoculaire ou microscope confocal. Il est probable également que la GFP ait pu être excisée du génome du virus lors de la propagation vers les feuilles juvéniles (celles-ci étant rouges et non pas vertes dans le tabac infecté par du TEV-GFP) puisque le virus descend d'abord dans les racines avant de remonter vers les feuilles. Pour cela, l'expérience devra être répétée et dans le cas où la GFP n'est toujours pas visualisable sur arabidopsis, la présence de la GFP dans le génome du virus devra être vérifiée par RT-PCR.

4- CONCLUSION

4-Conclusions

L'étude des facteurs d'initiation de la traduction dans la recherche de résistance au TuMV contournant E116Q a conduit à tester la combinaison de mutation *eifiso4e x eif4g* chez *A.thaliana*.

La sensibilité des plantes doubles mutantes *eifiso4e x eif4g* au TuMV CDN1 est un résultat inattendu dont l'hypothèse principale serait que la formation d'un complexe hybride eIF4F/eIFiso4F permettrait au virus de se multiplier sur des plantes ne possédant pas les facteurs eIFiso4E et eIF4G. Les mutations de facteurs d'initiation de la traduction eIFiso4E et eIF4G modifieraient la balance d'expression des autres facteurs du complexe. Néanmoins, pour tester cela, l'équipe de C.Caranta est dans l'attente de l'obtention d'anticorps anti-eIF4E1, eIF4E2 (eIF4E3 possédant une séquence trop proche d'eIF4E2, son anticorps ne sera pas développé) et anti-eIFiso4E.

L'étude du double mutant *eifiso4e x eif4g* dans la recherche de résistance au TuMV est la première étape d'un plus vaste projet, visant à combiner différentes mutations dans les complexes 4F et iso4F dans le but d'élargir les spectres de résistance au potyvirus. Cette étude est cependant limitée par la létalité des plantes que certaines mutations peuvent entraîner sur *A.thaliana*, comme la combinaison *eifiso4e x eif4e1* (données non publiées).

Dans le cadre de l'étude des mécanismes d'infection par le TEV chez *A.thaliana*, le matériel végétal *eifiso4e x rtm1* a été testé.

Bien que le bilan obtenu dans le second axe de recherche ne soit concluant, les résultats des différents tests n'excluent pas la possibilité d'utilisation du TEV-GFP afin de visualiser la progression en systémique du virus chez *A.thaliana*. De plus, même si les résultats doivent être confirmés, il semble que le matériel végétal testé soit utilisable pour permettre l'introduction du facteur eIF4E1 de piment et approfondir la compréhension du mécanisme d'infection du TEV.

5- REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

Références bibliographiques :

1. **Revers, F., Le Gall, O., Candresse, T., Maule, A.J. (1999).** New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. *Mol Plant Microbe Interact* **12**, 367–376.
2. **Robaglia, C., Caranta, C. (2006).** Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends Plant Sci* **11**, 40–45.
3. **Nicaise, V., Gallois, J. L., Chafiai, F., Allen, L. M., Schurdi-Levraud, V., Browning, K. S., Candresse, T., Caranta, C., Le Gall, O. & German- Retana, S. (2007).** Coordinated and selective recruitment of eIF4E and eIF4G factors for potyvirus infection in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* **581**, 1041–1046.
4. **Duprat, A., Caranta, C., Revers, F., Menand, B., Browning, K. S. & Robaglia, C. (2002).** The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant J* **32**, 927–934.
5. **Gallois, J. L., Charron, C., Sacher, F., Pagny, G., Houvenaghel, M.C., Moretti, A., Ponz, F., Revers, F., Caranta, C., Retana, S. (2010).** Single amino acid changes in the turnip mosaic virus viral genome-linked protein (VPg) confer virulence towards *Arabidopsis thaliana* mutants knocked out for eukaryotic initiation factors eIF(iso)4E and eIF(iso)4G. *J Virol* **91**, 288–293
6. **Charron, C., Nicolai, M., Gallois, J. L., Robaglia, C., Moury, B., Palloix, A. & Caranta, C. (2008).** Natural variation and functional analyses provide evidence for co-evolution between plant eIF4E and potyviral VPg. *Plant J* **54**, 56–68
7. **Lellis, A., Kasschau, K., Witham, S., Carrington, C. (2002).** Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential rôle for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Curr. Biol.* **12**, 1046-1051.
8. **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). *Plant J* **32**, 1067-1075.
9. **Mahajan, S.K., Chislom, S., Carrington, C. (1998).** Identification and characterization of a locus (*RTMI*) that restricts long-distance movement of tobacco etch virus in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **14**(2), 177-186.
10. **Schaad, M.C., Jensen, P., Carrington, C. (1997).** Formation of plant RNA virus replication complexes on membranes: role of an endoplasmic reticulum-targeted viral protein. *The EMBO J*, **13**, 4049-4059.

6- ANNEXE

EXTRACTION ARN TRI REAGENT

○ Homogénéisation

Prélever 1 feuille jeune (50 mg) dans tube eppendorf 1.5mL. Broyer dans azote liquide.
Ajouter 600µL TRI Reagent.
Incuber 5min à température ambiante.

○ Extraction des ARN

Ajouter 120µL chloroforme. Vortexer.
Incuber 10min à température ambiante.
Centrifuger 15min 13000rpm 4°C.

○ Précipitation des ARN

Transférer la phase aqueuse (surnageant) dans un nouveau tube.
Ajouter 150µL isopropanol. Mélanger par inversion.
Incuber 30min (ou plus) à -20°C.
Centrifuger 10min 13000rpm 4°C.

○ Lavage de l'ARN

Éliminer le surnageant.
Ajouter 100µL éthanol (70% Froid).
Centrifuger 5min 12000rpm 4°C.

○ Solubilisation de l'ARN

Laisser sécher le culot 10min.
Resuspendre par pipetage dans 50µL d'H₂O (RNase free).

FORMULE DES DIFFERENTS TAMPONS

Tampon EXTRACTION ADN :

TP EXTRACTION ADN :	stock	Pour 200mL
Tris HCl pH 7.5 200mM	1M	40mL
NaCl 250mM	5M	10mL
EDTA 25mM	0.5M	10mL
SDS 0.5%	20%	5mL
EAU		135mL

Tampon BROYAGE:

TP BROYAGE:	Pour 200mL
Na ₂ HPO ₄	2,15g
DIECA	0,4g
EAU	200mL ajuster le volume

Tampon COATING :

TP COATING :	Pour 250mL
H ₂ O	200mL ajuster le vol
Na ₂ CO ₃	0,40g
NaHCO ₃	0,74g

Tampon CONJUGUÉ:

TP CONJUGUÉ :	Pour 500mL
Tampon lavage (PBS1+tween)	450mL ajuster le volume
NaN ₃	0,1g
PVP K25 de Fluka	10g
BSA (albumine bovine)	1g

Tampon SUBSTRAT

TP SUBSTRAT :	Pour 200mL
diéthanolamine	19.4mL
EAU	150mL Ajuster le volume
Diluer au moment de l'emploi 1mg de paranitrophénylphosphate par mL de tampon	

Marie Salvini (2010) Caractérisation de mutants d'*Arabidopsis* pour les facteurs d'initiation de la traduction: impact sur la résistance aux *Potyvirus*.

Résumé. Les phytovirus causent de nombreux dégâts dans le domaine de l'agriculture. L'utilisation de variétés résistantes représente une voie prometteuse de lutte contre ces bio-agresseurs. Cette étude consiste à approfondir les connaissances concernant les facteurs d'initiation de la traduction (eIF4E, eIFiso4e, eIF4G, eIFiso4G) qui constituent des cibles génétiques pour la résistance aux potyvirus chez de nombreuses plantes, dont la plante modèle *Arabidopsis thaliana*.

Le facteur eIFiso4E est essentiel à la multiplication du *Turnip mosaic virus* (TuMV, genre potyvirus), mais cette résistance peut être contournée. Nous nous sommes intéressés à la combinaison de mutations *eifiso4e x eif4g*, chez *A.thaliana*, en vue d'élargir le spectre de résistance aux virus, et notamment à ces souches contournantes. Or notre étude suggère qu'au contraire, les plantes *eifiso4e x eif4g* sont sensibles au TuMV. Cette sensibilité pourrait être causée par la redistribution, chez les mutants, de la présence d'autres facteurs d'initiation de la traduction.

En parallèle, cette étude s'inscrit dans un axe de recherche visant à approfondir les connaissances sur les processus d'infection par le *Tobacco Etch Virus* en introduisant la mutation *eifiso4e* dans un fonds Ler, qui possède gène muté *rtm1* (*Restricted TEV Movement*) afin de pouvoir observer la progression en systémique du virus. Nos tests d'inoculation par TEV (ou TEV-GFP) n'ont pas donné de résultats concluants. Néanmoins, les tests ELISA ont permis de détecter la migration systémique du virus dans un fonds *rtm1*, et laisse suggérer la résistance des plantes *eifiso4e x rtm1* au TEV. Ce matériel végétal sera utilisable pour la suite du projet de recherche.

Ces résultats constituent une étape dans la poursuite de l'étude des mécanismes moléculaires de résistances aux *Potyvirus* et dans le choix des cibles génétiques pour une résistance durable.

