

Université Bordeaux Segalen

Année 2012

Thèse N°1998

Thèse

pour le

Doctorat de l'université Bordeaux 2

Ecole doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

Mention: Sciences, Technologie, Santé

Spécialité: Biologie végétale

Présenté et soutenue publiquement le:

20 Décembre 2012

Par

POQUE Sylvain

Identification de nouveaux mécanismes de résistance au *Plum Pox Virus* chez *Arabidopsis thaliana*

Membres du Jury

Mr. Eric GOMES	Professeur Université Bordeaux 1	Président
Mr. Benoît MOURY	Directeur de Recherches INRA	Rapporteur
Mr. Jean Benoît MOREL	Directeur de Recherches INRA	Rapporteur
Mr. Fabrice ROUX	Chargé de Recherches CNRS	Examineur
Mr Daniele BASSI	Professeur Université de Milan	Examineur
Mme Véronique DECROOCQ	Directrice de Recherches INRA	Directrice de thèse

Remerciements

En premier lieu je souhaiterais remercier Mr Thierry Candresse de m'avoir accueilli au sein de l'unité de virologie.

Je tiens également à remercier ma directrice de thèse, Véronique Decroocq sans qui ce travail n'aurait pas pu aboutir. Encore merci pour son accueil dans son équipe, pour sa pédagogie, son dévouement de chaque instant et surtout sa patience. Son soutien tout au long de ces trois années m'a été d'une grande aide. Elle a su me transmettre sa passion pour la recherche.

Un grand merci à Juan Antonio Garcia, pour m'avoir permis de passer 3 mois dans son laboratoire afin d'acquérir de nouvelles techniques. Merci également merci à toute son équipe surtout Maria et Adrian pour leurs précieux conseils et leur accueil chaleureux. Ce fut une formidable expérience.

Je remercie toutes les personnes ayant pris du temps pour moi, Gaëlle qui m'a guidé lors de mes premiers pas au laboratoire, Pat pour ses précieux et nombreux marqueurs, Luc le spécialiste des clonages désespérés, Carole qui m'a permis de dompter le lightCycler et Fater pour son humour et sa bonne humeur

Je tiens aussi à remercier tout particulièrement les serristes: Thierry Mauduit et Aurélie Bailly-Poque d'avoir supporté mes nombreuses demandes de plantes, même les plus farfelues. Un grand merci à Jean Philippe Eyquard pour son expertise sur les analyses ELISA, ainsi qu'à toutes les personnes qui ont permis la mise en place et les inoculations de mes essais surdimensionnés. Bien sûr je ne peux oublier Aurélie Chague pour sa compagnie et son aide lors des nombreux prélèvements en S3, ainsi que pour les quelques ELISA qu'elle a eu à faire pour moi.

Toute ma reconnaissance va à Stéphanie pour avoir partagé ses connaissances de statisticienne et de génétique d'association, à Timi pour ses idées et nos longues discussions à la cantine. A Sylvie pour m'avoir donné de nombreux conseils tout au long de ma thèse et avoir eu la gentillesse de relire puis corriger l'introduction de cette thèse. A Fred et Val pour s'être montrés disponibles à chacune de mes requêtes.

J'aimerais remercier et saluer chaleureusement tous ceux qui m'ont entouré pendant ces 3 années, Chantal, Noëlle, Armelle, Mélodie, Daniela, Pat, Luc, Jos Geneviève, Bert, Claudine, Salma et Anas, David, Laurence, Pascal, Fred Delmas... Cette liste n'est bien sûr pas exhaustive, et que les personnes non mentionnées veuillent bien m'excuser.

Merci aussi à Maud et Amandine pour leurs amitiés et pour m'avoir soutenu pendant ces 3 ans. Plus particulièrement pour l'aide apportée lors de l'écriture de cette thèse. Je sais que ce ne fut pas toujours facile, mais elles ont toujours tenue bon. De plus j'aimerais souhaiter bon courage aux deux thésardes restante Maud et Justine, et surtout qu'elles n'oublient jamais, qu'elles sont les meilleures et qu'elles vont y arriver.

Pour finir je tiens à remercier ma famille pour m'avoir soutenu dans mes choix et pour m'avoir permis d'en arriver là... promis je vais essayer d'arrêter les études pour trouver un vrai travail.

Et le meilleur pour la fin, je remercie tout particulièrement ma femme pour son soutien H 24, et toutes les concessions qu'elle a eu à faire pour moi. Merci pour ton amour, ta patience et tout le réconfort que tu m'as apporté durant cette période, ce manuscrit t'est dédié.

Production scientifique

Publication dans des journaux à comité de lecture

Pagny* G, Paulstephenraj* PS, **Poque S***, Sicard O, Cosson P, Eyquard J-P, Caballero M, Chague A, Gourdon G, Negrel L, et al (2012) "Family-based linkage and association mapping reveals novel genes affecting Plum pox virus infection in *Arabidopsis thaliana*". *New Phytologist*

Poque S, Pagny G, Ouibrahim L, Chague A, Eyquard J-P, Candresse T, Caranta C, Mariette S, Decroocq V "Allelic variation at the *rpv1* locus is controlling partial restriction of Plum pox virus early infection in *Arabidopsis thaliana*", en cours de soumission.

Communication

Poque S., Eyquard J.P., Chague A., Garcia J.A., Candresse T., Decroocq V. "Identification and Characterization of a new recessive resistance mechanism to Plum pox virus in *Arabidopsis thaliana*". 13^{ème} rendez-vous de virologie végétal, du 16-20 janvier 2011, Aussois, France. **Poster**.

Poque S., Eyquard J.P., Chague A., Garcia J.A., Candresse T., Decroocq V. "Identification and Characterization of a new recessive resistance mechanism to Plum pox virus in *Arabidopsis thaliana*". 11^{ème} journée scientifique de l'Ecole doctorale de l'université Bordeaux 2, 7 avril 2011, Arcachon, France. **Poster**.

Poque S., Eyquard J.P., Chague A., Garcia J.A., Candresse T., Decroocq V. "Identification and Characterization of a new recessive resistance mechanism to Plum pox virus in *Arabidopsis thaliana*". École-Chercheurs, Génomique et Diversité des Caractères à Déterminisme Complexe, 15-20 mai 2011, La Colle-sur-Loup, France, **Poster**

Poque S., Eyquard J.P., Chague A., Garcia J.A., Candresse T., Decroocq V. "Identification and Characterization of a new recessive resistance mechanism to Plum pox virus in *Arabidopsis thaliana*". 12^{ème} journée scientifique de l'Ecole doctorale de l'université Bordeaux 2, 28 mars 2012, Arcachon, France. **Poster**.

Tables des matières

Tables des matières	1
Index des figures.....	5
Index des tableaux.....	6
Listes des abréviations	7
Listes des virus cités	11
Introduction	15
I. Avant-propos.....	15
II. Généralités	15
II.1. Organisation et stratégie d'expression du génome des potyvirus	15
II.2. Le cycle viral	18
III. Techniques mises en œuvre pour identifier les facteurs de l'hôte interagissant avec une/des protéine(s) virale(s).....	19
III.1. Technique d'interaction directe pour identifier les facteurs de l'hôte interagissant avec une/des protéine(s) virale(s)	20
III.1.1. Système double hybride chez la levure	21
III.1.2. Chromatographie d'affinité	22
III.1.3. Technique de retard sur gel	22
III.2. Emploi de la génétique afin d'identifier des facteurs de la plante hôte intervenant dans le cycle viral ..	23
III.2.1. Criblage de banques de mutants.....	24
III.2.2. Etude des résistances récessives naturelles	26
III.2.3. Recherche de QTL (quantitative trait loci) liés à la résistance.....	29
IV. Connaissances acquises sur cycle viral et importance des interactions Plantes/Virus.....	30
IV.1. Etapes de traduction et réplication	30
IV.1.1. Les facteurs d'initiation de la traduction: points clés de l'infection virale	30
IV.2. Mécanismes spécifique de la réplication	37
IV.2.1. Facteurs viraux indispensable à la réplication	37
IV.2.2. Membranes des organites (réticulum, golgi, chloroplaste) et réplication virale	38
IV.2.3. Les facteurs de l'hôte impliqués dans la réplication virale.....	39
IV.3. Mouvement de cellule à cellule	39
IV.3.1. Importance des plasmodesmes dans le mouvement de cellule à cellule	39
IV.3.2. Protéines virales impliquées dans le mouvement de cellule à cellule	40
IV.3.3. Facteurs de l'hôte impliqués dans le mouvement de cellule à cellule	42
IV.4. Mouvement à longue distance	44
IV.4.1. Importance du phloème dans le mouvement longue distance	44
IV.4.2. Protéines virales impliquées dans le mouvement longue distance	45
IV.4.3. Facteurs de l'hôte impliqués dans le mouvement longue distance	46
V. Conclusion.....	47
VI. Présentation du sujet d'étude.....	48
VI.1. La maladie de la sharka	48
VI.2. Un "hôte" particulier: <i>Arabidopsis thaliana</i>	50
VI.3. Contexte scientifique de la thèse	52

Chapitre 1: Family-based linkage and association mapping reveals novel genes affecting *Plum pox virus* infection in *Arabidopsis thaliana*..... 59

I. Abstract	61
II. Introduction	61
III. Material and Method	62
III.1. Plant material	62
III.2. Viral material	62
III.3. PPV resistance phenotyping	62
III.4. Construction of parental linkage maps and mapping of the genetic determinants in biparental populations	63
III.5. Mapping of the genetic determinants in multiparental population	63
III.6. Association Mapping	63
IV. Results	64
IV.1. Variation in response to PPV infection across accessions of two <i>Arabidopsis</i> core collections	64
IV.2. Linkage mapping of the recessive resistance trait(s) in biparental populations	64
IV.3. Linkage mapping of the recessive resistance trait in multiparental recombinant population	65
IV.4. Genome-wide association mapping of <i>Arabidopsis</i> resistance to PPV long-distance movement	67
IV.5. Genetic and geographic origins of PPV resistant accessions	68
IV.6. Candidate genes for the control of <i>sha3</i> resistance trait	69
V. Discussion	71
VI. Supporting Information	75

Chapitre 2: Allelic variation at the *rpv1* locus is controlling partial restriction of *Plum pox virus* early infection in *Arabidopsis thaliana* 91

I. Abstract	94
II. Introduction	95
III. Materials and methods	97
III.1. Plant material	97
III.2. Viral material	98
III.3. PPV resistance phenotyping	98
III.4. Mapping of the genetic determinants in bi-parental populations	99
III.5. Mapping of the genetic determinants in the multiparental population (MAGIC lines)	101
III.6. Association mapping	101
III.7. Virus-induced gene silencing (VIGS)	102
III.8. RNA isolation and real-time PCR	103
IV. Results	103
IV.1. Response of JEA and Col-0 <i>Arabidopsis</i> accessions to PPV infection	103
IV.2. Linkage mapping of the resistance trait in the recombinant populations JEAxCol-0	104
IV.3. Fine-mapping of <i>rpv1</i>	106
IV.4. Colocalisation between the Cvi-1 and Col-0 genetic determinant(s)	107
IV.5. Linkage mapping of the mechanical inoculation resistance trait in a multiparental recombinant population	107
IV.6. Genome Wide Association (GWA) mapping of <i>Arabidopsis</i> resistance to PPV long distance movement	109
IV.7. Effect of the parental alleles on the resistance to PPV infection	111
IV.8. One potential candidate	111
V. Discussion	112
VI. Données complémentaires	131

Chapitre 3: Cas (très) particulier de l'accession JEA..... 137

I. Comportement de PPV-R chez JEA 138

- I.1. Formation des hampes et sensibilité au PPV..... 139
- I.2. Induction florale et sensibilité au PPV 140
- I.3. Une résistance spécifique au mouvement du PPV-R dans les feuilles de rosette chez JEA..... 141
- I.4. Une implication du phloème ? 142

II. Déterminant viral permettant le contournement de la résistance chez JEA par PPV-NAT 144

- II.1. Génération de clones recombinants infectieux 145
- II.2. Comportement des quatre clones recombinants chez *Arabidopsis thaliana* 147

III. Conclusion 148

Discussion et perspectives 155

I. Identification d'un nouveau facteur de la plante hôte jouant un rôle dans l'établissement du cycle infectieux du PPV..... 156

- I.1. Rôle de la phosphoglycérate kinase chloroplastique dans la sensibilité au PPV 156
- I.2. Quels liens entre la résistance contrôlée par *rpv1* et la méthode d'inoculation ? 159

II. Une nouvelle résistance spécifique aux feuilles de la rosette 161

III. Identification d'un nouveau facteur de la plante hôte essentiel au mouvement à longue distance du PPV..... 162

IV. Conclusion 165

Matériel et méthodes 171

I. Matériel végétal 171

II. Matériel viral 173

III. Technique d'inoculation 173

- III.1. Inoculation mécanique..... 173
- III.2. Inoculation par biolistique 174
- III.3. Inoculation par agro-inoculation..... 175

IV. Détection du virus 175

- IV.1. ELISA (Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay) 175
 - IV.1.1. Préparation de la solution d'anticorps conjugué..... 175
 - IV.1.2. Test dit "ELISA"..... 176
- IV.2. Extraction d'ARN selon la méthode dite de Bertheau et RT-PCR 177
 - IV.2.1. Extraction des ARN totaux 177
 - IV.2.2. RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) 177
- IV.3. Visualisation des virus marqués 178
 - IV.3.1. Observation de la fluorescence associée à la GFP 178
 - IV.3.2. Observation de la réaction histochimique liée au gène GUS 179

V. Génotypage 179

- V.1. Extraction d'ADN en plaque 179
- V.2. Amplification d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction) 179
- V.3. Gels d'agarose 180
- V.4. Génotypage par HRM..... 180
- V.5. Séquenceur ABI 3730..... 181
- V.6. Marqueurs utilisés..... 182

VI. Analyse statistique, recherche et cartographie de QTL 183

- VI.1. Analyse statistique et étude des phénotypes 183

VI.2. Lignées biparentales	184
VI.2.1. Cartes génétiques	184
VI.2.2. Détection et cartographie de QTL.....	184
VI.2.3. Meta-analyse QTL.....	185
VI.3. Lignées multi-parentales	185
VI.4. Génétique d'association	186
VII. Virus induced gene silencing (VIGS).....	187
VII.1. Culture des souches.....	187
VII.2. Extraction des ARN totaux et synthèse des ADNc	188
VII.3. PCR temps réel	189
VIII. Construction des clones recombinants PPV-R/NAT	190
VIII.1. Amplification des fragments de PPV-NAT par immunocapture et RT-PCR	190
VIII.2. RT-PCR (Titan One - Roche)	191
VIII.3. Purification des produits obtenus.....	191
VIII.4. Purification sur gel (Freeze and Squeeze)	192
VIII.5. ADN ligase du bactériophage T4.....	192
VIII.6. Souche bactérienne	192
VIII.7. Transformation d'E coli par choc thermique.....	193
VIII.8. Milieux de culture.....	193
VIII.9. Purification d'ADN plasmidique d'E. coli.....	193
VIII.10. Enzyme de restriction	193
VIII.11. Génération des Clones infectieux	194
VIII.11.1. Clones intermédiaires.....	194
VIII.11.2. Clones infectieux.....	194
IX. Induction florale de l'accession JEA par vernalisation	195
X. Visualisation du phloème.....	195
X.1. Carboxyfluorescéine.....	195
X.2. Observation de la fluorescence	196
Références bibliographiques	201
Annexe: Tableaux complémentaires	225

Index des figures

Intro Fig 1A&B. Organisation du génome des potyvirus	16
Intro Fig 2. Représentation schématique des différentes étapes du cycle d'infection d'une cellule végétale par un potyvirus ..	18
Intro Fig 3. Complexe d'initiation de la traduction cellulaire chez les eucaryotes	31
Intro Fig 4. Cycle de réplication du génome des virus à ARN ±.....	37
Intro Fig 5. Représentation schématique d'un plasmodème	40
Intro Fig 6. Modèle proposé pour le passage du TEV de cellule à cellule au travers d'un plasmodème	41
Intro Fig 7. Dernier modèle proposé pour le passage des potyvirus de cellule à cellule impliquant le rôle de la protéine P3N-PIPO	42
Intro Fig 8. Rôle potentiel de l'interaction P3N-PIPO/PCaP1 dans le mouvement des potyvirus	43
Intro Fig 9A. Représentation schématique d'une section transversale de feuille	44
Intro Fig 9B. Coupe longitudinale d'un faisceau de phloème	44
Intro Fig 10. Symptômes induits par le <i>Plum pox virus</i> (PPV).....	49
Chap 1 Fig 1. Green fluorescence protein (GFP) and β-glucuronidase (GUS)-tagged <i>Plum pox virus</i> (PPV-R) movement is restricted to inoculated leaves of St-0, RRS-7 and Ts-1 <i>Arabidopsis thaliana</i> accessions	65
Chap 1 Fig 2. Genetic locations of <i>Arabidopsis thaliana</i> loci linked to <i>Plum pox virus</i> (PPV) restricted long-distance movement by biparental (a, b), multiparental (c) and genome-wide association (d) mapping	68
Chap 1 Fig 2e. Manhattan plot representing the genome-wide association results for SNPs in the <i>sha3</i> region.....	68
Chap 1 Fig 3. Correlation between response to <i>Plum pox virus</i> (PPV) infection and the genetic similarity of the 147 <i>Arabidopsis thaliana</i> accessions.....	70
Chap 1 Fig S1. Variation in PPV accumulation across MAGIC (Multiparent Advanced Generation Inter-Cross) line founders after agro-inoculation with pBINPPVnkGFP.....	75
Chap 1 Fig S2. Allele effects at position 21528561 on restriction of PPV long-distance movement among the 19 MAGIC founders	75
Chap 1 Fig S3. Distribution of the set of 147 accessions according to their mean viral accumulation value as a percentage of optical density value 21 days after inoculation.....	76
Chap 1 Fig S4. Linkage disequilibrium blocks over the <i>sha3</i> locus for 147 <i>Arabidopsis</i> accessions	77
Chap 1 Fig S5. PPV systemic infection of the N517845 and 801D05 RTM3 T-DNA disrupted mutants	78
Chap 1 Fig S6. Schematic representation of the clustering of genes coding for MATH domain containing proteins over the <i>sha3</i> LD bin.....	78
Chap 1 Notes S1. St-0 x <i>Ler</i> , <i>Ler</i> x RRS-7, <i>Ler</i> x Ts-1 and Ts-5 x MZ-0 linkage maps and list of primers used in this study.....	84
Chap 2 Fig 1. Graphical representation of susceptibility in <i>Ler</i> , Col-0 and Cvi-1 accessions	124
Chap 2 Fig 2. Schematic representation of near-isogenic lines (NILs) and makers used to fine map <i>rpv1</i>	126
Chap 2 Fig 3. Linkage mapping of the recessive resistance to PPV in an F8 JEAxCol-0 RIL population	127
Chap 2 Fig 4. GWAM of the resistance to PPV in the MAGIC population.....	127
Chap 2 Fig 5. Green fluorescence protein (GFP)-tagged <i>Plum pox virus</i> (PPV-R) behavior into inoculated leaves of <i>Ler</i> and a PPV-resistant LCN line (LCN-1.12).....	127
Chap 2 Fig S1. Estimation des effets des accessions sur l'accumulation virale au niveau du SNP MN1_2166964	132
Chap 2 Fig S2. Génétique d'association à l'échelle du génome complet d' <i>Arabidopsis</i> à partir de lignées multi-parentales ne présentant pas d'allèles associés à la résistance contrôlée par <i>rpv1</i>	132
Chap 3 Fig 1. Observation sous UV de l'accumulation, chez JEA, Col-0 et une plante F1 issue du croisement JEAxCol-0, de particules fluorescentes produites par l'isolat PPV-R couplé au gène codant pour la GFP.....	137
Chap 3 Fig 2. Observation sous UV de la carboxyfluorescéine chez Col-0 et Blh-1	143
Chap 3 Fig 3. Observation sous UV de la carboxyfluorescéine chez JEA	144
Chap 3 Fig 4. Représentation schématique des quatre clones recombinants générés	146
Chap 3 Fig S1. Carte génétique de la population F2 (JEA x Blh-1)	150
Chap 3 Fig S2. Distribution des 147 accessions en fonction des valeurs moyenne d'accumulation virale.....	151
Discussion Fig 1. Mécanisme de mouvement du virus impliquant SHA3 ou RTM3	164
M&M Fig 1. Création d'une population de lignées recombinantes (RIL).....	171
M&M Fig 2. Création de lignées quasi isogénique (NIL).....	172
M&M Fig 3. Ensembles des conditions utilisées pour induire l'induction florale de l'accession JEA.....	195

Index des tableaux

Intro Tab1. Fonctions attribuées aux différentes protéines virales	17
Intro Tab2. Facteurs de la plante hôte interagissant avec une/des protéine(s) virale(s)	20
Intro Tab3. Résistances récessives naturelles aux virus partiellement caractérisées	27
Intro Tab4. Résistance récessive aux virus dont le gène sous-jacent est encore inconnu	28
Intro Tab5. Facteurs de la plante hôte jouant un rôle dans le cycle infectieux	35
Intro Tab6. Résultats phénotypique de l'inoculation de la collection cœur 24 du VNAT avec 5 souches de PPV	53
Chap 1 Tab 1. Identification of recessive, allelic resistance mechanism(s) of <i>Plum pox virus</i> (PPV) systemic restriction in F1 <i>Arabidopsis thaliana</i> populations	62
Chap 1 Tab 2. Identification of three <i>Arabidopsis thaliana</i> quantitative trait loci (QTLs) involved in recessive restriction of Plum pox virus (PPV) long-distance movement in bi- and multiparental populations	66
Chap 1 Tab 3. Candidate genes associated with the most significant single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the <i>sha3</i> region	71
Chap 1 Tab S1. PPV infection phenotype of the accessions of the two <i>Arabidopsis</i> core collections challenged by agro-inoculation with the pBINPPVnkGFP PPV infectious cDNA clone	79
Chap 1 Tab S2. <i>Arabidopsis</i> accessions genotyped with the full 250 K SNPs dataset and challenged with PPV by agro-inoculation	80
Chap 1 Tab S3. 100 top markers when testing genome wide association with restricted PPV systemic infection in <i>Arabidopsis</i> accessions	81
Chap 1 Tab S4. Annotation of the LG3 cluster of genes coding for MATH domain-containing proteins and others	83
Chap 2 Tab 1. Primers use to fine map <i>rpv1</i> in LCN near isogenic lines and JEA x Col-0 RIL population	123
Chap 2 Tab 2. Phenotype of JEA, Col-0 and Cvi-1 when mechanically inoculated with the pICPPVnkGFP infectious clone	124
Chap 2 Tab 3. Identification of <i>Arabidopsis</i> genomic regions controlling restriction of PPV infection in bi- and multiparental populations	125
Chap 2 Tab 4. <i>Arabidopsis</i> accessions genotyped with the full 250K SNPs data set and challenged with PPV by mechanical inoculation	128
Chap 2 Tab 5. Most informative SNPs in the 500 top markers when testing genome wide association with restricted PPV systemic infection in <i>Arabidopsis</i> accessions	129
Chap 3 Tab 1. Réponse des accessions JEA et Col-0 à l'infection par PPV-R et PPV-NAT	137
Chap 3 Tab 2. Agro-inoculation avec pBINPPVnkGFP de Col-0 et JEA fleurissant naturellement ou après induction par vernalisation	140
Chap 3 Tab 3. Nombre de mutations entre chaque fragment PPV-NAT cloné et la séquence disponible dans la base de données du NCBI	145
Chap 3 Tab 4. Inoculation mécanique de JEA, Col-0 et <i>Ler</i> avec les quatre clones recombinants infectieux	147
Chap 3 Tab S1. Listes des marqueurs utilisés pour réaliser la carte génétique de la population F2 (JEA x Blh-1)	150
M&M Tab 1. Amorces spécifiques de chacun des recombinants viraux	178
M&M Tab 2. Liste des marqueurs de sélections pour les différents clones utilisés lors du VIGS	188
M&M Tab 3. Amorces utilisées pour les réactions de PCR temps réel	190
M&M Tab 4. Amorces utilisées pour générer les différents fragments PPV-NAT	191

Listes des abréviations

TAIR	The Arabidopsis Information Resource
NASC	Nottingham Arabidopsis Stock Centre
CATdb	Complete Arabidopsis Transcriptome Database
CNB	Centro Nacional de Biotecnologia
BL-3	Biosafety Level 3

Produits et Réactifs

PBS	Tampon Phosphate Salin
PVP	PolyVinylPyrrolidone
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétracétique
DIECA	Diethyl Dithiocaremate de Sodium
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
pNPP	Para-Nitrophényl-Phosphate
LB	Luria-Bertani
SOC	Super Optimal broth with Catabolite repression
TBE	Tris Borate EDTA
BEt	Bromure d'Ethidium
MES	Acide 2-(N-morpholino) Ethanesulfonic
F/Z	Freeze and Squeeze
AcNa	Acetate de Sodium
EMS	Ethyl-Methanesulfonate
FAM	6-Carboxyfluorescéine
CF	Carboxyfluoresceine
GFP	Green Fluorescent Protein
GUS	β -glucuronidase
X-Gluc	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Glucuronide
IgG	Immunoglobuline G
BSA	Sérum Albumine Bovine
Triton X100	Octylphenol Polyethoxylate
UV	Lumière Ultra-Violette

Marqueurs Moléculaire

SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSLP	Simple Sequence Length Polymorphism
SSR	Simple Sequence Repeats
ISBP	Insertion Site-Based Polymorphism
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism
CAPS	Cleaved Amplified Polymorphic Sequences

Unités

DO	Densité Optique
rpm	Revolutions Per Minute
k	Kilo-(10^3)
c	Centi-(10^{-2})
m	Milli-(10^{-3})
μ	Micro-(10^{-6})
n	Mano-(10^{-9})
p	Pico-(10^{-12})
% p/v	Pourcent (Poids par volume)
% p/p	Pourcent (Volume par volume)
°C	Degré Celsius
Da	Dalton
h	Heure
min	Minute
s	Seconde
nm	Nanomètre (Longueur d'Onde)
psi	Pound Per Square Inch
L	Litre
g	Gramme
M	Mole par Litre
mol	Mole
PM	Poids Moléculaire
pH	Potentiel Hydrogène
jai ou dpi	Jours Après Inoculation ou Day Post Inoculation

Méthodes

ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay
HRM	High Resolution Melting Curve
EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
VIGS	Virus Induced Gene Silencing

Statistique et Génétique quantitative

ANOVA	Analyse de la variance (ANalysis Of Variance)
χ^2	Khi-deux
QTL	Locus à Effets Quantitatifs (Quantitative Trait Locus)
LOD	Logarithme de Vraisemblance (Logarithm of the Odds)
IM	Cartographie d'Intervalle Simple (Interval Mapping)
CIM	Cartographie d'Intervalle Composite (Composite Interval Mapping)
EMMA	Efficient Mixed-Model Association
RIL	Recombinant Inbred Lines
NIL	Near Isogenic Lines
MAGIC	Multiparent Advanced Generation Inter-Cross
GWA	Génétique d'Association à l'Echelle du Génome Entier
ln	Logarithme Népérien
Log	Logarithme
R^2	Pourcentage de Variance Phénotypique Expliqué
h^2	Héritabilité

Acides Nucléique, Nucléotides

A	Adénine
T	Thymine
G	Guanine
C	Cytosine
U	Uracile
%GC	Teneur en Guanine et Cytosine
dNTP	Désoxyribonucléotides (dATP, dCTP, dGTP et dTTP)
ADNc	ADN complémentaire
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ARN	Acide RiboNucléique
ARMm	ARN messenger
ARNt	ARN de transfert
T-DNA	ADN de transfert
ATP	Adénosine-TriPhosphate
GTP	Guanosine TriPhosphate
nt	Nucleotides
bp	Paire de Base
kb	Kilo Paire de Base
Mb	Mega Paire de Base
cM	Centimorgan
UTR	Untranslated Region
ORF	Cadre Ouvert de Lecture (Open Reading Frame)
Tm ou Ta	Température de Fusion ou Température d'hybridation
PCR	Polymerase Chain Reaction
RT-PCR	Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
AA	Acide Aminé
RNP	RiboNucléoProtéine

Souches et isolats viraux de PPV cités

D	Dideron
M	Marcus
Rec	Recombinant
C	Cherry
W	Winoma
EA	El Amar
T	Turquie
R	Rankovic
NAT	Non-Aphid Transmissible

Protéines virales

CI	Protéine d'Inclusion Cyindrique
CP	Protéine de Capside
MP	Protéine de Mouvement
VPg	Protéine Virale Liée au Génome
HcPro	Facteur Assistant / Protéase
NIa	Protéine d'Inclusion Nucléaire a
NIb	Protéine d'Inclusion Nucléaire b
Pro	Protéinase
PIPO	Pretty Interesting Potyviridae ORF
RdRp	ARN Polymérase ARN Dépendante

Facteurs cellulaires

eIF	Facteur d'Initiation de la Traduction
PABP	PolyA Binding Protein
PME	Pectine Methylesterase
PVIP	Potyvirus VPg-Interaction Protein
HIP1	HCpro Interacting Protein1
HSP	Protéines de Choc Thermique
PDLP	PlasmoDesme-Located Proteins
rpv	Restricted <i>Plum pox virus</i>
sha	Résistance à la sharka
RTM	Restricted TEV Movement
PCaP1	Plasma-Membrane Associated Cation Binding Protein
SYTA	Synaptotagmin
AtRH8	<i>Arabidopsis thaliana</i> Dead-box RNA helicase like
PpDDXL	<i>Prunus persica</i> Dead-box RNA helicase like
NbEF1	<i>N. benthamiana</i> Elongation Factor 1
PGK	Phosphoglycerate Kinase
cPGK	Chloroplast Phosphoglycerate Kinase

Abrebiations autres

CC	Coiled Coil
CW	Paroi Cellulaire
MS	Mésophylle
BS	Cellule du Parenchyme Périvasculaire
Cco	Cellules Compagnes
PP	Cellules de Parenchyme Phloémien
SE	Cellules des Tubes Criblés
SP	Pore d'Elément Criblé
PPU	Plasmodesmes Branchés (Unités Pore-Plasmodesma)
SEL	Seuil d'Exclusion Limite

Listes des virus cités

Abréviation	Espèce	Genre	Famille
BCMV	<i>Bean common mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
BCMV	<i>Blackeye cowpea mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
BiMoV	<i>Bidens mottle virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
BYMV	<i>Bean yellow mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
CeMV	<i>Celery mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
ChiVMV	<i>Chilli veinal mottle virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
CIYVV	<i>Clover yellow vein virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
LMV	<i>Lettuce mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
MWMV	<i>Watermelon Moroccan mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
PepMoV	<i>Pepper mottle virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
PPV	<i>Plum pox virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
PRSV	<i>Papaya ringspot virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
PSbMV	<i>Pea seed-borne mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
PTV	<i>Peru tomato mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
PVA	<i>Potato virus A</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
PVMV	<i>Pepper veinal mottle virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
PVY	<i>Potato virus Y</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
PWV	<i>Passionfruit woodiness virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
SMV	<i>Soybean mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
TVMV	<i>Tobacco vein mottling virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
WMV	<i>Watermelon mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
YMV	<i>Yam mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
ZYFV	<i>Zucchini yellow fleck virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
ZYMV	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>	<i>Potyvirus</i>	<i>Potyviridae</i>
BaMMV	<i>Barley mild mosaic virus</i>	<i>Bymovirus</i>	<i>Potyviridae</i>
BaYMV	<i>Barley yellow mosaic virus</i>	<i>Bymovirus</i>	<i>Potyviridae</i>
BaMV	<i>Bamboo mosaic virus</i>	<i>Potexvirus</i>	<i>Alphaflexiviridae</i>
PVX	<i>Potato virus X</i>	<i>Potexvirus</i>	<i>Alphaflexiviridae</i>
BMV	<i>Brome mosaic virus</i>	<i>Bromovirus</i>	<i>Bromoviridae</i>
CCMV	<i>Cowpea chlorotic mottle virus</i>	<i>Bromovirus</i>	<i>Bromoviridae</i>
CMV	<i>Cucumber mosaic virus</i>	<i>Cucumovirus</i>	<i>Bromoviridae</i>
TSWV	<i>Tomato spotted wilt virus</i>	<i>Tospovirus</i>	<i>Bunyaviridae</i>
TBRV	<i>Tomato black ring virus</i>	<i>Nepovirus</i>	<i>Comoviridae</i>
ACMV	<i>African cassava mosaic virus</i>	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>
BCTV	<i>Beet curly top virus</i>	<i>Curtovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>
BGMV	<i>Bean golden mosaic virus</i>	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>
BGYMV	<i>Bean golden yellow mosaic virus</i>	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>
CaLCuV	<i>Cabbage leaf curl virus</i>	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>
CuLCrV	<i>Cucurbit leaf crumple virus</i>	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>

Liste des virus cités (suite)

Abréviation	Espèce	Genre	Famille
CuLCrV	<i>Cucurbit leaf crumple virus</i>	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>
MYMV	<i>Mungbean yellow mosaic virus</i>	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>
PYMV	<i>Potato yellow mosaic virus</i>	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>
ToCMoV	<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>
TYLCV	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	<i>Begomovirus</i>	<i>Geminiviridae</i>
BLRV	<i>Bean leaf roll virus</i>	<i>Luteovirus</i>	<i>Luteoviridae</i>
BWYV	<i>Beet Western yellows virus</i>	<i>Polerovirus</i>	<i>Luteoviridae</i>
CABYV	<i>Cucurbit aphid-borne yellows mosaic virus</i>	<i>Polerovirus</i>	<i>Luteoviridae</i>
CPSMV	<i>Cowpea severe mosaic virus</i>	<i>Comovirus</i>	<i>Secoviridae</i>
GFLV	<i>Grapevine fanleaf virus</i>	<i>Nepovirus</i>	<i>Secoviridae</i>
RTSV	<i>Rice tungro spherical virus</i>	<i>Waikavirus</i>	<i>Sequiviridae</i>
MNSV	<i>Melon necrotic spot virus</i>	<i>Carmovirus</i>	<i>Tombusviridae</i>
TBSV	<i>Tomato bushy stunt virus</i>	<i>Tombusvirus</i>	<i>Tombusviridae</i>
TCV	<i>Turnip crinkle virus</i>	<i>Carmovirus</i>	<i>Tombusviridae</i>
CGMMV	<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i>	<i>Tobamovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>
TMV	<i>Tobacco mosaic virus</i>	<i>Tobamovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>
TRV	<i>Tobacco rattle virus</i>	<i>Tobravirus</i>	<i>Virgaviridae</i>
TVCV	<i>Turnip vein clearing virus</i>	<i>Tobamovirus</i>	<i>Virgaviridae</i>
GRV	<i>Groundnut rosette virus</i>	<i>Umbravirus</i>	-
RBDV	<i>Raspberry bushy dwarf virus</i>	<i>Idaeovirus</i>	-
RYMV	<i>Rice yellow mottle virus</i>	<i>Sobemovirus</i>	-

Introduction

Introduction

I. Avant-propos

Cette revue bibliographique vise à décrire les mécanismes connus d'interactions moléculaires, mis en place lors de l'infection d'une plante hôte par les virus appartenant au genre des *Potyvirus*. Dans le cas de mécanismes moins documentés pour les potyvirus, nous ferons également appel à des informations disponibles pour d'autres genres viraux tels les *Tobamovirus*, *Potexvirus*, *Bromovirus*, *Cucumovirus*, *Begomovirus* et le genre des virus animaux *Picornavirus*.

II. Généralités

Depuis toujours les plantes sont soumises à l'action de pathogènes provoquant des dommages considérables réduisant plus ou moins fortement le rendement mais aussi la qualité des produits végétaux. Parmi les maladies des plantes, celles causées par les virus ont une grande incidence économique, représentant à elles seules 51% des maladies émergentes (Anderson et al., 2004). Les pertes annuelles dues aux virus atteignent les 60 milliards de dollars chaque année. Les *Potyvirus* représentent 30% des virus de plantes connus à ce jour, ils sont capables d'infecter toutes sortes de cultures telles que les céréales, les oléagineux, les légumes, les plantes ornementales et les arbres fruitiers.

II.1. Organisation et stratégie d'expression du génome des potyvirus

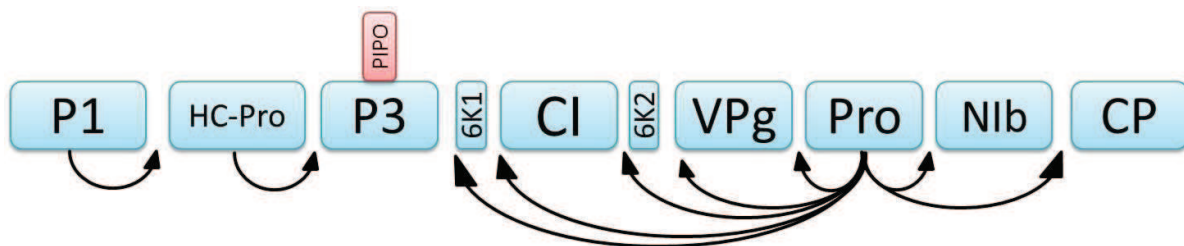
Les potyvirus consistent en des virions filamenteux flexueux à symétrie hélicoïdale, composés d'environ 2 000 copies d'une seule protéine de capsid (CP). Cette particule renferme un ARN génomique monocaténaire de polarité positive, d'environ 10 000 nucléotides. Les virions franchissent la paroi des cellules végétales lors de blessures provoquées par des piqures de pucerons. Après décapsidation, l'ARN viral simple brin est libéré dans le cytoplasme. Il possède à son extrémité 5' une protéine virale liée de façon

covalente (*Viral genome linked protein* ou VPg) et une queue polyadénylée à son extrémité 3' (Intro Fig 1A).

A



B



Intro Fig 1. Organisation du génome des potyvirus

A. Le génome (ARN simple brin) est schématisé par une ligne horizontale, et la VPg est représentée par un cercle solide à l'extrémité 5' (An : queue poly-A à l'extrémité 3'). La polyprotéine codée par l'ARN génomique est représentée par les rectangles.

B. Les sites de clivage de la polyprotéine sont représentés par les flèches.

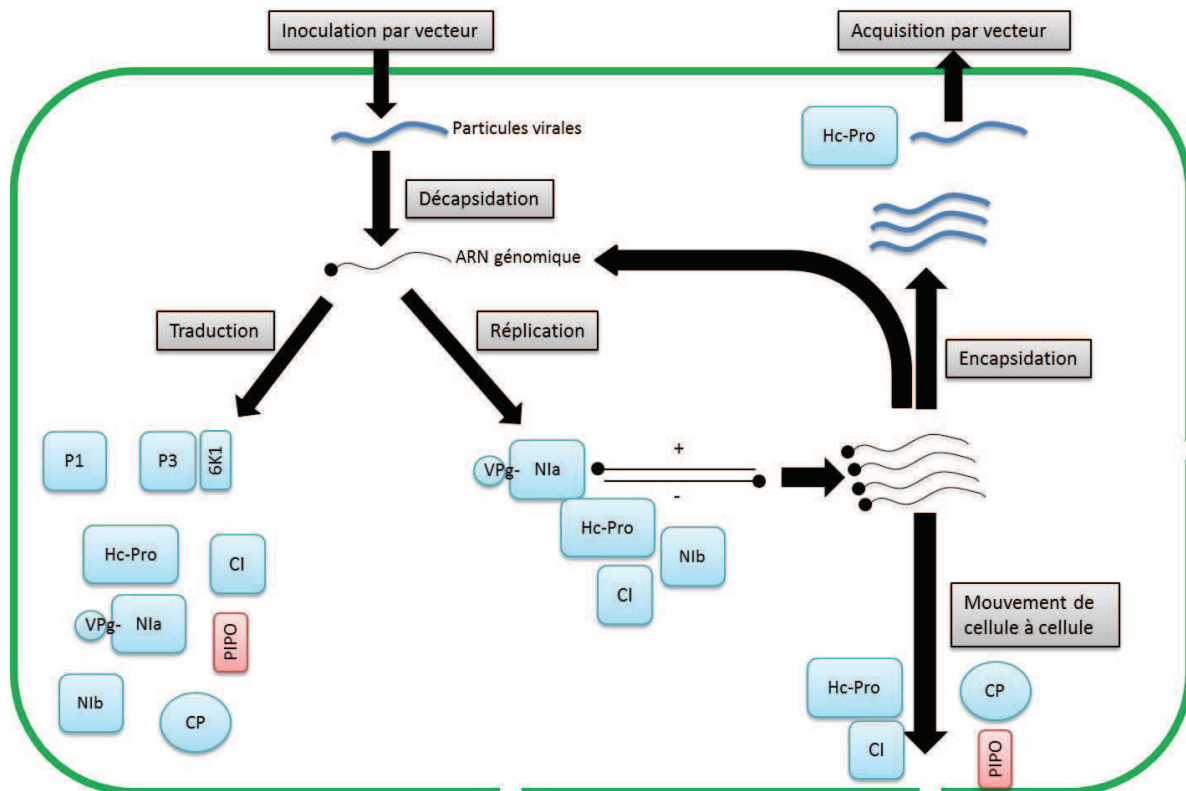
L'ARN viral possède deux cadres de lecture distincts. Le premier code pour une polyprotéine d'environ 350 kDa. Celle-ci sera clivée en dix protéines multifonctionnelles par trois protéases virales (Intro Fig 1B) (Riechmann et al., 1992). Le deuxième cadre de lecture code potentiellement pour une protéine de 7 kDa nommée PIPO (*Pretty Interesting Potyviridae ORF*) (Intro Fig 1A). Sa traduction serait issue du produit d'un décalage du cadre de lecture principal au niveau de l'ORF (Open Reading Frame) codant pour la protéine P3, il en résulte alors une protéine sous la forme d'une fusion P3Nter-PIPO (Chung et al., 2008; Wen and Hajimorad, 2010). Le nombre de protéines virales reste faible (11, la P3Nter-PIPO incluse Intro Tab 1). Pour compenser cette limitation, les potyvirus, tout comme la plupart des virus qui sont des parasites obligatoires, ont la nécessité d'interagir avec et/ou de recruter des facteurs de l'hôte, afin de se reproduire, de se multiplier et de se déplacer dans la plante.

Protéine	Taille KDa	Fonctions	Références
P1	32-64	Protéinase	(Verchot et al., 1991)
		Réplication du génome	(Verchot and Carrington, 1995)
		Suppresseur de silencing et gamme d'hôte	(Valli et al., 2006; Carbonell et al., 2012; Maliogka et al., 2012)
HC-Pro	56	Protéinase à cystéine de type papaine	(Carrington et al., 1989)
		Réplication du génome	(Kasschau and Carrington, 1995)
		Mouvement de cellule à cellule	(Rojas et al., 1997)
		Mouvement à longue distance	(Cronin et al., 1995)
		Symptomatologie	(Redondo et al., 2001)
		Suppresseur de silencing	(Lakatos et al., 2006)
		Transmission par pucerons	(Huet et al., 1994)
P3	37	Réplication du génome	(Merits et al., 1999)
		Symptomatologie	(Jenner et al., 2003)
6K1	6	?	
PIPO	7-14	Mouvement de cellule à cellule	(Chung et al., 2008)
		Mouvement à longue distance	(Wen and Hajimorad, 2010)
CI	79	Hélicase, ATPase	(Lain et al., 1990)
		Mouvement de cellule à cellule	(Carrington et al., 1998)
		Réplication	(Kekarainen et al., 2002)
6K2	6	Ancrage membranaire du complexe de réplication	(Restrepo-Hartwig and Carrington, 1994)
		Mouvement à longue distance	(Spetz and Valkonen, 2004)
		Symptomatologie	(Spetz and Valkonen, 2004)
VPg-Pro	49	Protéinase	(Carrington et al., 1998)
		VPg lié en 5' de l'ARN viral	(Murphy et al., 1996)
		Réplication du génome	(Schaad et al., 1996)
		Mouvement de cellule à cellule	(Nicolas et al., 1997)
		Mouvement à longue distance	(Schaad et al., 1997a)
		Transmission par pucerons	(Torrance et al., 2006)
NIb	58	ARN polymérase ARN dépendante	(Hong and Hunt, 1996)
CP	28-40	Réplication du génome	(Mahajan et al., 1996)
		Mouvement de cellule à cellule	(Rojas et al., 1997)
		Mouvement à longue distance	(Dolja et al., 1995)
		Encapsidation du génome	(Allison et al., 1985)
		Transmission par pucerons	(Flasinski and Cassidy, 1998)

Intro Tab 1. Fonctions attribuées aux différentes protéines virales.

II.2. Le cycle viral

Le cycle viral peut être divisé en quatre étapes principales: la décapsidation, la traduction, la réplication et le mouvement dans la plante (Intro Fig 2). Ces quatre étapes sont décrites très succinctement ci-dessous et les facteurs viraux et cellulaires impliqués à chacune de ces étapes seront décrits plus précisément dans la partie IV de ce chapitre.



Intro Fig 2. Représentation schématique des différentes étapes du cycle d'infection d'une cellule végétale par un potyvirus.

Au niveau des différentes étapes du cycle viral sont indiquées les protéines virales potentiellement impliquées.

La première étape appelée décapsidation, consiste en la dissociation de la capsid virale et a pour but de libérer l'ARN génomique dans le cytoplasme. Cette étape est essentielle pour l'initiation de l'infection. Cependant, elle est encore mal connue chez les potyvirus. On suppose que les potyvirus utilisent la stratégie de "décapsidation co-translationnelle" mise en évidence pour le TMV (*Tobacco mosaic virus*, *Tobamovirus*), dans laquelle l'étape de décapsidation est couplée à celle de la traduction de l'ARN viral (Saunal et al., 1993).

Une fois entré dans la cellule végétale, le virus a besoin de détourner la machinerie cellulaire afin de réaliser son cycle infectieux au sein de l'organisme hôte. Cette étape de traduction des protéines virales se déroule à partir des premières molécules d'ARN libérées par la décapsidation, et plus tard, tout au long du cycle viral.

En plus de la production des protéines qu'il code, l'ARN viral doit se répliquer afin de produire de nouvelles molécules d'ARN qui alimenteront les étapes ultérieures de traduction et de réplication. Ces deux étapes se trouvent étroitement liées et se font simultanément dans les cellules infectées.

Afin de gagner les tissus encore sains, le virus doit se propager dans son hôte au niveau local, de cellule à cellule, puis à plus longue distance, par les vaisseaux vasculaires. Après s'être déplacés de cellule à cellule, au sein des feuilles inoculées, initiant à chaque fois un nouveau cycle de multiplication, les virus atteignent le phloème où ils sont transportés par le flux de sève élaborée depuis les tissus "sources" vers un point de déchargement, les tissus "puits", où une infection secondaire peut avoir lieu (Bel, 2003). Cette étape impliquant le chargement/déchargement des particules virales au niveau du système vasculaire est appelée mouvement en systémie ou à longue distance.

III. Techniques mises en œuvre pour identifier les facteurs de l'hôte interagissant avec une/des protéine(s) virale(s).

Comme nous venons de le voir, le cycle viral fait appel à la machinerie cellulaire. Il est par conséquent, facile d'imaginer l'existence d'interactions entre les facteurs de l'hôte et les protéines virales. Dans le but de comprendre les mécanismes moléculaires du processus d'infection des virus, de nombreuses études ont été réalisées. Elles font appel à diverses techniques de criblage comme suit.

III.1. Technique d'interaction directe pour identifier les facteurs de l'hôte interagissant avec une/des protéine(s) virale(s)

Diverses approches "d'interactomique", techniques visant à identifier des interactions physiques entre les protéines virales et les facteurs de la plante, ont été développées (Intro Tab 2).

Locus/ gène	Protéine hôte	Protéine virale	Méthode employée	Espèce virale	Plante hôte	Références
-	TOM1	Réplicase	Criblage de Mutants	TMV	<i>A. thaliana</i>	(Ishikawa et al., 1993) (Yamanaka et al., 2000)
-	TOM2	-	Criblage de Mutants	TMV	<i>A. thaliana</i>	(Ohshima et al., 1998)
-	TOM3, THH2	-	Criblage de Mutants	TMV	<i>A. thaliana</i>	(Yamanaka et al., 2002)
lsp1	eIF(iso)4E		Criblage de Mutants	TuMV, TEV	<i>A. thaliana</i>	(Lellis et al., 2002)
ssi3	SSI3	-	Criblage de Mutants	CMV	<i>A. thaliana</i>	(Sekine et al., 2004)
pus4	PUS4	-	Criblage de Mutants	BMV	<i>N. benthamiana</i>	(Zhu et al., 2007)
ded2	DED2	-	Criblage de Mutants	BMV	<i>S. cerevisiae</i>	(Noueiry et al., 2000)
lsm1	LSM1	-	Criblage de Mutants	BMV	<i>S. cerevisiae</i>	(Diez et al., 2000)
ole2	OLE2	-	Criblage de Mutants	BMV	<i>S. cerevisiae</i>	(Lee et al., 2001)
ydj2	YDJ2	-	Criblage de Mutants	BMV	<i>S. cerevisiae</i>	(Tomita et al., 2003)
-	PME	MP	Double Hybride	TMV	<i>N. tabacum</i>	(Chen et al., 2000)
-	PVIP	VPg	Double Hybride	PsbMV, TEV, GFLV, TBRV	<i>P. sativum</i>	(Dunoyer et al., 2004)
-	HIP	HcPro	Double Hybride	PVA	<i>S. tuberosum L.</i>	(Guo et al., 2003)
-	AtRH8, PpDDX	VPg	Double Hybride	PPV	<i>A. thaliana</i>	(Huang et al., 2010)
	PCaP1	P3N-PIPO	Double Hybride	TuMV	<i>A. thaliana</i>	(Vijayapalani et al., 2012)
	SYTA	MP	Double Hybride	TMV, CaLCuV	<i>A. thaliana</i>	(Lewis and Lazarowitz, 2010)
	PaCRT	HcPro	Double Hybride	PRSV	<i>C. papaya</i>	(Shen et al., 2010)
	rgs-CaM	HcPro	Double Hybride	TEV	<i>N. benthamiana</i>	(Anandalakshmi et al., 2000)
	NtMinD	HcPro	Double Hybride	PVY	<i>N. tabacum</i>	(Jin et al., 2007)
	Rieske Fe/S	P1	Double Hybride	SMV	<i>P. ternata</i>	(Shi et al., 2007)
rymv1	eIF(iso)4G	VPg	Double Hybride	RYMV	<i>O. sativa</i>	(Hébrard et al., 2010)
	eIF4E, eIF(iso)4E	VPg	Double Hybride	ChiVMV	<i>C. annuum</i>	(Hwang et al., 2009)
-	eIF4E, eIF(iso)4E	VPg, 6K2-VPg-Pro, VPg-Pro	Chromatographie	TuMV	<i>A. thaliana</i>	(Léonard et al., 2004) (Miyoshi et al., 2006)
-	eIF4E, eIF4E-eIF4G	VPg, CI	Chromatographie ELISA BIFC (<i>in planta</i>)	LMV	<i>L. sativa</i>	(Michon et al., 2006) (German-Retana et al., 2008) (Tavert-Roudet et al., 2012)
	PDLP	MP	FLIM-FRET Criblage de mutant	GFLV	<i>N. benthamiana</i> <i>A. thaliana</i>	(Amari et al., 2010)
-	eIF1A	RdRp	Chromatographie	TuMV	<i>A. thaliana</i>	(Thivierge et al., 2008)
	StREM1.3	TGBp1	Chromatographie Co-localisation	PVX	<i>S. tuberosum</i>	(Raffaele et al., 2009)
-	cPGK	3'UTR	EMSA	BaMV	<i>N. benthamiana</i>	(Lin et al., 2007)

Intro Tab 2. Facteurs de la plante hôte interagissant avec une/des protéine(s) virale(s)

III.1.1. Système double hybride chez la levure

Cette technique permet le criblage d'une banque d'ADNc de plante ou d'un tissu particulier de la plante, avec une protéine virale (proie) ou la vérification d'une interaction entre deux protéines (double hybride ciblé). La protéine virale est clonée dans un vecteur en fusion avec un domaine de liaison à l'ADN d'un activateur, tandis que les protéines hôte, tout au moins les ADNc correspondants, sont clonés dans un vecteur en fusion avec un domaine d'activation de ce même activateur. Lorsqu'il y a interaction physique entre deux protéines, l'activateur est reconstitué, induisant la transcription de gènes rapporteurs spécifiques. À l'inverse, si les protéines n'interagissent pas, l'activateur sera inactif et le gène rapporteur ne sera pas transcrit (Lalonde et al., 2008; Stynen et al., 2012).

De nombreuses interactions ont été montrées par l'emploi du système double hybride, notamment chez la levure. Chez les plantes, cette technique a permis de mettre en évidence que la protéine de mouvement (MP) du *Tobacco mosaic virus* (TMV) interagit avec une pectine méthylesterase PME du tabac (Chen et al., 2000). En outre, cette technique a aussi permis de démontrer chez le pois que la VPg de nombreux *Potyvirus* tel que le PSbMV (*Pea seed-borne mosaic virus*) ou le TEV (*Tobacco etch virus*), mais aussi de certains *Nepovirus* tel que le GFLV (*Grapevine fanleaf virus*) ou le TBRV (*Tomato black ring virus*) interagit avec la protéine PVIP (Potyvirus VPg-interacting protein) (Dunoyer et al., 2004). Chez la pomme de terre, l'interaction directe de HcPro du PVA avec la protéine HIP1 (HcPro Interacting Protein1) possédant un domaine de liaison de type RING finger a été démontrée selon ce procédé (Guo et al., 2003). En ce qui concerne le PPV (*Plum pox virus*, *Potyvirus*), Huang et al., (2010) ont employé le système double-hybride pour montrer que la VPg interagit avec les protéines AtRH8 d'*Arabidopsis* et PpDDXL du pêcher, toutes deux des analogues du facteur d'initiation de la traduction eIF4A (Huang et al., 2010) (Intro Tab 2).

III.1.2. Chromatographie d'affinité

La synthèse de protéines virales recombinantes fusionnées à une étiquette affine pour une colonne de chromatographie permet d'aller chercher les protéines hôtes interagissant avec la protéine virale par chromatographie d'affinité. En effet, cette technique a permis de montrer que la protéine virale VPg ainsi que les polyprotéines 6K₂-VPg-Pro et VPg-Pro du TuMV (*Turnip mosaic virus*, *Potyvirus*) se fixent spécifiquement sur les protéines eIF4E et eIF(iso)4E d'*Arabidopsis* (Léonard et al., 2004; Miyoshi et al., 2006). En utilisant une étiquette GST (glutathione S-transferase), il a été démontré que la VPg du LMV (*Lettuce mosaic virus*, *Potyvirus*) se lie à eIF4E ainsi qu'au complexe eIF4E-eIF4G de la laitue (Michon et al., 2006). L'usage du système TAP-tag (tandem affinity purification) en complément de cette technique a conduit chez *Arabidopsis* à montrer que la RdRp (RNA-dependent RNA polymerase) du TuMV fixe le facteur d'élongation eEF1A (Thivierge et al., 2008) (Intro Tab 2).

III.1.3. Technique de retard sur gel

La technique du retard sur gel (EMSA pour Electrophoretic Mobility Shift Assay) est basée sur le retard de migration dans un gel natif de polyacrylamide de duplex formés entre une molécule d'acide nucléique (ADN ou ARN) et une protéine. La variation de migration des duplex complexés aux protéines par rapport aux acides nucléiques libres est suivie grâce au marquage radioactif. Cette technique a été utilisée pour déterminer les facteurs du tabac (*Nicotiana tabacum*,) pouvant fixer la région 3'UTR d'un *potexvirus*, le BaMV (*Bamboo mosaic virus*). Ce travail a ainsi débouché sur l'identification de la phosphoglycerate kinase chloroplastique (cPGK), essentielle à l'accumulation virale du BaMV (Lin et al., 2007) (Intro Tab 2).

Il faut noter ici que les méthodes précédemment citées permettent de démontrer des interactions directes entre protéines virales et protéines de l'hôte candidat mais ne démontrent

pas le rôle biologique de ces interactions dans l'infection virale. Une validation biologique est donc nécessaire. Malheureusement, ceci n'est pas toujours possible, notamment dans le cas où le facteur de l'hôte est codé par un gène appartenant à une famille multigénique dont les membres sont partiellement redondants au niveau fonctionnel et se complètent. Pour cela, l'emploi d'étude de mutants ou d'analyse phénotypique de résistances par le biais de la génétique sera indispensable, avant de comprendre le rôle exact de cette interaction dans le cycle viral.

III.2. Emploi de la génétique afin d'identifier des facteurs de la plante hôte intervenant dans le cycle viral

Certains facteurs de l'hôte sont indispensables au bon déroulement de l'infection. Par conséquent, une absence ou une mutation d'un de ces facteurs peut suffire à ralentir ou à stopper le développement de l'infection. A l'état homozygote, ce type d'évènement amènerait une perte de la sensibilité (Lellis et al., 2002). Le déterminisme génétique de cette résistance est dit récessif puisque, à l'état hétérozygote, l'allèle sauvage est capable de compléter fonctionnellement l'allèle déficient et de permettre ainsi le bon déroulement du cycle viral. Seuls les individus homozygotes pour la mutation apparaîtront donc résistants. Ces mécanismes de résistance récessive représentent près de 50% des résistances aux potyvirus (Kang et al., 2005b) et il est communément accepté que, dans le cas de pathosystèmes plante/virus, ces résistances récessives sont associées à l'existence d'un gène de sensibilité sous-jacent.

Une situation alternative est toutefois envisageable, à l'image du mécanisme de résistance récessive chez l'orge et le piment vis-à-vis de l'oïdium, contrôlé par le gène *mlo* (Piffanelli et al., 2004; Kim and Hwang, 2012). Dans ce cas, l'inactivation d'un gène de sensibilité codant pour un facteur de la plante hôte inhibant la réaction de défense permet

alors de rétablir la réaction de défense conduisant à une résistance. Cependant, ce type d'hypothèse n'a à l'heure actuelle, pas été démontré pour la résistance récessive aux virus.

Une autre manière de décrypter la relation entre les protéines virales et les facteurs de la plante est donc d'identifier des résistances récessives mises en évidence chez la plante hôte. Par des approches de génétique, il est alors possible de cloner ces gènes qui codent pour des protéines de l'hôte indispensables au(x) virus, et plus communément appelés gènes de sensibilité (Intro Tab 3 et 4).

III.2.1. Criblage de banques de mutants

Dans le but d'identifier des facteurs de l'hôte capables d'induire une perte ou une réduction de l'infection virale, plusieurs banques de mutants ont été inoculées par différents virus.

Par exemple, Ishikawa et al. (1997), ont généré une souche de levure capable d'exprimer et de répliquer le BMV. Cette souche de levure a été préalablement soumise à un agent mutagène avant criblage. L'étude des mutants issus de cette mutagenèse et ne répliquant plus le BMV ont ainsi permis de découvrir des facteurs de l'hôte essentiels à la réplication virale. Grâce à cette méthode, il a été démontré que l'apparition de mutation(s) dans les gènes *lsm1*, *ole1*, *ydj1*, de la levure bloque la réplication du BMV (Díez et al., 2000; Lee et al., 2001; Tomita et al., 2003). Par la même approche, une souche de levure possédant la capacité de répliquer le *Tomato bushy stunt virus* (TBSV) a été générée par Panavas and Nagy, (2003). L'étude de mutants de cette souche a permis l'identification de nombreux gènes indispensables à la réplication virale du TBSV (Serviene et al., 2005; Serviene et al., 2006) .

De même, l'étude de banques de mutants d'*Arabidopsis* a permis la découverte de nombreuses résistances récessives. Dans le cas des *tobamovirus*, après criblage d'une banque de mutants obtenus par traitement à l'EMS (Ethyl-Methanesulfonate), le mutant *vsm1* chez lequel l'infection par le TVCV (*Turnip vein clearing virus*) est bloquée a été mis en évidence.

Cependant, le gène *VSM1* n'a pas encore été identifié (Lartey et al., 1998). Ce mutant empêcherait la propagation du virus dans la plante en affectant le passage du virus des tissus non vasculaires aux tissus vasculaires. Par contre, dans le cas des mutants *tom1* et *tom3* dans lesquels la réplication du TMV (un autre *tobamovirus*) est inhibée, l'emploi de populations en ségrégation a permis de cartographier *TOM1* sur le chromosome IV et *TOM3* sur le chromosome II. Ces deux gènes codent pour des protéines transmembranaires du tonoplaste (Ishikawa et al., 1993; Yamanaka et al., 2000; Yamanaka et al., 2002). De même, chez les potyvirus, l'emploi de cette technique a permis de mettre en évidence le mutant *lsp1* (*loss of susceptibility*) chez lequel l'infection par le TuMV est bloquée (Lellis et al., 2002) (Intro Tab 2). Ce fut la première démonstration biologique de l'importance des facteurs d'initiation de la traduction dans le cycle viral.

Par conséquent, l'étude de banques de mutants a permis la caractérisation de plusieurs résistances récessives et par là même, la découverte de facteurs de l'hôte essentiels au(x) virus. Il est important de rappeler qu'à cause du caractère récessif de ces résistances, les mutants doivent être à l'état homozygote pour la mutation pour être résistants à l'infection virale, ce qui limite le nombre de facteurs identifiés à ce jour. En effet, un certain nombre de facteurs de l'hôte, impliqués dans l'inhibition de l'infection virale ont également été identifiés par criblage de banques de mutants, mais après caractérisation du déterminisme génétique de cette résistance (dominante), il est apparu que l'allèle sauvage code non pas pour un gène de sensibilité mais pour un gène de résistance. C'est le cas, chez *Arabidopsis*, de la résistance dominante appelée RTM (Restricted TEV movement) qui bloque le mouvement à longue distance de trois potyvirus, le TEV (Chisholm et al., 2001), le LMV et le PPV (Decroocq et al., 2006; Decroocq et al., 2009). A ce jour, trois gènes, *RTM1*, *RTM2* et *RTM3*, ont été identifiés (Mahajan et al., 1998; Whitham et al., 1999). La résistance n'est possible que si ces trois loci présentent un allèle de résistance fonctionnel. Cette résistance ne provoque ni de

mort cellulaire par réaction d'hypersensibilité, ni de mécanisme de résistance systémique acquise (Chisholm et al., 2000; Whitham et al., 2000). Les trois gènes *RTM* ont été clonés par une approche de clonage positionnel. La protéine RTM1 présente des homologues de séquence avec des lectines (D-galactose-specific lectin), alors que RTM2 est homologue aux protéines de choc thermique (HSP) (Chisholm et al., 2001). La protéine RTM3, quant à elle, appartient à une famille de protéines comprenant 29 membres, qui possèdent tous au moins un domaine homologue à meprin et TRAF (MATH) à son extrémité N-terminale et, dans certains cas, un domaine de type "coiled-coil" (CC) à son extrémité C-terminale (Cosson et al., 2010). Les protéines RTM1 et RTM2 sont associées au phloème, confirmant ainsi leur rôle probable dans la prévention du mouvement à longue distance du TEV (Chisholm et al., 2001). Ces protéines auraient ainsi la capacité de former un complexe multiprotéique pour bloquer le mouvement à longue distance des potyvirus. De même, il a été montré plus tard que la protéine RTM3 est capable d'auto-interagir ainsi que d'interagir avec RTM1 (Cosson et al., 2010).

III.2.2. Etude des résistances récessives naturelles

Comme tout organisme vivant, les plantes sont en perpétuelle évolution. Au sein des plantes sensibles à un virus phytopathogène, il est parfois possible de mettre en évidence certaines lignées possédant des mécanismes de résistance récessive. Les études se sont rapidement orientées vers le décryptage de ces résistances récessives naturelles. Par exemple, certaines lignées de piment (*Capsicum* spp) possèdent des allèles *pvr1*, *pvr2*, *pvr3*, *pvr5* qui confèrent une résistance récessive à plusieurs potyvirus : TEV, PepMoV (*Pepper mottle virus*) et PVY (*Potato virus Y*) (Dogimont et al., 1996; Kyle and Palloix, 1997). De même chez le pois (*Pisum sativum*), les allèles *sbm1*, *sbm2*, *sbm3* et *smb4* amènent une résistance récessive au PSbMV (Johansen et al., 2001) (Intro Tab 4). De manière intéressante, dans le cas de ces résistances naturelles, il a été démontré que les loci *pvr2* et *sbm1* codent pour le facteur d'initiation de la traduction eIF4E (Ruffel et al., 2002; Gao et al., 2004b).

Il est à noter que nombre de ces résistances récessives naturelles n'ont cependant pas encore été étudiées, ou très partiellement (Intro Tab 3), en tout cas même si elles ont été décrites, le(s) gène(s) sous-jacents ne sont pas encore connus (Intro Tab 4).

Plante hôte	Virus	Nombre de gène(s) impliqué(s)	Références
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Beet curly top virus</i>	-	(Park et al., 2002)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Tobacco mosaic virus</i>	Monogénique	(Dardick et al., 2000)
<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Groundnut rosette virus</i>	Digénique	(Olorunju, 1992)
<i>Brassica campestris</i>	<i>Turnip mosaic virus</i>	Digénique	(Yoon et al., 1993)
<i>Capsicum annum</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i>	Au moins deux gènes majeurs	(Grube et al., 2000)
<i>Capsicum frutescens</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i>	Au moins deux gènes majeurs	(Grube et al., 2000)
<i>Citrullus lanatus</i>	<i>Watermelon mosaic virus</i>	Au moins deux gènes majeurs	(Xu et al., 2004)
<i>Cucumis melo</i>	<i>Watermelon mosaic virus</i>	-	(Díaz-Pendón et al., 2005)
<i>Cucumis melo</i>	<i>Cumcuber green mottle mosaic virus</i>	Polygénique	(Rajamony et al., 1990)
<i>Cucumis sativus</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i>	-	(Munshi et al., 2008)
<i>Cucumis sativus</i>	<i>Papaya ring spot virus</i>	Monogénique	(Grumet et al., 2000)
<i>Dioscorea rotundata</i>	<i>Yam mosaic virus</i>	Monogénique	(Mignouna et al., 2001)
<i>Glycine max</i>	<i>Cowpea chlorotic mottle virus</i>	Digénique	(Goodrick, 1991)
<i>Lactuca sativa</i>	<i>Bidens mottle virus</i>	-	(Provvidenti and Hampton, 1992)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Peru tomato mosaic virus</i>	-	(Provvidenti and Hampton, 1992)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Tomato spotted wilt virus</i>	-	(Maluf et al., 1991)
<i>Lycopersicon hirsutum</i>	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	Digénique ou trigénique	(Vidavsky and Czosnek, 1998)
<i>Manihot esculenta</i>	<i>African cassava mosaic virus</i>	-	(Legg and Thresh, 2000)
<i>Manihot glaziovii</i>	<i>African cassava mosaic virus</i>	Polygénique	(Legg and Thresh, 2000)
<i>Matthiola incana</i>	<i>Turnip mosaic virus</i>	-	(Provvidenti and Hampton, 1992)
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Turnip mosaic virus</i>	-	(ShiJian et al., 2011)
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Tobacco etch virus</i>	Digénique	(Schaad and Carrington, 1996)
<i>Oryza glaberrima</i>	<i>Rice yellow mottle virus</i>	-	(Albar et al., 2006)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Clover yellow vein virus</i>	-	(Sato et al., 2003)
<i>Rubus idaeus</i>	<i>Raspberry bushy dwarf virus</i>	-	(Knight and Barbara, 1981)
<i>Solanum pimpinellifolium</i>	<i>Potato yellow mosaic virus</i>	-	(Boissot et al., 2008)
<i>Vicia faba</i>	<i>Bean yellow mosaic virus</i>	-	(Provvidenti and Hampton, 1992)
<i>Vigna mungo</i>	<i>Bean yellow mosaic virus</i>	Digénique	(Pal et al., 1991)
<i>Vigna radiata</i>	<i>Mungbean yellow mosaic virus</i>	-	(Malik et al., 1986)
<i>Vigna unguiculata</i>	<i>Cowpea severe mosaic virus</i>	Trigénique	(Umaharan et al., 1997)
<i>Vinia unguiculata</i>	<i>Blackeye cowpea mosaic virus</i>	-	(Provvidenti and Hampton, 1992)

Intro Tab 3. Résistances récessives naturelles aux virus partiellement caractérisées

Plante hôte	Virus	Nom du locus	Reference
<i>Apium graveolens</i>	<i>Celery mosaic virus</i>	cmv	(D'Antonio et al., 2001)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Plum pox virus</i>	rpv1, rpv3	((Decroocq et al., 2006) (Sicard et al., 2008)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Turnip crinckle virus</i>	rrt	(Kachroo et al., 2000)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Turnip vein clearing virus</i>	vsm1	(Lartey et al., 1998)
<i>Brassica rapa</i>	<i>Turnip mosaic virus</i>	retr01	(Hughes et al., 2002) (Rusholme et al., 2007)
<i>Capsicum annum</i>	<i>Potato virus Y</i>	pvr3, pvr5	(Dogimont et al., 1996) (Kyle and Palloix, 1997)
<i>Capsicum annum</i>	<i>Pepper mottle virus</i>	pvr3	(Murphy, 1995)
<i>Citrullus lanatus</i>	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>	zym-CH	(Provvidenti, 1991) (Xu et al., 2004)
<i>Cucumis melo</i>	<i>Melon necrotic spot virus</i>	nsv	(Coudriet et al., 1981)
<i>Cucumis melo</i>	<i>Cucurbit aphid-borne yellows mosaic virus</i>	cab-1, cab-2	(Dogimont et al., 1997)
<i>Cucumis melo</i>	<i>Cucumber mosaic virus</i>	cmv1	(Essafi et al., 2008)
<i>Cucumis melo</i>	<i>Cucurbit leaf crumple virus</i>	culcrv	(McCreight et al., 2008)
<i>Cucumis sativus</i>	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>	zym	(Ullah and Grumet, 2002)
<i>Cucumis sativus</i>	<i>Watermelon mosaic virus</i>	wmv2	(Wai and Grumet, 1995)
<i>Cucumis sativus</i>	<i>Zucchini yellow fleck virus</i>	zyf	(Gilbertalbertini et al., 1995)
<i>Cucumis sativus</i>	<i>Moroccan watermelon mosaic virus</i>	mwm	(Kabelka and Grumet, 1997)
<i>Cucurbita moschata</i>	<i>Papaya ringspot virus</i>	prv	(Brown et al., 2003)
<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Barley yellow mosaic virus</i>	rym 18	(Kai et al., 2011)
<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Barley yellow mosaic virus</i>	rym1 à rym12	(Kanyuka et al., 2003)
<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Barley mild mosaic virus</i>	rym1 à rym12	(Kühne et al., 2003)
<i>Lactuca sativa</i>	<i>Beet Western yellows virus</i>	bwy	(Pink et al., 1991)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Tomato chlorotic mottle virus</i>	tcm-1	(Giordano et al., 2005)
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Popato virus Y</i>	va1, va2, vam	(Masuta et al., 1999) (Acosta-Leal and Xiong, 2008)
<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Tobacco vein motting virus</i>	va	(Nicolas et al., 1997)
<i>Oryza sativa</i>	<i>Rice tungro spherical virus</i>	tsv-1, tsv-2	(Azzam et al., 2000)
<i>Oryza sativa</i>	<i>Rice yellow mottle virus</i>	rymv 2	(Thiémélé et al., 2010)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Bean common mosaic virus</i>	bc-1, bc-1 ² , bc-2 bc-2 ² , bc-u	(Miklas et al., 2000)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Bean golden yellow mosaic virus</i>	bgm-1	(Blair et al., 2007)
<i>Pisum sativum</i>	<i>Bean common mosaic virus</i>	bcm	(Provvidenti, 1991)
<i>Pisum sativum</i>	<i>Bean leafroll virus</i>	lr	(Baggett and Hampton, 1991)
<i>Pisum sativum</i>	<i>Brome mosaic virus</i>	mab1-1, mab2-1, mab3-1	(Ishikawa et al., 1997)
<i>Pisum sativum</i>	<i>Pea seedborne mosaic virus</i>	sbm2, sbm3, sbm4	(Johansen et al., 2001))
<i>Pisum sativum</i>	<i>pea mosaic virus</i>	pmv	(Provvidenti, 1990)
<i>Pisum sativum</i>	<i>Passion fruit woodiness virus</i>	pwv	(Provvidenti and Niblett, 1994)
<i>Pisum sativum</i>	<i>Bean yellow mosaic virus</i>	mo	(Schroeder, 1971)
<i>Pisum sativum</i>	<i>Watermelon mosaic virus</i>	mo	(Schroeder, 1971)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i>	ty-5	(Anbinder et al., 2009)
<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>Tomato leaf curl virus</i>	tgr-1	(Bian et al., 2007)
<i>Solanum spp</i>	<i>Clover yellow vein virus</i>	non-cyv2, cyv1	(Choi et al., 2012)

Intro Tab 4. Résistance récessive aux virus dont le gène sous-jacent est encore inconnu

III.2.3. Recherche de QTL (quantitative trait loci) liés à la résistance

La variabilité phénotypique observée lors de l'adaptation à des environnements plus ou moins contrastés, suggère l'existence d'une variabilité génétique entre les plantes. L'existence de cette variabilité chez les plantes hôtes est un atout dans la recherche de nouveaux facteurs impliqués dans la résistance. L'analyse de populations en ségrégation issue d'un croisement entre deux plantes répondant différemment au virus permet de mettre en évidence la variation génétique potentiellement responsable de cette différence.

Chez *Arabidopsis*, l'utilisation de populations F2 et de recombinants issus du croisement entre l'accession Cvi-1 (partiellement résistante à l'isolat PPV-PS) et *Ler* (sensible à l'isolat PPV-PS) a permis de mettre en évidence un locus majeur positionné sur le chromosome I. Le locus nommé *rpv1* identifié chez Cvi-1 confère une résistance récessive (Decroocq et al., 2006). L'utilisation des mêmes populations confrontées à l'isolat PPV-R a identifié un QTL de résistance positionné sur le locus *rpv1* ainsi qu'un second facteur, nommé *rpv3*, provenant du parent sensible, *Ler* (Sicard et al., 2008). A l'aide d'une population de lignées isogéniques contenant la région *rpv1* de Cvi-1 dans un fond génétique de type *Ler*, une cartographie fine de la région *rpv1* a été initiée (Sicard et al., 2008).

Suivant une approche similaire, plusieurs loci à effet quantitatif ont ainsi pu être mis en évidence (Dogimont et al., 1996). En effet, l'utilisation de lignées recombinantes chez le melon a fait apparaître 7 loci qui contrôlent une résistance récessive au CMV (*Cucumber mosaic virus*, *Cucumovirus*). L'un d'entre eux, positionné sur le chromosome XII, est responsable d'une forte part de la variance phénotypique (Dogimont et al., 2000). L'emploi de lignées isogéniques a confirmé et précisé ce QTL nommé *cmv1* (Essafi et al., 2008).

Il est intéressant de noter ici que dans ces deux études, les loci liés à la résistance ne co-localisent pas avec des facteurs d'initiation de la traduction (Essafi et al., 2008; Sicard et al.,

2008) (Intro Tab 4). Par conséquent, il est tout à fait possible d'imaginer que ces résistances récessives font appel à de nouveaux facteurs de l'hôte.

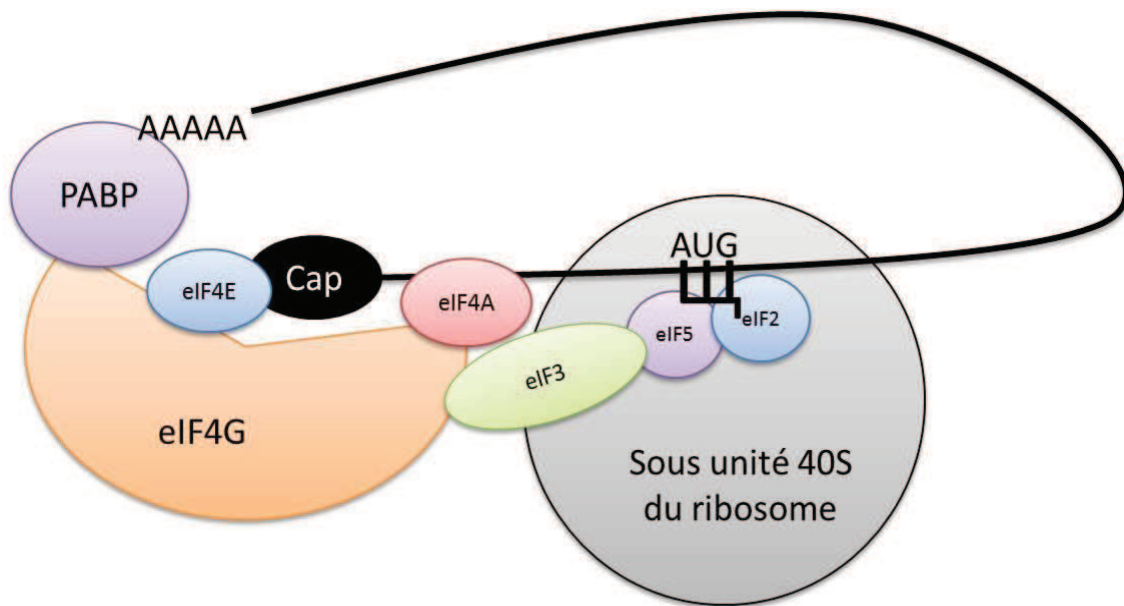
Nous venons de voir que l'ensemble de ces approches (biochimique et génétique) ont permis l'identification de nombreux facteurs de plantes interagissant avec le virus, ou tout au moins indispensables au bon déroulement du cycle viral (Intro Tab 3 et 4). Ces données sont essentielles à la compréhension des différentes étapes du cycle infectieux comme nous le verrons dans la partie IV de cette introduction.

IV. Connaissances acquises sur cycle viral et importance des interactions Plantes/Virus

IV.1. Etapes de traduction et réplication

IV.1.1. Les facteurs d'initiation de la traduction: points clés de l'infection virale

Chez les plantes, le mécanisme de traduction des ARNm cellulaires a été amplement étudié et décrit. Les ARNm eucaryotes possèdent à leur extrémité 5' une coiffe constituée d'une guanine modifiée ($m^7G_5'ppp_5'N_m pN_m$) et une queue poly(A) à leur extrémité 3' (Dever, 1999). Au niveau de l'extrémité 5', la coiffe a la capacité de recruter le facteur d'initiation de la traduction eIF4E (Dever, 1999). Du côté de l'extrémité 3', la queue de poly(A) fixe la protéine PABP (*poly(A) binding protein*) (Dever, 1999). Le facteur d'initiation eIF4G permet la circularisation de l'ARNm en fixant deux autres facteurs, eIF4E et PABP. De plus eIF4G recrute une hélicase à ARN: eIF4A, dans le but de dérouler les structures secondaires de l'ARN, ainsi que eIF3 qui, à son tour, recrute le complexe de pré-initiation 43S (sous-unité ribosomique 40S, eIF2-GTP-ARNt^{met}, eIF3, eIF5). Ce complexe ainsi formé parcourt l'ARNm à la recherche du codon d'initiation. Une fois identifié, eIF2 sous le contrôle de eIF5, hydrolyse la GTP, dissociant ainsi les facteurs d'initiation. La sous unité ribosomal 60S peut alors se lier, et l'élongation, débiter (Intro Fig 3).



Intro Fig 3. Complexe d'initiation de la traduction cellulaire chez les eucaryotes.

PAPB: PolyA binding protein, eIF: facteurs d'initiation de la traduction, CAP: coiffe, AUG: Codon d'initiation, AAAAA: queue polyadenylée de l'ARNm

Chez les plantes, eIF4E est capable de se lier à la protéine eIF4G pour former le complexe eIF4F et eIF(iso)4E interagit préférentiellement avec la protéine eIF(iso)4G pour former le complexe eIF(iso)4F (Browning et al., 1992; Browning, 2004). Il apparait *in vivo* que les deux complexes eIF4F et eIF(iso)4F ont des affinités pour différentes coiffes d'ARNm cellulaire (Rodriguez et al., 1998) Le complexe eIF4F permettrait préférentiellement la traduction d'ARNm présentant des structures secondaires en 5' et d'ARNm non coiffés et/ou dicistroniques (ARNm contenant deux cistrons consécutifs, et donc codant deux chaînes polypeptidiques), alors que eIF(iso)4F traduirait préférentiellement des ARNm présentant peu de structures secondaires et liés à des coiffes hyperméthylées (Gallie, 2001; Mayberry et al., 2009).

Dans le cas de l'infection virale, la question se pose sur le mécanisme permettant la traduction des ARN viraux. (Wittmann et al., 1997; Thivierge et al., 2005) posent l'hypothèse que les virus recrutent le/les complexes d'initiation de la traduction cellulaire(s) afin de traduire leurs particules d'ARN. Cependant moins de 20% des genres viraux regroupent des

virus dont les ARN ont une structure comparable à celle de l'ARNm cellulaire (Dreher and Miller, 2006). Les virus ont donc mis en place des stratégies basées sur des structures particulières dans les parties 5' et/ou 3'UTR (Untranslated region) dans le but de détourner la machinerie de traduction à leur avantage (Thivierge et al., 2005).

En effet, les résultats de plusieurs études réalisées en parallèle sur des genres viraux distincts concourent à confirmer cette hypothèse. Comme nous l'avons décrit précédemment, certaines lignées de piment (*Capsicum* spp) possèdent des allèles *pvr1*, *pvr2*, *pvr3*, *pvr5* qui confèrent une résistance récessive à trois potyvirus, le TEV, PePMOV et PVY. A l'aide de marqueurs RFLP (restriction fragment length polymorphism), il a été démontré que le locus *pvr2* co-ségrège avec un gène codant pour un facteur d'initiation de la traduction, eIF4E. Le clonage de ce gène a permis de valider fonctionnellement qu'il était responsable de la résistance au PVY chez le piment (Ruffel et al., 2002). Une étude de la diversité génétique des facteurs d'initiation de la traduction eIF4E et eIF(iso)4E chez différents cultivars de laitue a mis en évidence que les gènes de résistance récessive au LMV, *mol¹* et *mol²*, codent pour des formes mutées d'eIF4E (Nicaise et al., 2003). De même chez le pois (*Pisum sativum*), les allèles *sbm1*, *sbm2*, *sbm3* et *smb4* amènent une résistance récessive au PSbMV (Johansen et al., 2001). Une approche gène candidat a permis de montrer que l'allèle de résistance récessive *sbm1* est fortement lié à eIF4E (Gao et al., 2004a). En comparant les séquences d'eIF4E de pois sensibles et résistants, il a été établi que la sensibilité au PSbMV corrélait avec la série allélique d'eIF4E (Gao et al., 2004b) (Intro Tab 5).

Chez *Arabidopsis*, le criblage d'une banque de mutants a permis d'identifier le gène *LSP1*, dont la mutation entraîne une résistance au TuMV. Une approche gène candidat a conduit à l'identification du facteur d'initiation de la traduction eIF(iso)4E (Lellis et al., 2002). De même, toujours chez *Arabidopsis*, les lignées *cum1* et *cum2* sont caractérisées par une perte de sensibilité au CMV. Ces gènes ont été localisés sur les chromosomes IV et III et

codent pour les facteurs d'initiation de la traduction eIF4E et eIF4G, respectivement (Yoshii et al., 1998; Yoshii et al., 2004) (Intro Tab 5).

Suite à l'ensemble de ces données préliminaires, des travaux ont été engagés afin de vérifier l'importance de ces facteurs d'initiation de la traduction dans d'autres pathosystèmes. Cette approche requiert avant tout l'obtention de mutants "perte de fonction" par l'insertion de l'ADN de transfert d'*Agrobacterium tumefaciens* (T-DNA). Ainsi, des mutations introduites dans les gènes *At-eIF4E* et *At-eIF(iso)4E* entraînent une inhibition de la réplication du CIYVV (*Clover yellow vein virus*, *Potyvirus*) et du TuMV (Sato et al., 2005). De la même manière, Nicaise et al. (2007), ont montré que le mutant *At-eIF4G* est résistant au CIYVV tandis que le mutant *At-eIF(iso)4G1* est résistant au PPV et LMV et le double mutant *eIF(iso)4G1* × *At-eIF(iso)4G2*, au TuMV (Intro Tab 5). L'ensemble de ces résultats démontrent bien que les facteurs de la traduction de l'hôte sont essentiels au bon déroulement du cycle viral.

En parallèle à ces approches menées chez la plante modèle *Arabidopsis*, la co-ségrégation génétique entre des facteurs de résistance récessive et des gènes codant pour eIF4E ou eIF4G (ou leurs isoformes) a été mise en évidence chez plusieurs autres espèces végétales, notamment dans le cas d'un QTL de résistance au PPV et le gène codant pour eIF(iso)4E chez *Prunus davidiana* (Marandel et al., 2009), entre le gène *retr01* de résistance au TuMV et *eIF(iso)4E* chez le chou chinois (Rusholme et al., 2007), entre le gène *bc-3* au BCMV (*Blackeye cowpea mosaic virus*, *Potyvirus*) et *eIF4E* chez le haricot (Naderpour et al., 2010) et finalement, entre le facteur de résistance récessive au ZYMV (*Zucchini yellow mosaic virus*, *Potyvirus*) et *eIF4E* chez le melon (Ling et al., 2009) (Intro Tab 5).

Chez les potyvirus, la protéine virale VPg qui se trouve liée de manière covalente avec l'extrémité 5' des ARN viraux a la capacité d'interagir avec les facteurs d'initiation de la traduction. La technique du double hybride chez la levure a permis de mettre en évidence que

la protéine virale VPg du TuMV se lie avec eIF(iso)4E d'*Arabidopsis* (Wittmann et al., 1997). De plus cette interaction est nécessaire pour l'infection (Léonard et al., 2000) et a été confirmée *in planta* (Beauchemin and Laliberté, 2007). Depuis, de nombreuses études ont confirmé cette interaction dans différents pathosystèmes (Kang et al., 2005a; Grzela et al., 2006; Khan et al., 2006; Michon et al., 2006; Miyoshi et al., 2006; Yeam et al., 2007; Charron et al., 2008; German-Retana et al., 2008; Okade et al., 2009; Taver-Roudet et al., 2012) (Intro Tab 2). Gallois et al. (2010), ont mis en évidence qu'une seule mutation dans la VPg était nécessaire pour restaurer la virulence du TuMV au mutant *At-eIF(iso)4E*. De plus, Charron et al. (2008), ont montré que la VPg des isolats avirulents de PVY n'interagit pas avec les différentes formes d'eIF4E codées par les variants alléliques de *pvr2* qui confèrent la résistance, tandis que les VPg d'isolats virulents sont capables d'interagir avec ces formes d'eIF4E. Par conséquent, la clé du contournement de la résistance liée à eIF4E chez le piment vis-à-vis du PVY, est la restauration de l'interaction entre la VPg et eIF4E, et que ceci passe par des substitutions d'acides aminés au sein des séquences respectives de l'une ou l'autre des deux protéines (Charron et al., 2008). Une des hypothèses serait que les potyvirus miment les ARN messagers (ARNm) dans le but de détourner le complexe cellulaire d'initiation de la traduction via leur VPg (Thivierge et al., 2005)

Cependant, même si la majorité des cas de résistance récessive liée aux facteurs d'initiation est la conséquence d'interaction eIF4E-VPg interrompue ou diminuée, ceci n'est pas une généralité. En effet, (Nakahara et al., 2010) ont montré, chez le pois, que le facteur d'avirulence qui va déterminer la sensibilité ou la résistance récessive contrôlée par le gène *cyy2*, codant pour eIF4E, est la P1 du CIYVV. Une seule substitution d'acide aminé à la position 24 de la P1 (transformant une isoleucine en valine) confère au CIYVV la capacité à contourner la résistance *cyy2* (Nakahara et al., 2010). De même, Abdul-Razzak et al., (2009)

démontre qu'une mutation dans la partie C-terminale de la CI du LMV provoque le contournement de la résistance récessive *mol* chez la laitue (Abdul-Razzak et al., 2009).

L'ensemble de tous ces résultats suggère que les virus ont développés des stratégies variées pour interagir avec la machinerie de traduction de l'hôte. L'évolution constante du génome viral lui permet également de s'adapter tout en rétablissant l'interaction avec la/les protéine(s) de l'hôte (ici eIF4E et isoformes) et donc la sensibilité dans un contexte *a priori* incompatible. Cependant, même s'il est prouvé que les virus détournent le/les complexes eucaryotes d'initiation de la traduction, il n'est pas encore certain que ce complexe soit détourné pour la traduction *sensu stricto* des ARN viraux ou pour toute autre étape du cycle infectieux telle la réplication ou le mouvement (Gao et al., 2004b; Robaglia and Caranta, 2006).

Intro Tab 5. Facteurs de la plante hôte jouant un rôle dans le cycle infectieux

Locus / gène	Protéine hôte	Méthode d'identification	Rôle	Espèce virale	Plante hôte	Références
<i>cum1</i>	eIF4E	Test Mutant	Facteur d'initiation de la traduction	CIYVV CMV	<i>A. thaliana</i>	(Sato et al., 2005) (Yoshii et al., 2004)
<i>cum2</i>	eIF4G	Test Mutant	Facteur d'initiation de la traduction	TCV	<i>A. thaliana</i>	(Yoshii et al., 2004)
<i>cum2</i>	eIF4G	Test Mutant	Facteur d'initiation de la traduction	CMV	<i>A. thaliana</i>	(Yoshii et al., 2004)
<i>cyv-2</i>	eIF4E	Test Mutant	Facteur d'initiation de la traduction	CIYVV	<i>P. sativum</i>	(Andrade et al., 2009)
<i>E6</i>	eIF(iso)4E	Test Mutant	Facteur d'initiation de la traduction	LMV PPV TuMV	<i>A. thaliana</i>	(Duprat et al., 2002) (Decroocq et al., 2006) (Duprat et al., 2002)
<i>lsp1</i>	eIF(iso)4E	Test Mutant	Facteur d'initiation de la traduction	TuMV TEV	<i>A. thaliana</i>	(Lellis et al., 2002)
<i>mol¹, mol²</i>	eIF4E	Test Mutant	Facteur d'initiation de la traduction	LMV	<i>Lactuca spp.</i>	(Nicaise et al., 2003)
-	eIF4G eIF(iso)4G eIF(iso)4G 1 eIF(iso)4G 1 eIF(iso)4G 2	Test Mutant	Facteur d'initiation de la traduction	CIYVV LMV PPV TuMV TuMV	<i>A. thaliana</i>	(Nicaise et al., 2007)
<i>pvr2¹⁰ à pvr2¹⁴</i>	eIF4E	Test Mutant	Facteur d'initiation de la traduction	PVY	<i>Capsicum spp.</i>	(Ibiza et al., 2010)
-	AtRH8 PpDDX	Test Mutant	DEAD-box RNA helicase (DDX)	PPV	<i>A. thaliana</i>	(Huang et al., 2010)

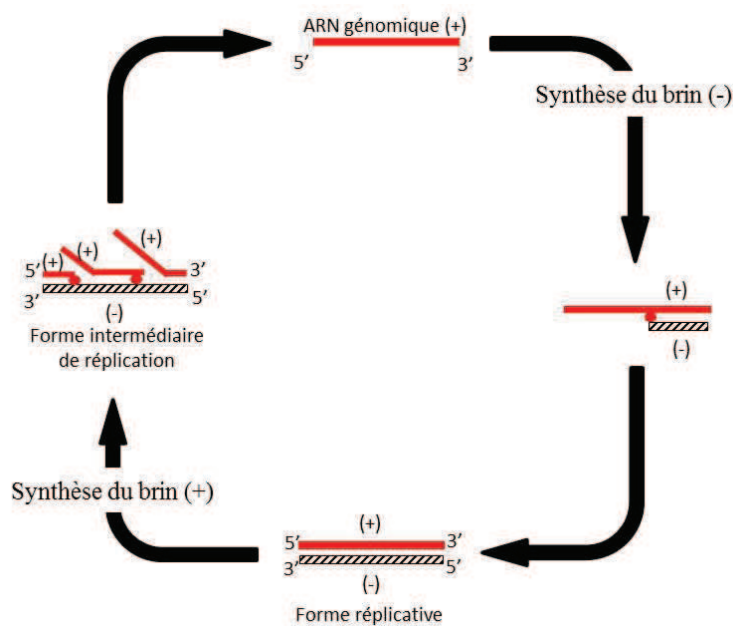
Intro Tab 5 (Suite)

Locus / gène	Protéine hôte	Méthode d'identification	Rôle	Espèce virale	Plante hôte	Références
-	cPGK	Test Mutant	chloroplast phosphoglycerate kinase	BaMV	<i>N. benthamiana</i>	(Lin et al., 2007)
-	PCaP1	Test Mutant	Protéine associée à la membrane	TuMV	<i>A. thaliana</i>	(Vijayapalani et al., 2012)
-	SYTA	Test Mutant	synaptotagmine	TMV CaLCuV	<i>A. thaliana</i>	(Lewis and Lazarowitz, 2010)
-	PME	Test Mutant Silencing	pectine méthylesterase	TMV	<i>N. tabacum</i>	(Chen et al., 2000)
-	PVIP	Test Mutant Silencing	Potyvirus VPg-interacting protein	TuMV	<i>A. thaliana</i> <i>N. benthamiana</i>	(Dunoyer et al., 2004)
	StREM1. 3	Silencing	Remorine	PVY	<i>S. lycopersicu m</i>	(Raffaele et al., 2009)
<i>bc-3</i>	eIF4E	Cartographie	Facteur d'initiation de la traduction	BCMV	<i>P. vulgaris</i>	(Naderpour et al., 2010)
<i>nsv</i>	eIF4E	Cartographie	Facteur d'initiation de la traduction	MNSV	<i>C. melo</i>	(Nieto et al., 2006)
<i>pot1</i>	eIF4E	Cartographie	Facteur d'initiation de la traduction	PVY TEV	<i>Lycopersico n spp.</i>	(Ruffel et al., 2005)
<i>pvr2</i>	eIF4E	Cartographie	Facteur d'initiation de la traduction	PVY TEV ChiVMV	<i>Capsicum spp.</i>	(Ruffel et al., 2005) (Charron et al., 2008) (Hwang et al., 2009)
<i>pvr6</i>	eIF(iso)4 E	Cartographie	Facteur d'initiation de la traduction	PVMV ChiVMV	<i>Capsicum spp.</i>	(Ruffel et al., 2006) (Hwang et al., 2009)
<i>rym4</i> <i>rym5</i> <i>rym6</i>	eIF4E	Cartographie	Facteur d'initiation de la traduction	BaYMV, BaMMV	<i>H. vulgare</i>	(Stein et al., 2005)
-	cPGK	Test Mutant	chloroplast phosphoglycerate kinase	BaMV	<i>N. benthamiana</i>	(Lin et al., 2007)
-	PCaP1	Test Mutant	Protéine associée à la membrane	TuMV	<i>A. thaliana</i>	(Vijayapalani et al., 2012)
-	SYTA	Test Mutant	synaptotagmine	TMV CaLCuV	<i>A. thaliana</i>	(Lewis and Lazarowitz, 2010)
-	PME	Test Mutant Silencing	pectine méthylesterase	TMV	<i>N. tabacum</i>	(Chen et al., 2000)
-	PVIP	Test Mutant Silencing	Potyvirus VPg-interacting protein	TuMV	<i>A. thaliana</i> <i>N. benthamiana</i>	(Dunoyer et al., 2004)
	StREM1. 3	Silencing	Remorine	PVY	<i>S. lycopersicu m</i>	(Raffaele et al., 2009)
<i>bc-3</i>	eIF4E	Cartographie	Facteur d'initiation de la traduction	BCMV	<i>P. vulgaris</i>	(Naderpour et al., 2010)
<i>nsv</i>	eIF4E	Cartographie	Facteur d'initiation de la traduction	MNSV	<i>C. melo</i>	(Nieto et al., 2006)

IV.2. Mécanismes spécifique de la réplication

IV.2.1. Facteurs viraux indispensable à la réplication

La réplication de l'ARN des potyvirus se fait en deux étapes (Intro Fig 4). La réplicase virale NIb équivalente à une ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) synthétise une molécule d'ARN de polarité négative, complémentaire à l'ARN génomique. Par la suite, cet ARN nouvellement synthétisé sert de matrice pour la synthèse de nouvelles molécules d'ARN de polarité positive équivalentes à l'ARN génomique parental (Wang and Maule, 1995)



D'après Astier et al. (2001)

Intro Fig 4. Cycle de réplication du génome des virus à ARN+

L'ARN dépendante ARN polymérase virale est représenté par un rond rouge.

Les données concernant la réplication chez les potyvirus sont peu nombreuses. Les hypothèses sur cette étape du cycle viral se basent sur les connaissances acquises pour d'autres virus à ARN similaires aux potyvirus par leur organisation génomique et leur stratégie d'expression du génome, tels que les virus animaux de la famille des *Picornaviridae* (Agol et al., 1999; Andino et al., 1999). La VPg des *picornaviridae* sert d'amorce lors de la synthèse du brin positif d'ARN (Paul et al., 1998; Murray and Barton, 2003). Il a ainsi été proposé que la VPg des potyvirus jouerait un rôle similaire lors de la réplication de ces virus

chez les plantes (Puustinen and Mäkinen, 2004). La NlB interagit avec les structures secondaires de l'ARN du TEV (Haldeman-Cahill et al., 1998) et la PABP de l'hôte fixe l'extrémité 3' de l'ARN viral (Wang et al., 2000). Cela permet le positionnement du complexe de réplication sur l'ARN viral. Chez les potyvirus, ce complexe contiendrait au moins la NlB (RdRp) (Martin et al., 1995), l'hélicase virale (CI) (Lain et al., 1990) mais aussi la NIa interagissant avec la NlB via la VPg (Hong et al., 1995) ou via le domaine NIa-Pro (Li et al., 1997; Guo et al., 2003). L'interaction NIa-NlB stimule l'activité polymérase de la NlB (Fellers et al., 1998) et est nécessaire pour l'infectivité du TEV (Daròs et al., 1999). De même, chez ce virus, l'interaction entre les protéines NlB et P1 réalise la fonction d'amplification du génome (Li and Carrington, 1995; Verchot and Carrington, 1995), alors que les protéines NIa et HcPro sont requises pour maintenir la viabilité du TEV (Kasschau and Carrington, 1995; Schaad et al., 1996).

IV.2.2. Membranes des organites (réticulum, golgi, chloroplaste) et réplication virale

Plusieurs travaux récents semblent indiquer que l'étape de réplication virale des potyvirus se déroule au niveau des membranes intracellulaires et plus particulièrement au niveau du réticulum endoplasmique. L'ancrage des protéines de réplication au niveau des membranes du réticulum endoplasmique se ferait à l'aide de la protéine virale 6K2 possédant un domaine hydrophobe. Lors de la réplication virale, la 6K2 induit la formation de vésicules au niveau des sites de sortie du réticulum. Ces vésicules transitent par l'appareil de Golgi pour atteindre les chloroplastes où elles s'agrègent et induisent des invaginations de l'enveloppe externe du chloroplaste (Wei and Wang, 2008; Wei et al., 2010a). Il est aussi important de noter que dans le cas des *tobamovirus* il a été observé que la réplication virale pouvait aussi se dérouler au niveau des membranes externes du tonoplaste (Hagiwara et al., 2003). La formation de vésicules au niveau des membranes protégerait ainsi les ARN doubles brins

(forme intermédiaire lors de la réplication) des réactions de défense de la plante basées sur l'ARN interférence.

IV.2.3. Les facteurs de l'hôte impliqués dans la réplication virale

Il a été découvert chez *Arabidopsis* que la mutation du gène *TOM1* provoque une diminution de la réplication du TMV (*Tobamovirus*) et du CMV (*Cucumovirus*) (Ishikawa et al., 1991; 1993). Le clonage de ce gène a conduit à l'identification d'une protéine transmembranaire interagissant avec le domaine hélicase de la réplicase des *Tobamovirus* (Yamanaka et al., 2000). De la même manière, il a été mis en évidence un homologue de *TOM1*, le gène *TOM3*. L'inactivation de ces deux gènes inhibe complètement la multiplication du TMV (Yamanaka et al., 2002). En parallèle, le clonage du mutant *tom2* a montré l'implication de deux gènes, *TOM2A* et *TOM2B*. Il se trouve que *TOM2A* code une protéine transmembranaire interagissant avec *TOM1* (Tsujimoto et al., 2003). Suite à des expériences de microscopie confocale à balayage laser, il est apparu que l'ensemble de ces facteurs de l'hôte, *TOM1*, *TOM3* et *TOM2A*, permettent l'ancrage du complexe de réplication à la membrane tonoplastique via une interaction avec la réplicase des *tobamovirus* (Yamanaka et al., 2000; Tsujimoto et al., 2003) (Intro Tab 5). Malheureusement, aucune donnée similaire n'est disponible dans le cas de la réplication des potyvirus.

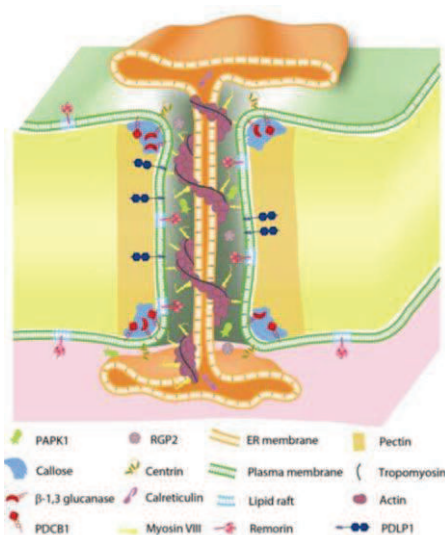
IV.3. Mouvement de cellule à cellule

IV.3.1. Importance des plasmodesmes dans le mouvement de cellule à cellule

Le mouvement intracellulaire d'ARN viral se fait par l'intermédiaire des plasmodesmes. Ce sont des canaux complexes traversant la paroi cellulaire végétale, permettant une continuité cytoplasmique entre les cellules adjacentes.

L'utilisation de la microscopie électronique par transmission a permis de démontrer que les plasmodesmes sont des canaux transmembranaires traversés par une structure tubulaire

dérivant du réticulum endoplasmique appelée desmotubule (Roberts, 2007). Le desmotubule est entouré d'un "annulus" de protéines globulaires sur toute l'épaisseur du plasmodesme (B. Ding, 1992). A chaque extrémité du desmotubule, on observe un col où la callose se dépose et régule l'ouverture ou la fermeture des plasmodesmes, permettant le contrôle de la circulation de molécules à travers le canal (Intro Fig 5) (Guseman et al., 2010; Lee and Lu, 2011).



D'après (Benitez-Alfonso et al., 2010)

Intro Fig 5. Représentation schématique d'un plasmodesme.

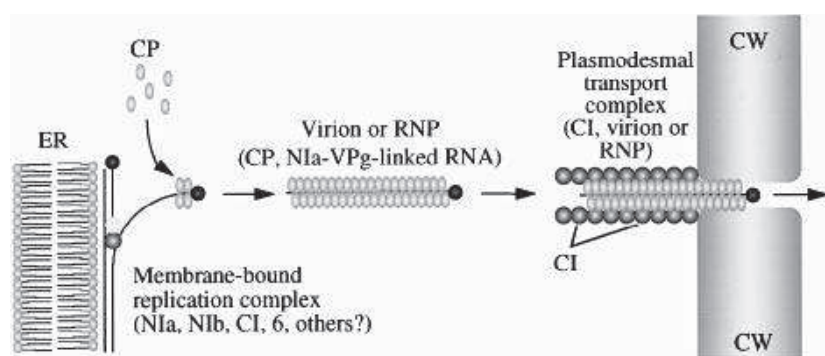
Coupe longitudinale faite au niveau du centre d'un plasmodesme.

A l'état naturel, les plasmodesmes ont une taille limite d'exclusion (SEL) de 1 kDa ne permettant pas le passage passif du virus (350 kDa). Ils se trouvent donc être des éléments clefs pour le passage des particules virales entre les différentes cellules. Nous verrons plus tard comment l'interaction avec des facteurs de la plante hôte joue une fois de plus un rôle important dans ce passage de cellule à cellule du virus (Benitez-Alfonso et al., 2010; Fernandez-Calvino et al., 2011).

IV.3.2. Protéines virales impliquées dans le mouvement de cellule à cellule

Si la plupart des virus disposent d'une (des) protéine(s) de mouvement (nommée(s) MP), codée(s) par leur génome, chez les potyvirus, près de la moitié de leurs protéines virales seraient impliquées dans le mouvement de cellule à cellule (Urcuqui-Inchima et al., 2001). Dolja et al. (1994; 1995), ont démontré chez le TEV qu'une mutation dans la CP provoquait

un arrêt du mouvement de cellule à cellule. De nombreuses autres études montrent également une implication de la CI dans le mouvement de cellule à cellule (Eagles et al., 1994; Klein et al., 1994) et plus particulièrement sa région N-terminale (Carrington et al., 1998). L'usage de la microscopie électronique a permis de localiser la CI du TVMV (*Tobacco vein mottling virus*, *Potyvirus*) et du PSbMV, au niveau des plasmodesmes dans les cellules infectées (Rodriguez-Cerezo et al., 1997; Roberts et al., 1998). Chez le TEV, il est proposé qu'un canal formé de plusieurs copies de la protéine CI guide le virion ou ribonucléoprotéine au travers du plasmodesme, mais que l'interaction entre le virus et le plasmodesme a lieu via la CP (Intro Fig 6) (Carrington et al., 1998), ce qui laisse à penser que les potyvirus utilisent ces canaux pour réaliser leur passage de cellule à cellule.



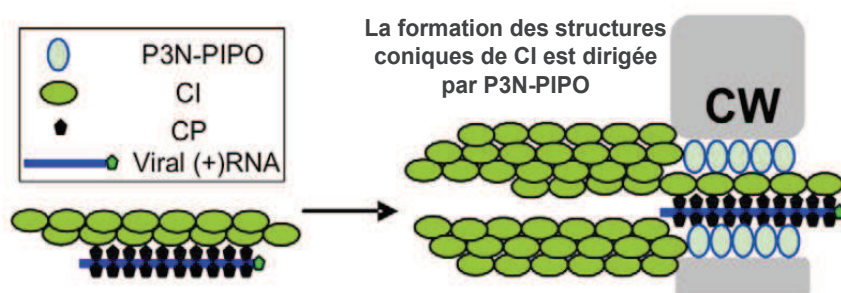
D'après (Carrington et al., 1998)

Intro Fig 6. Modèle proposé pour le passage du TEV de cellule à cellule au travers d'un plasmodesme.

CW : paroi cellulaire, CP : protéine de capsid, CI : protéine d'inclusion cylindrique, NIa : protéine d'inclusion nucléaire a, NIb : protéine d'inclusion nucléaire b, VPg : protéine liée au génome viral, RNP : ribonucléoprotéine.

Chez un autre potyvirus, le TuMV, il a été démontré récemment que la CI avait la capacité d'interagir avec la protéine P3N-PIPO (Wei et al., 2010a) et que cette interaction provoque l'accumulation de CI sous forme de structure conique au niveau des plasmodesmes (Wei et al., 2010b). Un modèle impliquant à la fois la CI et P3N-PIPO a été proposé par les auteurs. D'après ce modèle, lors des événements initiaux du mouvement, la CP serait recrutée par la CI. Le complexe ainsi formé et comprenant à la fois le virion et la CI pourrait se lier soit à P3N-PIPO libre dans le cytoplasme, avant qu'il ne soit transporté jusqu'aux plasmodesmes, soit à P3N-PIPO déjà associé aux plasmodesmes. Le virion est ensuite

transmis à travers les structures coniques composées de plusieurs copies de la CI, ancrées à l'aide de P3N-PIPO sur les plasmodesmes (Intro Fig 7)(Wei et al., 2010b).



D'après (Wei et al., 2010b)

Intro Fig 7. Dernier modèle proposé pour le passage des potyvirus de cellule à cellule impliquant le rôle de la protéine P3N-PIPO.

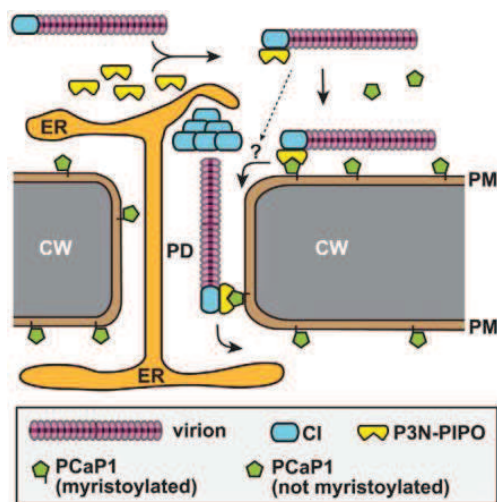
Le "complexe" virion-CI serait transporté jusqu'au plasmodesme modifié où la CI s'agrège sous la forme de structures coniques ancrées par la P3N-PIPO localisée dans le plasmodesme. Le virion est ensuite transporté via des interactions CI-P3N-PIPO dans le plasmodesme pour entrer dans la cellule adjacente. CW : paroi cellulaire.

Il apparaît également qu'au sein de la cellule, le cytosquelette permet au virus de se déplacer sous forme de complexe ribonucléoprotéique (MP-ARN viral), ou de virions, dans le cytoplasme puis au travers des plasmodesmes (Wright et al., 2007). Dans le cas du PSbMV, cette interaction pourrait se faire via eIF4E et eIF4G, de façon indépendante de la traduction et/ou de la réplication (Gao et al., 2004b).

IV.3.3. Facteurs de l'hôte impliqués dans le mouvement de cellule à cellule

Chez les potyvirus, bien que la plupart des protéines virales participent au mouvement à courte et/ou longue distance, très peu de facteurs de l'hôte interagissant avec ces protéines et essentiels à cette étape du cycle viral ont été identifiés. Dans le cas du TuMV, il a été récemment démontré que la protéine virale P3N-PIPO possède la capacité d'interagir avec la protéine membranaire PCaP1 (Vijayapalani et al., 2012). Chez Arabidopsis, le mutant *pcap1* provoque une forte diminution d'accumulation du TuMV. L'étude de protoplastes présentant cette mutation a permis d'exclure un rôle de la PCaP1 dans la réplication du TuMV. La découverte de ce facteur de l'hôte permet donc de préciser le mécanisme de mouvement de cellule à cellule des potyvirus. En effet, les auteurs proposent que P3N-PIPO se rapproche de

la membrane plasmique et des plasmodesmes via son interaction avec PCaP1 afin de participer au mouvement de cellule à cellule du TuMV (Intro Fig 8 et Tab 5) (Vijayapalani et al., 2012). Ceci tendrait à confirmer le rôle présumé de P3N-PIPO dans le mouvement des potyvirus, comme décrit par (Wei et al., 2010b) (voir Intro Fig 8).



D'après (Vijayapalani et al., 2012)

Intro Fig 8. Rôle potentiel de l'interaction P3N-PIPO/PCaP1 dans le mouvement des potyvirus.

Des informations supplémentaires sont disponibles dans d'autres genres viraux. La protéine synaptotagmine d'*Arabidopsis* (SYTA) possède la capacité d'interagir avec les protéines de mouvement (MP) d'un *Begomovirus* (CaLCuV, *Cabbage leaf curl virus*) et d'un *Tobamovirus* (TMV) (Lewis and Lazarowitz, 2010). Chez le mutant perte-de-fonction par insertion d'un ADN-T, *syta-1*, l'infection par le CaLCuV est fortement ralentie et les symptômes sont diminués. Ceci suggère que SYTA régule, via les plasmodesmes, le mouvement de cellule à cellule de ces deux virus. Puisque cette protéine végétale régule l'endocytose au niveau des membranes plasmiques, il est supposé que les MP du CaLCuV et du TMV se serviraient de l'adressage de ce facteur de l'hôte pour transiter du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique et ainsi gagner les plasmodesmes (Lewis and Lazarowitz, 2010) (Intro Tab 5).

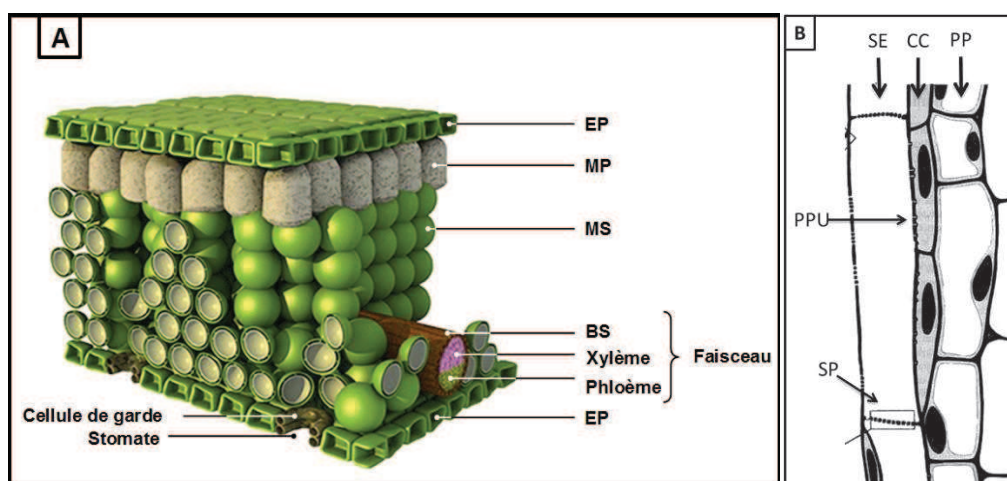
Dans le cas du *Grapevine fanleaf virus* (GFLV), un membre de la famille *Secoviridae*, Amari et al. (2010), ont démontré une interaction de la protéine de mouvement MP avec une

protéine localisée spécifiquement au niveau des plasmodesmes, appelée PDLP (PlasmoDesme-Located Proteins). Une inhibition de l'adressage des PDLP au plasmodesme provoque une accumulation des particules virales du GFLV dans le cytoplasme. De plus l'extinction de l'expression de trois copies du gène, codant pour la PDLP chez *Arabidopsis* entraîne une diminution du mouvement de cellule à cellule du GFLV, sans affecter la réplication virale (Amari et al., 2010).

IV.4. Mouvement à longue distance

IV.4.1. Importance du phloème dans le mouvement longue distance

Au cours du mouvement longue distance, le virus traverse différents types de tissus incluant le mésophylle (MS), la gaine périvasculaire (BS) et le phloème (Intro Fig 9A). Le phloème est constitué de plusieurs types cellulaires très spécialisés: les cellules compagnes (CCo), les cellules de parenchyme phloémien (PP) et les cellules des tubes criblés (SE). Les tubes criblés sont composés de cellules organisées en longues files cellulaires dont les parois transversales sont perforées de nombreuses ouvertures (SP), permettant ainsi la circulation libre de la sève élaborée (Intro Fig 9B).



D'après (Fitzgibbon et al., 2010)

Intro Fig 9.

(A). Représentation schématique d'une section transversale de feuille.

EP: cellule épidermique, MP : cellule du mésophylle palissadique, MS : cellule du mésophylle, BS : Cellule du parenchyme périvasculaire.

(B). Coupe longitudinale d'un faisceau de phloème.

SE : élément criblé, CCo : cellule compagne, SP : pore d'élément criblé, PPU : unité pore-plasmodesme.

Les plasmodesmes dit "branchés" (PPU pour *Pore-Plasmodesmata Units*) permettant de relier les tubes criblés et les cellules compagnes possèdent un seuil d'exclusion limite exceptionnellement grand de l'ordre de 10 à 40 kDA (Kempers and van Bel, 1997). Le complexe cellule/compagne–tube criblé (SE-CCo) est considéré comme une seule unité fonctionnelle en raison des relations structurelles et fonctionnelles entre les SE et les CCo (Oparka and Turgeon, 1999). Ces structures s'avèrent être importantes pour le mouvement systémique des virus, et même s'il a été proposé que leur transport via le phloème pourrait se faire de manière passive (Carrington et al., 1996), il a néanmoins été démontré qu'un certain nombre de facteurs de la plante hôte sont essentiels au mouvement longue distance du virus dans la plante (Chen and Citovsky, 2003; Dunoyer et al., 2004; Harries and Ding, 2011).

IV.4.2. Protéines virales impliquées dans le mouvement longue distance

Les modalités exactes de l'entrée des potyvirus dans le phloème et du transport à longue distance dans les vaisseaux vasculaires ne sont toutefois pas bien connues. Carrington et al. (1996), ont suggéré que le passage de la cellule compagne vers les tubes criblés ferait appel à des mécanismes – et donc probablement des facteurs de plante– différents suivant l'hôte ou le virus. Ceci a été en partie vérifié dans le cas où l'infection par un même isolat viral résulte en une infection locale ou généralisée selon l'hôte inoculé (Sáenz et al., 2002).

Un certain nombre de protéines virales sont impliquées dans le mouvement à longue distance des potyvirus. Chez le TEV (*Potyvirus*), la délétion de la région C-terminale de la CP inhibe le mouvement en systémie (Dolja et al., 1995). La protéine HcPro possède un domaine central impliqué dans le mouvement vasculaire (Cronin et al., 1995) tandis que du côté de la VPg, une mutation de sa région centrale perturbe le mouvement vasculaire du PVA (*Potato virus A, Potyvirus*) et du TEV (Schaad et al., 1997b; Rajamäki and Valkonen, 1999; Rajamäki and Valkonen, 2002). De même, des mutations dans sa région C-terminale affectent l'accumulation virale et/ou le mouvement à longue distance du PVA (Rajamäki and Valkonen,

2002). Par ailleurs, la VPg du PVA s'accumule au niveau des cellules compagnes des feuilles non-infectées, situées au-dessus des feuilles inoculées, en l'absence d'autres protéines virales et de l'ARN viral (Rajamäki and Valkonen, 2003). Ainsi, ces données suggèrent que la VPg serait transportée par le système vasculaire en amont du front d'infection virale. De plus, des mutations dans la CI (Carrington et al., 1998) et la 6K2 (Rajamäki and Valkonen, 1999; Spetz and Valkonen, 2004) interfèrent avec l'infection systémique du TEV et du PVA respectivement.

IV.4.3. Facteurs de l'hôte impliqués dans le mouvement longue distance

Dans le cas des potyvirus, il a été montré que la protéine PVIP interagit avec la protéine virale VPg de plusieurs potyvirus (Dunoyer et al., 2004). Lors de l'abolition de cette interaction soit par une mutation dans la VPg du TuMV, soit par suppression des transcrits du gène *PVIP*, il est observé un ralentissement de l'infection systémique et une diminution significative de l'accumulation virale au niveau des feuilles non inoculées. Cela semble donc démontrer que cette protéine, même si elle n'est pas essentielle, participe au mouvement longue distance (Dunoyer et al., 2004) (Intro Tab 2 et 5).

Chez le tabac, une pectine méthylesterase (PME) de la paroi se lie avec la MP d'un *Tobamovirus*, le TMV. L'abolition de cette interaction soit par mutation de la protéine virale ou par silencing du gène *PME* provoque respectivement un blocage du mouvement de cellule à cellule (Chen et al., 2000) ou un arrêt de l'infection systémique (Chen and Citovsky, 2003) (Intro Tab 5). L'étude par microscopie de l'immunofluorescence du TMV chez des plantes de tabac n'exprimant plus la protéine PME, démontre la présence du virus dans les feuilles inoculées et dans les tissus vasculaires, mais un blocage complet du virus en amont des feuilles caulinaires. Cette protéine semble donc jouer un rôle important dans la sortie du virus des tissus vasculaires (Chen and Citovsky, 2003).

Dans le cas des *umbravirus*, il a été montré que la protéine cytoplasmique ORF3 du *Groundnut rosette virus* (GRV, *Umbravirus*) nécessite un passage par le nucléole, pour former les particules ribonucléoprotéiques (RNP) qui seront transportées dans le reste de la plante via le phloème (Kim et al., 2007). De plus, il apparaît que la protéine ORF3 interagit avec une protéine du nucléole, la fibrillarine, elle-même impliquée à la fois dans l'entrée de ORF3 dans le nucléole et dans la formation des particules virales RNP essentielles au mouvement longue distance (Kim et al., 2007).

V. Conclusion

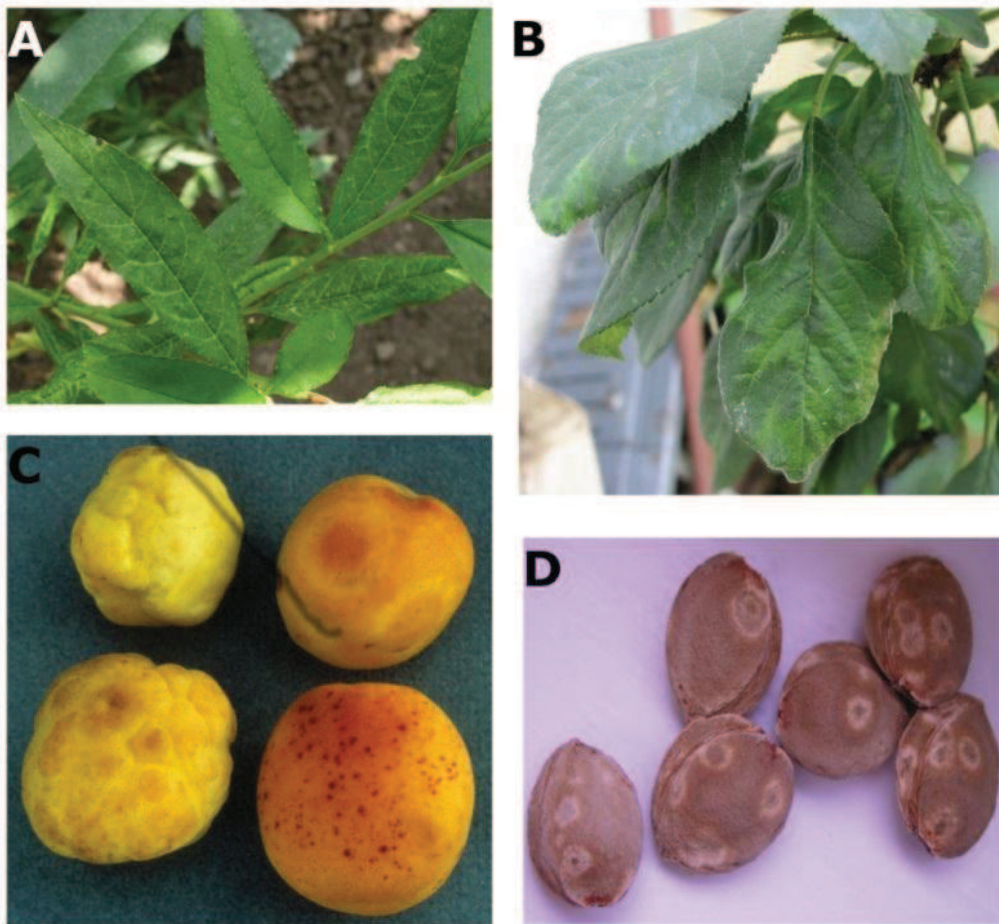
Nous venons de voir que le bon déroulement du cycle infectieux des virus, et notamment des potyvirus, repose sur des interactions entre protéines virales et protéines de l'hôte, ou même entre molécules d'ARN et protéines. A ce jour, les principaux gènes de sensibilité aux potyvirus clonés codent pour les facteurs eucaryotes d'initiation de la traduction, à savoir eIF4E et eIF4G (et leurs isoformes) (Intro Tab 5). Au regard d'informations telles que l'interaction directe entre la VPg-Pro et PABP chez le TuMV (Léonard et al., 2004) et la cartographie de déterminants génétiques contrôlant la résistance récessive au PPV (Decroocq et al., 2006; Sicard et al., 2008), on peut penser que, dans le futur, d'autres facteurs essentiels à l'accomplissement du cycle viral, et distincts des facteurs d'initiation de la traduction, seront identifiés. Outre l'intérêt qu'ils représentent comme source potentielle de résistance aux virus dans des variétés cultivées, ces facteurs permettront de mieux comprendre les modalités du cycle viral dans l'hôte en identifiant de nouveaux interacteurs directs ou indirects.

VI. Présentation du sujet d'étude

VI.1. La maladie de la sharka

La maladie de la sharka ou variole du prunier est apparue vers 1917 en Bulgarie (Atanassov, 1932). Elle affecte principalement les arbres fruitiers à noyaux du genre *Prunus*. Son agent causal, le *Plum pox virus* (PPV), appartient au genre *Potyvirus*, de la famille des *Potyviridae*. Il est transmis naturellement par pucerons selon un mode non persistant. On dénombre sept souches différentes à ce jour. Les souches Dideron (PPV-D) et Marcus (PPV-M) sont les plus fréquentes. Il existe une souche recombinante (PPV-Rec) résultant d'un évènement de recombinaison entre les souches D et M au niveau du gène de la P3 (Glasa et al., 2004). La souche C a été découverte chez le cerisier (Fanigliulo et al., 2003). La souche Winona (PPV-W) a été isolée pour la première fois au Canada (James and Varga, 2005) mais elle se trouve être très présente en Russie et dans les pays de l'ex-URSS (Sheveleva et al., 2012). La souche El Amar (PPV-EA) a été, quant à elle, isolée dans la région du delta du Nil et la souche PPV-T (Turquie) a été découverte dans la province d'Ankara (Serçe et al., 2009). L'ensemble de ces souches divergent selon leurs caractéristiques sérologiques, biologiques ou génétiques. Cependant, elles partagent une forte identité tant au niveau nucléotidique que protéique (plus de 80%).

Le PPV provoque des anneaux chlorotiques sur les feuilles et les fruits, une déformation du fruit et une chute précoce (Intro Fig 10). Ces fruits déformés sont impropres à la commercialisation. Le coût des pertes mondiales liées à la maladie de la sharka atteint 10 milliards d'euros sur les 30 dernières années (Cambra et al., 2006). Le seul moyen d'éradiquer cette maladie est l'arrachage des arbres infectés et la plantation d'arbres sains. Ce pathogène a été classé parmi les organismes de quarantaine par l'Union Européenne (EU council directive 2000/29/EEC, annexe II) et parmi les 10 agents phytopathogènes les plus dangereux pour les Etats Unis (Public Health Security and Bioterrorism Act of 2002).



Intro Fig 10. Symptômes induits par le *Plum pox virus* (PPV)

Symptômes observés sur les feuilles de pêcher (*Prunus persica*) (A), symptômes observés sur les feuilles de prunier (*Prunus domestica*) (B), taches en anneaux, décoloration et malformation sur abricot, le fruit sain est présent en bas à droite (C) et décolorations blanches et taches en anneaux sur des noyaux d'abricot (D).

Cependant les sources de résistances naturelles à la maladie de la sharka chez les *Prunus* sont très limitées (Escalettes et al., 1998; Martinez-Gomez et al., 2000). Il est donc essentiel de les diversifier, en allant identifier de nouveaux mécanismes de résistance présents chez d'autres espèces, hôtes de ce virus, avant de les transférer vers les espèces fruitières cultivées.

Nous venons de voir que les résistances récessives impliquent des facteurs de la plante hôte très conservés entre les genres et les espèces. Ces facteurs de l'hôte qui participent au bon déroulement du cycle viral présentent également des fonctions de base, dans la cellule végétale. Par conséquent, ils sont généralement fortement conservés entre les espèces et

même les genres. On peut donc facilement imaginer que l'identification d'orthologues à ces facteurs de l'hôte peut conduire à identifier chez d'autres espèces, cultivées, de nouvelles sources de résistance. Pour cette raison, de nombreuses études cherchent à identifier de nouveaux mécanismes de résistance récessive chez la plante modèle *Arabidopsis* afin de les transférer à l'avenir vers les espèces cultivées.

VI.2. Un "hôte" particulier: *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis est considéré comme la plante modèle la plus importante en ce qui concerne la compréhension des mécanismes biologiques du développement des plantes ainsi que leur adaptation aux stress biotiques et abiotiques. Elle appartient à la famille des Brassicacées qui comprend de nombreuses espèces cultivées (Chou, navet, colza, radis...). La répartition géographique d'*Arabidopsis* est très large, allant de l'Asie à l'Amérique et sur la plupart des continents.

Cette plante herbacée mesure à l'état adulte 10 à 15 cm de haut. Sa partie végétative est constituée d'une rosette d'environ 5cm de diamètre située au ras du sol d'où se séparent la partie racinaire courte et la hampe florale portant des feuilles alternes et l'inflorescence. Sa fleur est actinomorphe (symétrie axial), de couleur blanche, et mesure quelques millimètres de longueur. Elle est constituée de 4 pétales, 4 sépales, 4 étamines et un pistil bicarpellé multi-ovulé qui, après fécondation, donnera une silique contenant 30 à 50 graines de 0.5mm de longueur. Son cycle de vie est relativement court, de 6 à 8 semaines. *Arabidopsis* possède un petit génome d'environ 125 Mb, organisé en 5 chromosomes.

L'intérêt porté à cette plante provient de plusieurs facteurs. Sa petite taille et son cycle de vie court en font une plante idéale pour la culture en serre. Elle est autogame, diploïde et produit des milliers de graines, facilitant l'obtention de descendance nombreuses. Les croisements sont relativement faciles à réaliser, par application du pollen sur la surface du stigmate. Sa transformation par *Agrobacterium tumefaciens* est aussi aisée. De plus,

Arabidopsis possède l'un des plus petits génomes des plantes à fleurs. Depuis les années 2000, le génome de l'accension Col-0 est complètement séquencé (<http://www.arabidopsis.org/>). Etant donné qu'une multitude de laboratoires travaillent sur cette plante modèle, il existe de nombreux outils facilitant les approches de génomique et de génétique chez cette espèce. Parmi eux, une large collection de mutants d'insertion est disponible (<http://www.arabidopsis.org/>). Il existe également de nombreuses ressources de marqueurs moléculaires (Amplified fragment length polymorphism (AFLP), Cleaved Amplified Polymorphic Sequences (CAPS), Simple Sequence Repeats (SSR)...). Enfin, un projet de séquençage de 1001 accessions est en cours depuis 2008 (<http://www.1001genomes.org/>) et le séquençage en masse des accessions d'Arabidopsis a conduit à l'identification de centaines de milliers de marqueurs de type SNP (single-nucleotide polymorphism). A l'heure actuelle, une banque de 250 000 SNP est accessible publiquement (<https://cynin.gmi.oeaw.ac.at/home/resources/atpolydb>).

Du fait de la large distribution géographique d'Arabidopsis il existe une variabilité génétique naturelle considérable entre les différentes accessions (Alonso-Blanco and Koornneef, 2000). La facilité de croisement et le cycle de vie court de la plante permettent la production de nombreuses lignées recombinantes que ce soient des RIL (Recombinant Inbred Lines) ou des NIL (Near isogenics Lines, voir M&M Fig 1 et 2) ce qui en fait un puissant outil pour la cartographie et le clonage de QTLs. De plus, la caractérisation de nombreux marqueurs SNP polymorphes entre différentes accessions naturelles a récemment permis l'utilisation de la génétique d'association à l'échelle du génome complet (Genome-Wide Association (GWA)) (Aranzana et al., 2005; Atwell et al., 2010). Ce type d'étude vise à lier la variation d'un phénotype donné chez des accessions naturelles au polymorphisme génotypique entre ces différentes accessions, polymorphisme mis en évidence au travers de centaines de milliers de SNPs.

VI.3. Contexte scientifique de la thèse

Nous avons vu qu'à l'heure actuelle, les sources de résistance au PPV chez les *Prunus* sont très limitées. De plus, la volonté de progresser sur la recherche de résistances à ce virus est freinée par la biologie des *Prunus*, notamment leur cycle de vie relativement long (3 à 8 ans d'une génération à l'autre), leur encombrement spatial et des auto incompatibilités polliniques variées, selon les espèces. Le but ultime du laboratoire de virologie est donc de diversifier ces sources de résistance chez les plantes hôtes cultivées par la recherche de nouveaux mécanismes transférables de la plante modèle vers les arbres fruitiers. Il a été montré précédemment au laboratoire que la plante modèle *Arabidopsis* peut être artificiellement inoculée par le PPV (Decroocq et al., 2006). Au vu du grand nombre de ressources génétiques accessibles chez cette plante, le pathosystème PPV-*Arabidopsis* apparut donc judicieux pour la recherche de nouvelles sources de résistances, récessives.

Une collection-cœur d'*Arabidopsis* représentative de la diversité naturelle de l'espèce a été phénotypée avec 5 souches de PPV (O. Sicard, PhD thesis Université Bordeaux Ségalen, 2007) (Intro Tab 6). Cela a permis de confirmer que non seulement *Arabidopsis* était sensible au PPV mais surtout que la gamme de réponse était très variée, allant de la sensibilité à la résistance en passant par la tolérance.

NASC	Accessions	R (D) ¹	NAT (D) ¹	EA ¹	PS-I4 (M) ¹	Soc ¹
N8581	Ler	S+	S+	Tol	Tol	Ri
N1092	Col	S+	S+	Rsys	Rsys	Ri
VNAT24	Accessions	R (D)	NAT (D)	EA	PS-I4 (M)	Soc
8AV	Pyl-1	Rsys	Rsys	Rsys	Rsys	Ri
25AV	Jea	Rsys	Tol	Rsys	Rsys	Ri
42AV	Bl-1	S+	S+	S+	Tol	Rsys
62AV	St-0	Rsys	Rsys	Ri	Rsys	Ri
70AV	Kn-0	S+	Tol	nd	Rsys	Ri
83AV	Edi-0	S+	Tol	Rsys	Ri	Ri
91 AV	Tsu-0	Tol	Tol	Tol	Rsys	Ri
92AV	Stw-0	Tol	Tol	nd	Rsys	Ri
94AV	Mt-0	S+	S+	Tol	Rsys	Ri
101AV	Ge-0	Tol	Tol	Tol	Rsys	Ri
157AV	Ita-0	Tol	Tol	Tol	Rsys	Rsys
162AV	Ct-1	S+	S+	S+	Tol	Ri
163AV	Can-0	Tol	Tol	nd	Rsys	Ri
166AV	Cvi-0	*S+	S+	Rsys	Rsys	Ri
172AV	Bur-0	S+	S+	S+	Tol	Rsys
178AV	Alc-0	Tol	Tol	nd	Rsys	Ri
180AV	Blh-1	Tol	Tol	Tol	Tol	Ri
200AV	Gre-0	¶Rsys	Tol	Tol	Rsys	Ri
215AV	Mh-1	S+	Tol	nd	Rsys	Ri
224AV	Oy-0	S+	Tol	S+	Rsys	Ri
236AV	Shahdara	Tol	Tol	Rsys	Rsys	Ri
252AV	Akita	S+	S+	S+	Rsys	Ri
257AV	Sakata	Tol	Tol	Rsys	Rsys	Ri
266AV	N13	Tol	Tol	Rsys	Rsys	Ri

Intro Tab 6. Résultats phénotypique de l'inoculation de la collection cœur 24 du VNAT avec 5 souches de PPV.

S+: phénotype sensible symptomatique, Tol: Tolérant, Ri: résistance locale, Rsys: résistance systémique.

¹ Nom des isolats testés et, entre parenthèse, souche virale correspondante. R : Rankovic, NAT : Non-Aphid Transmissible, EA : El Amar, Soc : Sour Cherry.

* L'accession Cvi-0 n'est pas complètement sensible à la souche PPV-R, un certain nombre de plantes échappent à l'infection.

¶ Ce phénotype n'a pas pu être confirmé.

Cette étude a conduit à l'identification d'accessions au comportement contrasté lors de l'infection par le PPV. L'utilisation de lignées recombinantes (RIL et NIL) entre les accessions Cvi-1 et Ler a mis en évidence le locus *rpv1* (Decroocq et al., 2006; Sicard et al., 2008) qui contrôle une résistance récessive à deux souches de PPV, PPV-D (isolat PPV-R pour PPV-Rankovic) et PPV-M (isolat PPV-PS).

Cependant au vu des résultats obtenus par (Sicard et al., 2008), d'autres mécanismes de résistance, totale ou partielle, semblent exister chez Arabidopsis. Nous nous sommes donc

attachés durant les trois dernières années à décortiquer certains de ces mécanismes et à mettre en évidence le(s) déterminant(s) génétique(s) sous-jacent(s).

Tout au long de cette étude, nous avons utilisé l'isolat PPV-R (souche PPV-D). Cet isolat a servi précédemment à la construction de deux clones infectieux, pICPPVnkGFP et pBINPPVnkGFP, le premier étant inoculable par blessures (inoculation mécanique ou biolistique) et le second, inséré dans un vecteur binaire, est inoculable par *Agrobacterium* (Fernandez-Fernandez et al., 2001; Jiménez et al., 2006). De façon très intéressante, une étude préliminaire avait montré que la réponse d'*Arabidopsis* à l'infection par l'isolat PPV-R différait selon le mode d'inoculation du virus (inoculation mécanique ou agro-inoculation).

En conséquence, nous avons conduit en parallèle des essais d'inoculation, mécanique ou par *Agrobacterium*, d'abord sur des populations issues de la collection cœur de 24 accessions de l'INRA de Versailles (Intro Tab 6) puis sur des populations bi- ou multi-parentales disponibles au fur et à mesure de l'avancement de la thèse. Les résultats obtenus lors d'agro-inoculation sont présentés dans le chapitre 1 de ce manuscrit tandis que le chapitre 2 se focalise sur l'identification d'un déterminant majeur de l'infection par le PPV lors d'inoculation mécanique. Ces deux chapitres font ou feront l'objet de publication dans des journaux à comité de lecture (Pagny et al., 2012; Poque et al., à soumettre) et sont donc présentés sous forme d'article.

Le chapitre 3 correspond, quand à lui, à la caractérisation d'un mécanisme particulier de résistance à l'infection en systémie par le PPV chez l'accession JEA (Intro Tab 6). Nous terminerons ce manuscrit par une discussion générale autour de la variabilité des mécanismes de résistance récessive au PPV chez la plante modèle *Arabidopsis*.

Chapitre 1

Family-based linkage and association mapping reveals novel genes affecting *Plum pox virus* infection in *Arabidopsis thaliana*

Chapitre 1: Family-based linkage and association mapping reveals novel genes affecting *Plum pox virus* infection in *Arabidopsis thaliana*

Ce chapitre est consacré à l'identification du/des déterminant(s) génétique(s) contrôlant l'infection par le PPV chez *Arabidopsis* lors d'agro-inoculation.

Pour cela, deux collections cœurs de 24 et 20 accessions d'*Arabidopsis* (McKhann et al., 2004; Clark et al., 2007) ont été phénotypées. Les résistances observées dans ces deux collections ont été cartographiées à l'aide de populations F2 (St-0 x *Ler*, *Ler* x RRS7, RRS7 x Col-0, *Ler* x Ts-1, Ts-1 x Col-0) et recombinantes (Ts-5 x Mz-0) préalablement génotypées. De plus, dans le but de valider ces résistances, nous avons mené une étude de génétique d'association à l'échelle du génome entier sur 147 accessions d'*Arabidopsis* ainsi qu'une étude de cartographie génétique à partir d'une population de lignées recombinantes multi-parentales (Multiparent Advanced Generation Inter-Cross MAGIC).

L'ensemble de ce travail a mené à l'identification d'un nouveau facteur de la plante hôte impliqué dans le mouvement longue distance du PPV.

Family-based linkage and association mapping reveals novel genes affecting *Plum pox virus* infection in *Arabidopsis thaliana*

Gaëlle Pagny*, Pauline S. Paulstephenraj*, Sylvain Poque*, Ophélie Sicard, Patrick Cosson, Jean-Philippe Eyquard, Mélodie Caballero, Aurélie Chague, Germain Gourdon, Lise Negrel, Thierry Candresse, Stéphanie Mariette and Véronique Decroocq

INRA, Université de Bordeaux, UMR 1332 BFP, BP81, 33883, Villenave d'Ornon Cedex, France

Author for correspondence:

Véronique Decroocq

Tel: +33 557122383

Email: decroocq@bordeaux.inra.fr

Received: 23 March 2012

Accepted: 21 July 2012

New Phytologist (2012)

doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04289.x

Key words: *Arabidopsis thaliana*, association mapping, *Plum pox virus*, PPV, QTL mapping, TRAF domain-containing proteins, virus movement.

Summary

- Sharka is a devastating viral disease caused by the *Plum pox virus* (PPV) in stone fruit trees and few sources of resistance are known in its natural hosts. Since any knowledge gained from *Arabidopsis* on plant virus susceptibility factors is likely to be transferable to crop species, *Arabidopsis*'s natural variation was searched for host factors essential for PPV infection.
- To locate regions of the genome associated with susceptibility to PPV, linkage analysis was performed on six biparental populations as well as on multiparental lines. To refine quantitative trait locus (QTL) mapping, a genome-wide association analysis was carried out using 147 *Arabidopsis* accessions.
- Evidence was found for linkage on chromosomes 1, 3 and 5 with restriction of PPV long-distance movement. The most relevant signals occurred within a region at the bottom of chromosome 3, which comprises seven RTM3-like TRAF domain-containing genes. Since the resistance mechanism analyzed here is recessive and the *rtm3* knockout mutant is susceptible to PPV infection, it suggests that other gene(s) present in the small identified region encompassing *RTM3* are necessary for PPV long-distance movement.
- In consequence, we report here the occurrence of host factor(s) that are indispensable for virus long-distance movement.

Introduction

Viruses are obligatory intracellular parasites that rely on the host cell machinery for progression of their infectious cycle. Successful viral infection in plants requires compatible interactions between host and viral factors during replication of the viral genome, translation of the viral proteins, and viral movement, both cell-to-cell and long-distance (Gilbertson & Lucas, 1996; Carrington & Whitham, 1998; Noueiry & Ahlquist, 2003; Waigmann *et al.*, 2004; Scholthof, 2005). Interruption of these processes by mutations or the complete absence of relevant host factors results in the failure of the corresponding viral infection step, which is operationally equivalent to recessive resistance (Fraser, 1990). Virus-permissive forms of these host factors, considered as virus susceptibility genes, also participate in other cell functions and are largely conserved between plant species. A case-of-study is the identification of the translation eukaryotic translation initiation factors 4E (eIF4E) and 4G (eIF4G) (for a review, see Robaglia & Caranta (2006)). Following this initial discovery, a growing number of recessive resistance genes have been cloned and nearly all of them, with the exception of the *tom* and *rim* genes (Yamanaka *et al.*, 2000, 2002; Tsujimoto *et al.*, 2003; Yoshii *et al.*, 2009),

encode translation initiation factors (Truniger & Aranda, 2009). The exact steps through which these factors contribute to viral infection have still not been identified precisely, but viral RNA translation, replication and/or virus cell-to-cell movement have been identified as potential candidates (Robaglia & Caranta, 2006; Truniger & Aranda, 2009). Interestingly, no susceptibility factor participating in the virus systemic movement has yet been identified, while it is obvious that multiple host factors are required for virus long-distance movement (Schaad & Carrington, 1996; Scholthof, 2005; Requena *et al.*, 2006).

Although *Arabidopsis* is not a crop, it has significant utility for the acquisition of basic knowledge of plants and their reactions towards biotic or abiotic stress. Its small genome (*c.* 150 Mb) and the ease of its manipulation have positioned it as the model plant for biotechnological and genetic studies, including plant disease resistance analysis. *Arabidopsis* is susceptible to various viral pathogens such as potyviruses (e.g. *Turnip mosaic virus*; *Tobacco etch virus* (TEV); *Lettuce mosaic virus* (LMV); *Plum pox virus* (PPV)), Cucumoviruses (*Cucumber mosaic virus*), Luteoviruses (*Beet western yellow virus*) and others, making it an ideal host for identifying genes that underlie susceptibility to viral infection (Carr & Whitham, 2007). Because of the significant conservation of these host factors across species, genera and even taxonomic families, information on plant susceptibility factors for an

*These authors contributed equally to this work.

Arabidopsis-virus pathosystem may be applied to screen for, to create, resistance against related viruses in crop species (Gómez *et al.*, 2009; Pavan *et al.*, 2010). Recessive resistance seems to be more frequent for plant–potyvirus pathosystems (40% of the resistances identified to date) than for other viral groups or for other plant pathogens (Fraser, 1990; Truniger & Aranda, 2009). Thus, extensive screening of susceptibility genes in model plants such as *Arabidopsis* offers the potential to develop resistances in a wide range of crops to which potyviruses pose a significant threat.

The goal of the present study was to identify host factors that influence the susceptibility to PPV. In *Arabidopsis*, PPV inoculation results in a wide range of phenotypic outcomes, from full susceptibility to complete resistance (Decroocq *et al.*, 2006). To identify PPV susceptibility genes (and thus recessive resistance candidate genes), we conducted a resistance screen in two core collections of 24 and 20 *Arabidopsis* accessions (McKhann *et al.*, 2004; Clark *et al.*, 2007). Heterozygous F1 and segregating F2 populations were used to select and map host determinants linked to recessive resistance. Genetic analysis and linkage mapping in biparental and multiparental populations confirmed the existence of new recessive resistance genes that do not colocalize with already known susceptibility factors. In a second step, genome-wide association mapping was used to refine the position of candidate loci. By combining results from linkage mapping in F2 and recombinant inbred line (RIL) crosses with association analysis, several promising true associations were identified, including a major locus closely linked to restriction of PPV long-distance movement. This study illustrates the potential of genome-wide association scans completed by traditional mapping methods as a tool for dissecting the genetics of plant–virus interactions. It also allowed us to identify the first susceptibility gene(s) involved in viral long-distance movement.

Materials and Methods

Plant material

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh accessions from the 24-core collection were provided by the VNAT INRA facility (<http://dbsgap.versailles.inra.fr/vnat/>). Other accessions were purchased from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre (<http://nasc.life.nott.ac.uk/>) (Clark *et al.*, 2007). The accessions used are described in Table 1 and in the Supporting Information, Table S2. F1 and F2 populations from a cross between *Ler* (N8581) or *Col-0* (N1092) and RRS-7 (N22688), Ts-1 (N22692) or St-0 (62AV) were obtained in the laboratory. Heterozygosity of the F1 populations was checked with the MSAT2.5 simple sequence repeat (SSR) marker (see <http://www.inra.fr/internet/Produits/vast/msat.php>). F2 populations were obtained by self-pollinating single F1, heterozygote plants. The RIL population derived from the cross between Ts-5 (N22648) and MZ-0 as well as the Multiparent Advanced Generation Inter-Cross (MAGIC) recombinant population were also obtained from NASC (<http://nasc.nott.ac.uk/>).

Plants were grown in a BL-3 containment glasshouse under temperature- and humidity-controlled conditions (20°C and relative humidity of 60%). Six plants per accession of each core

Table 1 Identification of recessive, allelic resistance mechanism(s) of *Plum pox virus* (PPV) systemic restriction in F1 *Arabidopsis thaliana* populations

Crossings (parent 1 × parent 2)	Parent 1	Parent 2	Number of plants tested	Observed segregation ratio (S:R)	Status
<i>Ler</i> × RRS-7	S	R	6	5 : 1	Recessive
<i>Ler</i> × Ts-1	S	R	20	19 : 1	Recessive
Ts-1 × <i>Ler</i>	R	S	6	5 : 1	Recessive
St-0 × <i>Ler</i>	R	S	6	5 : 1	Recessive
<i>Ler</i> × Hi-0	S	R	5	5 : 0	Recessive
Hi-0 × <i>Ler</i>	R	S	3	3 : 0	Recessive
Sf-2 × <i>Ler</i>	R	S	3	3 : 0	Recessive
M353 ^{HI} × <i>Ler</i> *	R	S	12	12 : 0	Recessive
M336 ^{HI} × <i>Ler</i> *	R	S	3	3 : 0	Recessive
M53 ^{Sf} × <i>Ler</i> *	R	S	12	12 : 0	Recessive
M338 ^{Sf} × <i>Ler</i> *	R	S	3	3 : 0	Recessive
M370 ^{Rec} × <i>Ler</i> *	R	S	12	12 : 0	Recessive
M449 ^{Rec} × <i>Ler</i> *	R	S	12	12 : 0	Recessive
RRS-7 × Ts-1	R	R	6	0 : 6	Allelic
Ts-1 × Hi-0	R	R	6	0 : 6	Allelic
Sf-2 × RRS-7	R	R	10	0 : 10	Allelic
Hi-0 × RRS-7	R	R	9	0 : 9	Allelic
St-0 × Ts-1	R	R	7	0 : 7	Allelic
St-0 × Hi-0	R	R	3	0 : 3	Allelic
Hi-0 × Sf-2	R	R	10	0 : 10	Allelic

*M353, M336, M53, M338, M370 and M449 correspond to Multiparent Advanced Generation Inter-Cross (MAGIC) recombinant lines resistant to PPV infection. They are numbered following the NASC nomenclature (see <http://nasc.life.nott.ac.uk/CollectionInfo?id=112>). Haplotype of the MAGIC RILs at the *sha3* locus are indicated in uppercase as follows: HI, Hi-0 haplotype; Sf, Sf-2 haplotype; Rec, recombinant in between Hi-0 and Sf-2 haplotypes.

collection were phenotyped following PPV agroinoculation. Experiments were repeated at least three times.

Viral material

Viral clones used in this study are all derived from the PPV-R isolate, which belongs to the PPV-Dideron strain (Riechmann *et al.*, 1990). Construction of pICPPVnkGUS and pBINPPVnkGFP containing the full-length nucleotide sequence of PPV-R coupled with the β-glucuronidase (*GUS*) or green fluorescence (*GFP*) proteins has been described in Fernández-Fernández *et al.* (2001) and Jimenez *et al.* (2006), respectively.

PPV resistance phenotyping

The pBINPPVnkGFP viral clone was agroinoculated on the rosette leaves at 4 wk after sowing. Virus infection was scored at 21 d postinoculation (dpi) in noninoculated tissues (floral stems or newly developed rosette leaves). Protocols for *Agrobacterium* preparation and PPV agro- and biolistic inoculations have been described elsewhere (Decroocq *et al.*, 2006; Jimenez *et al.*, 2006). The agroinoculation procedure was carried out starting from *Agrobacterium* C58C1 cultures (OD₆₀₀ = 0.6) induced with acetosyringone. *Agrobacterium* pBINPPVnkGFP-transformed

cells were applied with a toothpick to three *Arabidopsis* rosette leaves. Direct particle bombardment inoculation was performed with the pICPPVnkGUS clone using a handheld device (Bio-Rad) and starting from 0.1 µg of infectious DNA per shooting.

At 21 dpi, viral accumulation was estimated for each individual plant from double antibody sandwich (DAS) enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) assays (Sicard *et al.*, 2008). Optical densities (ODs) were normalized using the PPVnkGFP-infected *Nicotiana benthamiana*-positive control deposited on every ELISA plate of an assay. Quantitative data were determined relative to the value of the PPVnkGFP-infected *N. benthamiana*, which was set at 100. In the case of RILs, the final viral accumulation value is the average of normalized measurements from all PPV-inoculated replicates of each RIL.

Fluorescence detection of GFP-tagged PPV is described in Decroocq *et al.* (2006) and histochemical GUS assay was carried out according to the method of Jefferson *et al.* (1987). Leaf and flower tissues were incubated in reaction buffer containing 50 mM NaH₂PO₄ (pH7), 0.01% Tween 20, 10 mM Na₂EDTA and 0.3% (w/v) 5-bromo-4-chloro-3-indolyl D-glucuronic acid. Explants were placed at 37°C for 24 h and later treated with ethanol 70% to intensify the blue staining under a Leica stereomicroscope.

Construction of parental linkage maps and mapping of the genetic determinants in biparental populations

From over hundreds of PCR markers available on the TAIR website (www.arabidopsis.org), we selected 100 which are distributed all along or throughout the *Arabidopsis* genome. They were then tested on a set of *Arabidopsis* parental accessions including *Ler*, RRS-7, Ts-1 and St-0. New SSR markers were also developed in the laboratory (P. Cosson *et al.*, unpublished); they are named BSATX.YY, X being the chromosome and YY, its relative position on the physical map (see <https://www6.bordeaux-aquitaine.inra.fr/bfp/Recherche/Equipe-de-Virologie-vegetale> as well as Notes S1 for the table of primers and the *Arabidopsis* linkage maps).

Linkage maps were generated with Kosambi mapping function in JoinMap software (Van Ooijen & Voorrips, 2001). A logarithm of odds (LOD) score of 5 was used to assign markers to linkage groups. In few cases, a decrease of the LOD threshold to 3 was necessary to insert all markers in the map. Alternatively, they were added manually, following their expected position as depicted on the *Arabidopsis* physical map (<http://www.arabidopsis.org/>). Linkage maps are displayed in the mapping supplemental data. A first map based on 240 F2 individuals was produced and used for QTL linkage mapping. Based on this first information, regions of chromosomes 1 and 3 where QTLs for resistance to PPV infection were identified were especially targeted with five to eight extra molecular markers. They were used in F2 populations of 400 individuals at least, in order to carry out fine-mapping of the resistance loci.

For the Ts-5 × MZ-0 recombinant lines, a set of 84 markers was previously scored as shown on <http://www.jic.ac.uk/staff/ian-bancroft/arabidopsis-populations.htm#TJ> or in Notes S1. They served to map Ts-5 PPV resistance determinant(s). Fifty of the original set of 92 Ts-5 × Mz-0 RILs were delivered by the NASC

and later tested in replicates in a four-block random design. A PPV-resistant control, the eFiso4E loss-of-function mutant, named E6 (Duprat *et al.*, 2002), together with the two parents, Ts-5 and Mz-0, were added to the study.

Quantitative trait locus analysis on F2 and recombinant biparental populations was done as described in Sicard *et al.* (2008), following the multiple QTL mapping method after automatic cofactor selection. A permutation test was performed to calculate the 5% limit for statistical significance both at chromosome level and genome-wide. The percentage of the phenotypic variation explained by the QTL corresponds to the regression value R^2 taken at the peak LOD score of the QTL in the MapQTL6 software (www.kyazma.nl). Epistatic interactions and additive QTL effects were tested by running the linkage mapping data through the QTLNetwork-2.1 software (<http://ibi.zju.edu.cn/software/qtlnetwork/>) (Yang *et al.*, 2008) as described in Brachi *et al.* (2010).

Quantitative trait locus meta-analysis was performed using the BioMercator V3 software (under development, O. Sosnowski & J. Joest, unpublished) (Arcade *et al.*, 2004) and was conducted in three steps as described in Marandel *et al.* (2009). The QTL meta-analysis algorithm implemented by Goffinet & Gerber (2000) was used to determine the best-fitting model, including the number of meta-QTLs effectively underlying the observed QTLs and their respective position and confidence intervals.

Mapping of the genetic determinants in multiparental population

Four hundred and thirty-five of the original set of 527 MAGIC recombinant lines were tested in triplicates, following a complete random three-block design. The 19 founders of the MAGIC lines were added, together with the PPV-resistant E6 mutant. The heritability among MAGIC lines was estimated by fitting a random-effects model (Kover *et al.*, 2009). ANOVA allowed the specific effect of 'genotype' and the broad-sense heritability to be determined, which is the ratio between the genetic variance and the total phenotypic variance and is calculated using the formula $h^2 = \sigma_g^2 / [\sigma_g^2 + (\sigma_e^2/n)]$, where σ_g^2 is the genetic variance, σ_e^2 is the environmental variance and n is the number of replicates. Procedures for QTL analysis are described in Kover *et al.* (2009). Briefly, the first step of the analysis is based on a probabilistic reconstruction of the haplotype mosaic of each MAGIC line. This allows computation of the probability for a given individual to be the founder individual at a given locus for a given MAGIC line, consequently giving the contributions of each founder to detected QTLs. The genome is then scanned for the presence of QTLs in each single nucleotide polymorphism (SNP) interval using a fixed effects model. We used the HAPPY R package to map QTLs (<http://mus.well.ox.ac.uk/magic/>).

Association mapping

One hundred and forty-seven accessions issued from Atwell *et al.* (2010) (Table S2) were tested following a complete random four-

block design. Quantitative data for viral accumulation were generated as described earlier. For binary data and to avoid intermediate scores, accessions were rated as susceptible (and assigned a value equal to 1) when the OD value reached at least three times the mean OD value of the PPV-resistant E6 control (Decroocq *et al.*, 2006). By contrast, plants were rated as resistant (value of 0).

Genotyping data (based on SNP markers) are from Atwell *et al.* (2010) and are publicly available. Four different types of analyses were performed to test for the association between genotypes and phenotypes. Fisher's exact tests were implemented on binary data. Wilcoxon rank-sum tests were used on quantitative data. In addition, a regression analysis was implemented using the Plink software (Purcell *et al.*, 2007) (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>). These three analyses are expected to have false positives as a result of population structure. Thus, we also used the EMMA method (Kang *et al.*, 2008), based on a mixed model that accounts for confounding as a result of population structure. The matrix of genotype similarity was calculated on a subset of 1000 SNPs regularly sampled in the set of filtered 214 553 SNPs using a homemade R program. The same set of 1000 SNPs was used to calculate the genetic relationship between the 147 accessions and to build a UPGMA tree using the DARwin software (Perrier & Jacquemoud-Collet, 2006). Linkage disequilibrium analysis was performed using TASSEL (Bradbury *et al.*, 2007).

An *in silico* search was done on the TAIR8 Col-0 genome annotation for candidate genes linked to the SNP linkage disequilibrium (LD) bin(s). *Ler*-predicted amino acid sequences were retrieved from the MAGIC founders' sequence database (<http://mus.well.ox.ac.uk/19genomes/>) (Gan *et al.*, 2011).

Results

Variation in response to PPV infection across accessions of two *Arabidopsis* core collections

We evaluated resistance to PPV, over three replicate experiments, with the 24-accession VNAT core collection (McKhann *et al.*, 2004) and the 20-accession core collection (Clark *et al.*, 2007). The pBINPPVnkGFP PPV infectious cDNA clone, introduced in *Agrobacterium tumefaciens*, was used to agroinoculate the plants because its original PPV parental form, PPV-Rankovic, is able to overcome the dominant restricted TEV movement (RTM) resistance, which restricts PPV long-distance movement in *Arabidopsis* (Decroocq *et al.*, 2006, 2009). *Arabidopsis* accessions showed a range of phenotypic variation from full susceptibility to resistance to PPV (see Table S1).

The PPV-resistant accessions St-0, RRS-7 and Ts-1 were backcrossed with the *Ler* PPV-susceptible parent. The F1 populations were then challenged by agroinfection with the pBINPPVGFP viral clone. Nearly all individuals in the F1 generation of the St-0 $\times$ *Ler*, *Ler* $\times$ RRS-7 and *Ler* $\times$ Ts-1 cross supported PPV long-distance movement (hereafter called PPV-LDM) (Table 1), demonstrating that the resistance mechanism controlling PPV-LDM in these accessions is recessive.

In consequence, St-0 (62AV) from the VNAT, and RRS-7 (N22688) and Ts-1 (N22692) from the other collection (Clark *et al.*, 2007) were selected for further phenotypic observations. These accessions were again inoculated, either via agroinoculation using pBINPPVnkGFP or by biolistics using pICPPVnkGUS. PPV accumulation in inoculated leaves and in uninoculated floral tissues was scored at 9 and 21 dpi, respectively (Fig. 1). *Ler* plants served as a positive, susceptible control while plants of the E6, *AteIF(iso)4E* knockout line served as a negative, fully resistant control (Duprat *et al.*, 2002; Decroocq *et al.*, 2006). While PPV was able to replicate and accumulate both locally and systemically in the *Ler* control plants, a clear restriction of PPV long-distance spread and systemic accumulation was demonstrated by both GFP fluorescence observation (Fig. 1a) and GUS histochemical staining (Fig. 1b) in the St-0, RRS-7 and Ts-1 accessions. As expected, no PPV infection could be detected, locally or systemically, in E6 (Decroocq *et al.*, 2006). Since pBINPPVnkGFP and pICPPVnkGUS behaved similarly, the impairment in PPV-LDM is not related to resistance to *Agrobacterium*-mediated inoculation.

Linkage mapping of the recessive resistance trait(s) in biparental populations

Restriction of PPV-LDM was evaluated in five F2 biparental populations comprising 240–400 individuals each (see Table 2) following agroinoculation with the pBINPPVnkGFP viral clone. It segregated as a trait controlled by one or two recessive genes, segregation rates ranging from 24.89 to 43.10% of PPV-negative F2 plants. Five distinct linkage maps were constructed from SSR and simple sequence length polymorphism (SSLP) molecular markers available on the TAIR website (<http://www.arabidopsis.org/>) or developed in the laboratory (see <https://www6.bordeaux-aquitaine.inra.fr/bfp/Recherche/Equipe-de-Virologie-vegetale> and Notes S1). QTL analysis was performed as described in the Materials and Methods section, using MapQTL6 and QTLNetwork software. Significant loci contributing to PPV-LDM restriction are presented in Table 2. When crossed with *Ler*, one to three loci (designated *sha* for resistance to sharka, followed by the linkage group number) were detected, the most significant being *sha3* (LOD scores ranging from 28.61 to 15.86, with an R^2 reaching 66.4%). Interestingly, when RRS-7 and Ts-1 were crossed with the PPV-susceptible parent Col-0, only the effect of the *sha3* locus was observed, with LOD scores of 46 and 22.6, respectively, and a maximum R^2 of 42.5% (Table 2). Col-0 and the PPV-resistant accessions, Ts-1 and RRS-7, possibly share similar alleles at the *sha1* and *sha5* loci or the effect of these loci is too low in a Col-0 susceptible background to be detected.

These results suggest a major effect of the *sha3* locus in the control of PPV-LDM in *Arabidopsis* in the three resistant accessions analyzed. No epistatic effect between the different QTLs was detected, at the probability of 1–5%.

In parallel, an F8 RIL population derived from a cross between Ts-5 and MZ-0 was challenged using the same conditions as described earlier. Only 50 of the 94 Ts-5 $\times$ Mz-0 RILs were

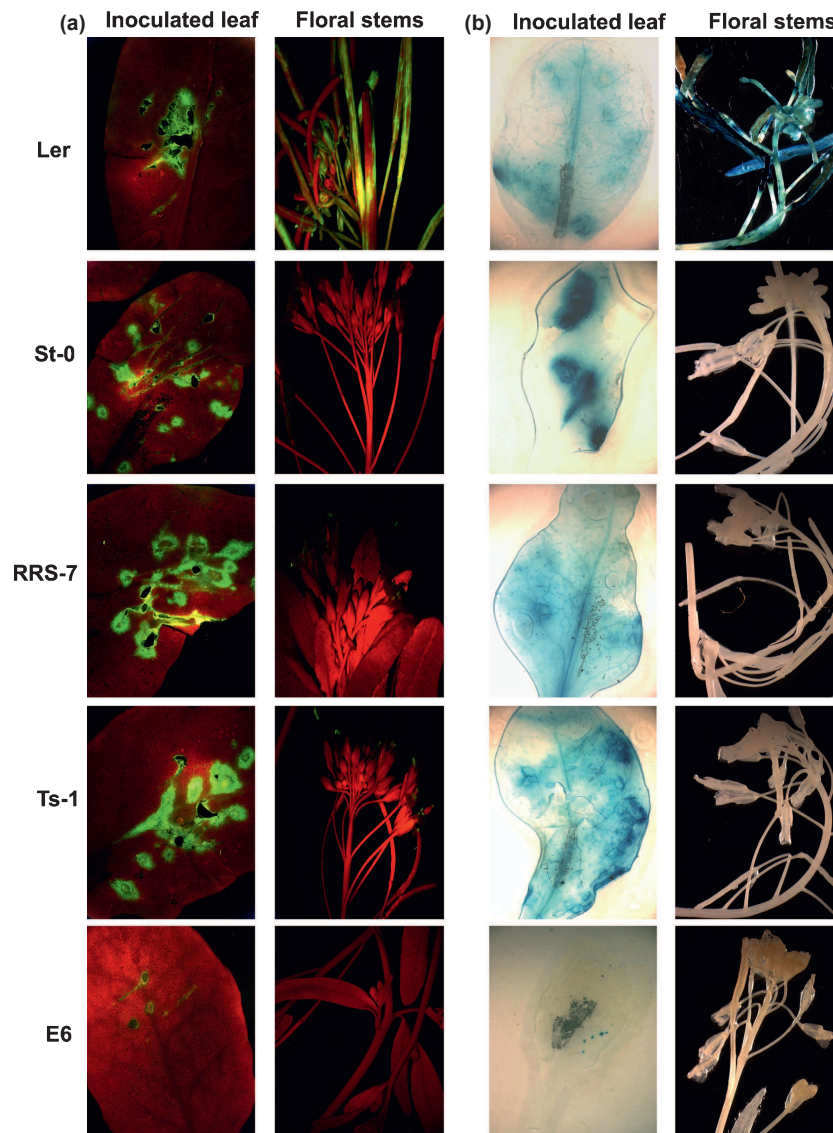


Fig. 1 Green fluorescence protein (GFP)- and β -glucuronidase (GUS)-tagged *Plum pox virus* (PPV-R) movement is restricted to inoculated leaves of St-0, RRS-7 and Ts-1 *Arabidopsis thaliana* accessions. (a) Photographs under a UV stereomicroscope of GFP accumulation in Ler, St-0, RRS-7 and Ts-1 inoculated (first column) and systemic tissues (second column) after agroinoculation with pBINPPVnkGFP. (b) Photographs under a stereomicroscope showing GUS accumulation in Ler, St-0, RRS-7 and Ts-1 inoculated and systemic tissues (third and fourth columns, respectively) after biolistic inoculation of pICPPVnkGUS. Negative control consisted of plants of an *eIF(iso)4E* knockout mutant line (named E6). Photographs were taken at 9 d (inoculated leaves) and 21 d (noninoculated floral stems) postinoculation.

obtained from the NASC and were tested in four replicates, following a full random block design. Twenty-one days after inoculation, PPV was scored by ELISA in the noninoculated tissues. Before the QTL analysis, a linkage map was generated from the Ts-5 $\times$ Mz-0 locus genotype file (<http://www.jic.ac.uk/staff/ian-bancroft/arabidopsis-populations.htm#TJ>). Composite interval mapping scans detected only the *sha3* locus in the Ts-5 $\times$ Mz-0 recombinant population (Table 2). Genotyping the Ts-5 $\times$ Mz-0 RILs with an additional set of eight CAPS markers (Hou *et al.*, 2010) (see <http://amp.genomics.org.cn/>) spanning the *sha3* region allowed the fine-mapping of this single major-effect locus down to an 875 kb interval, delimited by markers AL390921–8963 (position 21 027 402 bp) and AL356014–9336 (21 903 190 bp) (data not shown).

Respective intervals of the *sha3* locus were computed in a QTL meta-analysis. It showed that the best model fitting the phenotypic observations is 1-QTL model (A.I.C 18.4), meaning that one single metaQTL (named Meta-Sha3 in Fig. 2b) actually underlies all QTLs detected on LG3.

Linkage mapping of the recessive resistance trait in a multiparental recombinant population

Four hundred and thirty-five of the 527 MAGIC RILs described by Kover *et al.* (2009) and obtained from NASC were evaluated for restriction of PPV-LDM in a three random blocks design. The broad-sense heritability of PPV resistance for the MAGIC lines was calculated from the variance analysis (see the Materials and

Table 2 Identification of three *Arabidopsis thaliana* quantitative trait loci (QTLs) involved in recessive restriction of *Plum pox virus* (PPV) long-distance movement in bi- and multiparental populations

	Type of population/ Nb of individuals or RILs	Parental phenotypes		Predicted <i>sha</i> locus location				Maximum LOD ^b	<i>R</i> ² (%)		
		Nb markers ^a	Parent 1	Parent 2	Name of the locus	Linkage group	Resistance parental allele				
Biparental progenies	F2/240	25	R	S	<i>sha1</i> <i>sha3</i>	LG1 LG3	St-0 St-0	Nga59-JV26/27 BSAT3.011- Nga112	8643–4 015 243 18 443 089–23 179 348	4.34 29.54^b	10.9 66.4
	F2/400	30 ^d	S	R	<i>sha5</i> <i>sha1</i> <i>sha3</i>	LG5 LG1 LG3	St-0 RRS-7 RRS-7	BSAT5.007-CIW9 F19P19B-JV18/19 F9D24.1- T20N10.2	8 665 026–17 061 229 1 157 727–5 160 594 21 509 910–21 774 851	15.59 ^c 31.6 ^b 28.5^b	nd 23.4 21.2
RRS-7 × Col-0	F2/400	30	R	S	<i>sha3</i>	LG3	RRS-7	F9D24.1- T20N10.2	21 509 910–21 774 851	46^b	41.3
<i>Ler</i> × Ts-1	F2/400	33 ^d	S	R	<i>sha1</i> <i>sha3</i> <i>sha5</i>	LG1 LG3 LG5	Ts-1 Ts-1 Ts-1	ACC2-JV26/27 F1P2-Nga6 Nga139- ATHS0191	176 325–4 015 243 17 552 222–23 042 025 8 428 136–15 021 915	12.76 ^b 15.86^b 4.90 ^b	13 18.6 7.2
	F2/240 RIL F8/50 ^e	29 84 ^d	R R	S S	<i>sha3</i> <i>sha3</i>	LG3 LG3	Ts-1 Ts-5	F1P2-Nga6 Athcd2bg-Nga6	17 552 222–23 042 025 20 058 340–23 042 025	22.6^b 10.37^b	42.5 63
Multiparental progeny log ^f	Type of population/ Nb of RILs genome-wide <i>P</i> - value	Set of markers used for the analysis	Contributing parents		Name of the locus	Linkage group	Peak in bp	Peak SNP	Interval in bp		
MAGIC	RIL/435 ^e	1260 SNPs	Hi-0	Sf-2	<i>sha3</i>	LG3	21517584	MN3_21528561	1 666 6699–23 291 586	33.93	0

^aNumber of markers used to build the core genetic map (simple sequence repeat or simple sequence length polymorphism).^bSignificant after 1000 permutations and at 95% statistical confidence.^cDetected only by interval mapping (IM).^dFine-mapping of the *sha3* and *sha1* loci was performed in those populations, with five to eight extra molecular markers.^eIn four repeats for the Ts-5 × JIC240#14 recombinant inbred lines (RILs) and triplicates for the Multiparent Advanced Generation Inter-Cross (MAGIC) lines.^flogP is equivalent to the $-\log_{10}(P\text{-value})$, nd, not determined.The *sha3* locus is represented in bold. Bp, base pairs; maximum LOD, score associated with the peak of the logarithm of odds (LOD) plot using multiple QTL mapping; R², proportion of the phenotypic variation explained by the peak of the LOD plot using multiple QTL mapping (explained variance); Nb, number.

Methods section) and reached 0.89. Each founder accession was tested in parallel to the MAGIC RILs (see Fig. S1). Only two accessions, Hi-0 and Sf-2, appeared fully resistant to pBINPPVnkGFP systemic infection. However, other accessions displayed a continuous distribution of the mean viral accumulation value estimated in ELISA assays, with six accessions (Kn-0, Edi-0, Bur-0, Ct-2, Wu-0 and Can-0) showing partial resistance to PPV accumulation. This indicates the existence of other genetic factors with significant effects on the degree of virus accumulation in susceptible accessions. A similar variability of PPV accumulation in the Col-0, Cvi-1 and *Ler*-susceptible accessions has been described previously (Sicard *et al.*, 2008).

A significant block effect was also detected and accounted for either by integrating it in the computation or by analyzing each block separately. We performed a QTL mapping analysis using data from each block separately as well as one using the mean over all blocks. Analysis of the variation in susceptibility to PPV infection identified for each analysis one major QTL, with a maximum of the $-\log_{10}(P\text{-value})$ of 33.93 for the mean values. This locus mapped at the bottom of chromosome 3 (see Fig. 2c) and colocalized with the previously identified Meta-*sha3* QTL. The genetic interval ranged from 16 666 699 to 23 291 586 bp, with a peak at 21 517 584 bp (Table 2). Interestingly, the same genomic region was identified when using data from each block separately or from the mean values of the three blocks. QTL analysis of MAGIC lines allowed reconstruction of the genome of each line as a mosaic of the founder haplotypes (Kover *et al.*, 2009). Based on this reconstruction, it was possible to determine that the two founders contributing the QTL detected in the MAGIC lines were indeed Hi-0 and Sf-2 (Fig. S2).

To verify the recessive resistance identified in the MAGIC founders, Hi-0 and Sf-2, as well as various PPV-resistant MAGIC recombinant lines, were crossed to the *Ler*-susceptible accession. All F1 populations proved susceptible to PPV systemic infection (Table 1), confirming that the *sha3*-controlled resistance trait is recessive. In order to test whether the *sha3* genetic determinant is the same in RRS-7, Ts-1, St-0, Ts-5, Hi-0 and Sf-2, these accessions were crossed to test allelism. All F1 populations were entirely resistant (Table 1), confirming that *sha3* is allelic in all these accessions.

Genome-wide association mapping of Arabidopsis resistance to PPV long-distance movement

To refine QTL intervals to a candidate gene level, a genome-wide association study (GWAS) in 147 Arabidopsis accessions (Table S2) from wild populations was conducted (see Fig. S3). Two PPV-susceptible controls (namely Col-0 and *Ler*-0) that have been previously phenotyped under similar conditions (Decroocq *et al.*, 2006) were added to the experiment, together with E6, used as a negative control. For phenotypic assays, a completely randomized design in four independent blocks was used. Two types of data were generated from the phenotypic assays: quantitative virus accumulation data (normalized ELISA OD values) and binary data (1 for susceptible, 0 for resistant).

The broad-sense heritability of PPV resistance for the accessions reached 0.92. A block effect was detected with both quantitative

and binary data, which was mainly the result of a difference of means between blocks 1 and 2 on one side and blocks 3 and 4 on the other. We performed association analyses on each block separately and on means (mean of blocks 1 and 2 and mean of blocks 3 and 4). Using the Bonferroni correction (significant $-\log_{10}(P\text{-value}) > 6.63$), a very low number of SNPs showed association with resistance to PPV. However, on LG3, a block of SNPs showed significant association in all analyses (Table S3) with a peak at position 21 603 348 identified with both binary and quantitative analyses, including the EMMA analysis which takes population structure into account.

Notably, 15 of the 100 SNPs with the lowest *P*-values obtained when analyzing binary data were located in the *sha3* interval as determined by QTL analysis in the multiparental population (16 666 699–23 291 586 bp; see Table 2). While processing the quantitative data, eight or nine SNPs of the 100 SNPs with the lowest *P*-values were identified in the same interval with the EMMA and PLINK packages, respectively (Table S3). In all analyses, the peak SNPs included the SNP at position 21 603 348, even after taking into account the population structure (EMMA analysis).

To determine the resolution of this association study, the extent of LD around the best-associated SNP (21 603 348) was investigated. We successively used three sets of SNPs: 460 SNPs covering the *sha3* interval, 158 SNPs distributed 30 kb centromeric and telomeric to 21 603 348 (see the results in Fig. S4), and 82 SNPs present in a range of 10 kb above and under 21 603 348. A significant LD ($P < 0.0001$) around the 21 603 348 SNP, extending roughly from positions 21 592 393 to 21 606 184 (13.79 kb wide) was detected. For simplicity, SNPs that are highly correlated with SNP 21 603 348 are referred to as belonging to a *sha3* LD bin and map in an interval of 13.8 kb (Fig. S4).

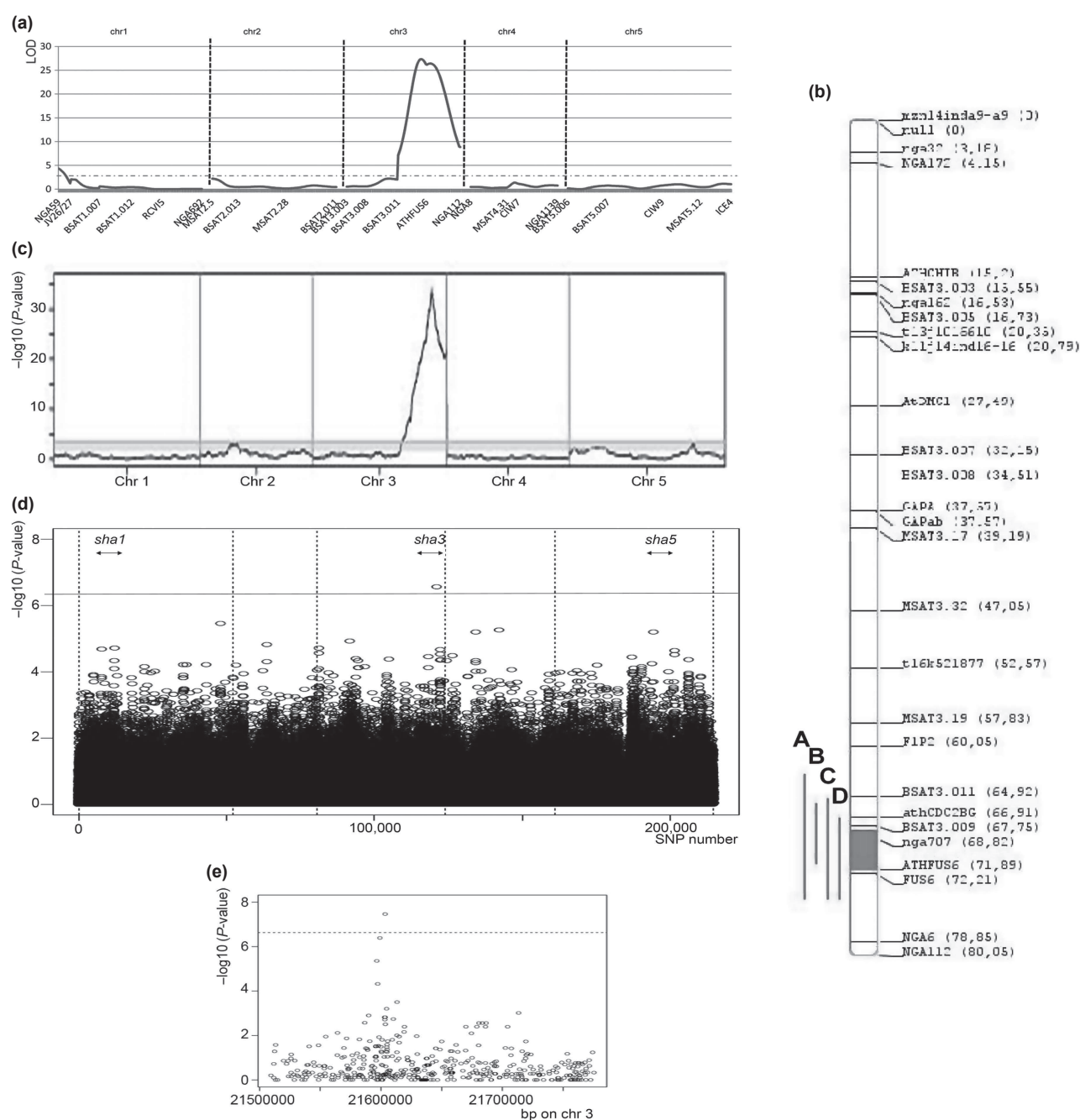
Other than in the *sha3* region, several intriguing association signals were found elsewhere in the genome, mostly within the *sha5* locus, with the highest evidence of association observed at position 15 820 863 and 17 196 614 ($-\log_{10}(P\text{-value}) = 4.62$ and 5.20 for the binary and quantitative data, respectively, Tables S3a, S3c). Most of the SNPs identified on chromosome five are located within or just over the *sha5* region identified through linkage analysis in the St-0 $\times$ *Ler* (positions 8 665 026–17 061 229) and Ts-1 $\times$ *Ler* (positions 8 428 136–15 021 915) biparental populations. However, while the same locus was detected, GWAS based on quantitative and binary data did not share strictly the same SNPs (Tables S3a,b). A significant enrichment in SNPs associated with restriction of PPV-LDM is observed between positions 13 902 662 and 17 196 614, on chromosome 5, for quantitative data (14 SNPs within the 100 best-associated SNPs after EMMA analysis), and *c.* 15 820 863 for binary data. Nevertheless, the genetic interval remains large (*c.* 3.2 Mb) and the effect of this locus in relation to *sha3* awaits further study. A larger set of Arabidopsis accessions might also help, in the future, to refine the *sha1* and *sha5* loci.

In summary, different alleles of the same *sha3* gene appear to confer restriction of PPV-LDM in St-0, RRS-7, Ts-1, Ts-5, Sf-2 and Hi-0. Seven new accessions among the 147 that were tested

presented a similar phenotype at 21 dpi, but this can be linked either to another *sha3* allele or to alternative gene(s) in the same bin region being able to afford the same movement restriction phenotype. In the initial experiments, Fei-0 presented an intermediate response to PPV infection (Table S1), with no accumulation detected upon mechanical or biolistic inoculation, but with detectable (although extremely weak) accumulation upon agroinoculation. This could be explained by the occurrence of a 'leaky' *sha3* allele or by the effect of *sha3*-independent background gene(s). We cannot favor one hypothesis over the other until we map the respective determinant(s), which is in progress for Fei-0, Ei-2, Ca-0 and An-1 (RILs at <http://arabidopsis.info/webservices/index.html>).

Genetic and geographic origins of PPV resistant accessions

Although GWAS has allowed significant advances for plant pathogen resistance studies (Aranzana *et al.*, 2005; Nemri *et al.*, 2010; Todesco *et al.*, 2010), to date no susceptibility locus for virus infection has been identified using this strategy. LD analysis allowed us to refine the mapping of *sha3*. It consists of a tightly linked LD bin spanning *c.* 13.8 kb that includes 10 genes whose polymorphisms define resistance alleles that are found in Arabidopsis accessions issued from several geographic areas. There is no obvious geographic structure to the distribution of *sha3*-controlled, PPV-resistant accessions. While the Iberian populations (Spain, Portugal)



concentrate half of the resistant alleles (Ts-1, Ts-5 and Sf-2), the origin of the other resistant accessions ranges from northern Europe (Sweden for St-0, the Netherlands for Hi-0) to North America (RRS-7).

In order to understand the origin of the PPV-resistant accessions, we selected a subset of 1000 SNPs regularly sampled in the set of filtered 214 553 SNPs. They were used to build a UPGMA tree (Fig. 3), which revealed two main clusters. Indeed, it appears that the PPV-resistant phenotypes are spread in two clusters and there is no strong correlation between resistance and the genetic origin of individuals. Hi-0, RRS-7 and St-0 belong to the first genetic cluster, as depicted in Fig. 3, while the Ts accessions belong to group 3. Sf-2 was not added in this analysis because it was not genotyped with the set of 250 K SNPs. Genetic similarity analysis also revealed new possible resistant alleles from all over Europe to the USA (Fig. 3). While one is related to the previously identified resistant accessions (Se-0 is grouping with Ts accessions), some are clearly distinct from the original founders (Ca-0, An-1, Pu2-7, Ra-0, Fei-0, Ei-2) or even belong to a new genetic similarity group (An-1 and Ra-0 in group 2, Fig. 3).

Candidate genes for the control of *sha3* resistance trait

Focusing on the *sha3* QTL interval, we retained SNPs that showed highly significant signal but also mapped within the *sha3* QTL interval as identified in the multiparental population (Table S3). Assignment of the SNP coordinates to functional and structural positions was performed using the TAIR8 annotation (<http://www.arabidopsis.org/>).

Based on the genome-wide association scan, we observed the most significant association signal at 21 603 348 (Table S3a–c, Fig. 2e), which lies in the fourth exon of the *RTM3* gene

(At3g58350) (Table 3). The *RTM3* product, which is characterized by a meprin and TRAF (MATH) homology domain, is hypothesized to be part of a multiprotein complex that blocks the long-distance movement of several potyviruses (Whitham *et al.*, 1999; Cosson *et al.*, 2010), including PPV (Decroocq *et al.*, 2006). However, two elements seem to rule against the implication of *RTM3* in a susceptibility mechanism controlling PPV-LDM. First, the resistance conferred by *RTM3* in the Col-3 accession is dominant (Mahajan *et al.*, 1998; Whitham *et al.*, 1999), while *sha3* controls a recessive resistance mechanism. Moreover, the PPV-R isolate used in this study, as well as all its derivatives, including pBINPPVnkGFP and pICPPVnkGUS, overcomes the *RTM3* resistance mechanism (Decroocq *et al.*, 2006, 2009) so that Columbia accessions (Col-0, Col-1 and Col-3) are fully susceptible to PPV-R (and its derivatives). In addition, the *RTM3*^{-/-} mutants developed by Cosson *et al.* (2010) were fully susceptible to PPV infection when challenged with the pBINPPVnkGFP viral clone (Fig. S5). Since homozygous *RTM3*^{-/-} mutants remain susceptible to PPV infection, this result rejects the hypothesis that *RTM3* could be the *SHA3* susceptibility factor needed for successful PPV-LDM in Arabidopsis.

Still, the *P* values of four other SNPs in this region (in bold in Table 3) indicate that SNPs situated near the *RTM3* gene are strongly associated with restricted PPV movement (Table S3, Fig. 2e). Three intergenic SNPs (SNPs 21 599 048, 21 596 493 and 21 613 164) and one exonic one (21 597 258) were found to be associated with restriction of PPV-LDM (Table 3). They all map within or in proximity to *RTM3* MATH domain-containing gene copies. This result, together with the LD analysis (ranging from 21 592 393 to 21 606 184), defines an extended *sha3* LD bin of *c.* 20 kb (from At3g58280 to At3g58400; see Fig. S6) that encompasses a cluster of seven MATH domain-containing genes

Fig. 2 Genetic locations of *Arabidopsis thaliana* loci linked to Plum pox virus (PPV) restricted long-distance movement by biparental (a,b), multiparental (c) and genome-wide association (d) mapping. (a) Map location of the *sha1* and *sha3* PPV resistance loci associated with restricted PPV movement in the St-0 × Ler F2 population. Logarithm of odds (LOD) plot for the PPV resistance loci mapping on the St-0 × Ler population was calculated with the MapQTL6 software. In both loci, on chromosomes 1 and 3, additive effects were observed after computation with the QTLNetwork 2.1 software (not represented here), with the major contribution of the St-0 alleles in the resistance trait. Negative values (−3.1798 and −26.7955 for *sha1* and *sha3*, respectively, *P*-value < 10^{−6}) indicated the positive additive effect of the St-0 allele in restriction of PPV long-distance movement. No epistatic interaction was detected between the *sha1* and *sha3* loci at the probability level of 1%. The *sha5* locus was not detected by the composite interval mapping method, only by interval mapping in MapQTL6 software, and thus is not represented here. The horizontal dotted bar is depicting the genome-wide LOD threshold at 5% and after 1000 permutation tests. Vertical bars indicate the chromosome (chr) intervals. (b) Representation of the Arabidopsis linkage group 3 consensus map with Ts-5 (A), St-0 (B), Ts-1 (C) and RRS-7 (D) quantitative trait loci (QTLs) and the projected *sha3* metaQTL. To compare the respective positions of the *sha3* locus, results from linkage mapping in the four biparental populations, Ts-5 × Mz-0 (A), St-0 × Ler (B), Ler × RRS-7 (C), Ler × Ts-1 (D), were merged in a single QTL meta-analysis. The meta-analysis showed that the best metaQTL model fitting the phenotypic observations is the 1-QTL model (A.I.C 18.4), meaning that one single metaQTL actually underlies the four QTLs detected on LG3 (named Meta-*sha3*). Meta-*sha3* maps at 70.12 cM at the bottom of chromosome 3 and ranges from 68.15 to 72.08 cM, being flanked by the BSAT3.009 (67.75 cM) and FUS6 (72.21 cM) markers. Bars on the left represent the 1 − logarithm of odds (1 − LOD) confidence interval of the QTLs and the rectangle inserted in the chromosome body depicts the Meta-*sha3* QTL. (c) QTL scan of association with impaired PPV long-distance movement in the Multiparent Advanced Generation Inter-Cross (MAGIC) recombinant population. Values of $-\log_{10}(P)$ (y-axis) are plotted against the chromosome position (x-axis). Vertical bars delimit the five Arabidopsis chromosomes. Chr, chromosome. (d) Whole-genome scan of 214 553 SNPs for association with restriction of PPV long-distance movement across 147 Arabidopsis accessions. GWA mapping was conducted using the 250 k high-resolution dataset, filtered down to 214 553 SNPs. Binary data were analyzed following the Fisher test and quantitative data, with the Wilcoxon rank-sum test. Chromosomes (chr) are numbered 1–5. Manhattan plot shows association $-\log_{10}(P)$ -value (y axis) for individual SNPs (corrected for population structure with the EMMA package) against chromosome position (x axis). The *sha1*, *sha3* and *sha5* QTL intervals are depicted by horizontal arrows. (e) Manhattan plot representing the genome-wide association results for SNPs in the *sha3* region. The Manhattan plot shows the association $-\log_{10}(P)$ -value (y axis) for individual SNPs against chromosome position (x axis) after analysis by Fisher's test of the binary data. The threshold *P* value calculated by Bonferroni is indicated by a dotted line. The region plotted contains the 264 kb extended *sha3* region from markers F9D24.1 (21509910) to T20N10.2 (21774851) as identified in the Ler × RRS-7 biparental population (see Table 2). The arrow tip specifies the position of *RTM3*. The top (four) SNPs are located within or 6.8 kb upstream of the *RTM3* gene (At3g58350).

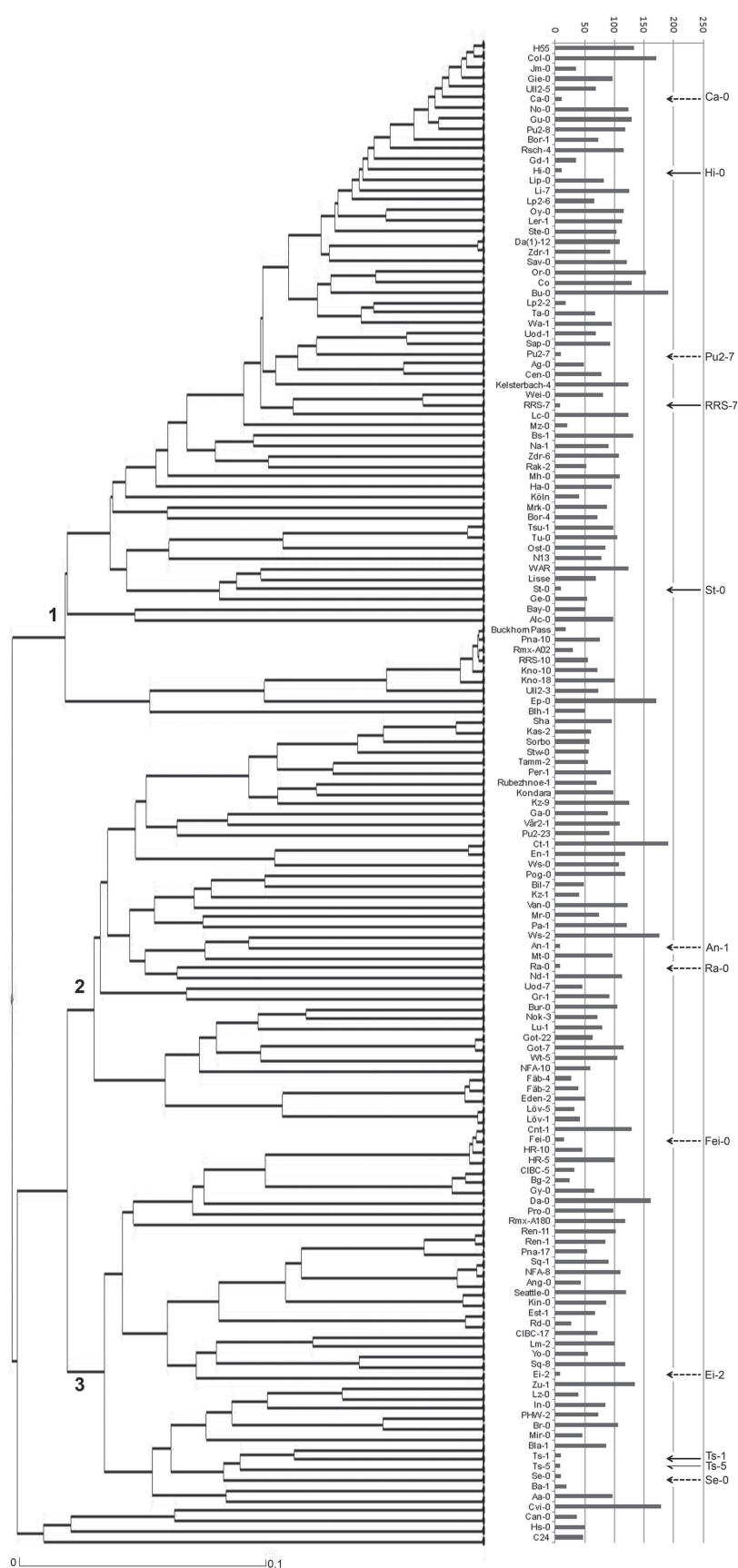


Table 3 Candidate genes associated with the most significant single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the *sha3* region

Chr	SNP (position in bp)	Gene	Location (intron...)	Gene function (BEST <i>Arabidopsis thaliana</i> protein match)	Log10 (P-value)
3	21603348	At3g58350	4th exon	RTM3, MATH-TRAF and coil-coiled protein	7.46
3	21599048	–	Noncoding region between AT3G58330 and AT3G58340	MATH-TRAF and coil-coiled proteins, RTM3-like	6.38
3	21596493	–	3p region, 51 bp downstream AT3G58320	Coil-coiled RTM3-like protein	5.35
3	21597258	At3g58320	1st exon	Coil-coiled RTM3-like protein	4.32
3	22410020	AT3G60590	1st exon	Similar to unknown protein [<i>Arabidopsis thaliana</i>] (TAIR:AT1G48460.1)	4.31
3	21395856	–	5p region, 38 bp upstream AT3G57700	Putative protein kinase	4.23
3	20917567	–	3p region, 220 bp downstream AT3G56380	Identical to Two-component response regulator ARR17	4
3	21408359	–	3p region, 263 bp downstream AT3G57760	Wall-associated protein kinase 1	3.83
3	17094208	AT3G46420	Second intron	Leucine-rich repeat protein kinase	3.69
3	20754174	AT3G55910	Second exon	Unknown function	3.66
3	17096107	AT3G46420	9th exon	Leucine-rich repeat protein kinase	3.59
3	21412336	AT3G57780	Last exon	Nucleolar protein gar2-related protein	3.5
3	21613164	–	Between AT3G58390 and AT3G58400	Between genes coding for eukaryotic release factor 1 and MATH-TRAF domain-containing protein	3.5
3	23095613	AT3G62380	Second exon	Similar to S locus F-box-related protein	3.38
3	18313809	–	Between AT3G49350 and AT3G49360	Between genes coding for RabGAP/TBC domain-containing protein and glucosamine/galactosamine-6-phosphate isomerase-related protein	3.24

(similar to the RTM3 MATH domain), five nonMATH domain-containing genes (phospholipases) and one pseudogene (Table S4).

We retrieved the entire genomic sequences of the 19 MAGIC parents (Gan *et al.*, 2011), including the PPV-resistant (Hi-0 and Sf-2) founders, as well as the corresponding coding sequences (CDS) of each of the genes in the extended *sha3* LD bin (from AT3G58280 to AT3G58400) (<http://mus.well.ox.ac.uk/19genomes/>). Genomic and coding sequences were aligned with ClustalW in the BioEdit package. Unfortunately, the relative high sequence variability (up to 14 substitutions and one indel in At3g58350, for example) allowed us to eliminate only one candidate gene (At3g58300), which is identical between PPV-susceptible and -resistant accessions.

Discussion

In this study, we report the identification in *A. thaliana* of genomic regions associated with susceptibility to PPV, and more particularly

with virus long-distance movement. In order to fine-map the host determinant(s), we combined linkage mapping in F2 and RIL crosses with association analysis. Each of the bi- and multiparental linkage mapping experiments detected a major and recurrent locus, named *sha3*, as well as another set of unique loci, depending on the genetic background. In a single cross, not all the loci affecting a specific complex phenotype are expected to be detected, since a locus can exert allele-specific effects only in crosses derived from two accessions carrying different alleles. Allelism tests indicate that restriction of PPV-LDM shared by the St-0, RRS-7, Ts-1 and Ts-5 accessions is controlled by the same gene, within the *sha3* locus. However, we cannot rule out the possibility that, while they share the same genetic determinant, the mutations affecting the SHA3 susceptibility host factor are different in each accession. Linkage mapping allowed the *sha3* locus to be mapped at the bottom of linkage group 3, between the F9D24.1 and T20N10.2 markers (*c.* 265 kb). Interestingly, mapping accuracy of the *sha3* QTL was not improved in the multiparental population when compared

Fig. 3 Correlation between response to Plum pox virus (PPV) infection and the genetic similarity of the 147 *Arabidopsis thaliana* accessions. The tree on the left was constructed with DARWIN, from the matrix of genotype similarity calculated from 1000 SNPs randomly chosen among the 214 553 filtered SNPs. Genetic clusters are numbered 1–3. On the right, PPV accumulation in the 147 *Arabidopsis* accessions is depicted as a percentage of optical density value, 21 d after inoculation. Accessions are ordered following their genotype similarity. They are considered as resistant when their mean OD value is inferior or equal to three times the *elfiso4E* loss-of-function optical density (dotted line). PPV-resistant founders analyzed in this manuscript are designed by an arrow. They appear to belong to two distinct groups (1 and 3), Hi-0, RRS-7 and St-0 corresponding to the northern European (group 1), and Ts-1 and Ts-5 to the southern European clade (group 3). Interestingly, RRS-7 is, in fact, of North American origin (see <http://arabidopsis.gmi.oeaw.ac.at:5000/Accession/#By%20Name>). New accessions appear resistant to PPV infection, that is, Ca-0, An-1, Se-0, Ra-0, Fei-0, Ei-2, Pu2-7, and are represented by a black, dashed arrow.

with traditional biparental mapping population such as *Ler* × RRS-7, but the use of the MAGIC lines confirmed, with a relatively low mapping effort, the *sha3* QTL as well as the identified two new PPV-resistant accessions.

A GWAS was conducted in 147 *Arabidopsis* accessions sampled among unrelated, wild populations. It resulted in a significant increase in mapping resolution, from QTL intervals to candidate genes. Overall, GWAS confirmed putative loci and fine-mapped the major *sha3* locus down to 13 candidate genes. Candidates identified here support the overlap between host factors inhibiting PPV-LDM in a dominant fashion (RTM3) (Decroocq *et al.*, 2006; Cosson *et al.*, 2010) and other(s) participating in PPV-LDM (SHA3), restricting it in a recessive fashion. Indeed, the predominance of the peak over RTM3-like genes in the genome-wide scan demonstrates that allelic variation at this locus is the major determinant of global variation for PPV long-distance movement.

The comparison of genetic similarity in the set of 147 accessions with natural variation in PPV-LDM did not show strong geographic or genetic relationships among resistant accessions, although several of them originated from the Iberian Peninsula. It is notable that none of the Caucasian and Mid-Asian *Arabidopsis* ecotypes tested in the present study are resistant to PPV infection but they are also significantly underrepresented. Schmid *et al.* (2006) showed previously that accessions originating from the Iberian Peninsula and from Central Asia constitute distinct and genetically diverged clusters. They also showed that Central Asian accessions display a low degree of polymorphism, which could explain the absence of mutation(s) in the *sha3* locus. Cao *et al.* (2011) confirmed a clear differentiation between European and Central Asian populations, thus possibly explaining the prevalence of PPV resistance alleles in the first population but not in the latter. More interestingly, François *et al.* (2008) determined a major east to west migration wave of *A. thaliana* in Europe, which is consistent with a natural, postglacial recolonization from an Eastern glacial refugium as suggested by Schmid *et al.* (2006). Similarly, Jørgensen & Mauricio (2004) placed the origin of North American *A. thaliana* populations with the group of weeds from Europe that invaded North America at the time of European colonization. Therefore, either mutation(s) in the *sha3* locus may not be rare in the ancestral, Eastern population, explaining its occurrence in distinct European and North American populations after colonization, or the mutation(s) occurred independently in separate and unrelated populations. Alternatively, allelic variation at the *sha3* locus, comprising functional and nonfunctional alleles in the same local population, could be maintained in distant, unrelated wild populations, and is consistent with this locus being under selection (see LD analysis in the Results section).

Effectively, a significant LD was detected within the *sha3* region and around the most significant SNP marker (SNP 21 603 348) in comparison with the *Arabidopsis* whole-genome LD analysis (Kim *et al.*, 2007). This also means that any polymorphic SNP marker detected in this *sha3* LD bin will also be tightly linked to RTM3 and that *sha3*-controlled PPV-LDM restriction can be linked to polymorphic allele(s) of any gene in this *sha3* LD bin.

Our results also show that RTM3 by itself is not a susceptibility gene since RTM3-/- lines remain susceptible to PPV infection. This

clearly distinguishes the (dominant) RTM3-controlled restriction of PPV-LDM from the *sha3* (recessive) control of PPV systemic invasion. In this second case, the product of the dominant SHA3 allele is predicted to be recruited by the virus to perform long-distance movement in the host plant. However, we cannot rule out at this stage the possibility that SHA3 might code for an RTM3-like protein. The possibility that more than one gene of the *sha3* LD bin could be recruited for PPV-LDM, although not fully invalidated, seems to be largely ruled out by the allelism tests performed with the RRS-7, Ts-1, St-0, Ts-5, Hi-0 and Sf-2 accessions that indicated that all of them were allelic.

RTM3 and RTM3-like genes in the *sha3* extended LD bin are characterized by a meprin and TRAF (MATH) homology domain and a coiled-coil domain (Park *et al.*, 1999), but they differ in length and by the presence or absence of one of these two domains (Cosson *et al.*, 2010). Indeed, within the extended *sha3* LD bin, RTM3-like predicted proteins display RTM3 features, except for AT3G58300, AT3G58320, AT3G58330 and AT3G58370, which have only the highly conserved coil-coiled domain (Cosson *et al.*, 2010). Other candidate genes of the *sha3* region are characterized by a phospholipase domain with or without the MATH domain. The complexity of this MATH-related gene cluster suggests evolutionary rearrangements, including proximal duplication and/or gene conversion events. This would lead to contraction/expansion of MATH-related genes and probably loss/acquisition of function(s). A similar pattern of intracluster evolution has been extensively described for nucleotide binding site-leucine-rich repeat (NBS-LRR) resistance gene clusters and appears related to the accumulation of repeat sequences (transposons) (Ratnaparkhe *et al.*, 2011), which is not the case in the *sha3* LD bin.

The role of MATH proteins in plants is still poorly understood. The first biological function experimentally demonstrated for a MATH protein was its implication in the RTM resistance, which is active against at least three potyviruses (TEV, LMV and PPV) (Whitham *et al.*, 1999; Decroocq *et al.*, 2006; Cosson *et al.*, 2010). MATH domain-containing proteins are able to self-interact (Park *et al.*, 1999; Cosson *et al.*, 2010) as well as interact with other proteins (Weber *et al.*, 2005). Therefore, assuming that MATH proteins are able to interact between them, RTM3 may interact, as a negative dominant factor, with the SHA3 protein, preventing it from playing its role in potyvirus long-distance movement. However, this hypothesis can only be verified once the *sha3* gene has been identified.

Ultimately, this linkage and association mapping delimited a short list of candidates for further genetic and functional studies. To our knowledge, the present report describes the first combined GWAS and linkage mapping study identifying susceptibility factors associated with virus long-distance movement. Future research will focus on validating the effect of the candidate genes identified in this study, challenging the corresponding loss-of-function mutants with PPV and understanding how the SHA3 gene product participates in the virus long-distance movement in *A. thaliana*. It also poses the question of the exact role of the MATH protein(s) in plant-virus interactions, either to restrict or to participate in virus long-distance movement. This will condition

the use of this class of genes in crop species such as stone fruit trees for the deployment of an efficient resistance strategy.

Acknowledgements

This work was supported by the SharCo FP7 Small Collaborative Project No 204429, by grants from the EPR Aquitaine (nos 20081201005 and 20091201003) and INRA divisions of Plant Health and Plant Breeding. We are grateful to T. Mauduit and A. Bailly for plant production. Special thanks are given to G. Marandel and S. Decroocq for advice in the statistical analysis. The development of the new version of BioMercator is supported by ANR 08GENO126. Grateful thanks to F. Roux (LGEPV, Lille University) and Prof. A.G. Abbott (Clemson University) for critical reading of the manuscript. Author contributions: V.D. conceived and designed the experiments; G.P., P.P., S.P., M.B., G. G., L.N. and V.D. performed the experiments; P.C., G.P., P.P. and V.D. developed molecular markers and mapping tools; J.P.E. and A.C. contributed reagents/material/ELISA analysis; V.D., G.P. and P.P. performed the QTL analysis; S.M. analyzed the data for association mapping and from multiparental lines; V.D. and S.M. wrote the paper; and T.C. proofread the paper.

References

- Aranzana MJ, Kim S, Zhao K, Bakker E, Horton M, Jakob K, Lister C, Molitor J, Shindo C, Tang C *et al.* 2005. Genome-wide association mapping in *Arabidopsis* identifies previously known flowering time and pathogen resistance genes. *PLoS Genetics* 1: e60.
- Arcade A, Labourdette A, Falque M, Mangin B, Chardon F, Charcosset A, Joets J. 2004. BioMercator: integrating genetic maps and QTL towards discovery of candidate genes. *Bioinformatics* 20: 2324–2326.
- Atwell S, Huang YS, Vilhjalmsen BJ, Willems G, Horton M, Li Y, Meng D, Platt A, Tarone AM, Hu TT *et al.* 2010. Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines. *Nature* 465: 627–631.
- Brachi B, Faure N, Horton M, Flahauw E, Vazquez A, Nordborg M, Bergelson J, Cuguen J, Roux F. 2010. Linkage and association mapping of *Arabidopsis thaliana* flowering time in nature. *PLoS Genetics* 6: 1–17.
- Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y, Buckler ES. 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23: 2633–2635.
- Cao J, Schneeberger K, Ossowski S, Gunther T, Bender S, Fitz J, Koenig D, Lanz C, Stegle O, Lippert C *et al.* 2011. Whole-genome sequencing of multiple *Arabidopsis thaliana* populations. *Nature Genetics* 43: 956–963.
- Carr T, Whitham S. 2007. An emerging model system: *Arabidopsis* as a viral host plant. In: M WEaH ed. *Plant cell monographs: Viral Transport in Plants*. Waigmann E, Heinlein M, eds. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 159–183.
- Carrington JC, Whitham SA. 1998. Viral invasion and host defense: strategies and counter-strategies. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 336–341.
- Clark RM, Schweikert G, Toomajian C, Ossowski S, Zeller G, Shinn P, Warthmann N, Hu TT, Fu G, Hinds DA *et al.* 2007. Common sequence polymorphisms shaping genetic diversity in *Arabidopsis thaliana*. *Science* 317: 338–342.
- Cosson P, Sofer L, Le QH, Léger V, Schurdi-Levraud V, Whitham SA, Yamamoto ML, Gopalan S, Le Gall O, Candresse T *et al.* 2010. RTM3, which controls long-distance movement of potyviruses, is a member of a new plant gene family encoding a meprin and TRAF homology domain-containing protein. *Plant Physiology* 154: 222–232.
- Decroocq V, Salvador B, Sicard O, Glasa M, Svanella L, Cosson P, Revers F, García JA, Candresse T. 2009. The determinant of potyviruses ability to overcome the RTM resistance of *Arabidopsis thaliana* maps to the N-terminal region of the coat protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22: 1302–1311.
- Decroocq V, Sicard O, Alamillo J-M, Lansac M, Eyquard J-P, García JA, Candresse T, Le Gall O, Revers F. 2006. Multiple resistance traits control PPV infection in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 541–549.
- Duprat A, Caranta C, Revers F, Menand B, Browning KS, Robaglia C. 2002. The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso) 4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses. *Plant Journal* 32: 927–934.
- Fernández-Fernández MR, Mouriño M, Rivera J, Rodríguez F, Plana-Durán J, García JA. 2001. Protection of rabbits against rabbit hemorrhagic disease virus by immunization with the VP60 protein expressed in plants with a potyvirus-based vector. *Virology* 280: 283–291.
- François O, Blum MGB, Jakobsson M, Rosenberg NA. 2008. Demographic History of European Populations of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* 4: e1000075.
- Fraser RSS. 1990. The genetics of resistance to plant viruses. *Annual Review of Phytopathology* 28: 179–200.
- Gan X, Stegle O, Behr J, Steffen JG, Drewe P, Hildebrand KL, Lyngsoe R, Schultheiss SJ, Osborne EJ, Sreedharan VT *et al.* 2011. Multiple reference genomes and transcriptomes for *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 477: 419–423.
- Gilbertson RL, Lucas WJ. 1996. How do viruses traffic on the vascular highway? *Trends in Plant Sciences* 1: 260–268.
- Goffinet B, Gerber S. 2000. Quantitative trait loci: a meta-analysis. *Genetics* 155: 463–473.
- Gómez P, Rodríguez-Hernández AM, Moury B, Aranda MA. 2009. Genetic resistance for the sustainable control of plant virus diseases: breeding, mechanisms and durability. *European Journal of Plant Pathology* 125: 1–22.
- Hou X, Li L, Peng Z, Wei B, Tang S, Ding M, Liu J, Zhang F, Zhao Y, Gu H *et al.* 2010. A platform of high-density INDEL/CAPS markers for map-based cloning in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 63: 880–888.
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. 1987. Gus fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene marker in higher plants. *EMBO Journal* 6: 3901–3907.
- Jimenez I, Lopez L, Alamillo JM, Valli A, García JA. 2006. Identification of a *Plum pox virus* CI-interacting protein from chloroplast that has a negative effect in virus infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 350–358.
- Jørgensen S, Mauricio R. 2004. Neutral genetic variation among wild North American populations of the weedy plant *Arabidopsis thaliana* is not geographically structured. *Molecular Ecology* 13: 3403–3413.
- Kang HM, Zaitlen NA, Wade CM, Kirby A, Heckerman D, Daly MJ, Eskin E. 2008. Efficient control of population structure in model organism association mapping. *Genetics* 178: 1709–1723.
- Kim S, Plagnol V, Hu TT, Toomajian C, Clark RM, Ossowski S, Ecker JR, Weigel D, Nordborg M. 2007. Recombination and linkage disequilibrium in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* 39: 1151–1155.
- Kover PX, Valdar W, Trakalo J, Scarcelli N, Ehrenreich IM, Purugganan MD, Durrant C, Mott R. 2009. A multiparent advanced generation inter-cross to fine-map quantitative traits in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genetics* 5: e1000551.
- Mahajan SK, Chisholm ST, Whitham SA, Carrington JC. 1998. Identification and characterization of a locus (RTM1) that restricts long-distance movement of tobacco etch virus in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 14: 177–186.
- Marandel G, Salava J, Abbott A, Candresse T, Decroocq V. 2009. Quantitative trait loci meta-analysis of *Plum pox virus* resistance in apricot (*Prunus armeniaca* L.): new insights on the organization and the identification of genomic resistance factors. *Molecular Plant Pathology* 10: 347–360.
- McKhann HI, Camilleri C, Bérard A, Bataillon T, David JL, Reboud X, Le Corre V, Caloustian C, Gut IG, Brunel D. 2004. Nested core collections maximising genetic diversity in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 38: 193–202.
- Nemri A, Atwell S, Tarone AM, Huang YS, Zhao K, Studholme DJ, Nordborg M, Jones JDG. 2010. Genome-wide survey of *Arabidopsis* natural variation in downy mildew resistance using combined association and linkage mapping. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 107: 10302–10307.
- Noueiry AO, Ahlquist P. 2003. Brome mosaic virus RNA replication: revealing the role of the host in RNA virus replication. *Annual Review of Phytopathology* 41: 77–98.
- Park YC, Burkitt V, Villa AR, Tong L, Wu H. 1999. Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2. *Nature* 398: 533–538.

- Pavan S, Jacobsen E, Visser RG, Bai Y. 2010. Loss of susceptibility as a novel breeding strategy for durable and broad-spectrum resistance. *Molecular Breeding* 25: 1–12.
- Perrier X, Jacquemoud-Collet JP. 2006. DARwin software Version: 5.0.158 (2009-07-06). [WWW document] URL <http://darwin.cirad.fr/darwin>.
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PIW, Daly MJ *et al.* 2007. PLINK: a toolset for whole-genome association and population-based linkage analysis. *American Journal of Human Genetics* 81(3): 559–575.
- Ratnaparkhe MB, Wang X, Li J, Compton RO, Rainville LK, Lemke C, Kim C, Tang H, Paterson AH. 2011. Comparative analysis of peanut NBS-LRR gene clusters suggests evolutionary innovation among duplicated domains and erosion of gene microsynteny. *New Phytologist* 192: 164–178.
- Requena A, Simón-Buella L, Salcedo G, García-Arenal F. 2006. Potential involvement of a cucumber homolog of Phloem Protein 1 in the long distance movement of *Cucumber Mosaic Virus* particles. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19: 734–746.
- Riechmann JL, Lain S, Garcia JA. 1990. Infectious *in vitro* transcripts from a *plum pox potyvirus* cDNA clone. *Virology* 177: 710–716.
- Robaglia C, Caranta C. 2006. Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends in Plant Science* 11: 40–44.
- Schaad M, Carrington J. 1996. Suppression of long-distance movement of tobacco etch virus in a nonsusceptible host. *Journal of Virology* 70: 2556–2561.
- Schmid KJ, Törjék O, Meyer R, Schmuths H, Hoffmann MH, Altmann T. 2006. Evidence for a large-scale population structure of *Arabidopsis thaliana* from genome-wide single nucleotide polymorphism markers. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1104–1114.
- Scholthof HB. 2005. Plant virus transport: motions of functional equivalence. *Trends in Plant Science* 10: 376–382.
- Sicard O, Loudet O, Keurentjes J-J-B, Candresse T, Le Gall O, Revers F, Decroocq V. 2008. Identification of QTLs controlling symptom development during viral infection in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 21: 198–207.
- Todesco M, Balasubramanian S, Hu TT, Traw MB, Horton M, Eppe P, Kuhns C, Sureshkumar S, Schwartz C, Lanz C *et al.* 2010. Natural allelic variation underlying a major fitness trade-off in *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 465: 632–636.
- Truniger V, Aranda MA. 2009. Recessive resistance to plant viruses. *Advances in Virus Research* 75: 119–159.
- Tsujimoto Y, Numaga T, Ohshima K, Yano M, Ohsawa R, Goto D, Naito S, Ishikawa M. 2003. *Arabidopsis* TOBAMOVIRUS MULTIPLICATION (TOM) 2 locus encodes a transmembrane protein that interacts with TOM1. *EMBO Journal* 22: 335–343.
- Van Ooijen JW, Voorrips RE. 2001. *JoinMap® 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps*. Wageningen, the Netherlands: Plant Research International.
- Waigmann E, Ueki S, Trutnyeva K, Citovsky V. 2004. The ins and outs of nondestructive cell-to-cell and systemic movement of plant viruses. *Critical Reviews in Plant Sciences* 23: 195–250.
- Weber H, Bernhardt A, Dieterle M, Hano P, Mutlu A, Estelle M, Genschik P, Hellmann H. 2005. *Arabidopsis* AtCUL3a and AtCUL3b form complexes with members of the BTB/POZ-MATH protein family. *Plant Physiology* 137: 83–93.
- Whitham SA, Yamamoto ML, Carrington JC. 1999. Selectable viruses and altered susceptibility mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 96: 772–777.
- Yamanaka T, Imai T, Satoh R, Kawashima A, Takahashi M, Tomita K, Kubota K, Meshi T, Naito S, Ishikawa M. 2002. Complete inhibition of tobamovirus multiplication by simultaneous mutations in two homologous host genes. *Journal of Virology* 76: 2491–2497.
- Yamanaka T, Ohta T, Takahashi M, Meshi T, Schmidt R, Dean C, Naito S, Ishikawa M. 2000. TOM1, an *Arabidopsis* gene required for efficient multiplication of a tobamovirus, encodes a putative transmembrane protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 97: 10107–10112.
- Yang J, Hu C, Hu H, Yu R, Xia Z, Ye X, Zhu J. 2008. QTLNetwork: mapping and visualizing genetic architecture of complex traits in experimental populations. *Bioinformatics* 24: 721–723.
- Yoshii M, Shimizu T, Yamazaki M, Higashi T, Miyao A, Hirochika H, Omura T. 2009. Disruption of a novel gene for a NAC-domain protein in rice confers resistance to *Rice dwarf virus*. *Plant Journal* 57: 615–625.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1 Variation in response to PPV infection across Multiparent Advanced Generation Inter-Cross (MAGIC) line founders.

Fig. S2 Allele effects at position 21528561 on restriction of PPV long-distance movement among the 19 MAGIC founders.

Fig. S3 Distribution of the set of 147 accessions according to their mean viral accumulation value as a percentage of optical density value 21 d after inoculation.

Fig. S4 Linkage disequilibrium blocks over the *sha3* locus for 147 *Arabidopsis* accessions.

Fig. S5 PPV systemic infection of the N517845 and 801D05 RTM3 T-DNA disrupted mutants.

Fig. S6 Physical map of the LG3 cluster of genes coding for MATH domain-containing proteins and of the *sha3* LD bin.

Table S1 Accessions of the two *Arabidopsis* core collections challenged with the pBINPPVnkGFP viral clone

Table S2 *Arabidopsis* accessions genotyped with the full 250 K SNPs dataset and challenged with PPV by agroinoculation

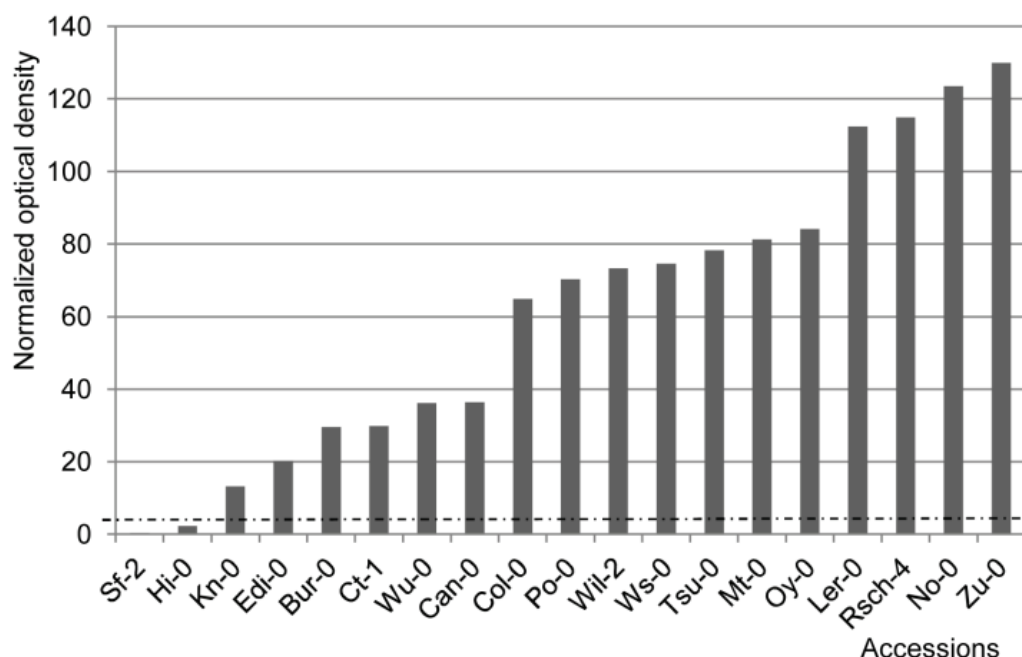
Table S3 Markers with significant association to restricted PPV long-distance movement in *Arabidopsis* accessions

Table S4 Annotation of the LG3 cluster of genes coding for MATH domain-containing proteins and others

Notes S1 St-0 × *Ler*, *Ler* × RRS-7, *Ler* × Ts-1 and Ts-5 × MZ-0 linkage maps and list of primers used in this study.

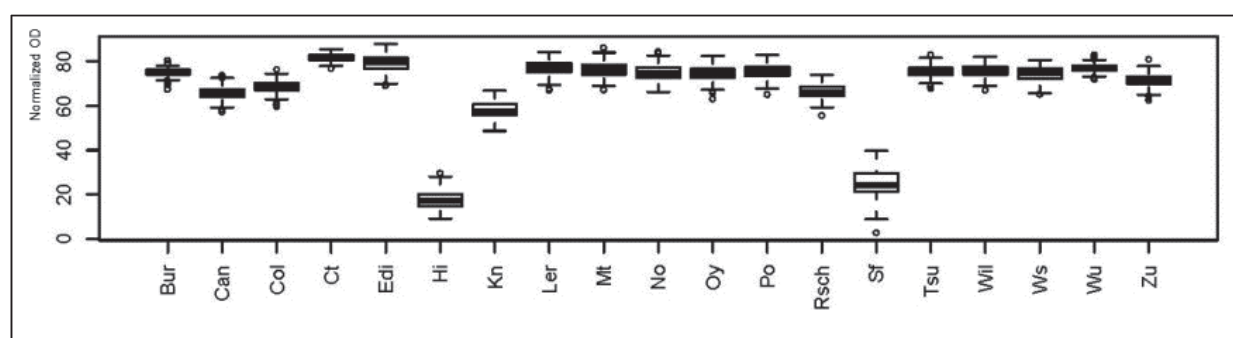
Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting information supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the *New Phytologist* Central Office.

VI. Supporting Information



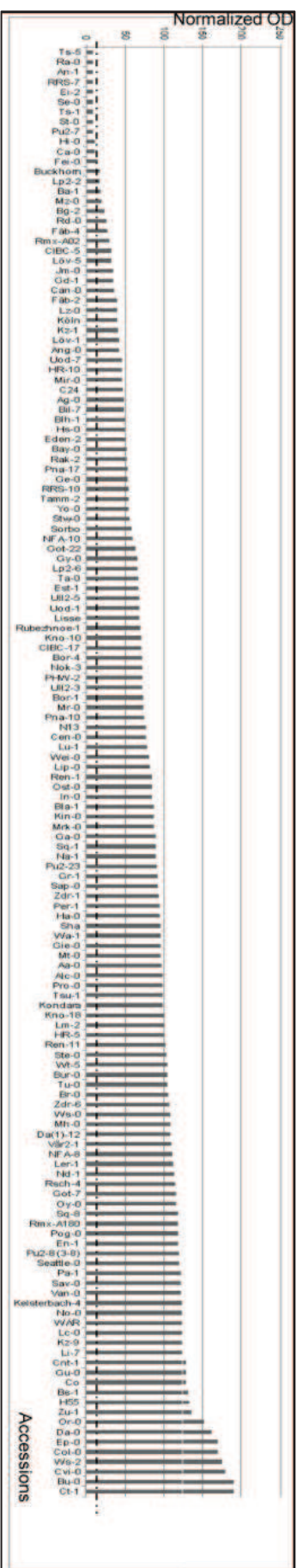
Chap 1 Fig S1. Variation in PPV accumulation across MAGIC (Multiparent Advanced Generation Inter-Cross) line founders after agro-inoculation with pBINPPVnkGFP

Shown is the average of four replicates for each accession. Accessions are ordered from the lowest to the highest viral accumulation value depicted as the mean OD value. PPV infected *Nicotiana benthamiana* ELISA control was set at 100. Accessions were considered as resistant when their mean OD value is inferior or equal to three times the *eIFiso4E* loss-of-function optical density (see horizontal dotted line).



Chap 1 Fig S2. Allele effects at position 21528561 on restriction of PPV long distance movement among the 19 MAGIC founders.

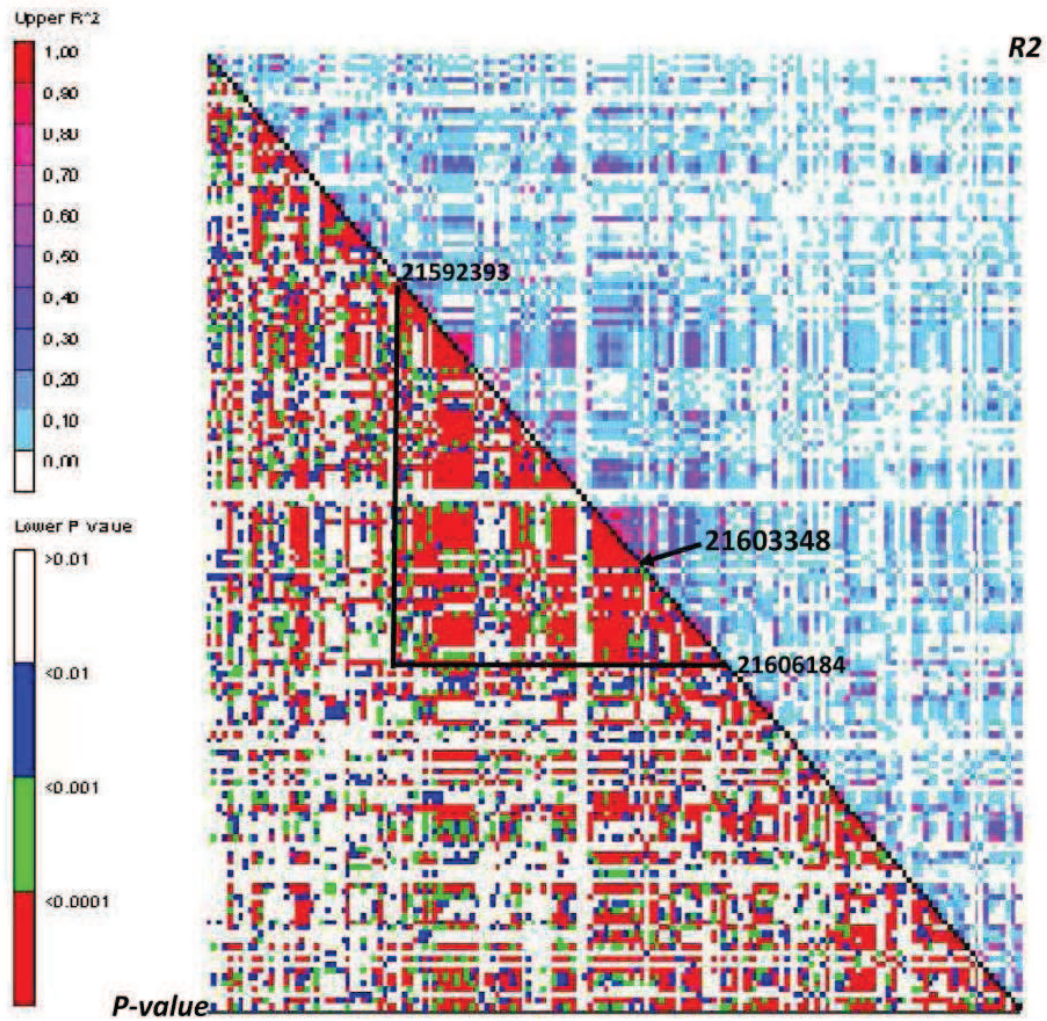
Box plots indicate distribution of accession-specific SNPs. Position 21,528,561 corresponds to the peak SNP (MN3_21528561) as identified in the MAGIC recombinant population (see table2).



Chap 1 Fig S3. Distribution of the set of 147 accessions according to their mean viral accumulation value as a percentage of optical density value 21 days after inoculation

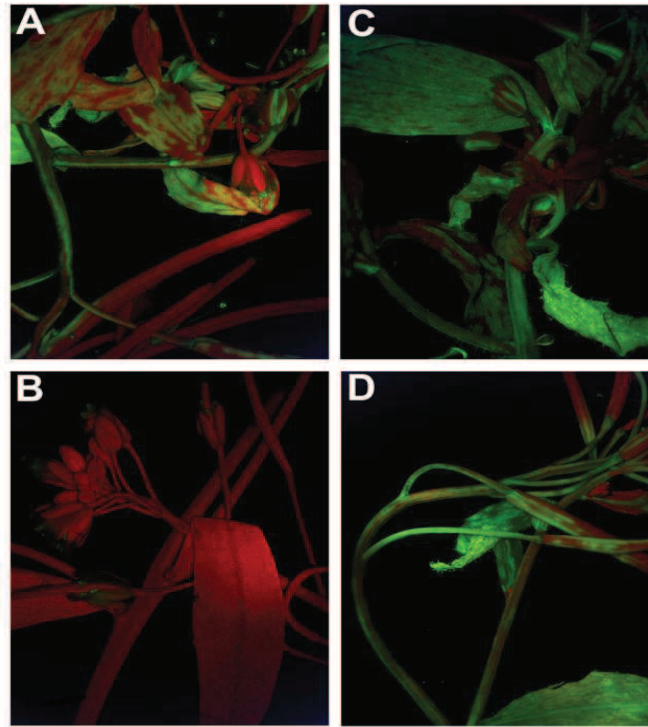
Individuals are ordered from the lowest to the highest. Accessions were considered as resistant when their mean OD value is inferior or equal to three times the *eIFiso4E* loss-of-function optical density. Resistant *versus* susceptible threshold is displayed as a horizontal dotted line.

Following these criteria, a total of 12 accessions were shown as fully resistant, ranging from Ts-5 to Fei-0 on figure S3. The level of viral accumulation (depicted as a value of ELISA optical density normalized over a PPV-infected positive control, see material and methods) reached an average of 9.7 among the resistant accessions while susceptible accessions displayed a continuous distribution of the mean viral accumulation value estimated in ELISA assays, from 17 to 190.



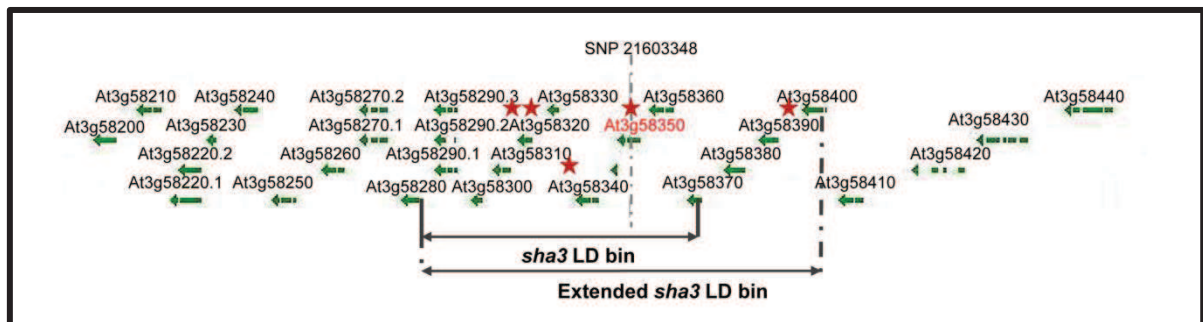
Chap 1 Fig S4. Linkage disequilibrium blocks over the *sha3* locus for 147 Arabidopsis accessions

158 SNP markers are sorted following their respective order on the Arabidopsis linkage map. They are distributed in an interval of 60 kb around the 21,603,348 SNP. The upper right part of each block is depicting the R^2 estimate and the lower left part shows their significance *p-value* resulting from the permutation tests.



Chap 1 Fig S5. PPV systemic infection of the N517845 and 801D05 RTM3 T-DNA disrupted mutants

Photographs of systemic, non-inoculated tissues were taken at 21 dpi under UV stereo-microscope of pBINPPVnkGFP infected wildtype Col-0 (A) and loss-of-function mutant plants, in a Col-0 background, as follows: *eIFiso4E* E6 mutant (B), N517845 (C) and 801D05 (D) RTM3 mutants.



Chap 1 Fig S6. Schematic representation of the clustering of genes coding for MATH domain containing proteins over the sha3 LD bin

Each gene is numbered and mapped according to Seqviewer and Mapviewer (www.arabidopsis.org). The representation is centered on the SNP 21,603,348 in the 4th exon of the Restriction TEV Movement 3 (*RTM3*) gene (At3g58350). Functional genes are presented by arrows indicating their orientation. The *sha3* LD bin refers to the interval calculated by linkage disequilibrium analysis. SNPs significantly associated with restriction of PPV long distance movement are displayed by stars. The extended *sha3* LD bin refers to a larger *sha3* LD bin which includes all significant SNPs in the MATH gene cluster. Annotation of each gene of the cluster is presented in table S4.

Chap 1 Tab S1. PPV infection phenotype of the accessions of the two Arabidopsis core collections challenged by agro-inoculation with the pBINPPVnkGFP PPV infectious cDNA clone

Accessions	NASC ID	Phenotype		Accessions	NASC ID	Phenotype
VNAT24 collection				Clark's collection		
Pyl-1	8AV	R		Bay-0	N22676	S
Jea	25AV	R		Bor-4	N22677	S
Bl-1	42AV	S		Br-0	N22678	S
St-0	62AV	R		Bur-0 *	N22679	S
Kn-0	70AV	S		C24	N22680	S
Edi-0	83AV	S		Col-0	N22681	S
Tsu-0	91 AV	S		Cvi-0 *	N22682	S
Stw-0	92AV	S		Est-1	N22683	S
Mt-0	94AV	S		Fei-0	N22684	I
Ge-0	101AV	S		Got-7	N22685	S
Ita-0	157AV	S		Ler-1	N22686	S
Ct-1	162AV	S		NFA-8	N22687	S
Can-0	163AV	S		RRS-7	N22688	R
Cvi-0 *	166AV	S		RRS-10	N22689	S
Bur-0 *	172AV	S		Sakh dara *	N22690	S
Alc-0	178AV	S		Tamm-2	N22691	S
Blh-1	180AV	S		Ts-1	N22692	R
Gre-0	200AV	S		Tsu-1	N22693	S
Mh-1	215AV	S		Van-0	N22694	S
Oy-0	224AV	S		Lov-5	N22695	S
Shahdara *	236AV	S				
Akita	252AV	S				
Sakata	257AV	S				
N13	266AV	S				

R designates accessions resistant to PPV systemic infection at 21 days post-inoculation (dpi). S indicates susceptible ones and I, indeterminate phenotype. Accessions are considered as susceptible when at least one plant over 4 or 6 plants agro-inoculated with pBINPPVnkGFP showed viral accumulation in non-inoculated floral hamp tissues at 21 dpi. Some accessions, noted by a star in the table, appeared in duplicate in between the two collections and were tested separately. The Fei-0 accession presented an indeterminate response to PPV infection, being resistant by mechanical and biolistic inoculation. When agro-inoculated, Fei-0 plants did not show fluorescence in non-inoculated floral hamp tissues at 21 dpi. However, optical density value originating from non-inoculated floral hamp tissues appeared just over the negative control, the *eIFiso4E* loss-of-function mutant plant. The Pyl-1 and JEA accessions are not further described in this manuscript because they do not display a recessive resistance phenotype, on the contrary of St-0, RRS-7 and Ts-1.

Chap 1 Tab S2. Arabidopsis accessions genotyped with the full 250K SNPs data set and challenged with PPV by agro-inoculation (Accessions are issued from Atwell *et al.* 2010)

ID NASC	Accession	ID NASC	Accession	ID NASC	Accession
N1007	Bu-0	N22586	Ull2-5	N22637	Wt-5
N1031	Blh-1	N22587	Ull2-3	N22639	Ct-1
N1065	Can-0	N22588	Zdr-1	N22640	Mr-0
N1067	Cen-0	N22589	Zdr-6	N22641	Tsu-1
N1137	En-1	N22590	Bor-1	N22642	Mt-0
N1185	Gd-1	N22591	Bor-4	N22643	Nok-3
N1187	Ge-0	N22592	Pu2-7	N22644	Wa-1
N1199	Gr-1	N22593	Pu2-23	N22645	Fei-0
N1227	Hi-0	N22594	Lp2-2	N22646	Se-0
N1237	Hs-0	N22595	Lp2-6	N22647	Ts-1
N1239	In-0	N22596	HR-5	N22648	Ts-5
N1259	Jm-0	N22597	HR-10	N22649	Pro-0
N1307	Lc-0	N22598	NFA-8	N22651	Kondara
N1337	Lip-0	N22599	NFA-10	N22652	Sha
N1345	Lm-2	N22600	Sq-1	N22653	Sorbo
N1353	Lu-1	N22601	Sq-8	N22654	Kin-0
N1379	Mir-0	N22602	CIBC-5	N22656	Bur-0
N1385	Na-1	N22603	CIBC-17	N22658	Oy-0
N1431	Ost-0	N22604	Tamm-2	N22659	Ws-2
N1439	Pa-1	N22606	Kz-1	N3081	No-0
N1445	Per-1	N22607	Kz-9	N3180	Co
N1482	Rd-0	N22608	Got-7	N6002	PHW-2
N1485	Rak-2	N22609	Got-22	N6003	Köln
N1494	Rsch-4	N22610	Ren-1	N6033	Lisse
N1507	Sap-0	N22611	Ren-11	N6041	Kelsterbach-4
N1515	Sav-0	N22612	Uod-1	N6187	Seattle-0
N1535	St-0	N22613	Uod-7	N6600	Aa-0
N1539	Stw-0	N22614	Cvi-0	N6607	Ba-1
N1549	Ta-0	N22615	Lz-0	N6658	Ca-0
N1567	Tu-0	N22616	Ei-2	N6676	Da-0
N1656	Alc-0	N22617	Gu-0	N6697	Ep-0
N22342	Bg-2	N22618	Ler-1	N6720	Gie-0
N22449	Pu2-8 (3-8)	N22619	Nd-1	N6733	Ha-0
N22491	N13	N22620	C24	N6751	Kas-2
N22564	RRS-7	N22622	Wei-0	N6778	Li-7
N22565	RRS-10	N22623	Ws-0	N6792	Mh-0
N22566	Kno-10	N22624	Yo-0	N6822	Or-0
N22567	Kno-18	N22625	Col-0	N6842	Pog-0
N22568	Rmx-A02	N22626	An-1	N6864	Ste-0
N22569	Rmx-A180	N22627	Van-0	N6903	Zu-1
N22570	Pna-17	N22628	Br-0	N6921	Cnt-1
N22571	Pna-10	N22629	Est-1	N8067	Buckhorn Pass
N22573	Eden-2	N22630	Ag-0	N8143	WAR
N22574	Löv-1	N22631	Gy-0	N923	H55
N22575	Löv-5	N22632	Ra-0	N926	Petergof
N22576	Fäb-2	N22633	Bay-0	N927	Rubezhnoe-1
N22577	Fäb-4	N22634	Ga-0	N949	Ang-0
N22579	Bil-7	N22635	Mrk-0	N971	Bla-1
N22580	Vär2-1	N22636	Mz-0	N997	Bs-1

Chap 1 Tab S3. 100 top markers when testing genome wide association with restricted PPV systemic infection in Arabidopsis accessions

Table S3a			Table S3b			Table S3c		
Chr	Position	-log10(p-value)	Chr	Position	-log10(p-value)	Chr	Position	-log10(p-value)
3	21603348	7.46	3	21603348	6.58	3	21603348	6.56
3	21599048	6.39	4	8449008	5.29	1	27707172	5.46
3	21596493	5.35	1	27707172	5.29	4	8449008	5.26
3	5353075	5.25	3	6319042	4.94	5	17196614	5.20
2	11060520	4.89	2	7579129	4.82	4	5419657	5.20
5	15820863	4.62	1	4584639	4.74	3	6319042	4.93
3	6310835	4.57	3	22295843	4.72	2	7579129	4.82
4	8449304	4.55	1	7061997	4.71	1	7061997	4.71
4	8449008	4.54	3	379453	4.71	3	379453	4.71
4	5419657	4.44	5	19786230	4.70	1	4584639	4.68
3	21597258	4.32	3	22301591	4.59	3	22295843	4.67
3	22410020	4.31	3	379493	4.56	5	19786230	4.64
3	7886939	4.24	5	19786501	4.56	3	379493	4.56
3	7898113	4.24	4	962000	4.48	3	22301591	4.54
3	21395856	4.24	3	20047676	4.46	5	19786501	4.52
5	15814523	4.19	5	13902662	4.44	4	962000	4.48
2	7498068	4.17	3	22410020	4.42	3	20047676	4.46
1	22843424	4.09	5	17196614	4.42	5	13902662	4.44
5	3336145	4.06	4	5419657	4.42	3	7409005	4.39
2	19484383	4.02	3	22294522	4.41	3	12624735	4.38
3	20917567	4.00	5	22267592	4.37	3	22410020	4.37
3	2064897	3.93	2	7568164	4.36	5	22267592	4.37
3	5857274	3.93	3	7883513	4.34	3	22294522	4.35
2	11079429	3.89	4	158958	4.34	3	7883513	4.34
3	6319042	3.88	3	7409005	4.34	4	158958	4.34
5	24596588	3.88	1	7014724	4.33	1	7014724	4.33
2	9970645	3.84	3	12624735	4.29	4	5413237	4.33
3	21408359	3.84	4	5387834	4.27	2	7568164	4.30
3	6316490	3.83	1	24992925	4.25	4	5387834	4.27
4	10789645	3.83	5	16989528	4.24	5	16989528	4.24
5	19786230	3.79	4	5413237	4.23	1	22318648	4.22
5	19786501	3.79	2	702808	4.23	1	21719410	4.22
3	17094208	3.70	1	22318648	4.22	1	24992925	4.22
3	5432176	3.69	5	7489775	4.20	2	702808	4.20
5	15813880	3.68	1	12394870	4.19	5	7489775	4.20
1	5064879	3.67	3	7886939	4.16	3	9011429	4.16
2	7498053	3.67	3	7898113	4.16	5	15437778	4.15
3	20754174	3.67	3	9011429	4.16	1	12394870	4.15
4	8580961	3.67	5	15437778	4.15	3	20049134	4.13
5	19993035	3.67	3	20049134	4.13	3	7886939	4.13
3	2061450	3.64	5	14200521	4.11	3	7898113	4.13
5	7489775	3.64	4	10122297	4.10	5	14200521	4.11
5	6143281	3.64	3	401827	4.10	3	401827	4.10
3	6307197	3.62	2	19674722	4.10	1	7014701	4.10
4	7169719	3.62	1	7014701	4.10	5	15417254	4.09
2	18240778	3.62	5	4044260	4.09	4	10122297	4.07
4	6942503	3.61	5	15417254	4.09	2	19674722	4.05
3	17096107	3.60	4	6358873	4.07	5	4044260	4.03
1	11632066	3.59	5	15434079	4.02	2	6824078	4.03
3	2311580	3.59	5	14615	4.01	5	15434079	4.02
5	24588185	3.58	1	21719410	4.01	4	6358873	4.02

Chr	Position	-log10(p-value)	Chr	Position	-log10(p-value)	Chr	Position	-log10(p-value)
2	19315566	3.56	5	3336145	4.01	4	5407941	4.02
1	17139304	3.53	1	12388715	4.01	1	15821700	4.01
4	8459336	3.53	5	14162262	4.01	1	12388715	4.01
4	14451409	3.53	5	13907674	4.00	5	14162262	4.01
2	17028739	3.53	5	771967	3.99	5	18811977	4.00
2	7499258	3.50	5	22267428	3.97	5	13907674	4.00
2	11034500	3.50	1	13561392	3.97	5	771967	3.99
3	21412336	3.50	5	6598076	3.96	3	2311580	3.97
3	21613164	3.50	2	2146668	3.95	1	13561392	3.97
1	3126191	3.45	5	14069741	3.94	5	22263183	3.96
2	7567627	3.45	5	4948311	3.94	5	3336145	3.96
2	19014862	3.45	1	15821700	3.94	5	14615	3.96
3	12320053	3.45	5	15433141	3.93	5	6598076	3.96
2	11058982	3.43	4	17229325	3.93	2	2146668	3.95
5	6302487	3.42	3	12320053	3.92	5	14069741	3.94
2	11077142	3.39	5	14068256	3.91	5	4948311	3.94
5	24810142	3.39	5	18811977	3.91	5	15433141	3.93
2	4308788	3.38	2	6824078	3.91	4	17229325	3.93
3	5835689	3.38	1	3126191	3.90	5	14068256	3.91
3	12313811	3.38	1	10407890	3.89	5	22267428	3.91
3	23095613	3.38	5	22257497	3.87	1	3126191	3.90
1	4009645	3.38	5	6748174	3.86	3	12320053	3.90
2	9568061	3.37	1	4585433	3.86	1	21719188	3.90
5	3331313	3.37	5	14780805	3.84	1	3126607	3.88
2	9815207	3.36	1	30428951	3.83	3	3273516	3.88
3	11798860	3.36	3	3273516	3.83	1	7628846	3.88
5	22223492	3.36	5	15317871	3.83	5	15317871	3.87
1	17107478	3.35	1	4584625	3.82	4	3611212	3.86
2	7498183	3.35	5	22266326	3.82	5	24635421	3.86
4	7536644	3.35	5	22266580	3.82	4	3638451	3.85
1	17008253	3.35	5	22266818	3.82	1	4585433	3.85
1	24223898	3.34	1	21719188	3.82	3	12285847	3.84
3	8795066	3.34	2	172244	3.82	5	14780805	3.84
2	526712	3.30	4	3638451	3.81	5	24634391	3.84
4	8032860	3.30	4	5407941	3.80	3	7421193	3.83
2	11044734	3.28	5	22263183	3.80	1	30428951	3.83
1	6159840	3.28	3	22293859	3.79	1	10407890	3.83
2	622913	3.28	3	2311580	3.79	2	18379535	3.82
4	6889605	3.28	3	392114	3.79	5	22266326	3.82
5	18646025	3.26	5	24635421	3.79	5	22266580	3.82
3	7350439	3.25	1	3126607	3.79	5	22266818	3.82
3	18313809	3.25	4	8449304	3.79	5	6748174	3.82
1	17118991	3.24	1	3167797	3.78	1	21719527	3.82
3	7881968	3.24	5	14779545	3.77	1	21719584	3.82
3	7882169	3.24	5	15941883	3.77	1	4584625	3.81
5	3401092	3.24	5	22462072	3.77	5	22257497	3.80
2	7568164	3.24	5	19705799	3.76	2	172244	3.80
5	20021423	3.23	3	23051944	3.76	3	392114	3.79
3	5844583	3.21	5	14781153	3.75	5	22462072	3.78

Results of the mean binary (3a) and quantitative (3b) data for the 100 lowest p-values, after Fisher (3a) or regression (3b) (PLINK) analysis

In bold, SNPs belonging to the *sha3* interval as depicted in table S2 in the MAGIC recombinant population. Table S3c displays results from the EMMA analysis, taking into account the population structure. Chr: Chromosome.

Chap 1 Tab S4. Annotation of the LG3 cluster of genes coding for MATH domain containing proteins and others

Gene	Best Arabidopsis thaliana protein match	Domains ¹	Homology ²	CC domain ³
At3g58200	Meprin and TRAF (MATH) homology domain-containing protein (TAIR:AT3G44800.1)	MATH (meprin and TRAF-C) cd00121	2.25e-26	√*
		Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase COG5077	6.34e-05	
At3g58210	Arabidopsis phospholipase-like protein (PEARL1.4) with TRAF-like domain (TAIR:AT3G58270.2)	MATH (meprin and TRAF-C) cd00121	3.22e-37	√
		Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase COG5077	3.63e-11	
At3g58220.1	Meprin and TRAF (MATH) homology domain-containing protein (TAIR:AT3G58440.1)	MATH (meprin and TRAF-C) cd00121	9.20e-30	√
		Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase COG5077	2.32e-05	
		Polo Kinase Kinase domain pfam12474	1.02e-03	
At3g58220.2	Meprin and TRAF (MATH) homology domain-containing protein (TAIR:AT3G58440.1)	MATH (meprin and TRAF-C) cd00121	3.88e-29	√
		Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase COG5077	3.6e-05	
		Polo Kinase Kinase domain pfam12474	1.7e-03	
At3g58230	Ubiquitin-specific protease family C19-related protein (TAIR:AT3G58320.1)	Domain of protein of unknown function (DUF724)	5.20e-03	√
At3g58240	Arabidopsis phospholipase-like protein (PEARL1.4) with TRAF-like domain (TAIR:AT3G58270.2)	MATH (meprin and TRAF-C) cd00121	8.62e-21	√
		Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase COG5077	4.01e-03	
At3g58250	Meprin and TRAF (MATH) homology domain-containing protein (TAIR:AT3G58360.1)	MATH (meprin and TRAF-C) cd00121	1.72e-34	√
		Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase COG5077	2.25e-13	
		Chaperone_ClpB	5.79e-03	
At3g58260	Arabidopsis phospholipase-like protein (PEARL1.4) with TRAF-like	MATH (meprin and TRAF-C) cd00121	1.37e-24	√
		Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase COG5077	9.19e-06	
At3g58270	Arabidopsis phospholipase like protein with TRAF like domain / RESTRICTED TEV MOVEMENT 3-like (TAIR:AT3G58350.1)	MATH (meprin and TRAF-C) cd00121	1.04e-30	√
		Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase COG5077	7.62e-15	
		Phospholipase PEARL1.4 cl2213 (pfam05278)	1.03e-03	
At3g58280	Meprin and TRAF (MATH) homology domain-containing protein (TAIR:AT3G58290.1)	MATH (meprin and TRAF-C) cd00121	3.87e-05	√
At3g58290.1	Meprin and TRAF (MATH) homology domain-containing protein (TAIR:AT3G58280.1)	MATH (meprin and TRAF-C) cd00121	9.21e-17	√*
At3g58290.2	Meprin and TRAF (MATH) homology domain-containing protein (TAIR:AT3G58280.1)	MATH (meprin and TRAF-C) cd00121	2.27e-04	√*
At3g58290.3	Meprin and TRAF (MATH) homology domain-containing protein	MATH (meprin and TRAF-C) cd00121	2.18e-28	√*
		Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase COG5077	3.77e-06	
At3g58300	Arabidopsis phospholipase-like protein (PEARL1.4) family (TAIR:AT3G58330.1)	Phospholipase PEARL1.4 cl2213 (pfam05278)	2.47e-06	√
At3g58310	Receptor-like protein kinase-related family protein (TAIR:AT3G22060.1)	2x DUF26 (pfam01657) domains of unknown function found in Serine/threonine kinase	5.27e-24	--
At3g58320	Arabidopsis phospholipase-like protein (PEARL1.4) with TRAF-like	Phospholipase PEARL1.4 cl2213	3.16e-04	√
		rpoH2 RNA polymerase factor	3.27e-03	
		Chaperone_ClpB (TIGR03346)	6.96e-03	
At3g58330	Arabidopsis phospholipase-like protein (PEARL1.4) family	Phospholipase PEARL1.4 cl2213	2.54e-06	√
		Chaperone_ClpB (TIGR03346)	5.3e-03	
At3g58340	Meprin and TRAF (MATH) homology domain-containing protein	MATH (meprin and TRAF-C) cd00121 (truncated)	2.02e-30	√
		Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase COG5077	4.77e-07	
		reticulocyte binding protein 2	3.46e-04	
At3g58347	pseudogene			
At3g58350	Encodes RTM3 (Restricted Tobacco etch potyvirus Movement),	MATH (meprin and TRAF-C) cd00121	1.82e-30	√
		Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase COG5077	3.24e-07	
At3g58360	similar to RESTRICTED TEV MOVEMENT 3, Meprin and TRAF	MATH (meprin and TRAF-C) cd00121	1.97e-32	√
		Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase COG5077	1.30e-08	
		Phospholipase PEARL1.4 cl2213	1.28e-07	
At3g58370	Meprin and TRAF (MATH) homology domain-containing protein (TAIR:AT3G58410.1)	--		√
At3g58380	Meprin and TRAF (MATH) homology domain-containing protein (TAIR:AT3G58360.1)	MATH (meprin and TRAF-C) cd00121	1.11e-13	√
At3g58390	eRF1 Eukaryotic release factor	eRF1.1 cl04091	1.33e-42	--
		eRF1.2 cl04089	3.57e-30	
		eRF1.3 cl04090	1.99e-27	
At3g58400	similar to RESTRICTED TEV MOVEMENT 3, Meprin and TRAF	MATH (meprin and TRAF-C) cd00121	8.99e-16	√
		Phospholipase PEARL1.4 cl2213	1.72e-03	
At3g58410	Meprin and TRAF (MATH) homology domain-containing protein (TAIR:AT3G58340.1)	MATH (meprin and TRAF-C) cd00121	7.26e-26	√
		Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase COG5077	1.39e-07	
At3g58420	Meprin and TRAF (MATH) homology domain-containing protein (TAIR:AT3G58340.1)	MATH (meprin and TRAF-C) cd00121	5.38e-11	--
		Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase COG5077	3.59e-07	
At3g58430	Meprin and TRAF (MATH) homology domain-containing protein (TAIR:AT3G58410.1)	2x MATH (meprin and TRAF-C) cd00121	5.68e-18	√√
		Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase COG5077	3.73e-03	
At3g58440	Meprin and TRAF (MATH) homology domain-containing protein (TAIR:AT3G58410.1)	MATH (meprin and TRAF-C) cd00121	7.27e-22	√√
		Ubiquitin carboxyl terminal hydrolase COG5077	3.47e-11	

¹ domain(s) predicted with NCBI Conserved Domains (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi?>)

² Homology as depicted in NCBI Conserved Domains and Prosite (<http://prosite.expasy.org/>)

³ Coil-coiled structure prediction with PCOIL (<http://toolkit.tuebingen.mpg.de/pcoils>)

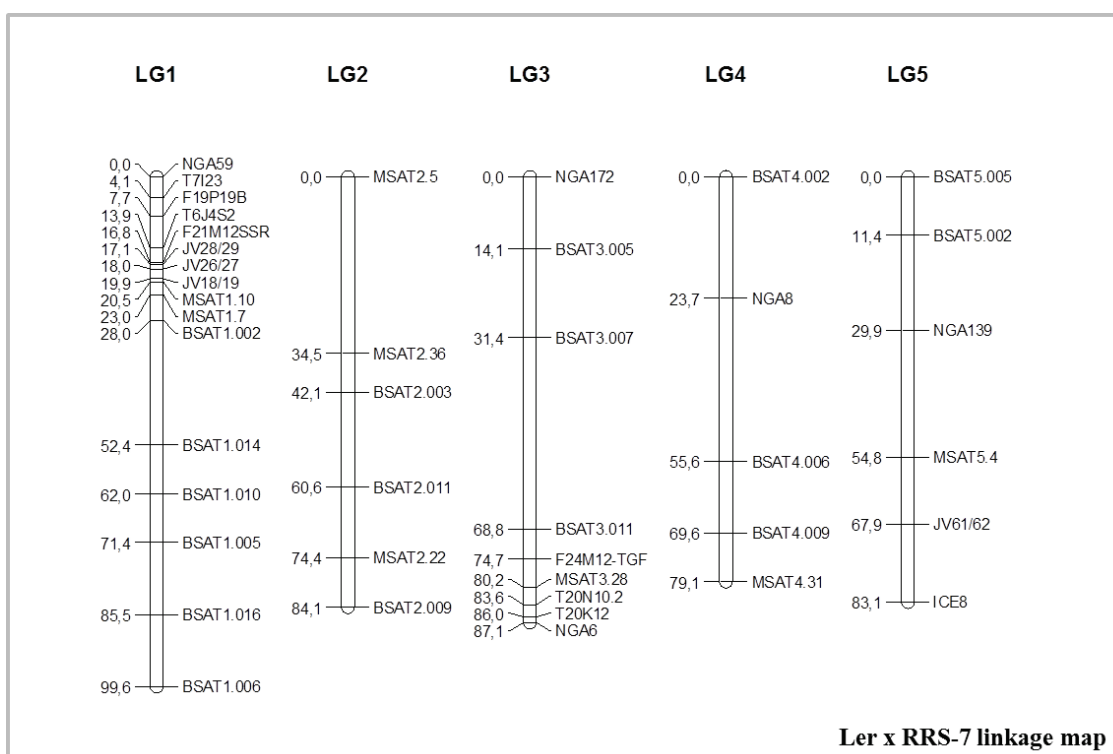
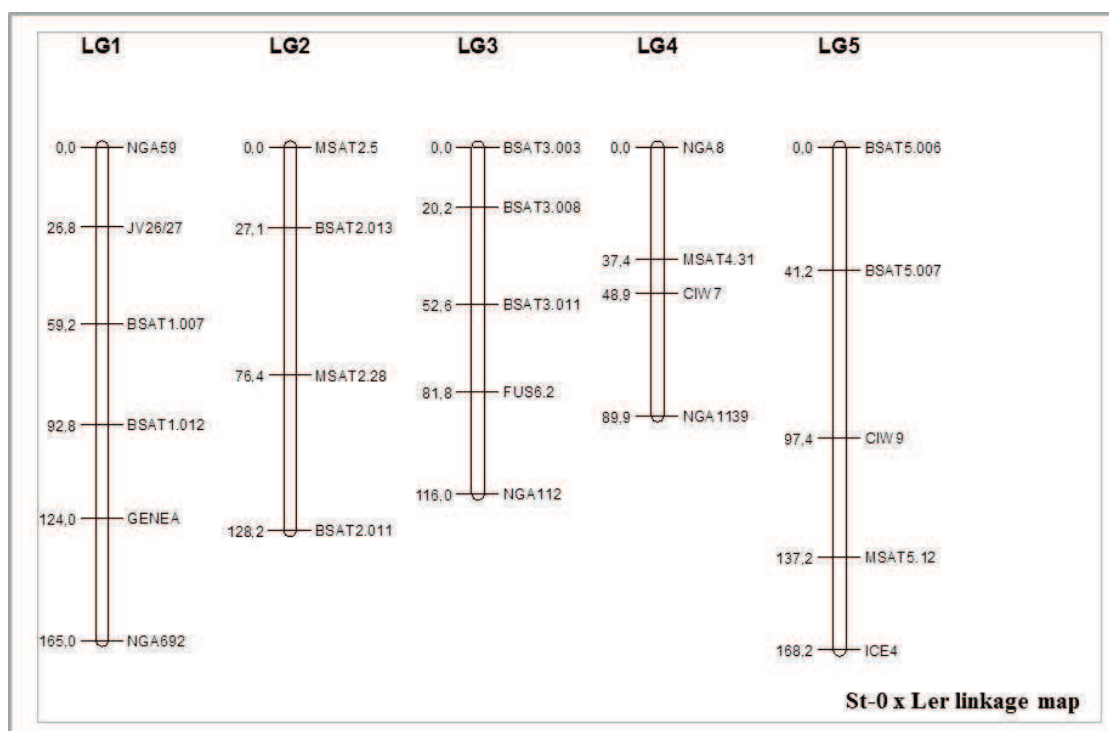
"—" no domain identified.

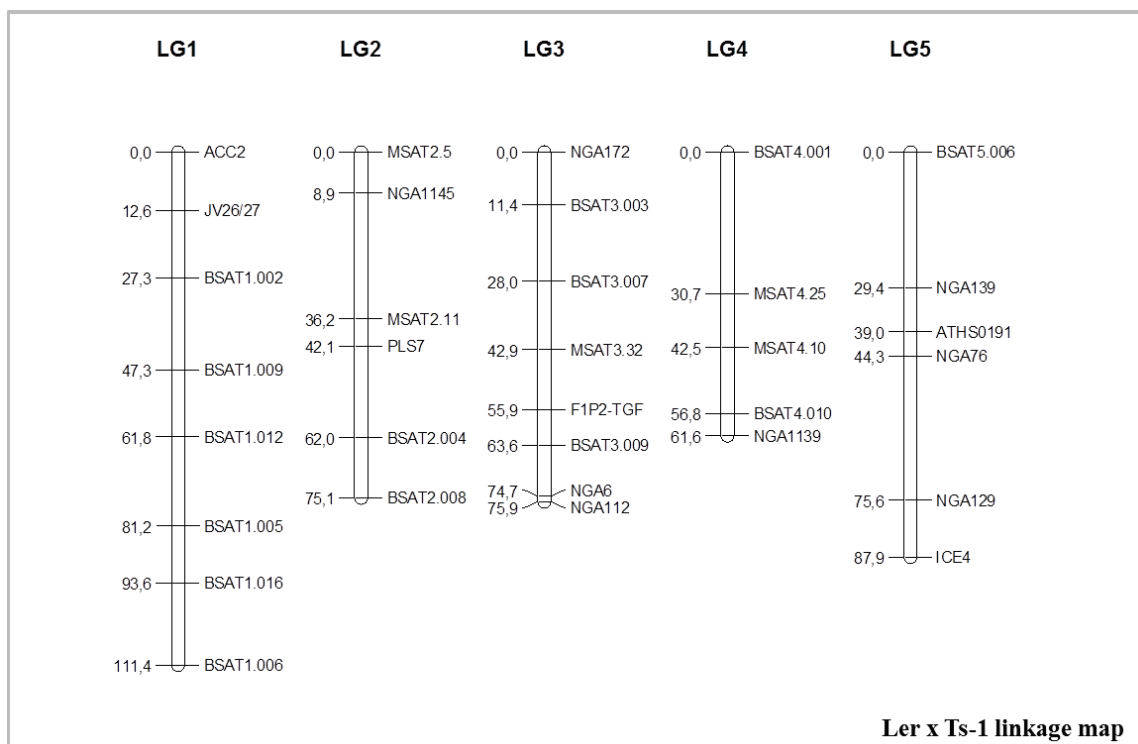
(√) coil-coiled domain detected with a high confidence probability of 0.9 to 1 in PCOIL

(√√) Two distinct coil-coiled domains detected

(√*) low probability of coil-coiled domain detection

Chap 1 Notes S1

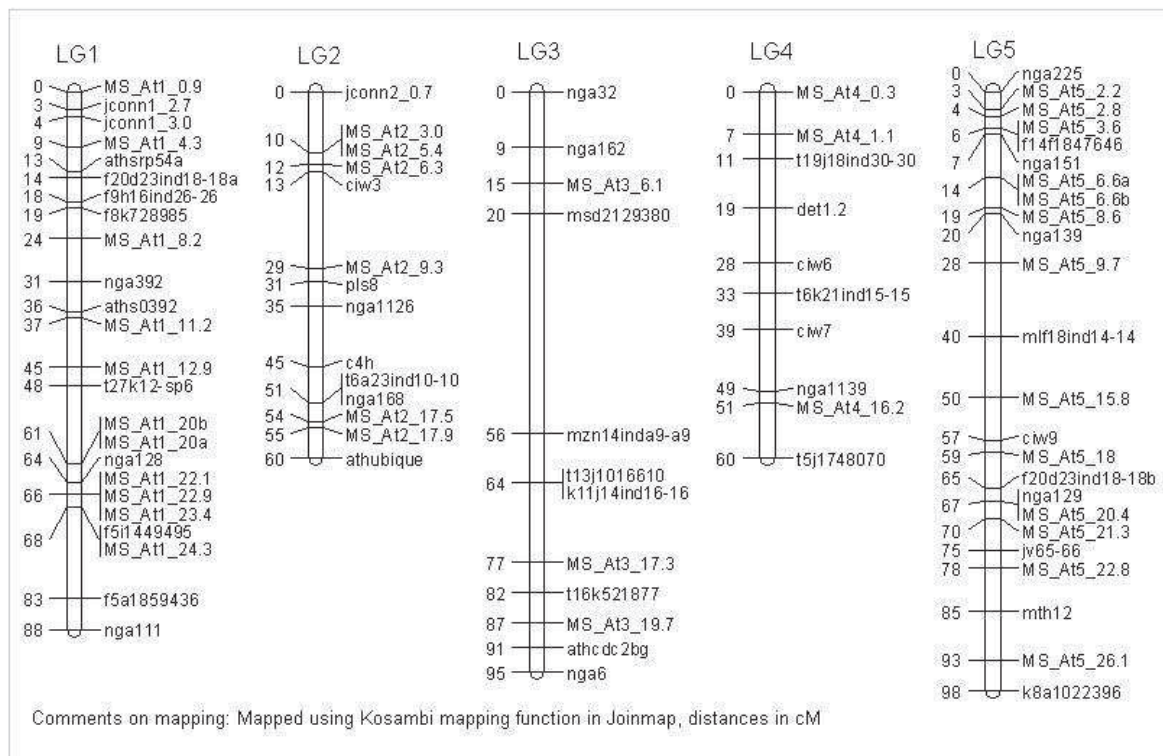




Snap-shot of the Ts-5 x MZ-0 linkage map

Kindly provided by Dr I. Bancroft and available at

http://www.jic.ac.uk/staff/ian-bancroft/research_page11.htm



List of markers used, nucleotide sequence of primer pairs and PCR condition (Ta=annealing temperature)

LG	Marker	Physical Position (bp) vs TAIR10.1	5'-3' Forward Primer	5'-3' Reverse Primer	annealing (°C)
1	NGA59	8643	GCATCTGTGTTCACTCGCC	TTAATACATTAGCCCAGACCCG	55
1	ACC2	176325	AAATGTGCAATTGCCTTC	AGAAGTTTAGACAGGTAC	50
1	T7I23	427343	CATGCACGTACGATTGTTTAAAC	GTGTCTTTTCTCAACGATG	55
1	F19P19B	1157728	CCACGTAGGTCAAGAAGAAG	TGCTGCTGCGATAGAGAGAG	55
1	F21M12SSR	3212189	GGCTTCTCGAAATCTGTCC	TTACTTTTGCCTCTTGTCTATG	55
1	JV28/29	3960436	CACITGTTCTGAAACGAAATTGA	GCTTCTCATTGCACTCCTTTG	50
1	JV26/27	4015243	CAAGAGATTGCAACATCCACA	AAGCTCCTTGGATCCGATTT	50
1	T6J4S2	4556757	GGGCCGACTTATGCATTTTT	GCTTTAGAGAGAGGGATCAATACA	50
1	JV18/19	5160599	TGTCGTATATCAATCGAAAAAGAGAT	AATTCAGTATCGAGATACCCCTCT	50
1	MSAT1.10	7296446	ATGGTGAGATACTGAGATTAT	CGAGAAGGTCTAAAGGTA	50
1	MSAT1.7	7987558	GCTTTTATCAGCTCAACAT	ACTCTTACGTTTGAGATTCA	50
1	BSAT1.002	8727111	AGATAGGATTGGTGAAGAAGAGC	CAGAGGCTCTAAAGTCTAACTGGC	57
1	BSAT1.007	8882489	TACCAAAAACACAAATGGTCC	GGCTATCTCGGCTAGTTGC	57
1	BSAT1.009	12882226	TTCCTAATAAAGTGCAAGACCC	AAACTACCACCACAAATCCTTAAT	57
1	BSAT1.010	13320547	TTCACGAAAACATCTCATTTTTGT	TCTCCATCCCTGTCTGTACG	57
1	BSAT1.014	17101782	TTGACTGAAGATAGGAATGAAGG	ATACGATTAGTTAGCCGGTGTATG	57
1	BSAT1.012	17246115	ATGGACTCACCTTAATCGGAA	AAATGAGAATAAGTTTGCCTCG	57
1	BSAT1.005	22134691	ATCTCATTCAAGAGCTTGTCCC	TGTTACATATCCAGGGTTTGGT	57
1	GENEA	22397092	ACATAACCACAAATAGGGGTGC	ACCATGCATAGCTTAAACTTCTTG	55
1	BSAT1.016	25685587	CCAACACCAAAATAAACCTTCA	AAAGATGGCAATAAGCAAGC	57
1	NGA692	28836552	AGCGTTTAGCTCAACCCTAGG	TTTAGAGAGAGAGAGCGCGG	55
1	BSAT1.006	30380980	CAAAATGTTCTGTTGAGTGTG	TTATTGTAATCAGTCGTCCGTC	57
2	MSAT2.5	208179	TGAGAGGGACAGTAGGAA	ATCAAAAGGGATACTGACAA	50
2	BSAT2.013	467176	AATTTTTCGGATGGATACACAA	CATCCAAGTAGCGGAGTCAC	57
2	NGA1145	683626	GCACATACCCCAACACGAA	CCTTCACATCCAAAACCCAC	55
2	MSAT2.28	6402763	AATAGAAATGGAGTTCGACG	TGAACCTGTTGTGAGCTTTG	50
2	MSAT2.11	8220744	GATTTAAAAGTCCGACCTA	CCAAAGAGTTGTGCAA	50
2	MSAT2.36	8678440	GATCTGCCTCTTGATCAGC	CCAAGAACTCAAAACCGTT	50
2	BSAT2.003	9772939	GAGATGATGATGCCCTATGC	ATGAGACGTTTGGACTTACACA	57
2	PLS7	9806670	GATGAATCTTCTCGTCCAAAAT	GACAAACTAAACAACATCCTCTT	55
2	BSAT2.004	14792814	TTGAGGTTACTCCTTAAATCGG	TGCTAGATCCAACTGCTGC	57
2	BSAT2.011	15485041	ACACCATAAATGTTTGACTCTGC	AACCAACCAAAAGTCAGAAC	57
2	BSAT2.008	19485701	AATGTTTTCCCATGAAACG	TGTAGTGAGAGACGCGGACACA	57
2	BSAT2.009	19617986	AATTGGTAAAAAGGAAGCACC	CAGCAATGCTCTTGTGACTG	57
2	MSAT2.22	19625873	CGATCCAATCGGTCTCTCT	TGGTAACATCCCGAATTC	50
3	NGA172	786296	CATCCGAATGCCATTGTTC	AGCTGCTCTTATAGCGTCC	55
3	BSAT3.005	4987485	GAAATGGTTCACAACCTAAAAACA	CTACACTGGTTATGGTACGGC	57
3	BSAT3.003	5081874	CCTAAAAGTCTCTCGATTCCG	GATGTGAACAAATGAATAGATCG	57
3	BSAT3.007	9325506	ACTCCGAATGCTTTATTTTCTG	ATTCATACCGACCGAAGATG	57
3	BSAT3.008	9517310	TCTATGCCAACGAAACGAATA	GAGGCAAACTTGGGTCAAAC	57
3	MSAT3.32	11206994	GCACCTGCAGCTTAACCT	CGTGACTGTCAAAACCG	50
3	MSAT3.1	12168121	GGACTCGCTGCTGCTACATTC	CCACGCACATGCAATTACATA	50
3	F1P2-TGF	17541237	TTGTCTGAAGATGTGGAGAGAGAG	CAAAACCCCACTCTTATTATTGT	50
3	BSAT3.011	18432105	AATTGACCGTTAAGTGGTTCA	TAGCTGATGAGTGGATGTGG	57
3	BSAT3.009	18653224	CTCCTTCTTGGTATGGGAT	ATACACTTATAGGGTCGATGGC	57
3	F24M12-TGF	19057377	GTTCTCTGCATTCCACATACTCT	CTTGGGTTATTCTGAAGAGCAATAAT	50
3	MSAT3.28	20456770	TACAAGTCATAATAGAGGC	GGGTTTAGCATTTAGC	50
3	T20N10.2	21774759	CACGAGGCTTAACCTCTCTG	ATGAAACACAACTTATCTGCCA	57
3	T20K12	22614127	TTTGACCTTTCAGTCAAAAGTAGAGG	CTCTCTACATACTGAAAAATGTTGG	57
3	FUS6.2	22626869	TTCTTGATCAGATTTTGGTCG	TCGTTCACTGGCTTGTCTG	50
3	NGA6	23031050	TGGATTCTTCTCTCTCTCAC	ATGAGAAAGCTTACACTGATC	55
3	NGA112	23168372	CTCTCCACCTCTCCAGTACC	TAATCAGGTGATGCAGCTGC	55
4	BSAT4.001	366468	GGTTTGATGATATTTGTTGGC	ATTTTCTATTTTATGATCGGGC	57
4	BSAT4.002	748696	CATACCGATTAGTTGTGGTTG	TTGTTGATTTTGTAGTTGTAGC	57
4	NGA8	5628813	GAGGGCAATCTTTATTTCGG	TGGCTTTCTGTTATAAACATCC	55
4	MSAT4.25	6975912	GAATGGTTGTTGATAGTTGA	AAATTTACGAGGATGATAGA	50
4	MSAT4.10	9969057	GGTAATTTTCTTGGAGACCC	CTAACTAGATCGTCCCTCGT	50
4	BSAT4.006	9969122	TTAAGCGAAAGCGTGTGAG	CTAGATCGTCCCTCGTCTGA	57
4	CIW7	11524350	AATTGGAGATTAAGCTGGAAT	CCATGTTGATGATAAGCAACA	50
4	BSAT4.010	14358509	AAATGGATCATACAATGTTACGG	TCTATAAAGTATCGGTTTGGGG	57
4	BSAT4.009	14558479	AGAAAGCCCTATGAGATGGT	TGAGGGAGTTAGGTAGCAACA	57
4	NGA1139	16444151	TTTTTCTTGTGTGCAATCC	TAGCCGGATGAGTTGGTACC	55
4	MSAT4.31	18572945	AGGGATATGGAATTGAGA	GCCGTATAACTATTGGTT	50
5	BSAT5.005	896429	CTTTCTAATTCCTAAACCAATCG	ATGCGAATTTTCAGGTTTAC	57
5	BSAT5.006	4573457	GCACGCACATACGATAAAGG	TGGATGCCTCATCAACAAGT	57
5	BSAT5.002	5397400	AAACGAAGACGAGAAGTCG	GTTCTTGACCCAGCAAGAAT	57
5	NGA139	8428133	GGTTTCGTTTCACTATCCAGG	AGAGCTACCAGATCCGATGG	55
5	BSAT5.007	8664974	GAACCTTTGAATCCACTTGTAGTTG	GCCATTGTAGAATAACTCCAGG	57
5	NGA76	10418610	AGGCATGGGAGACATTACG	GGAGAAAATGCACTCTCCACC	55
5	ATHS0191	15004685	TGATGTTGATGGAGATGGTCA	CTCCACCAATCATGCAAAATG	55
5	CIW9	17044001	CAGACGTATCAAAATGACAAATG	GACTACTGCTCAAACTATCCGG	50
5	MSAT5.4	17827214	TCAACCTAGATGGTGTGAT	TTCAATCATTTTGCCTGTA	50
5	NGA129	20115890	CACACTGAAGATGGTCTTGAGG	TCAGGAGGAAGTAAAGTGAGGG	55
5	MSAT5.12	21407702	GCATATTGTTGATAGAAAA	AGCCAAATGAATCGTT	50
5	JV61/62	22510397	CGCTTTCCTTGTGTCATTCC	AAATGCAAAATATTGATGTGAAA	50
5	ICE4	23819915	CACGAGGAATCTGGCATGGTCG	AGCGATTGCAAGCGGCTCAAG	55
5	ICE8	25477757	GTGTTACCGATCTGGCTCTG	TCAGCTTGAGCATTTACAG	55

Chapitre 2

Allelic variation at the *rpv1* locus is controlling partial restriction of *Plum pox virus* early infection in *Arabidopsis thaliana*

Chapitre 2: Allelic variation at the *rpv1* locus is controlling partial restriction of *Plum pox virus* early infection in *Arabidopsis thaliana*

Ce chapitre est consacré à l'identification du/des déterminant(s) génétique(s) contrôlant la résistance récessive à l'inoculation mécanique dans la population recombinante JEA x Col-0.

Après analyse, il s'est avéré qu'un seul locus contrôle ce caractère et qu'il co-localise avec un locus, *rpv1*, préalablement caractérisé au laboratoire dans la population de lignées recombinantes Cvi-1 x *Ler*. Nous nous sommes attachés dans un premier temps, à vérifier si ces deux loci potentiels ne faisaient qu'un. Dans un second temps, nous avons utilisé une population de lignées quasi-isogéniques dans lesquelles fut introgressée une région plus ou moins grande couvrant *rpv1* et provenant de Cvi-1 (résistant), dans un fond génétique sensible (*Ler*). Ceci permit de réduire la taille de l'intervalle *rpv1* à environ 200 Kb.

De la même manière que lors du chapitre précédent, nous avons mené une étude de génétique d'association à l'échelle du génome entier sur les mêmes 150 accessions d'*Arabidopsis* ainsi qu'une étude de cartographie génétique à partir de la population de lignées recombinantes multi-parentales MAGIC, mais cette fois, inoculées mécaniquement.

Une collaboration avec les Dr C. Caranta et L. Ouibrahim de l'équipe de Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes de l'INRA d'Avignon nous a amené à sélectionner dans l'intervalle *rpv1* un gène candidat codant pour la Phosphoglycerate kinase chloroplastique. A l'aide d'une technique d'extinction spécifique des gènes (Virus Induced Gene Silencing VIGS), nous avons finalement démontré qu'une diminution de l'expression de ce gène dans un contexte sensible entraînait une réduction significative de l'infection par le PPV.

Allelic variation at the *rpv1* locus is controlling partial restriction of *Plum pox virus* early infection in *Arabidopsis thaliana*

S. Poque¹, G. Pagny¹, L. Ouibrahim², A. Chague¹, J-P Eyquard¹, T. Candresse¹, C. Caranta²,
S. Mariette¹, V. Decroocq¹

¹INRA, Université de Bordeaux, UMR 1332 BFP, BP81, 33883 Villenave d'Ornon cedex, France.

²INRA-UR1052, Genetics and Breeding of Fruits and Vegetables, Dom. St Maurice, CS 60094, F-84143 Montfavet Cedex, France

Corresponding author: decroocq@bordeaux.inra.fr

Keywords: Partial resistance, recessive resistance, QTL mapping, association mapping, PPV, Plum Pox Virus, *Arabidopsis thaliana*, cPGK

I. Abstract

Sharka is a devastating viral disease caused by the *Plum Pox Virus* (PPV) in stone fruit trees and few sources of resistance are known in its natural hosts. In orchards, the virus is transmitted by aphids and by grafting. In model plants such as *Arabidopsis thaliana*, PPV is transferred to the host plant by mechanical inoculation, by biolistics with infectious cDNA clones and by *Agrobacterium*. Partial resistance to mechanical inoculation has been observed in a set of *Arabidopsis* accessions among which Cvi-1 and Col-0. One third of the plants were infected and viral accumulation was also lower in those plants in comparison with the *Ler* accession. The trait is monogenic to digenic depending on the accessions, with partial recessive resistance and incomplete penetrance.

Linkage analysis on recombinant inbred line populations allowed us to locate one major region of the genome associated with susceptibility to PPV. To confirm the QTL mapping, a genome-wide association analysis was done using multiparental lines and 147 *Arabidopsis* accessions. Our results demonstrated that the two Col-0 and Cvi-1 accessions share a resistant allele at the *rpv1* locus located in the middle of the long arm of chromosome 1. Fine mapping lead to the positioning of *rpv1* to a 200 kb interval. A candidate gene approach identified a Chloroplast Phosphoglycerate Kinase (CPGK) as the potential gene underlying partial resistance to mechanical inoculation in Col-0 and Cvi-0. Indeed, by using a virus-induced gene silencing system to knock down the chloroplast PGK, PPV viral accumulation was drastically reduced.

In consequence, we report here the existence of *rpv1* resistant allele(s) in both Cvi-1 and Col-0, and that these allele(s) are most likely related to variation at the *Arabidopsis* cPGK locus.

II. Introduction

Plant viruses cause an estimated \$60 billion crop loss worldwide per year. Among them, potyviruses are able to infect all agricultural crops such as cereals, oil crops, vegetables, ornamentals and fruits. They represent 30% of known plant viruses and are economically the most important threat for vegetable crop species and fruit trees. *Plum Pox Virus* (PPV), a member of the potyviridae, infects *Prunus* species (stone fruit) and causes Sharka disease. This disease devastates fruit and plant productivity significantly impacting crop quality. Over the last 30 years, Sharka disease costs to the worldwide industry have reached 10 billion Euros (Cambra et al., 2006). Unfortunately, only a few sources of natural resistance are available in the various *Prunus* crop species. In order to expand and understand the nature of resources of resistance, we are seeking new mechanisms of resistance to PPV in the model plant: *Arabidopsis thaliana*.

Arabidopsis is commonly used for the acquisition of knowledge on basic plant biology and its adaptation to biotic or abiotic stress. The plant's small size, rapid life cycle and the small genome size of ~150Mb make it an ideal model plant for biotechnological and genetic characterization of plant disease resistance. Moreover *Arabidopsis* is susceptible to various viral pathogens such as potyviruses (e.g. *Turnip mosaic virus*; *Tobacco etch virus*; *Lettuce mosaic virus*; *Plum pox virus*), Cucumoviruses (*Cucumber mosaic virus*), Luteoviruses (*Beet western yellow virus*) and others, making it an ideal host for identifying genes that underlie susceptibility to viral infection (Carr and Whitham, 2007).

Viruses are obligatory intracellular parasites requiring host cell machinery to complete the different steps of their infectious cycle. The disruption of compatible interactions between host and viral factors during replication of the viral genome or translation of the viral proteins leads to the failure of the corresponding viral infection step, that is operationally equivalent to recessive resistance (Fraser, 1990). This kind of resistance seems to be more frequent for

plant/potyvirus pathosystems representing 40% of the resistance identified up to now. It is worth noting that most of the studies on recessive resistance published to date point out genes encoding the translation initiation factors eIF4E, eIF4G or their isoforms (Truniger and Aranda, 2009). eIF4E and eIF(iso)4E factors are small cap-binding proteins that bind the 5' end of mRNAs and eIF4G and eIF(iso)4G factors are large proteins that interact with eIF4E and eIFiso4E, respectively, but also with eIF4A, eIF3, and the poly(A)-binding protein in order to form the translation initiation complex (Browning, 1996; Kawaguchi and Bailey-Serres, 2002).

Recently two recessive resistances involving two different potyviruses [*Plum Pox Virus* (PPV) and *Watermelon Mosaic Virus* (WMV)] were identified in the *Arabidopsis* cultivar, 'Cape Verde Island' (Cvi-1 and Cvi-0 respectively). They mapped in the same interval on the first chromosome of *Arabidopsis* (Ouibrahim et al., unpublished; Sicard et al., 2008) and resistant alleles were designated *rpv1* and *rwml* respectively. In the case of *rwml* a chloroplast phosphoglycerate kinase (cPGK) appears to be involved in WMV recessive resistance. This cytosolic isozyme of chloroplast PGK, is a ubiquitous monomeric protein that has been isolated from diverse species ranging from human to plants and bacteria (Watson and Littlechild, 1990). Some glycolytic enzymes are implicated in multiple functions, very distant from their original roles in glycolysis. For example, in mammalian systems, PGK and lactate dehydrogenase play roles in DNA repair (Popanda et al., 1998). Also in a Paramyxovirus, the Sendai virus, PGK was reported to stimulate mRNA transcription at the elongation step (Ogino et al., 1999). Most recently it was shown that the lowering of chloroplast PGK levels reduced the accumulation of the Bamboo mosaic virus (BaMV), a member of Potexvirus gender (Lin et al., 2007).

Interestingly, the recessive resistance to PPV is related to viral mechanical inoculation and is partial (Sicard et al., 2008). The tendency to escape infection was described by Lecoq

et al., (2004) as a partial resistance characterized by a lower probability of infection than in susceptible plants. Under artificial conditions (mechanically inoculated plants) partial resistance could be explain by an ability to escape the primary virus infection, to restrict the virus multiplication in the inoculated organ, or to prevent the long distance movement of the virus in the whole plant, especially when inoculum pressure is low (Caranta et al., 1997). The study of CMV resistance in pepper plants shows that QTLs with additive effect and digenic epistasis seemed to play an important role in the control of partial resistance to CMV. Moreover the combination of two different partial resistances leads to higher level of resistance (Caranta et al., 1997). Partial resistance to Barley Yellow Dwarf Virus (BYDV) in wheat is characterized by a high frequency of plants which escape from infection (Barloy et al., 2003) and whatever the difference between partial resistances is, their association is postulated as a means to achieve a higher level of resistance to BYDV (Jahier et al., 2009).

In this study, we employ genetic analysis and linkage mapping of recombinant inbred line populations, a multiparental population and genome wide association mapping to demonstrate the existence of *rpv1* resistant alleles in both Cvi-1 and Col-0, that are either linked very closely with or are variant alleles of the Arabidopsis cPGK locus.

III. Materials and methods

III.1. Plant material

We used two populations of recombinant inbreed lines (RILs), one derived from a cross between Col-0 (Columbia) (186AV in the VNAT collection, N1092 in the NASC collection) and JEA (25AV), and the other from a cross between Cape Verde Islands (Cvi-1) and Col-0. Both of them were developed by INRA of Versailles (<http://dbsgap.versailles.inra.fr/vnat/>)

For fine-mapping, we also used the so-called LCN near isogenics lines (NIL) developed by J. Keurentjes, Wageningen Agricultural University (Keurentjes et al., 2007). They originated from a Landsberg *erecta* (Ler) x Cvi-1 cross in which Cvi-1 genomic regions were

introgressed into a *Ler* background. From the LCN NILs, we generated two F2 populations as follows: one by backcrossing the PPV resistant LCN 1.12 in *Ler* and the second by crossing the LCN1-26 (susceptible) with LCN 1.21 (resistant). F1 heterozygous plants were checked before selfing with the AthGENEA marker for the first LCN1.12 x *Ler* cross and with T18A20 SSLP1 for LCN1.26 x LCN1.21 (see markers listed in Table 1).

One hundred and forty-seven accessions, issued from Atwell et al (2010), for genome-wide association study and the MAGIC (Multiparent Advanced Generation Inter-Cross) recombinant population were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC) (www.nasc.arabidopsis.org).

Plants were grown in a BL-3 containment greenhouse under temperature and humidity controlled conditions (20°C and relative humidity of 60%).

III.2. Viral material

Viral clones used in this study are all derived from the PPV-R isolate, which belongs to the PPV-Dideron strain (Riechmann et al., 1990). Construction of pBINPPVnkGFP containing the full-length nucleotide sequence of PPV-R coupled with the green fluorescence (GFP) protein has been described in (Fernandez-Fernandez et al., 2001)

III.3. PPV resistance phenotyping

The pICPPVnkGFP virus clone was mechanically inoculated on the rosette leaves at four weeks after sowing. Virus infection was scored at 21 days post inoculation (dpi) in non-inoculated tissues (flower stems or newly developed rosette leaves). The inoculum was derived from pICPPVnkGFP-infected *Nicotiana benthamiana* leaves. At 21 dpi, viral accumulation was estimated for each individual plant using double antibody sandwich (DAS) ELISA assays (Sicard et al., 2008). Optical densities (OD) were normalized using the PPVnkGFP infected *Nicotiana benthamiana* positive control deposited on every ELISA plate

of an assay. Quantitative data were normalized relative to the value of the PPVnkGFP infected *Nicotiana. benthamiana*, which was set at 100. In the case of RILs, the final viral accumulation value is the average of normalized measurements from all PPV-inoculated replicates of each RIL.

III.4. Mapping of the genetic determinants in bi-parental populations

The F8 JEAXCol-0 RIL population is comprised of 455 lines genotyped with 87 markers of which 81 are SNP markers (Single Nucleotide Polymorphism) (Simon et al., 2008). Two sets of 188 and 120 individuals, both parents, and the PPV resistant E6 eIFiso4E loss-of-function mutant (Decroocq et al., 2006), that served as a negative control, were challenged with PPV. Experiments were set up in a 4-blocks random design and the 188 set was duplicated over two years, while the next 120 RILs, recombinant over the candidate *rpv1* region, were tested only once. For both data sets (188 and 121 RILs), descriptive analysis was performed under R (<http://www.R-project.org>) including the Levene's, ANOVA and Kruskal-Wallis parametric and non-parametric tests.

A genetic map was constructed for the F8 JEAXCol-0 RIL population using Joinmap (Van Ooijen and Voorrips, 2001) with a LOD (logarithm of odds) score threshold of 3. Corresponding molecular markers were provided by the VNAT website (<http://dbsgap.versailles.inra.fr/vnat/Documentation/28/DOC.html>).

Quantitative trait analysis was performed with MapQTL3 (Ooijen et al., 1996) using first the non-parametric Kruskal-Wallis test because in both cases the distribution of the trait was not normal. Interval mapping was also performed to determine the LOD score of the putative QTLs. A permutation test was performed to calculate the 5% limit for statistical significance both chromosomally and genome-wide. The percentage of the phenotypic variation explained by the QTL corresponds to the regression value R^2 taken at the peak LOD score of the QTL in the MapQTL3.

In order to fine map the locus associated with partial resistance to mechanically inoculated PPV in Cvi-1, a total of twenty molecular markers were developed (see Chap 2 Tab 1). Microsatellite repeat motifs were identified in Arabidopsis BAC sequences using Sputnik software (<http://www.cbib.u-bordeaux2.fr/outils/Pise/sputnik.html>). Simple sequence length polymorphism (SSLP) and Single Nucleotide Polymorphism (SNP) were retrieved from the Monsanto Arabidopsis Polymorphism and *Ler* sequence collections (<http://www.arabidopsis.org/browse/Cereon/index.jsp>) using the name of the BAC clones as a search tag. Insertion Site-Based Polymorphism (ISBP) was identified by submitting the Col-0 genomic sequence to the ISBP Finder software (Paux et al., 2010). Consequently, oligonucleotide primers complementary to the regions flanking the identified repeat motifs or polymorphic sites were designed using the program Primer version 0.5 (National Biosciences, Plymouth, Minnesota), setting an annealing temperature of 57.5 °C.

PCR fragments were amplified as described by (Decroocq et al., 2003). SSR and SSLP markers were separated on 4% agarose gels while SNP and ISBP markers were scored by High Resolution Melting curve (HRM) on a real-time PCR LightCycler. Three of the above markers (namely T18A20 SSLP1, F7A10 SSR1 and T6H22 SSR2) were tested in the F2 LCN1.12 x *Ler* population. The forward primer was labeled either with FAM or with VIC and the allelic pattern of the three markers was scored among 1,736 F2 individuals in triplex on a capillary 3730 ABI sequencing machine.

To align the Cvi-1 x *Ler* and JEA x Col-0 genetic maps, we selected from the above markers seven SSR and SSLP markers co-localizing with the *rpv1* locus and polymorphic between the JEA and Col-0 parental accessions (see Chap 2 Fig 1). Two markers flanking the JEA x Col-0 locus were added, namely CIW1 and RCVI37. CIW1 is derived from the MSAT database (<http://www.inra.fr/internet/Produits/vast/msat.php>). RCVI37 is a microsatellite marker designed from the T7P1 BAC sequence, as described above (Table 1). All 9 markers

were screened on the full set of 250 JEA x Col-0 RILs before rerunning the quantitative analysis as described above.

III.5. Mapping of the genetic determinants in the multiparental population (MAGIC lines)

Four hundred and thirty five of the original set of 527 Multiparent Advanced Generation Inter-Cross (MAGIC) recombinant lines were tested in triplicates, following a complete random 3-block design. Included in these blocks were the 19 founders of the MAGIC lines and the PPV resistant E6 mutant. The heritability among MAGIC lines was determined to best fit a random effects model (Kover et al., 2009). Using ANOVA, we determined the specific effect of ‘genotype’ and the broad-sense heritability (h^2), which is the ratio between the genetic variance and the total phenotypic variance and is calculated using the formula $h^2 = \sigma_g^2 / [\sigma_g^2 + (\sigma_e^2/n)]$, where σ_g^2 is the genetic variance, σ_e^2 is the environmental variance and n the number of replicates. We used lsmeans for the genome scan analysis. Procedures for QTL analysis are described in (Kover et al., 2009) and (Pagny et al., 2012).

III.6. Association mapping

One hundred and forty-seven accessions, as described in Atwell et al., (2010), were tested following a complete random 4-block design, the experiment was repeated over two years. Quantitative data for viral accumulation and the estimation of the phenotypic mean (lsmean model) were generated as described above. We chose to combine the two experiments by considering the 8 blocks as a single data set in the lsmean model, the year effect being then included in the block effect. To resolve the phenotypic scoring into binary data, thus avoiding intermediate scores, we decided to rate accessions as susceptible (an assigned value of 1) when the lsmean value was at least three times the lsmean value of the PPV resistant E6 negative control (Decroocq et al., 2006).

Genotypic data (mostly Single Nucleotide Polymorphism) were assigned as described in Atwell et al., (2010) and are publically available at the AtPolyDB (<https://cynin.gmi.oeaw.ac.at/home/resources/atpolydb>).

Fisher's exact tests were implemented on binary data to test for the association between genotypes and phenotypes. For quantitative data we used a Wilcoxon rank sum tests. In addition a regression analysis was implemented using the Plink software (Purcell *et al.*, 2007) (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>). All those analyses were expected to have false positives due to population structure. Thus, we also used the EMMA method (Kang *et al.*, 2008) based on a mixed model that accounts for effects due to population structure.

III.7. Virus-induced gene silencing (VIGS)

The Tobacco rattle virus (TRV) based VIGS system was used to knock down the expression of host genes. Plasmids pTRV1, pTRV2/PGK-5, pTRV2/PGK-3 and pTRV2/PDS were kindly provided by Dr. C. Carenta (Génétique et Amélioration des Fruits et Légumes, INRA Avignon, France), their constructions are described in Ouibrahim et al., (unpublished). Two plasmids pTRV2/PGK-5 and pTRV2/PGK-3 containing fragments corresponding to 5' and 3' ends of tobacco chloroplast PGK, were used to knock down the Arabidopsis AT1G56190 chloroplast PGK. Plasmid pTRV2/PDS containing a phytoene desaturase was used as a positive control of silencing (Lin et al., 2007).

Nicotiana benthamiana was grown in BL-3 containment greenhouse under the controlled conditions of temperature (20°C) and relative humidity (60%). *Agrabacterium tumefaciens* cultures at OD₆₀₀ = 1 containing pTRV1 or pTRV2 derivative plasmids were mixed in 1:1 ratio and infiltrated with a syringe onto two leaves of each plant. Twelve days after infiltration, newly formed leaves were mechanically inoculated with the pICPPVnkGFP clone. Six days post inoculation (dpi), inoculated leaves and new leaves were sampled.

III.8. RNA isolation and real-time PCR

Total RNA was extracted from *Nicotiana Benthiana* using the SV Total RNA Isolation System[®] from Promega Biosciences, LLC. First strand cDNA was synthesized from total RNA using Superscript II[®] reverse transcriptase from Invitrogen. In the real-time PCR experiment, the chloroplast-specific PGK is amplified and detected by a forward primer (5'-GCCTTCTGTTGCAGGTTTCC-3') and a reverse primer (5'-ATTCCTCCACCCAAAAGCAA-3'). For comparison of the data among experimental samples, the real-time PCR results were normalized using the levels of *Nicotiana benthamiana* elongation factor 1 (NbEF1) mRNA using a forward primer (5'-GATTGGTGGTATTGGAAGTCTC-3') and a reverse primer (5'-AGCTTCGTGGTGCATCTC-3') (Rotenberg et al., 2006).

IV. Results

IV.1. Response of JEA and Col-0 Arabidopsis accessions to PPV infection

We evaluated the response to PPV infection of JEA and Col-0 by a mechanical inoculation using an inoculum derived from pICPPVnkGFP-infected *Nicotiana benthamiana* leaves. This inoculation technique is distinct from the one described in (Pagny et al., 2012) because *Agrobacterium tumefaciens* is no longer used as an intermediate for introducing viral particles in the host cells. PPV accumulation was scored at 21 days post inoculation (dpi). JEA appears to be resistant while Col-0 is partially susceptible, in comparison with the fully susceptible *Ler* accession (Chap 2 Tab 2 and Fig 1). It is worth noting that JEA is a late flowering accession, it requires at least a two to three months period after germination to induce floral stems (so-called bolting) while Col-0, an early flowering accession, is requiring about four weeks (29 days +/- 1 day according to Simon et al., (2008)). In consequence, both parents are not in the same developmental stage when tested. Indeed, at 21 dpi, we were testing PPV on floral stems for Col-0 and on rosette leaves for JEA. Many plants grown in

temperate climates require vernalization and have to experience an extended period of winter low temperature to initiate or accelerate the flowering process. We succeeded in inducing bolting and floral stem development in JEA by a vernalization period of two weeks at 4°C. Interestingly, early flowering JEA plants challenged with PPV were able to sustain PPV infection in the upper floral tissues but not in the basal rosette leaves (data unpublished). Hereafter, we focused our study on PPV systemic infection of *Arabidopsis* floral stems by collecting and studying PPV accumulation only in the upper tissues.

IV.2. Linkage mapping of the resistance trait in the recombinant populations JEAxCOL-0

Restriction of PPV infection following mechanical inoculation with pICPPVnkGFP virus clone was evaluated in two distinct sets of lines of the F8 JEAxCOL-0 recombinant inbred line population, constituted of 188 to 120 individuals respectively. The experiment on the set of 188RILs was duplicated over two years, each time conducted at the same winter period of the year. For each assay, a completely randomized design in four independent blocks was used. Floral stems from each plant were sampled individually at 21 dpi. It is worth noting that over 80% of the 188 recombinant lines were flowering at sampling time, without a previous vernalization period. It thus appears that the strong vernalization character as depicted in JEA was more or less lost during the construction of the F8 recombinant population.

PPV accumulation in each recombinant line was quantified by serological tests (ELISA). Raw optical density values (OD) were first normalized on the OD value of the same positive control used on each ELISA plate. Prior to the QTL analysis, a linkage map was obtained using Joinmap and a LOD threshold of 3. QTL analysis was performed, using MapQTL and RQtl softwares. Before running the QTL analysis, we investigated the block effect in each experiment to determine if we could pool the data among blocks or if we should

perform the QTL analysis on each block separately. The Levene's test was employed on normalized OD data for each experiment, comparing the homogeneity of the variances in between each block. Results show that variances are not significantly heterogeneous in all experiments (Levene's test p-value for both sets of 188 and the set of 120 RILs were 0.38, 0.33 and 0.48 respectively), and application of an ANOVA test confirmed the fact that the block design had no significant effect on viral accumulation (ANOVA test p-value for both sets of 188 and the set of 120 RILs were 0.3902, 0.1898 and 0.5466 respectively). This type of information was important to determine the appropriate procedure for quantitative trait analysis. In both experiments, since variances were not significantly different between each block, we can use the mean value of normalized OD for each recombinant line and then perform the QTL analysis on one single set of data. We first performed a Kruskal-Wallis test to detect markers linked to the resistance to PPV and then calculated an approximate LOD score through interval mapping. Chap 2 Tab 3A summarizes Kruskal-Wallis p-value and LOD score of each QTL. In the 188 RILs experiment the effect of only one locus was observed, with LOD score of 15.99 and a R^2 of 33.10%. We detected a single strong locus, located on chromosome one of Arabidopsis, from 60.5cM to 69.1cM (19,477,618bp to 23,381,469bp), (Chap 2 Fig 3). Interestingly, this coincides with another locus determining resistance to PPV-R (pICPPVnkGFP) mechanical inoculation in the accession Cap Verde Island (Cvi-1) and named *rpv1* (Sicard et al., 2008). The second set of JEA x Col-0 recombinant lines is constituted of 120 RILs that displays at least one recombination event over the 60.5-69.1 interval. The 120 RILs set was challenged with PPV, similarly to the 188 RILs set; data were processed as described above. Once again, we identified a single locus, co-localizing with *rpv1* but with a higher effect (R^2 up to 38.90%). The segregation rate in F2 Cvi-1 x Ler progenies (Sicard et al., 2008) as well as the fact that the F1 JEA x Col-0

population is susceptible lead us to postulate that both populations display a recessive resistance to PPV.

IV.3. Fine-mapping of *rpv1*

To avoid any epistatic interactions with other loci, we performed the fine mapping of *rpv1* with near isogenic lines (NIL) originating from a Cvi-1 x *Ler* recombinant inbred line population (Keurentjes et al., 2007). The procedure was conducted in three steps. First, a set of ten NIL, recombinant over the long arm of linkage group one, were challenged by mechanical inoculation. We thus determined the upper and lower borders of the *rpv1* locus which controls partial resistance in Cvi-1 (see Chap 2 Fig 2) as depicted in the NILs LCN1.29 and 1.26. Those recombination points were flanked by two markers, F6D8 SSLP1 and F12K22 SSR1, and delineated an interval of 1.8 Mb (see Chap 2 Fig 2).

Second, the fine mapping was pursued by screening 1,732 F2 plants from the LCN1.12 x *Ler* cross with a set of polymorphic markers developed specifically over the *rpv1* interval as determined by the LCN1.26 and 1.29 NILs. This allowed us to reduce the *rpv1* interval down to 460 Kb, between the markers T6H22 SSR2 and F12K22 SSR1. The third step consisted of a second run of fine-mapping but this time within the LCN1.26 (susceptible) x LCN1.21 (resistant) F2 population. 840 individuals were then screened with the T6H22 SSR2, ISBP 16, T8L23 SSR and F12K22 SSR1 markers. Each time, F2 recombinant individuals were self-pollinated and twelve to twenty-four F3 plants per F2 recombinant individual were challenged with PPV by mechanical inoculation. F3 lines having over 70% of plants not infected were scored as resistant and, in consequence, we considered that the parental F2 plants presented a Cvi-1 allele at the *rpv1* locus.

In total, 414 (LCN1.12 x *Ler*) and 372 (LCN1.26x LCN1.21) lines were challenged by pICPPVnkGFP mechanical inoculation and genotyped over the *rpv1* locus. This allowed us to

narrow down the *rpv1* interval from position 20,971,975 to position 21,232,895 on the long arm of chromosome 1 (Chap 2 Fig 2, between the T6H22 SSR2 and ISBP 16 markers).

IV.4. Colocalisation between the Cvi-1 and Col-0 genetic determinant(s)

We combined results from the 188RILs and 120RILs sets to artificially create a new set of 250RILs, and we generated a new linkage map with ten SSR or SSLP markers issued from the *rpv1* fine mapping approach (Chap 2 Tab 3A). Once again, only one locus was detected, with a LOD score of 21.78 and a R^2 of 34%. These results suggest a major effect of the locus delimited by the markers F6D8-SSLP1 (19,477,618 bp) and RCVI-32 (22,181,333 bp) in the control of PPV infection in the Arabidopsis F8 JEAxCol-0 recombinant inbred line populations (Chap 2 Fig 2).

IV.5. Linkage mapping of the mechanical inoculation resistance trait in a multiparental recombinant population

Data above demonstrated that in two non-related accessions (Cvi-1 and Col-0) a recessive resistance involving the same genomic region (*rpv1*) was mapped. In both cases, resistance was observed when plants were mechanically infected. We subsequently investigated the extent of this particular resistance by challenging a multiparental recombinant population following the same procedure as above.

Four hundred and thirty-five of the 527 MAGIC (Multiparent Advanced Generation Inter-Cross) recombinant inbred lines described by Kover et al., (2009) were obtained from NASC and evaluated for restriction of PPV infection in a three random blocks design. The broad-sense heritability of PPV resistance for the MAGIC lines was calculated from the variance analysis (see material and methods) and reached 0.77. Each founder accession was tested in parallel to the MAGIC RILs. A significant block effect was detected and accounted for either by integrating it in the computation or by analyzing each block separately. We performed a QTL mapping analysis using data from each block separately, as well as, one

using a lsmean model, accounting for the effect of each block. By using lsmean values, we identified a major QTL in the same genomic region with block 1 and 3 having a maxima of the $-\log_{10}$ (p-value) of 5.80 (Chap 2 Tab 3B). Interestingly, the same genomic region was identified when using data from block one and three separately or from the mean values of the three blocks and this region co-localized with the QTL previously identified in the F8 JEA x Col-0 and Cvi-1 x *Ler* recombinant inbred line populations. The genetic interval ranged from 19,515,673 bp to 22,286,231 bp, with a peak at 21,665,899 bp (Chap 2 Tab 3B and Fig 4). From the QTL analysis of the MAGIC lines, the genome of each line was reconstructed as a mosaic of the founder haplotypes (Kover et al., 2009). Based on this reconstruction, it was possible to determine that the three founders contributing the QTL detected in the MAGIC lines were indeed Col-0, Can-0 and Ws.

Interestingly, the same MAGIC population was previously challenged by agro-inoculation (Pagny et al., 2012). This resulted in the identification of a major locus, *sha3*, that controls PPV systemic infection in Arabidopsis. The *sha3* locus is distinct from *rpv1*, since it is located at the bottom of linkage group 3.

In the mechanical experiment, we failed to detect the *sha3* locus even if point wise p-values were significant at the 1% level. In order to try limiting the *rpv1* effect, the analysis was repeated removing lines that possess a higher probability of having the genotype of the resistant founders at the *rpv1* region. By re-running the QTL scanning without those lines, the point wise p-value at the *sha3* locus was decreased. This suggests that by lowering the effect of the *rpv1* locus in the mechanical experiment we were able to increase the detection of the *sha3* locus (data not shown). Therefore, even if the *sha3* QTL was difficult to detect, we conclude that resistance in the MAGIC lines is controlled by at least two loci *rpv1* and *sha3*, when plants were mechanically infected.

On the contrary, the lack of detection of the *rpv1* locus in the agro-experiment is explained either by a low effect of *rpv1* in a *sha3* context or by a breaking of the *rpv1*-mediated resistance when agro-inoculating. To test the latter possibility, we inoculated in parallel *Ler*, Cvi-1 and the 10 LCN NILs mechanically, using *Agrobacterium* or by biolistics (Chap 2 Fig 5B). In each case, we used the same PPV-R isolate from which the pBINPPVnkGFP and pICPPVnkGFP clones that were used for agro-inoculation or biolistics, respectively, were derived. Cvi-1 and the five PPV-resistant LCN lines (LCN 1.12, 1.18, 1.21, 1.22, 1.23) were 100% PPV positive when inoculated by *Agrobacterium* or biolistics. Taken together those results suggest that the *rpv1*-mediated resistance mechanism is linked to mechanical inoculation and is overcome by *Agrobacterium* or biolistic inoculation. Moreover, when inoculating mechanically *Ler* and PPV-resistant LCN lines (see LCN1.12 in Chap 2 Fig 5A), PPV accumulation is significantly higher in inoculated leaves of *Ler* than for PPV-resistant lines. It thus appears that *rpv1* is involved in a resistance mechanism acting early during the viral infectious cycle.

IV.6. Genome Wide Association (GWA) mapping of Arabidopsis resistance to PPV long distance movement

Similarly to Pagny et al. (2012), 147 *Arabidopsis* accessions previously genotyped with 250K (Atwell et al., 2010) (see Table 4 for the list of accessions used in this study) was inoculated with PPV-R; however, in this case, we used mechanical inoculation instead of agro-inoculation. A genome-wide association study (GWAS) on a set of 147 *Arabidopsis* accessions, a PPV susceptible control (*Ler*-0) and a negative control (E6) was conducted. For phenotypic assays, a completely randomized design in four independent blocks was used. The experiment was duplicated over two years. Two types of data were generated from the phenotypic assays: quantitative virus accumulation data (normalized ELISA, OD values) and binary data (value: 1 for susceptible, 0 for resistant). For the one experiment and its duplicate,

the broad-sense heritability of PPV resistance for the accessions reached 0.82 and 0.83, respectively. A block effect was detected in both experiments with the quantitative data. In fact, we observed variability in the viral accumulation response among blocks and between the two experiments. This variability could be explained by the inoculation method. We used the lsmean model as an estimation factor of the phenotypic variation in the GWA analysis.

We performed association analysis using a Fisher's exact test on the binary data. This statistical test allowed us to identify SNPs significantly linked to resistance to PPV. Notably, 15 of the 500 SNPs¹ with the lowest p-values obtained in the binary data analysis were located in the largest QTL interval identified previously (19,477,618bp to 23,381,469bp). Interestingly two of them, located at 21,041,405 and 21,089,285 of linkage group 1, were co-localizing with the *rpv1* Cvi-1 x *Ler* interval (20,971,975 – 21,232,895) (Chap 2 Tab 5A). While processing the quantitative data, 43, 31 and 31 SNPs, out of the 500 SNPs with the lowest p-values, belong to the largest QTL interval with Wilcoxon, PLINK and EMMA methods, respectively. Among these SNPs 4, 8 and 8 of them belong to the *rpv1* Cvi-1 x *Ler* interval (20,971,975 – 21,232,895) (Chap 2 Tab 5 B,C and D). Interestingly, among these SNPs, one of them at position 21,067,549bp of linkage group one appears to be the most significant SNP, as determined by both the EMMA and Plink methods (Chap 2 Tab 5 C and D). These SNPs in linkage disequilibrium with *rpv1* confirm the relevance of this locus in contributes to resistance to PPV infection after mechanical inoculation.

Moreover in the 500 most significant SNPs, we detected SNPs localized to *sha3* interval, using both quantitative and qualitative methods, thereby, confirming of the results of from the MAGIC lines. (Chap 2 Tab 5 A, B, C and D).

¹ The full dataset of the 500 first SNP sis presented in the annex of the PhD manuscript

IV.7. Effect of the parental alleles on the resistance to PPV infection

The study of the effect of each parental allele over the 19,477,618-22,181,333 interval showed that the resistance to PPV infection in the JEA x Col-0 population is derived from the Col-0 accession. As we showed before, Col-0 appears to be partially resistant to PPV, similarly to Cvi-1 which is carrying *rpv1* resistant allele (Sicard et al., 2008). Since both accessions are presenting a similar response when infected by PPV and because the JEA x Col-0 and the Cvi-1 x *Ler* loci are co-localizing, we suspect that both Col-0 and Cvi-1 share allelic variation at the same *rpv1* locus that determines partial resistance to PPV mechanical inoculation. By three different approaches we detected the same region involved in the PPV resistance. In both recombinant and multiparental lines we linked this resistant phenotype to Col-0. More intriguing is that in an unrelated recombinant population (Cvi-1 x *Ler*) a resistant allele for *rpv1* is co-localizing with our major QTL. In order to see if Col-0 displays the resistant allele of *rpv1*, we crossed Col-0 with a near isogenic line, resistant to PPV infection, introducing the *rpv1* genomic region of Cvi-1 in a *Ler* background namely LCN1.18 (See Chap 2 Fig 2). The corresponding F1 progeny was mechanically challenged with PPV and all of them appear to be resistant (negative by ELISA), confirming that *rpv1* is allelic in both accessions.

IV.8. One potential candidate

Ongoing studies in the Watermelon Mosaic Virus (WMV) – *Arabidopsis thaliana* pathosystem, have identified in Cvi-1 a recessive resistance gene (*rwml*) that maps to the long distal region of linkage group 1 (Ouibrahim et al., unpublished) co-localizing with the *rpv1* locus. Using the same approach as above for the fine-mapping of *rpv1*, the interval was reduced to just over 200 kb and a candidate gene approach identified a chloroplast phosphoglycerate kinase (CPGK) involved in WMV resistance. Similarly to Ouibrahim et al., (unpublished), we used a TRV-based VIGS system to generate specific gene-knockdown

plants to investigate the importance of this host factor in PPV accumulation in *Nicotiana benthamiana*. Two constructs were used to knockdown the chloroplast PGK, the 5' and 3' targeting regions designated PGK-5 and PGK-3 and a phytoene desaturase (PDS) gene construct was used as the knockdown control. Twelve days after infiltration, *Nicotiana benthamiana* were challenged with PPV. Six days later we sampled the leaves and extracted total RNA. Real-time PCR results showed that the levels of the chloroplast PGK mRNA in the PGK-5 and PGK-3 knockdown plants were reduced about 90% with both constructs. In the same plant we observed that viral accumulation of PPV was reduced about 90% for PGK-3 and 40% for PGK-5. Taken together, these results suggested that the chloroplast PGK is required for efficient PPV accumulation.

V. Discussion

In this study, we report the identification in *Arabidopsis* of one genomic region associated with partial resistance to PPV. In order to fine map the host determinant, we combined linkage mapping in RIL and NIL populations with genome wide association mapping. Each of the bi- and multi-parental linkage mapping experiments detected a major and recurrent locus that was previously mapped by Sicard et al., (2008) and named *rpv1*. Allele(s) which determine this partial resistance trait were evident both in the Cvi-1 and Col-0 accessions. Allelism tests indicated that restriction of PPV infection in these two accessions was controlled by the same gene, within the *rpv1* locus. However, we cannot rule out the possibility that the mutations affecting the *rpv1* locus are different in both accessions.

Indeed, a recent study in the Watermelon Mosaic Virus (WMV) – *Arabidopsis thaliana* pathosystem identified *rwm1*, a recessive resistant gene in Cvi-0, co-localizing with *rpv1*. Interestingly, the same locus appears to be involved in recessive resistance to PPV and WMV. In both cases, the resistance trait is associated with mechanical inoculation. In fact, WMV or PPV inoculation using an insect vector or *Agrobacterium*, respectively, leads, in every case, to

breaking of resistance (Ouibrahim et al., unpublished; Decroocq et al., unpublished data). In Cvi-0, *rwm1* determines total, recessive resistance to WMV, with incomplete penetrance (5% of plants are infected). This incomplete penetrance is speculated to be an environmental effect, in particular light exposure during inoculation of the plants (Ouibrahim et al., unpublished). In the case of *rpv1*, incomplete penetrance can attain a level of 30% of the plants being infected. In our case, the different populations were tested at the same period of the year and in the same environmental conditions (e.g. particular greenhouse, time of the day inoculation time and others). According to (Lecoq et al., 2004), partial resistance could be based on the tendency to escape infection, and may be characterized as a lower probability of infection than that of susceptible plants, using the same level of inoculum. Thus, we consider *rpv1* as a locus controlling partial resistance to PPV infection.

The term “partial resistance” and its various interpretations are widely used in plant/pathogen genetics, in particular in describing plant/virus interactions. In most of the cases, it has been associated with quantitative resistance and described as a reduction of disease incidence, rather than the absence of disease (Marcel et al., 2008; Lu et al., 2012). It can be attributed to a lower viral multiplication or accumulation. In this case, the virus may infect systemically the host plant but remains at a low concentration in the plant tissues (Caranta et al., 1997; García-Cano et al., 2010). Some authors refer to partial resistance when viruses are restricted to specific tissues or to specific stages of the host plant development (Headrick, 1987; Broers, 1989; Qi et al., 1998). Finally, others describe partial resistance as an absence of symptoms despite a normal viral accumulation in systemic tissues.

In our case, partial resistance to PPV infection in Cvi-1 and Col-0 is characterized by the tendency to escape infection. This could be explained by a weaker interaction between host factor(s) and viral proteins. Among potential candidate genes present in the restricted *rwm1* interval, Ouibrahim et al., (submitted) identified a chloroplast phosphoglycerate kinase

(cPGK2). By studying sequences of this gene in Cvi-0 and *Ler* accession, they discovered one non-synonymous mutation (S78G) in Cvi-0. By sequencing, we observed the presence of the same mutation in cPGK2 of Cvi-1 (data not shown). Ouibrahim et al., (submitted) hypothesized that this mutation could be responsible for *rwm1* recessive resistance to WMV infection. Moreover, they demonstrated by using a TRV-based virus induced gene silencing system on *Nicotiana benthamiana* that *rwm1* resistance was indeed correlated with the reduction of the AT1G56190 cPGK2 transcripts. We used the same approach to reduce cPGK2 accumulation in PPV infected *Nicotiana benthamiana* and thus demonstrated that the level of expression of the *cPGK2* gene significantly impacts the outcome of PPV infection. Therefore, we postulate that *RPV1* is a functional *cPGK2* gene, in PPV susceptible accessions such as *Ler*. Partial resistance in the Cvi-1 accession can be potentially explained by a weaker interaction between Cvi-cPGK2 and PPV viral protein(s), because of the S78G mutation in the Cvi-1 allele. However, Col-0 does not display nucleotide variation in comparison with the fully susceptible accession, *Ler*. This result adds some complexity to the resistance mechanism since it appears that *rpv1* resistance in Col-0 might occur at another level.

In Arabidopsis, there are three different phosphoglycerate kinases (PGK), two of them are chloroplastic (cPGK1, At3G12780 and cPGK2, At1G56190) and the third one is cytoplasmic (PGK3, At1G79550). Analysis of the transcriptomic database using genevestigator online software (www.genevestigator.com) shows that all three PGK genes are constitutively expressed in Col-0 during developmental stages and their transcripts are present in inflorescences, leaves and roots. Besides, in wheat and tobacco, *cPGK* transcripts seem to be modulated by illumination and a significant increase of *cPGK* mRNA was detected after extended light exposure (Raines et al., 1991; Bringloe et al., 1996). The Diurnal database (<http://diurnal.mocklerlab.org/>) that gave access to the diurnal and circadian expression of several genes in Arabidopsis shows that *cPGK2* regulation is positive during the day period

and negative during night period. In consequence, despite its constitutive expression, *cPGK2* transcript accumulation seems to be regulated by light exposure whether the accession is susceptible or not to PPV infection.

We postulated that the differential infection response to viral mechanical inoculation in Col-0 and *Ler* could be linked either to a de-regulation in *cPGK2* expression or a differential post-translational modification/s. In support of the first hypothesis, in the complete Arabidopsis transcriptome data base (CATdb) the *cPGK2* transcript level was not significantly different between *Ler* PPV-infected and mock inoculated plants (<http://urgv.evry.inra.fr/cgi-bin/projects/CATdb/catdb-projects.pl>). However, in contrast Babu et al., (2008) showed an induction in *cPGK2* expression, not a down-regulation, in Col-0 leaf tissues 17 days post inoculation.

In the case of the second hypothesis, a large-scale Arabidopsis phosphoproteome profiling revealed a phosphorylation on Serine 78 of cPGK1 (Reiland et al., 2009). Moreover, three lysine-acetylated sites were identified on cPGK1 and cPGK2. Acetylation of one or several of these sites down regulated cPGK activity (Finkemeier et al., 2011). Thus from these results, we suggest that a differential post-translational modification in the Col-0 cPGK2 in comparison to *Ler* (partially) inactivates this host factor leading to partial resistance to PPV infection.

Moreover, polygenic effects seem to play an important role in the control of partial resistance to viral infection (Caranta et al., 1997). Sicard et al., (2008) hypothesized that the resistance trait in the Cvi-1 x *Ler* population exhibits a digenic, recessive inheritance; one allele (*rpv1*) is provided by Cvi-1 while the other comes from *Ler* (*rpv3*). As we demonstrate in the case of the JEA x Col-0 population as well as the multiparental recombinant lines, only the *rpv1* locus was detected. Therefore, either Col-0 and JEA possibly share similar alleles at the *rpv3* locus or the effect of the *rpv3* locus is too low to be detected.

In this report, mechanical inoculation of a set of *Arabidopsis* accessions allowed us to identify a partial recessive resistance mechanism controlled by a single locus, *rpv1*. Recently, we challenged the same set of multiparental recombinant lines with the same isolate (PPV-R) and 147 *Arabidopsis* accessions but this time, by agro-inoculation (Pagny et al., 2012). We identified loci controlling PPV systemic movement in the host plant but no *rpv1* locus was detected. Indeed, the *rpv1*-controlled recessive resistance appears to be overcome both by agro-inoculation and biolistics. This phenomenon can be explained either by an over-load of PPV inoculum when inoculating by *Agrobacterium* or biolistics, or the biological form of the virus when delivered: an encapsidated virion when transferred mechanically, in contrast to purified DNA molecules when agro-inoculating or shooting. Decapsidation is a crucial step in the early stages of viral infection. It is commonly accepted that removal of the coat protein is tightly coupled with the initial steps of viral translation as it has been described for the tobacco mosaic virus (TMV) (Saunal et al., 1993). Thus, we hypothesize that the cPGK2 host factor is essential in the transition between decapsidation and viral translation.

On the contrary, we can also assume that the use of a more effective inoculation method such as agro-inoculation or higher level of viral particles transferred to the host cell allows the virus to overcome the *rpv1* resistance mechanism. This has been observed previously for the Cauliflower Mosaic Virus (Callaway, 1996) and the *Plantago Asiatica Mosaic Potexvirus* (Yamaji et al., 2012) but in both cases, the resistance is dominant, not recessive. Moreover, *rwm1*-mediated resistance is also overcome by aphid inoculation (Ouibrahim and Caranta, personal communication) which over-rides the hypothesis of resistance breaking because of the application of a higher inoculum pressure.

Ultimately, this linkage and association mapping study identified a recessive resistant locus named *rpv1*. This locus was delimited to a 200kb interval on the first chromosome of *Arabidopsis*. In the VIGS experiment, the cPGK2 host factor was shown to be required for

efficient PPV accumulation. Results derived from real-time PCR indicated that the reduction of chloroplast PGK transcript correlates with reduced accumulation of PPV. Most of the studies on recessive resistance published to date describe alleles of genes encoding the translation initiation factors (Truniger and Aranda, 2009) as mediators of virus resistance. The present report describes a PPV recessive resistance mechanism potentially involving a chloroplast phosphoglycerate kinase. The identification of a new PPV resistance mechanism, distinct of the translation initiation complex, is important for developing novel strategies for resistance gene pyramiding in stone fruit crop species.

Acknowledgements

This work was supported by the SharCo FP7 Small Collaborative Project No 204429, by grants from the EPR Aquitaine (nos 20091201003) and INRA divisions of Plant Breeding. We are grateful to T. Mauduit and A. Bailly for plant production. Special thanks are given to S. Decroocq for advice in the statistical analysis. Grateful thanks to Pr. A.G. Abbott (Clemson Univ) for critical reading of the manuscript. Author contributions: V.D. and SP conceived and designed the experiments; G.P., V.D. and S.P. performed the experiments; P.C., G.P., P.P. and V.D. developed molecular markers and mapping tools; J.P.E. and A.C. contributed reagents/material/ELISA analysis; V.D., and S.P. performed the QTL analysis; S.M. analyzed the data for association mapping and from multiparental lines; LO and CC developed VIGS constructions. V.D. and S.P. wrote the paper.

References

- Atwell S, Huang YS, Vilhjálmsson BJ, Willems G, Horton M, Li Y, Meng D, Platt A, Tarone AM, Hu TT, et al** (2010) Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines. *Nature* **465**: 627–631
- Babu M, Griffiths J, Huang T-S, Wang A** (2008) Altered gene expression changes in *Arabidopsis* leaf tissues and protoplasts in response to Plum pox virus infection. *BMC Genomics* **9**: 325
- Barloy D, Etienne C, Lemoine J, Saint Ouen Y, Jahier J, Banks PM, Trottet M** (2003) Comparison of TAF46 and Zhong 5 resistances to barley yellow dwarf virus from *Thinopyrum intermedium* in wheat. *Euphytica* **129**: 361–369
- Bringloe DH, Rao SK, Dyer TA, Raines CA, Bradbeer JW** (1996) Differential gene expression of chloroplast and cytosolic phosphoglycerate kinase in tobacco. *Plant Molecular Biology* **30**: 637–640
- Broers LHM** (1989) Influence of development stage and host genotype on three components of partial resistance to leaf rust in spring wheat. *Euphytica* **44**: 187–195
- Browning KS** (1996) The plant translational apparatus. *Plant Molecular Biology* **32**: 107–144
- Callaway A** (1996) Characterization of Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) Resistance in Virus-Resistant Ecotypes of *Arabidopsis*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **9**: 810
- Cambra M, Capote N, Myrta A, Llacer G** (2006) Plum pox virus and the estimated costs associated with sharka disease. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **36**:
- Caranta C, Palloix A, Lefebvre V, Daubèze AM** (1997) QTLs for a component of partial resistance to cucumber mosaic virus in pepper: restriction of virus installation in host-cells. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **94**: 431–438
- Carr T, Whitham SA** (2007) An emerging model system: *Arabidopsis* as a viral host plant. Department of Plant Pathology, Iowa State University, 351 Bessey Hall, Ames, IA 50011-1020, USA.
- Decroocq V, Favé MG, Hagen L, Bordenave L, Decroocq S** (2003) Development and transferability of apricot and grape EST microsatellite markers across taxa. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **106**: 912–922
- Decroocq V, Sicard O, Alamillo JM, Lansac M, Eyquard JP, García JA, Candresse T, Le Gall O, Revers F** (2006) Multiple resistance traits control Plum pox virus infection in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 541–549
- Fernandez-Fernandez MR, Mourino M, Rivera J, Rodriguez F, Plana-Duran J, Garcia JA** (2001) Protection of rabbits against rabbit hemorrhagic disease virus by immunization with the VP60 protein expressed in plants with a potyvirus-based vector. *Virology* **280**: 283–291

- Finkemeier I, Laxa M, Miguet L, Howden AJM, Sweetlove LJ** (2011) Proteins of Diverse Function and Subcellular Location Are Lysine Acetylated in Arabidopsis. *Plant Physiol* **155**: 1779–1790
- Fraser R** (1990) The Genetics of Resistance to Plant-Viruses. *Annu Rev Phytopathol* **28**: 179–200
- García-Cano E, Navas-Castillo J, Moriones E, Fernández-Muñoz R** (2010) Resistance to Tomato chlorosis virus in Wild Tomato Species that Impair Virus Accumulation and Disease Symptom Expression. *Phytopathology* **100**: 582–592
- Headrick JM** (1987) Expression of Partial Resistance to Common Rust in Sweet Corn Hybrids at Various Host Growth Stages. *Phytopathology* **77**: 454
- Jahier J, Chain F, Barloy D, Tanguy A-M, Lemoine J, Riault G, Margalé E, Trottet M, Jacquot E** (2009) Effect of combining two genes for partial resistance to Barley yellow dwarf virus-PAV (BYDV-PAV) derived from *Thinopyrum intermedium* in wheat. *Plant Pathology* **58**: 807–814
- Kawaguchi R, Bailey-Serres J** (2002) Regulation of translational initiation in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 460–465
- Keurentjes JJB, Bentsink L, Alonso-Blanco C, Hanhart CJ, Vries HB-D, Effgen S, Vreugdenhil D, Koornneef M** (2007) Development of a Near-Isogenic Line Population of *Arabidopsis thaliana* and Comparison of Mapping Power With a Recombinant Inbred Line Population. *Genetics* **175**: 891–905
- Kover PX, Valdar W, Trakalo J, Scarcelli N, Ehrenreich IM, Purugganan MD, Durrant C, Mott R** (2009) A Multiparent Advanced Generation Inter-Cross to fine-map quantitative traits in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* **5**: e1000551
- Lecoq H, Moury B, Desbiez C, Palloix A, Pitrat M** (2004) Durable virus resistance in plants through conventional approaches: a challenge. *Virus Research* **100**: 31–39
- Lin J-W, Ding M-P, Hsu Y-H, Tsai C-H** (2007) Chloroplast phosphoglycerate kinase, a gluconeogenic enzyme, is required for efficient accumulation of Bamboo mosaic virus. *Nucleic Acids Res* **35**: 424–432
- Lu Q, Bjørnstad Å, Ren Y, Asad M, Xia X, Chen X, Ji F, Shi J, Lillemo M** (2012) Partial resistance to powdery mildew in German spring wheat “Naxos” is based on multiple genes with stable effects in diverse environments. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **125**: 297–309
- Marcel TC, Gorguet B, Ta MT, Kohutova Z, Vels A, Niks RE** (2008) Isolate specificity of quantitative trait loci for partial resistance of barley to *Puccinia hordei* confirmed in mapping populations and near-isogenic lines. *New Phytol* **177**: 743–755
- Ogino T, Iwama M, Kinouchi J, Shibagaki Y, Tsukamoto T, Mizumoto K** (1999) Involvement of a Cellular Glycolytic Enzyme, Phosphoglycerate Kinase, in Sendai Virus Transcription. *J Biol Chem* **274**: 35999–36008

- Ooijen JW, Boer MP, Jansen RC, Maliepaard C** (1996) MapQTL 4.0: software for the calculation of QTL positions on genetic maps (user manual).
- Van Ooijen JW, Voorrips RE** (2001) JoinMap® 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, The Netherlands 1–51
- Ouibrahim L, Mazier M, Estevan J, Lecoq H, Desbiez C, Pagny G, Decroocq V, Moretti A, Caranta C** (unpublished) The Chloroplast phosphoglycerate kinase is a candidate gene for *rwml*-mediated resistance to Watermelon mosaic potyvirus in *Arabidopsis*. Plant Physiology
- Pagny G, Paulstephenraj PS, Poque S, Sicard O, Cosson P, Eyquard J-P, Caballero M, Chague A, Gourdon G, Negrel L, et al** (2012) Family-based linkage and association mapping reveals novel genes affecting Plum pox virus infection in *Arabidopsis thaliana*. New Phytologist
- Paux E, Faure S, Choulet F, Roger D, Gauthier V, Martinant J-P, Sourdille P, Balfourier F, Le Paslier M-C, Chauveau A, et al** (2010) Insertion site-based polymorphism markers open new perspectives for genome saturation and marker-assisted selection in wheat. Plant Biotechnology Journal **8**: 196–210
- Popanda O, Fox G, Thielmann HW** (1998) Modulation of DNA polymerases α , δ and ϵ by lactate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression **1397**: 102–117
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, Maller J, Sklar P, Bakker PIW de, Daly MJ, et al** (2007) PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. The American Journal of Human Genetics **81**: 559–575
- Qi X, Niks RE, Stam P, Lindhout P** (1998) Identification of QTLs for partial resistance to leaf rust (*Puccinia hordei*) in barley. TAG Theoretical and Applied Genetics **96**: 1205–1215
- Raines CA, Lloyd JC, Dyer TA** (1991) Molecular biology of the C3 photosynthetic carbon reduction cycle. Photosynthesis Research **27**: 1–14
- Reiland S, Messerli G, Baerenfaller K, Gerrits B, Endler A, Grossmann J, Gruissem W, Baginsky S** (2009) Large-Scale Arabidopsis Phosphoproteome Profiling Reveals Novel Chloroplast Kinase Substrates and Phosphorylation Networks. Plant Physiol **150**: 889–903
- Riechmann J, Lain S, Garcia J** (1990) Infectious In vitro Transcripts from a Plum Pox Potyvirus Cdna Clone. Virology **177**: 710–716
- Rotenberg D, Thompson TS, German TL, Willis DK** (2006) Methods for effective real-time RT-PCR analysis of virus-induced gene silencing. Journal of Virological Methods **138**: 49–59

- Saunal H, Witz J, Regenmortel MHVV** (1993) Inhibition of in vitro Cotranslational Disassembly of Tobacco Mosaic Virus by Monoclonal Antibodies to the Viral Coat Protein. *J Gen Virol* **74**: 897–900
- Sicard O, Loudet O, Keurentjes JJB, Candresse T, Le Gall O, Revers F, Decroocq V** (2008) Identification of quantitative trait loci controlling symptom development during viral infection in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 198–207
- Simon M, Loudet O, Durand S, Bérard A, Brunel D, Sennesal F-X, Durand-Tardif M, Pelletier G, Camilleri C** (2008) Quantitative trait loci mapping in five new large recombinant inbred line populations of *Arabidopsis thaliana* genotyped with consensus single-nucleotide polymorphism markers. *Genetics* **178**: 2253–2264
- Truniger V, Aranda MA** (2009) Recessive resistance to plant viruses. *Adv Virus Res* **75**: 119–159
- Watson HC, Littlechild JA** (1990) Isoenzymes of phosphoglycerate kinase: evolutionary conservation of the structure of this glycolytic enzyme. *Biochem Soc Trans* **18**: 187–190
- Yamaji Y, Maejima K, Komatsu K, Shiraishi T, Okano Y, Himeno M, Sugawara K, Neriya Y, Minato N, Miura C, et al** (2012) Lectin-Mediated Resistance Impairs Plant Virus Infection at the Cellular Level. *Plant Cell* **24**: 778–793

Tables and Figures

Chap 2 Tab 1. Primers use to fine map *rpv1* in LCN near isogenic lines and JEA x Col-0 RIL population

Name	Position in bp*	Type	Forward	Reverse	Tm
RPVm2 / CIW1	18367546	SSR	ACATTTTCTCAATCCTTACTC	GAGAGCTTCTTTATTTGTGAT	55°C
F6D8-SSLP1	19624423	SSLP	TTTCGGGTGATTAGTACGGA	ATTGACTCCGTCTTCCAGA	55°C
F12M16-SSR1	19840749	SSR	AAAAACCTTCCGTGAGAGTGC	GAGAAGACGATTATGGTGATGAT	55°C
F12M16-SSR2	19860943	SSR	TCACGGCCCATTAAGTGTCT	TTTCTCAAACGCGAAAGCC	55°C
T18A20-SSLP1	20075679	SSLP	TTCGTAATGAAATGAAGTGAAGC	CCATTGACCAAGTTATCATTTATG	55°C
F20D21-SSR2	20255382	SSR	TCCTTAACCGATGTAATGTCCA	TCTTCTGGTGTCTTGGTACG	55°C
F14C21-SSR2	20510667	SSR	AGAGTTGACAAGCAAAGGGA	CAAAACGTGATCATCTTCA	55°C
NGA-128	20633249	SSR	GGTCTGTTGATGTCGTAAGTCG	ATCTTGAAACCTTTAGGGAGGG	55°C
F20N2-SSR1	20777881	SSR	CGAGTCCAGAGCAGCAAC	CTTTTCCACTGTGAACGAAGA	55°C
NGA-280	20877363	SSR	GGCTCCATAAAAAGTGCA	CTGATCTCAGGACAATAGTGC	55°C
F14J16-SSR2	20933254	SSR	TTACCTTGATTGAGAGTTCCG	CTCCTTCATATCTTCTTTTCCACT	55°C
T6H22-SSR2	20966441	SSR	ACATGAATGGGTATTATC	CAAGAACAATGAGAGCGA	55°C
T6H22-SNP1	20971975	SNP	TATCAGCCACCAAACTGAAGCC	CAGGTTATCCCCACAGCCAGAA	58°C
T6H22-SSR1	20983250	SSR	GTTTCATCTCTCCACGTCC	TTGGGTTTCCATAAACTCTCA	55°C
F14G9-SNP3	21094499	SNP	GGAAAGACATAGAGTTCTGGTFC	GCCCAAGGTTTGTGGTT	58°C
ISBP-16	21232619	ISBP	CCGACAACCTTCTAAGCTCCG	GCTTCACTCCCTAGCCAA	60°C
F25P12-SNP2	21253016	SNP	CTCAACTTCACAAAGTCAACACTG	GGCAGATATCAATCTTAGTAAGAT	53°C
F25P12-SNP1	21318292	SNP	AAGTGTCCGGTACACGCTTC	TATCCGCAAAAGTTTGAACC	53°C
T8L23-SSR	21324252	SSR	TGTAGCATATTCCTCTGACTGG	GGAATCAAAACCAACGACCTA	55°C
T8L23-SNP2	21379240	SNP	TAAGCTGCATGAATCTTTCCACTG	GGATCCTCTGTCTTGTCTG	53°C
F12K22-SSR1	21428414	SSR	CAAGCATGCATATATTATTGTAA	AATTTGTCTAGTTTTCAGGGATGT	55°C
T15M6-SSR1	21541832	SSR	ATCAAATTCATCACAGAACTCTT	GAGAAGGTAACATAATCCAAACA	55°C
F16M22-SSR2	21605239	SSR	GCAAGGTTTGGAAAGTGTGA	CGATGGTCGATGGGTTTAGG	55°C
RCVI-23	22015943	SSLP	CGTTAAATCCAAAAGCTGTGT	AACAAGAAGCACCATTGACAG	55°C
RCVI-1	22255648	SSR	ATTTAAATGCATGGAGAATAGAAG	AGGAAGCTAGTTCTAACGACATCT	55°C
RCVI-37	22472690	SSR	TTCCGATCAAAGGAACGC	TTCTGACTTAGATAGTGGTATGG	55°C

*: Base pair

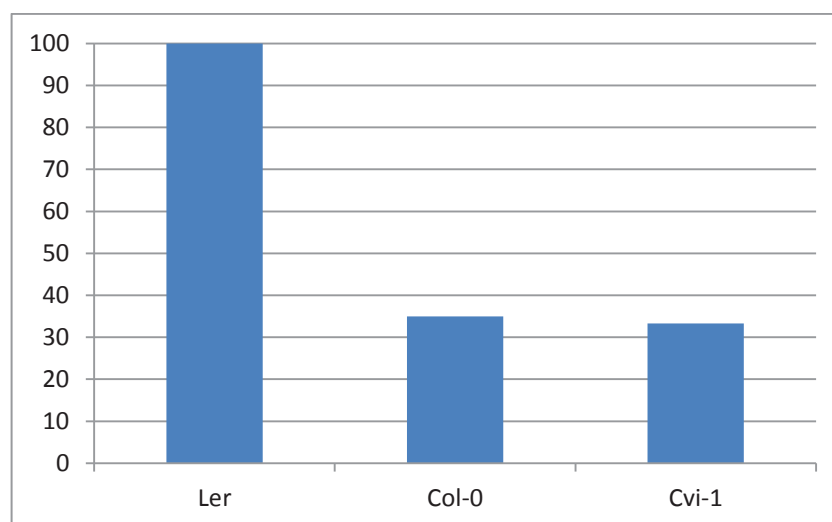
Chap 2 Tab 2. Phenotype of JEA, Col-0 and Cvi-1 when mechanically inoculated with the pICPPVnkGFP infectious clone

Accessions	Inoculation method	Strain	Individual	Results		
				Infected [¶]	Non-infected	Ratio*
Col	Mechanical	pICPPVnkGFP	40	14	26	35
JEA	Mechanical	pICPPVnkGFP	24	2	22	8,33
Cvi-1	Mechanical	pICPPVnkGFP	24	8	16	33,33
Flowering JEA	Mechanical	pICPPVnkGFP	24	10	14	41,66

[¶] Plants were scored as infected if ELISA assay on upper tissues were positives

* Percent of PPV infected plants for each accession

Chap 2 Fig 1. Graphical representation of susceptibility in *Ler*, Col-0 and Cvi-1 accessions



This histogram represent the percentage of infected plants (y axis) among susceptible (*Ler*) and partially resistant (Col-0, Cvi-1) accessions (x axis)

Chap 2 Tab 3. Identification of Arabidopsis genomic regions controlling restriction of PPV infection in bi- and multi-parental populations

A

Bi- parental progenies	Type of population / Nb of RILs	Nb Markers †	Parental phenotypes		Predicted locus location						R ²
			Parents 1	Parents 2	linkage group	Resistant parental allele	Marker interval	Interval in bp	Maximum LOD (IM) ‡,*	P-Value (KW) ‡,*	
JEAxCol-0	RIL F8 / 188 ¹	87	S	R	LG1	Col-0	c1_19478 / c1_23381	19,477,618 – 23,381,469	15,99	65,48	33,10%
JEAxCol-0	RIL F8 / 120 ¹	87	S	R	LG1	Col-0	c1_19478 / c1_23381	19,477,618 – 23,381,469	12,5	45,431	38,90%
JEAxCol-0	RIL F8 / 250 ¹	97	S	R	LG1	Col-0	F6D8-SSLP1 / RCVI-32	19,624,624 - 22,181,333	21,78	81,865	34%

¹ In four repeats for the JEA x Col-0 RILs population and triplicate for the MAGIC lines.

† Number of markers used to build the core genetic map (SSR or SNP) (Simon et al., 2008).

‡ Detected by Interval Mapping (IM) or Krustal Wallis (KW).

* Significant after 1,000 permutations and at 95% statistical confidence.

B

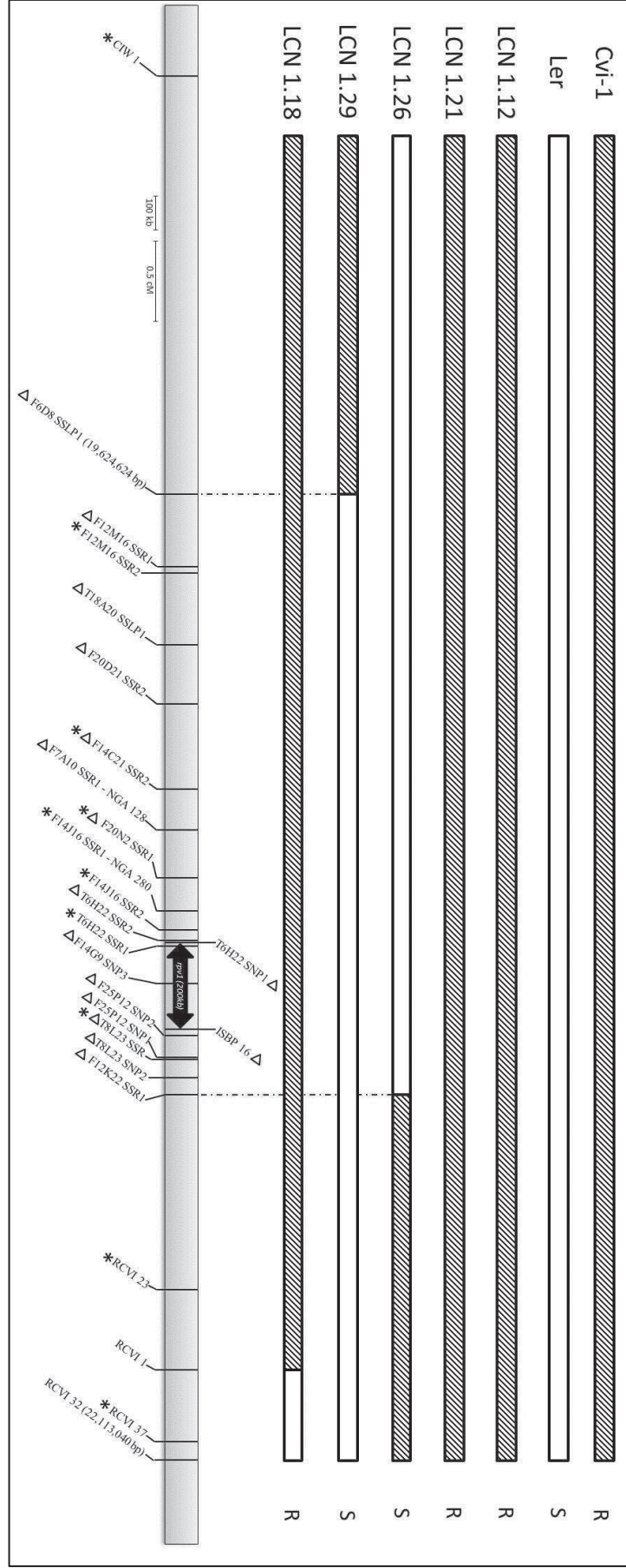
Multiparental progeny	Type of population / Nb of RILs	Set of markers used for the analysis †	Linkage group	Peak in Bp	Peak SNP	Interval in Bp	LogP	Genome-wide P-Value
MAGIC	RIL / 435 ¹	1,260 SNPs	LG1	21665899	MN1_21669564	19,515,673 - 22,286,231	5,80	0.002

¹ LogP is equivalent to the -log10(p-value).

nd: not determined.

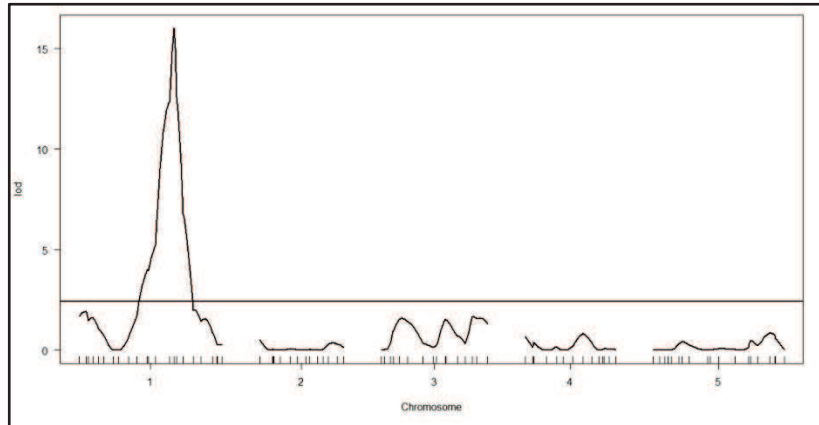
Bp: base pairs, Maximum LOD: score associated with the peak of the LOD plot using Map QTL, R2: Proportion of the phenotypic variation explained by the peak of the LOD plot using multiple QTL mapping (explained variance).

Chap 2 Fig 2. Schematic representation of near-isogenic lines (NILs) and makers used to fine map *rpv1*

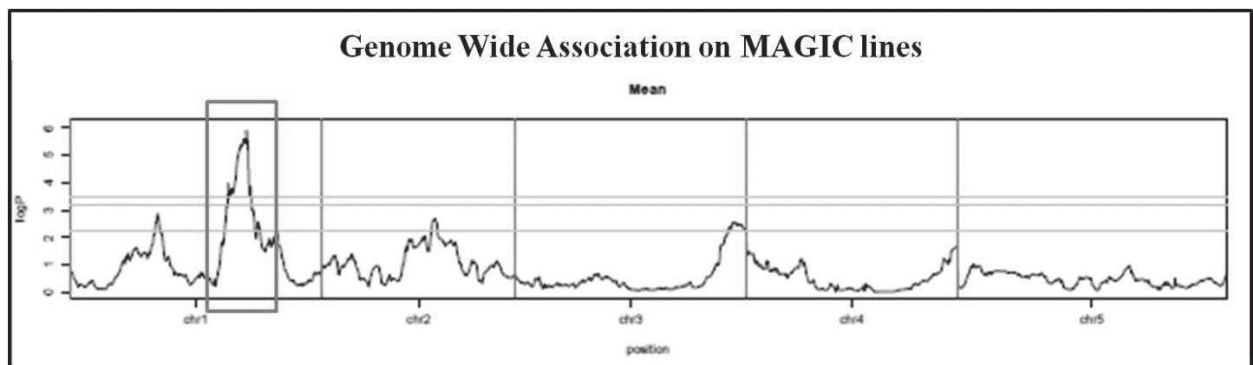


Δ Markers used to fine map *rpv1* in Near-isogenic lines

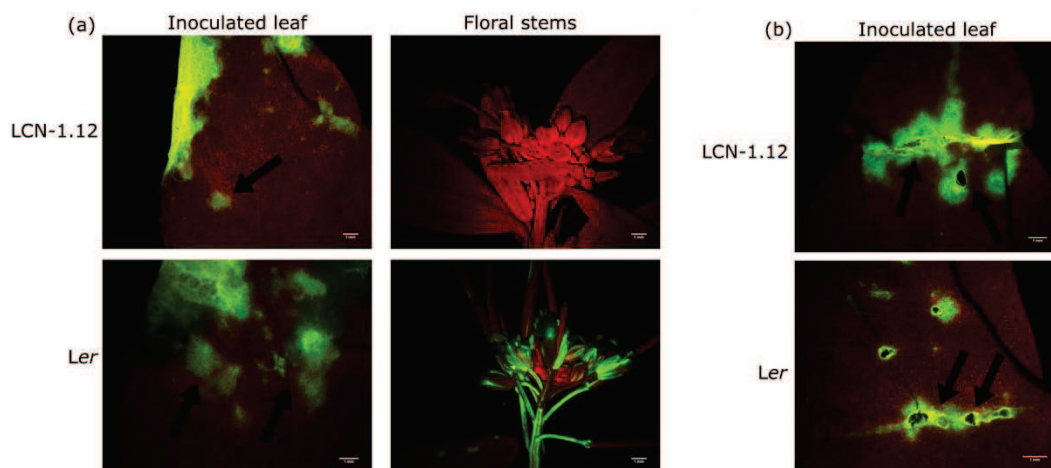
* Markers used to improved linkage mapping in JEA x Col-0 Recombinant inbred lines



Chap 2 Fig 3. Linkage mapping of the recessive resistance to PPV in an F8 JEAxCol-0 RIL population
The y axis represents the LOD score obtained by interval mapping (IM) on the first set of 188RILs



Chap 2 Fig 4. GWAM of the resistance to PPV in the MAGIC population
The y axis represent $-\text{Log}_{10}(\text{P value})$ obtained for each SNP throughout the five Arabidopsis chromosomes. Chr: chromosome. The frame is highlighting the position of the *rpvl* locus.



Chap 2 Fig 5: Green fluorescence protein (GFP)-tagged Plum pox virus (PPV-R) behavior into inoculated leaves of *Ler* and a PPV-resistant LCN line (LCN-1.12)

Photographs under a UV stereomicroscope of GFP accumulation in *Ler* and LCN 1.12, inoculated (first column) and systemic tissues (second column) after mechanical inoculation with pICPPVnkGFP (a) and inoculated leaf after agro-inoculation with pBINPPVnkGFP (b)

Black arrows point out inoculation area

Chap 2 Tab 4. Arabidopsis accessions genotyped with the full 250K SNPs data set and challenged with PPV by mechanical inoculation

ID NASC	Accession	ID NASC	Accession	ID NASC	Accession
N1007	Bu-0	N22586	Ull2-5	N22637	Wt-5
N1031	Blh-1	N22587	Ull2-3	N22639	Ct-1
N1065	Can-0	N22588	Zdr-1	N22640	Mr-0
N1067	Cen-0	N22589	Zdr-6	N22641	Tsu-1
N1137	En-1	N22590	Bor-1	N22642	Mt-0
N1185	Gd-1	N22591	Bor-4	N22643	Nok-3
N1187	Ge-0	N22592	Pu2-7	N22644	Wa-1
N1199	Gr-1	N22593	Pu2-23	N22645	Fei-0
N1227	Hi-0	N22594	Lp2-2	N22646	Se-0
N1237	Hs-0	N22595	Lp2-6	N22647	Ts-1
N1239	In-0	N22596	HR-5	N22648	Ts-5
N1259	Jm-0	N22597	HR-10	N22649	Pro-0
N1307	Lc-0	N22598	NFA-8	N22651	Kondara
N1337	Lip-0	N22599	NFA-10	N22652	Sha
N1345	Lm-2	N22600	Sq-1	N22653	Sorbo
N1353	Lu-1	N22601	Sq-8	N22654	Kin-0
N1379	Mir-0	N22602	CIBC-5	N22656	Bur-0
N1385	Na-1	N22603	CIBC-17	N22658	Oy-0
N1431	Ost-0	N22604	Tamm-2	N22659	Ws-2
N1439	Pa-1	N22606	Kz-1	N3081	No-0
N1445	Per-1	N22607	Kz-9	N3180	Co
N1482	Rd-0	N22608	Got-7	N6002	PHW-2
N1485	Rak-2	N22609	Got-22	N6003	Köln
N1494	Rsch-4	N22610	Ren-1	N6033	Lisse
N1507	Sap-0	N22611	Ren-11	N6041	Kelsterbach-4
N1515	Sav-0	N22612	Uod-1	N6187	Seattle-0
N1535	St-0	N22613	Uod-7	N6600	Aa-0
N1539	Stw-0	N22614	Cvi-0	N6607	Ba-1
N1549	Ta-0	N22615	Lz-0	N6658	Ca-0
N1567	Tu-0	N22616	Ei-2	N6676	Da-0
N1656	Alc-0	N22617	Gu-0	N6697	Ep-0
N22342	Bg-2	N22618	Ler-1	N6720	Gie-0
N22449	Pu2-8 (3-8)	N22619	Nd-1	N6733	Ha-0
N22491	N13	N22620	C24	N6751	Kas-2
N22564	RRS-7	N22622	Wei-0	N6778	Li-7
N22565	RRS-10	N22623	Ws-0	N6792	Mh-0
N22566	Kno-10	N22624	Yo-0	N6822	Or-0
N22567	Kno-18	N22625	Col-0	N6842	Pog-0
N22568	Rmx-A02	N22626	An-1	N6864	Ste-0
N22569	Rmx-A 180	N22627	Van-0	N6903	Zu-1
N22570	Pna-17	N22628	Br-0	N6921	Cnt-1
N22571	Pna-10	N22629	Est-1	N8067	Buckhorn Pass
N22573	Eden-2	N22630	Ag-0	N8143	WAR
N22574	Löv-1	N22631	Gy-0	N923	H55
N22575	Löv-5	N22632	Ra-0	N926	Petergof
N22576	Fáb-2	N22633	Bay-0	N927	Rubezhnoe-1
N22577	Fáb-4	N22634	Ga-0	N949	Ang-0
N22579	Bil-7	N22635	Mrk-0	N971	Bla-1
N22580	Vár2-1	N22636	Mz-0	N997	Bs-1

The experiment was repeated twice and in each experiment, all accessions were tested in four replicates, following a complete random 4-block procedure.

Chap 2 Tab 5. Most informative SNPs in the 500 top markers when testing genome wide association with restricted PPV systemic infection in Arabidopsis accessions

(A) Results of the mean binary data, after Fisher analysis

(B) Results of the quantitative data after Wilcoxon rank sum test

(C) Results of the quantitative data after PLINK method

(D) Results of the quantitative data after EMMA method.

(A)

SNP Rank	LG	Position	-log10
4	1	22961917	3,72
10	1	19562908	3,42
101*	1	21089285	2,62
149 ^o	3	21656578	2,48
200	1	22957819	2,39
201	1	22961382	2,39
202	1	22961993	2,39
211	1	19752811	2,37
212*	1	21041405	2,37
256	1	22956650	2,3
276	1	20000232	2,28
316	1	21362706	2,22
317	1	22960369	2,22
383	1	22442780	2,15
409	1	22953730	2,14
472	1	22961584	2,07

(B)

SNP Rank	LG	Position	-log10
13*	1	21067549	4,16
14	1	21365254	4,13
27	1	23315245	3,93
31	1	22332589	3,9
50	1	22358059	3,71
53	1	19550352	3,7
67	1	23270844	3,64
98 ^o	3	21603348	3,45
102	1	19581065	3,43
157	1	22190292	3,24
171	1	21271426	3,21
173*	1	21217366	3,19
180	1	22815589	3,18
183	1	23349817	3,17
185	1	20081964	3,17
187*	1	21187854	3,15
191	1	21270725	3,14
203	1	22887337	3,12
204	1	22232488	3,12
206 ^o	3	21613164	3,12
209	1	22190760	3,11
223	1	21515265	3,09
240	1	22684097	3,06
282	1	22282317	3
294	1	22333862	2,97
297	1	22367088	2,96
319	1	22407867	2,94
339 ^o	3	21614908	2,91
360	1	22887582	2,88
382	1	22690254	2,85
383	1	22784896	2,85
388	1	22284957	2,85
391	1	22886072	2,85
397	1	21669791	2,84
415	1	20081480	2,82
423	1	22869618	2,81
426	1	23224556	2,81
442*	1	21212550	2,79
446	1	19587888	2,79
452	1	23014444	2,78
457	1	23206403	2,77
462	1	23206520	2,77
472	1	23265950	2,76
485	1	22690950	2,74
496	1	22332460	2,73
499	1	23269125	2,73

(C)

SNP Rank	LG	Position	-log10
1*	1	21067549	6,6
20	1	23315245	4,41
38	1	21365254	4,01
46*	1	21210902	3,9
47*	1	21216992	3,9
54*	1	21187854	3,81
72	1	21856804	3,65
99	1	22282317	3,44
142	1	21270725	3,27
144*	1	21217366	3,26
145	1	22232488	3,26
159	1	21240024	3,22
164	1	21693546	3,2
195	1	23270844	3,15
203	1	22275176	3,14
207	1	22358059	3,13
211*	1	21212550	3,12
223	1	22281064	3,08
239	1	23206403	3,04
273	1	21237481	2,97
288	1	21381938	2,94
306	1	22190292	2,91
308	1	21271547	2,91
326*	1	21212104	2,88
337	1	20142834	2,87
360	1	21271426	2,84
369*	1	21179770	2,83
393	1	23265950	2,8
399 ^o	3	21614908	2,79
406	1	22190760	2,79
409	1	22745513	2,78
422	1	21856527	2,76

(D)

SNP Rank	LG	Position	0
1*	1	21067549	6,6
20	1	23315245	4,41
38	1	21365254	4,01
46*	1	21210902	3,9
47*	1	21216992	3,9
57*	1	21187854	3,81
73	1	21856804	3,65
101	1	22282317	3,44
143	1	21270725	3,27
145*	1	21217366	3,26
146	1	22232488	3,26
162	1	21240024	3,22
167	1	21693546	3,2
200	1	23270844	3,15
206	1	22275176	3,14
210	1	22358059	3,13
213*	1	21212550	3,12
226	1	22281064	3,08
243	1	23206403	3,04
282	1	21237481	2,97
296	1	21381938	2,94
317	1	22190292	2,91
319	1	21271547	2,91
338*	1	21212104	2,88
351	1	20142834	2,87
373	1	21271426	2,84
380*	1	21179770	2,83
401	1	23265950	2,8
408 ^o	3	21614908	2,79
415	1	22190760	2,79
418	1	22745513	2,78
434	1	21856527	2,76

SNPs belonging to the interval depicted in table 2 in the RIL population.

*: SNPs belonging to the *rpv1* interval

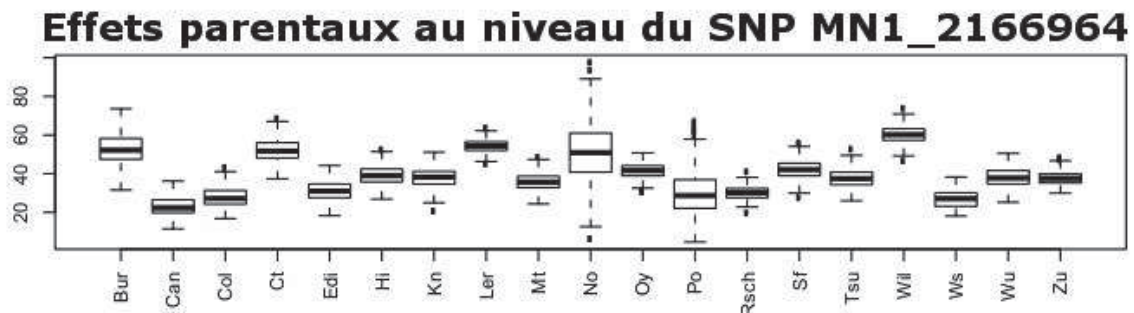
^o: SNPs belonging to the *sha3* interval

VI. Données complémentaires

L'inoculation mécanique des lignées multi-parentales MAGIC nous a permis, à l'aide d'une méthode de génétique d'association à l'échelle du génome entier de détecter le locus *rpv1* impliqué dans la résistance récessive au PPV lors d'inoculation mécanique (Chap 2). Or l'utilisation de cette même population, inoculée par *Agrobacterium*, avait également permis de mettre en avant un autre locus, distinct de *rpv1*, et cartographiant au bas du chromosome 3 (*sha3*: Chap 1; Pagny et al., 2012). Il apparaît donc que l'infection de plants d'*Arabidopsis* par le PPV requiert au moins deux facteurs fonctionnels de l'hôte, SHA3 et RPV1. Nous avons également montré que la résistance contrôlée par *rpv1* est contournée lors d'agro-inoculation (Chap 2 Fig 5) ce qui explique l'absence de détection de *rpv1* dans les lignées multi-parentales lors d'agro-inoculation (Pagny et al., 2012; Chap 1). Inversement, lors de l'inoculation mécanique des lignées parentales, seulement *rpv1* est détecté et non plus *sha3* (Chap 2). Nous avons également montré que RPV1 intervenait précocement dans le cycle viral, au niveau de la feuille inoculée (Chap 2 Fig 5), tandis que SHA3 est indispensable au mouvement longue distance du virus, au-delà des organes inoculés (Chap 1 Fig 1). Il convenait donc de vérifier si les deux mécanismes de résistance, liés à *rpv1* et *sha3*, existent, de manière concomitante, dans la population de lignées multi-parentales, mais un seul d'entre eux est détecté (*rpv1*) car intervenant en amont de la résistance associée à *sha3*. Nous avons donc opté pour l'analyse statistique de la résistance à l'infection par le PPV dans un sous-groupe de lignées multi-parentales qui ont la particularité de présenter toutes un allèle au locus *rpv1* lié à la sensibilité.

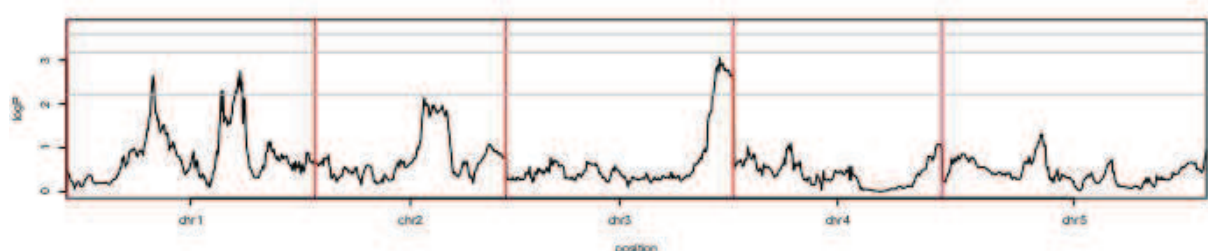
En effet, l'utilisation des lignées multi-parentales permet non seulement la détection de QTL, mais, de par leur structure très particulière, elles offrent la possibilité de déterminer à une position donnée, la contribution de chacun des 19 parents fondateurs sur le phénotype étudié. Le locus *rpv1*, précédemment identifié, cartographie entre les positions 19 515 673 bp

et 22 286 231 bp sur le bras long du chromosome 1, avec un pic maximal à 21 665 899bp correspondant au SNP MN1_21669564. Dans un premier temps nous avons donc recherché au niveau du SNP MN1_2166964 la contribution de chacun des parents sur l'accumulation virale (Chap 2 Fig S1)



Chap 2 Fig S1. Estimation des effets des accessions sur l'accumulation virale au niveau du SNP MN1_2166964

Cette étude a permis de déterminer que le génotype au SNP MN1_2166964 des accessions Can-0, Col-0, Po, Ws, Edi-0 et Rsch4 contribuent toutes au phénotype 'faible accumulation virale' et donc à la résistance liée au locus *rpv1*. Dans un second temps, nous avons identifié les lignées présentant dans l'intervalle complet de *rpv1* (19 515 673 - 22 286 231 bp) un génotype provenant de ces six accessions. Consécutivement, une nouvelle analyse a été réalisée après avoir retiré l'ensemble de ces lignées (84). Comme attendu le pic observé au niveau du locus *rpv1* a été fortement réduit (Chap 2 Fig S2) et, en contrepartie, nous avons observé un pic au bas du chromosome 3 correspondant à la région *sha3*.



Chap 2 Fig S2. Génétique d'association à l'échelle du génome complet d'Arabidopsis à partir de lignées multi-parentales ne présentant pas d'allèles associés à la résistance contrôlée par *rpv1*

La première analyse réalisée sur l'ensemble des 435 lignées multi-parentales n'avait pas permis de détecter de SNP significatifs dans la région de *sha3*. Après s'être affranchis (en partie) de l'effet de *rpv1* sur l'accumulation virale dans ces lignées, l'analyse menée, marqueur par marqueur a mis en évidence quatre SNPs significatifs appartenant à l'intervalle *sha3* : MN3_22146586, MN3_22230240, MN3_22316041 et NMSNP3_22617260. Cependant, il faut remarquer que lors de l'analyse à l'échelle du génome entier, ces marqueurs sont relativement peu significatifs (p-value comprises entre 0.12 et 0.19).

Au vu de ces résultats, il apparaît bien que l'infection locale et en systémie par le PPV de la population de lignées multi-parentales requiert successivement deux facteurs distincts : RPV1 et SHA3. Le premier intervient précocement dans le cycle viral tandis que le second est essentiel au mouvement à longue distance du virus. Rien ne semble indiquer de relation d'épistasie entre les gènes codants pour ces facteurs de l'hôte et nous pouvons donc penser que ces deux mécanismes de restriction de l'infection par le PPV chez *Arabidopsis* sont indépendants.

Chapitre 3

Cas (très) particulier de l'accession JEA

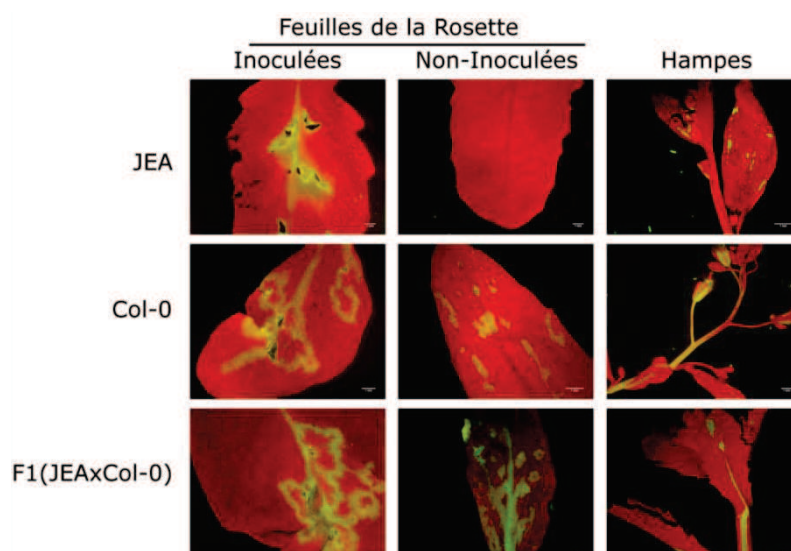
Chapitre 3: Cas (très) particulier de l'accession JEA

Dans une étude précédente, une collection cœur d'*Arabidopsis thaliana* représentative de la diversité naturelle de l'espèce a été phénotypée avec 5 souches de PPV (O. Sicard, PhD thesis Université Bordeaux Ségalen, 2007) (Intro Tab 6). Le tableau ci-dessous récapitule le phénotype observé chez l'accession JEA avec les isolats PPV-R et PPV-NAT (tous deux appartiennent à la souche PPV-D).

NASC	Accessions	R (D)	NAT (D)
N1092	Col-0	S+	S+
25AV	Jea	Rsys	Tol

Chap 3 Tab 1. Réponse des accessions JEA et Col-0 à l'infection par PPV-R et PPV-NAT
S+: phénotype sensible symptomatique, Tol: Tolérant, Rsys: résistance à l'infection en systémie.

Parmi les accessions testées, nous avons identifié une résistance à l'isolat PPV-R chez JEA se distinguant au niveau biologique des autres mécanismes de résistance. En effet chez cette accession, il semblerait que la propagation du virus a lieu uniquement au niveau des feuilles inoculées indiquant un blocage du mouvement longue distance du virus (Chap 3 Fig1).



Chap 3 Fig 1. Observation sous UV de l'accumulation, chez JEA, Col-0 et une plante F1 issue du croisement JEAxCol-0, de particules fluorescentes produites par l'isolat PPV-R couplé au gène codant pour la GFP

Les deux premières colonnes montrent les feuilles de la rosette, inoculées (13 *jai* –jours après inoculation-) et non inoculées (28 *jai*). La dernière colonne montre les hampes florales à 28 *jai*.

Cependant, que ce soit lors des inoculations en mécanique ou par *Agrobacterium* de la population de lignées recombinantes JEA x Col-0, aucune résistance issue du parent JEA n'a pu être mise en évidence (sous-groupe de 188 RILs testées). Il semblerait donc que ce caractère présent chez le parent JEA ne ségrège pas dans la population de lignées recombinantes 28RV. Par conséquent, nous nous sommes attachés à affiner le phénotype de cette résistance. Dans le but de s'affranchir de la résistance liée à *rpv1* et procurée par l'accession Col-0 (voir Chapitre 2), seul le clone pBINPPVnkGFP agro-inoculable est utilisé lors des tests réalisés avec la population 28RV.

En effet, nous avons vu dans le chapitre précédent que l'inoculation par *Agrobacterium* permet de 'casser' la résistance liée à *rpv1*. Puisque JEA ne porte pas d'allèle de résistance *rpv1* à l'inoculation mécanique, nous pourrions donc utiliser lors de l'infection de cette accession à la fois le clone pBINPPVnkGFP (agro-inoculation) ou pICPPVnkGFP (biolistique ou inoculation mécanique). Par contre, les tests sur la population JEA x Col-0 se feront exclusivement par agro-inoculation, éliminant ainsi tout effet de *rpv1*.

Sicard et al. (2007) ont également remarqué que la résistance observée chez JEA est contournée par l'isolat PPV-NAT. Les deux isolats PPV-R et PPV-NAT appartiennent au même groupe Dideron (PPV-D) et sont par conséquent très proches (98% d'identité). Nous avons donc tenté de mettre en évidence le déterminant viral permettant à l'isolat PPV-NAT de contourner la résistance portée par JEA.

I. Comportement de PPV-R chez JEA

Lors de l'inoculation par le PPV-R étiqueté avec le gène codant pour la GFP (clone pBINPPVnkGFP ou pICPPVnkGFP), le virus se multiplie de manière équivalente dans les feuilles inoculées chez l'accession JEA, Col-0 (Chap 3 Fig 1) ou même *Ler*. Cependant, des différences nettes sont observées lors de l'observation des tissus non inoculés (feuilles de la rosette ou hampes). Nous avons également remarqué qu'à 21 jours après inoculation (*jai*), *Ler*

ou Col-0 présentent des hampes mais pas JEA. En effet, il apparait que JEA est une accession dont la floraison est tardive, elle nécessite un minimum de 3 mois après germination pour induire la formation de hampes alors que Col-0 ne nécessite que 4 semaines (29 jours +/- 1, Simon et al., 2008).

Les mesures d'accumulation virale sont réalisées par ELISA 21 *jai*, ce qui correspond approximativement à 7 ou 8 semaines après germination. Par conséquent, lors des mesures d'accumulation virale, les accessions JEA et Col-0 ne sont pas au même stade de développement. A 21 *jai*, le virus est mesuré au niveau des hampes florales de Col-0 alors que chez JEA nous vérifions la présence du virus au niveau des feuilles de la rosette. Afin de déterminer si le stade de développement ou la nature des organes testés est lié à la différence de phénotype entre JEA d'un côté, Col-0 et *Ler* de l'autre côté, nous avons mis en place deux stratégies. La première consiste à inoculer JEA seulement une fois les premières hampes apparues. La deuxième consiste à induire une floraison précoce chez JEA avant inoculation.

I.1. Formation des hampes et sensibilité au PPV

Les plantes ont été conservées jusqu'à l'apparition des premières hampes chez JEA. Ces hampes ont été éliminées avant d'agro-inoculer les feuilles de la rosette. 21 *jai*, nous avons collecté séparément les hampes florales nouvellement formées et les feuilles de la rosette. Nous avons observé une complète absence du PPV au niveau de la rosette de JEA alors que les tissus floraux se sont révélés positifs (Figure 1, hampe florale de JEA). En comparaison chez Col-0, les hampes comme la rosette apparaissent positives au PPV (Chap 3 Fig 1 et Tab 2). Il semblerait donc que chez JEA, le mouvement du PPV est bloqué au niveau des feuilles de la rosette mais pas dans les hampes ni les feuilles caulinaires. La sensibilité au PPV chez JEA pourrait donc être conditionnée par les stades physiologiques de la plante hôte. Cependant, nous ne pouvons exclure la possibilité que lors de la floraison de JEA, les feuilles de la rosette étant relativement âgées, celles-ci seraient plus difficiles à inoculer. Il convenait

donc de répéter cette expérimentation mais en inoculant cette fois l'accession JEA au même stade physiologique et même âge que Col-0 ou *Ler*, à floraison.

1.2. Induction florale et sensibilité au PPV

Il se trouve que de nombreuses plantes issues de climat tempéré nécessitent une période hivernale, avec des températures relativement basses, pour initier ou accélérer les processus de floraison. Ce passage au froid est appelé vernalisation. L'accession JEA, contrairement à Col-0, fait partie des accessions nécessitant une période de vernalisation (M. Simon, JPB INRA Versailles, communication personnelle).

Nous avons soumis les graines de JEA à différentes périodes de vernalisation allant de une à quatre semaines. Les meilleurs résultats ont été obtenus après une vernalisation de deux semaines à 4°C. Dans ces conditions, la floraison de JEA coïncide avec la floraison de Col-0. Les accessions JEA et Col-0 ainsi traitées ont été agro-inoculées puis l'accumulation virale a été mesurée au niveau des hampes, ainsi que des feuilles de la rosette, à 21 *jai* (Chap 3 Tab 2). Les résultats de cette expérience ont permis de confirmer que chez JEA le virus est capable de se propager dans les tissus supérieurs, alors que son mouvement se trouve inhibé au niveau des feuilles de la rosette non inoculées (Chap 3 Tab 2). L'ensemble de ces résultats démontrent donc l'importance du stade physiologique de la plante pour sa sensibilité, mais aussi mettent en avant l'existence d'une résistance spécifique aux feuilles de la rosette.

	Inoculation	Rosette	Hampes
JEA Floraison naturelle	Agro	6%	45.9%
JEA Floraison induite	Agro	9%	43.3%
Col-0	Agro	100%	100%

Chap 3 Tab 2. Agro-inoculation avec pBINPPVnkGFP de Col-0 et JEA fleurissant naturellement ou après induction par vernalisation

Dans chaque essai, plus de 30 plantes furent testées, les pourcentages représentent le taux de plantes infectées

I.3. Une résistance spécifique au mouvement du PPV-R dans les feuilles de rosette chez JEA

Dans le but de mieux caractériser le déterminisme génétique de ce mécanisme de résistance spécifique, nous avons ensuite identifié des accessions qui, comme JEA, fleurissent tardivement mais sont cette fois sensibles à l'infection par PPV-R au niveau de la rosette. Pour cela, 147 accessions d'*Arabidopsis* appartenant au projet 1001 génomes (Atwell et al., 2010) ont été agro-inoculées² (Chap 1 Tab S2, Pagny et al 2012). Lors de cette étude, nous avons identifié 17 accessions ne présentant pas de hampes 21 *jai* (Chap 3 Fig S2). Parmi ces 17 accessions, une seule était négative pour le PPV: Ts-5. Nous avons vu dans le chapitre 1 que Ts-5 porte l'allèle de résistance *sha3* et donc cette absence de virus au niveau de la rosette chez Ts-5 est très probablement liée à *sha3*. Au sein des 16 accessions sensibles au PPV et ne formant pas de hampes, nous avons confirmé l'accumulation de particules virales chez Blh-1 (180 AV) dans les feuilles non-inoculées de la rosette. Blh-1 appartient à la collection cœur de 24 accessions du VNAT de l'INRA de Versailles (Intro Tab 6) auprès duquel nous avons pu récupérer deux populations F2 réciproques: JEA x Blh-1 et Blh-1 x JEA. Nous avons également réalisé au laboratoire le croisement JEA x Blh-1 afin de pouvoir tester la sensibilité des individus hétérozygotes de la population F1.

Dans un premier temps, nous avons donc agro-inoculé la descendance F1 issue du croisement entre JEA et Blh-1. Les cinq plantes obtenues (hétérozygotie vérifiée avec le marqueur NGA 59) se sont avérées sensibles au PPV, au niveau des feuilles de la rosette, non inoculées initialement. Ceci indique un déterminisme récessif de la résistance portée par JEA. Une première population F2 issue du croisement JEA x Blh-1 comprenant 200 individus a été agro-inoculée ; 190 individus ont présenté un phénotype sensible (95%). Ce taux de ségrégation est significativement différent de celui impliquant un seul gène à déterminisme récessif (1:3 avec 1 résistant pour 3 sensibles ou 25% d'individus F2 résistants à l'infection et

² Il est à remarquer que JEA ne fait pas partie de cette collection.

75% sensibles). Dans le cas d'un modèle à deux gènes présentant une relation d'épistasie entre eux, le taux de ségrégation attendu est de 1:15 soit 6.25% des plantes résistantes, L'emploi d'un test de Khi2 permet de valider avec un seuil de 1% que le taux de ségrégation observé dans la population F2 JEA x Blh-1 est en adéquation avec un modèle impliquant deux gènes épistatiques et contrôlant une résistance récessive (ou une sensibilité dominante). Des résultats sensiblement similaires ont été obtenus avec la population Blh-1 x JEA ce qui élimine toute implication du génome cytoplasmique.

Dans un second temps, nous avons initié le génotypage de la population F2 JEA x Blh-1 à l'aide de marqueurs de type SSR précédemment développés au laboratoire (P. Cosson, non publié) et complétés par des marqueurs issus de la base de données MSAT (<http://www.inra.fr/vast/msat.php>). Vingt et un marqueurs polymorphes ont été utilisés pour réaliser une carte génétique de cette population (Chap 3 Tab S1; Chap 3 Fig S1). L'analyse QTL, réalisée comme décrit dans les chapitres 1 et 2, n'a pas permis de mettre en évidence de région impliquée dans la résistance observée chez JEA. Cependant, comme la densité des marqueurs sur les chromosomes 4 et 5 demeure très faible (deux sur chaque chromosome), il conviendra à l'avenir de saturer cette carte avant de reprendre l'analyse statistique de la ségrégation de ce caractère.

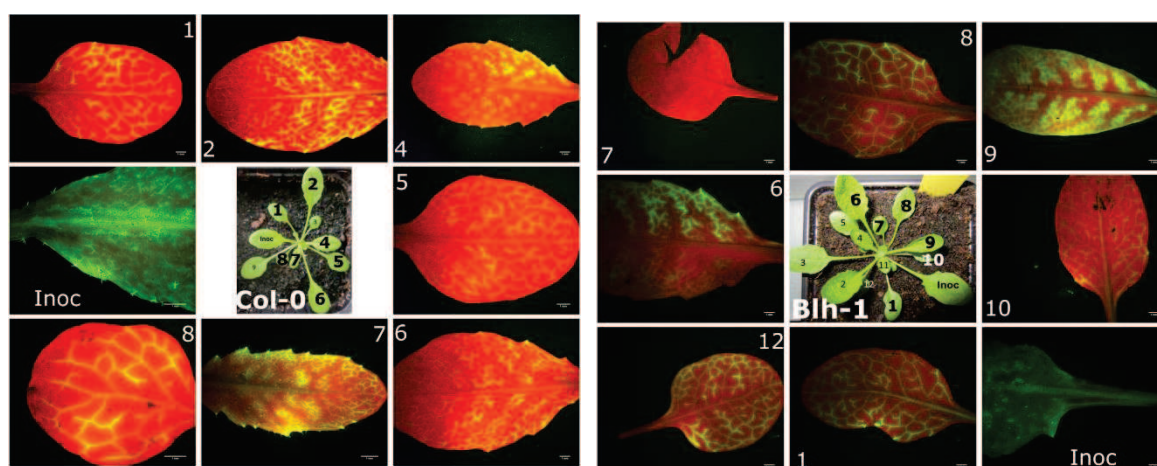
I.4. Une implication du phloème ?

Chez JEA, nous avons constaté que le virus ne se propageait pas au niveau des feuilles de la rosette alors qu'il avait la capacité d'infecter les tissus floraux. Le phloème qui se trouve être un élément clef dans le mouvement des photoassimilats, ainsi que de nombreux ARN, est donc apparu comme un candidat très probable dans le mécanisme de résistance porté par JEA. Nous avons montré dans l'introduction générale de ce manuscrit que le phloème est impliqué dans le mouvement longue distance des virus (Lough and Lucas, 2006; Dinant, 2008; Dinant and Lemoine, 2010). Dans le but de comparer le réseau phloémien de JEA avec celui de Col-0

et de Blh-1, nous avons utilisé un marqueur fluorescent, la carboxyfluorescéine (CF). Ce marqueur est couramment utilisé comme agent traceur. Il n'a pas la capacité de diffuser au travers des membranes, mais, grâce à sa taille, il peut diffuser librement dans le phloème des plantes. Par conséquent, ce marqueur est un très bon atout pour étudier les réseaux phloémiens (Oparka et al., 1994; Roberts et al., 1997).

La carboxyfluorescéine mélangée à un agent abrasif a été introduite dans les feuilles de JEA, Col-0 et Blh-1 par frottement, à raison d'une feuille par plante. 30 minutes plus tard, les feuilles non marquées initialement sont observées sous lumière ultra-violette (UV).

Dans le cas de Col-0 et de Blh-1, la sonde fluorescente est détectable dans la majorité des feuilles, délimitant parfaitement le réseau phloémien (Chap 3 Fig 2).



Chap 3 Fig 2. Observation sous UV de la carboxyfluorescéine chez Col-0 (photos de gauche) et Blh-1 (droite).

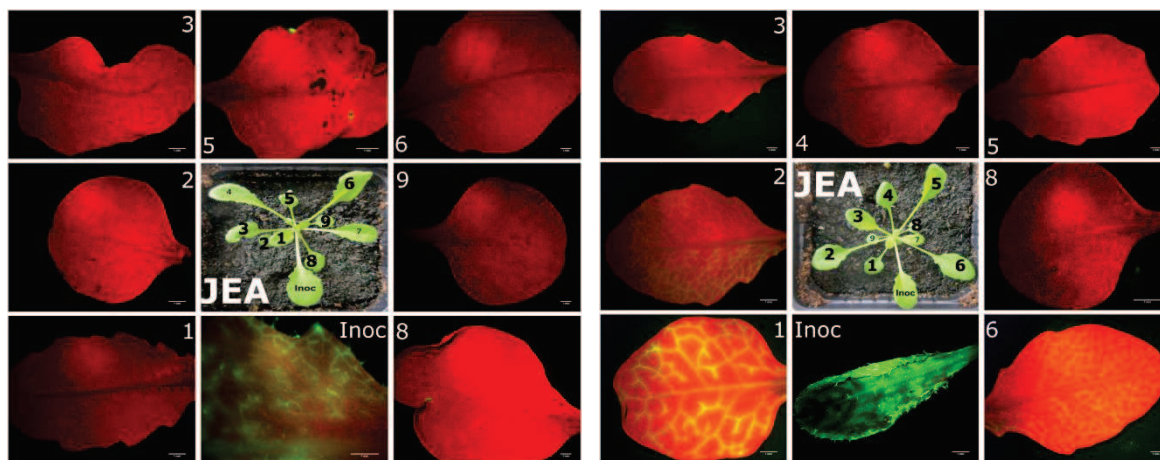
Visualisation, 30 minutes après marquage de la feuille annotée "Inoc"

Au centre: Aperçus des plantes avec les feuilles annotées

En périphérie: visualisation sous UV des différentes feuilles selon leur ordre d'apparition et de développement dans la rosette.

Dans le cas de JEA, la fluorescence est uniquement détectable au niveau de la feuille marquée (Chap 3 Fig 3). Il est important de noter qu'au cours de ces expériences, nous avons eu des problèmes de répétabilité. En effet dans certains cas, nous n'avons pu observer le moindre mouvement de la CF pour Col-0 ou Blh-1, sans savoir si cela était dû à l'âge de la plante, la méthode d'inoculation ou le choix de la feuille. En ce qui concerne JEA, quel que

soit l'expérience, il a été observé une propagation restreinte de la sonde sur tout au plus une à deux feuilles proches de la feuille marquée (Chap 3 Fig 3).



Chap 3 Fig 3. Observation sous UV de la carboxyfluorescéine chez JEA.

Visualisation 30 minutes après marquage de la feuille annotée "Inoc"

Au centre: Aperçu des plantes avec les feuilles annotées

En périphérie: visualisation sous UV des différentes feuilles de la rosette selon leur ordre d'apparition.

Du fait du blocage de la diffusion passive de la CF dans le phloème de JEA, nous pouvons donc poser l'hypothèse que le réseau phloémien chez JEA est moins permissif que celui de Col-0 ou Blh-1. Cependant, il conviendra de répéter ces résultats avant de valider cette hypothèse.

II. Déterminant viral permettant le contournement de la résistance chez JEA par PPV-NAT

La résistance de JEA à l'infection en systémie des feuilles de la rosette est contournée par l'isolat PPV-NAT. Nous avons initié l'identification du ou des facteur(s) viraux impliqués dans ce contournement afin de mieux comprendre le mécanisme moléculaire de l'interaction JEA/PPV.

Les séquences des isolats PPV-R et PPV-NAT sont toutes deux disponibles dans la base de données du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) mais nous ne disposons au laboratoire que du clone infectieux issu de PPV-R (pICPPV dont est issu pICPPVnkGFP et pBINPPVnkGFP). PPV-R et PPV-NAT appartiennent à la souche Dideron (PPV-D). En plus

de la délétion de 15 acides aminés (AA) présente au niveau de la protéine de capsid du PPV-NAT, seulement 44 acides aminés distinguent ces deux isolats. Il a été précédemment démontré au laboratoire que la délétion chez PPV-R des 15 AA absents chez PPV-NAT ne permet pas de contourner la résistance de JEA (Decroocq et al., données non publiées). Nous pouvons donc imaginer que parmi les 44 AA différents entre ces deux isolats, un (ou plusieurs) permet à l'isolat PPV-NAT de contourner la résistance de JEA. De plus, la mise en évidence de cette/ces mutation(s) nous permettrait d'identifier le facteur viral impliqué dans la sensibilité de JEA au PPV-NAT. Pour cela, nous nous sommes attachés à réaliser quatre clones recombinants en remplaçant un par un des fragments du pICPPV (PPV-R) par les fragments correspondants du PPV-NAT. Les travaux ont été réalisés en collaboration avec le Dr J-A Garcia (CNB-CSIC, Madrid), au travers d'une bourse EMBO courte durée.

II.1. Génération de clones recombinants infectieux

Les clones recombinants ont été générés en deux étapes. La première consistait à cloner chaque fragment du PPV-NAT dans un clone intermédiaire (Voir M&M Partie VIII.11.1). Les quatre clones intermédiaires appelés p35SeNosBNAT1-Pst, pUCPPVNATSalBam, pUCPPVNATBamSac, pUCPPVNATSacend contiennent respectivement les fragments 1-2926 bp, 3633-6936 bp, 6936-8981 bp et 8982-9654 bp du PPV-NAT. Tous ces clones ont été générés en double et vérifiés par séquençage. A ce stade, nous avons observé de nombreuses différences entre les séquences PPV-NAT des clones intermédiaires et la séquence originale du PPV-NAT disponible sur le NCBI (Chap 3 Tab 3).

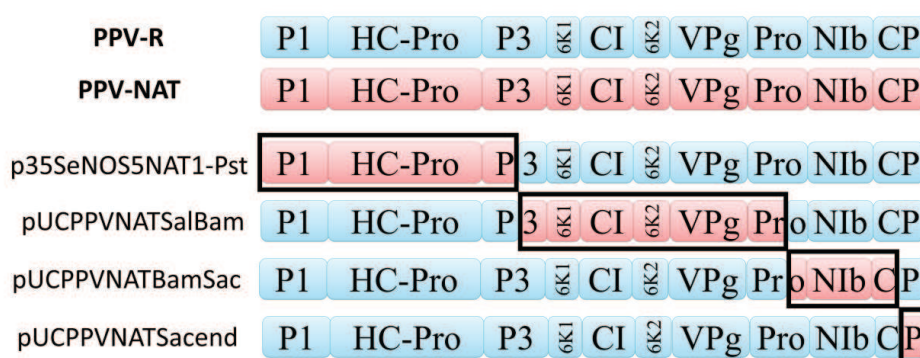
	Mutations présentes dans les fragments PPV-NAT clonés	
	Mutations synonymes	Mutations non synonymes
P35SeNOSBNAT1-Pst	12	4
pUCPPVNATSalBam	13	2
pUCPPVNATBamSac	12	1
pUCPPVNATSacend	1	0

Chap 3 Tab 3. Nombre de mutations entre chaque fragment PPV-NAT cloné et la séquence disponible dans la base de données NCBI

En comparant chaque fragment de PPV-NAT présent dans les clones intermédiaires avec les séquences du pICPPV et PPV-D (autre isolat manipulé au laboratoire, à Madrid), nous avons exclu toute contamination par ces isolats. Ces différences peuvent être expliquées soit par une évolution naturelle du PPV-NAT, soit par des erreurs dans la séquence originale du NCBI. Nous avons donc reséquencé le PPV-NAT complet, disponible au laboratoire, et confirmé l'authenticité des séquences clonées.

La deuxième étape a consisté à remplacer chaque fragment du pICPPV par le fragment correspondant du PPV-NAT (Voir M&M Partie VIII.11.2). Les quatre clones recombinants nommés pICPPVNAT1-Pst, pICPPVNATSalBam, pICPPVNATBamSac et pICPPVNATSacNde ont été obtenus avec succès. Chaque recombinant a été vérifié par digestion à l'aide d'enzymes de restriction spécifiques et par reséquençage.

Les quatre clones recombinants générés (Chap 3 Fig 4) ont ensuite servi à inoculer *Nicotiana benthamiana*, par biolistique (Voir M&M Partie III.2). Nous les avons ensuite propagés par inoculation mécanique à d'autres plants de *Nicotiana benthamiana*, avant vérification de la séquence virale présente.



Chap 3 Fig 4: Représentation schématique des quatre clones recombinants générés

Nous avons ainsi pu démontrer qu'après plusieurs passages successifs sur *Nicotiana benthamiana*, les quatre clones obtenus sont bien infectieux et que chaque plante infectée portait bien le clone viral attendu (vérification par PCR et digestion enzymatique).

II.2. Comportement des quatre clones recombinants chez *Arabidopsis thaliana*

Des feuilles de plants de *Nicotiana benthamiana* inoculés par biolistique avec chacun des 4 clones infectieux ont servi de source d'inoculum pour inoculer mécaniquement les accessions d'*Arabidopsis* suivantes: JEA, Col-0 et *Ler*.

Les accessions Col-0 et *Ler*, toutes deux sensibles aux deux isolats (ou partiellement dans le cas de Col-0, voir chapitre 2), nous ont servi de contrôles. Nous avons constaté dans le cas de *Ler* un taux de plantes positives avoisinant les 90% sauf dans le cas de la construction pICPPVNATBamSac (25%). Lors de l'infection de Col-0, même si les taux d'infection sont plus faibles (ceci étant sans doute lié à l'effet de *rpv1*), il reste proche ou supérieur à 50%, excepté pour la construction pICPPVNATBamSac (6.25%) (Chap 3 Tab 4). L'ensemble de ces résultats démontre que les clones recombinants pICPPVNAT1-Pst, pICPPVNATSalBam, et pICPPVNATSacNde sont capables d'infecter *Arabidopsis*. Le comportement du clone pICPPVNATBamSac est remarquable quelle que soit l'accession testée. Cependant, nous pouvons remarquer que la difficulté d'infecter *Arabidopsis* avec ce clone infectieux semble s'aggraver dans un contexte *rpv1* (Col-0) ou dans l'accession JEA.

	JEA	Col-0	<i>Ler</i>
pICPPVNAT1-Pst	57,50%	62,50%	90%
pICPPVNATSalBam	39,58%	45,83%	90,90%
pICPPVNATBamSac	4,16%	6,25%	25,00%
pICPPVNATSacNde	12,50%	83,30%	86,36%

Chap 3 Tab 4: Inoculation mécanique de JEA, Col-0 et *Ler* avec les quatre clones recombinants infectieux.
Dans chaque essai, plus de 40 plantes furent testées, les pourcentages représentent le taux de plantes infectés

Lors de cette expérimentation, l'accession JEA est apparue relativement plus sensible à l'infection par les clones recombinants pICPPVNAT1-Pst et pICPPVNATSalBam avec respectivement 57.50% et 39.58%. En comparaison, seulement 12,5% des plants JEA se sont révélés positifs lors de l'infection avec pICPPVNATSacNde (Chap 3 Tab 4). Il semblerait donc que le déterminant viral du contournement de la résistance portée par JEA ne se situe

pas dans la partie C-terminale du virus (8982-9654 bp). Les résultats obtenus avec les trois autres clones ne sont malheureusement pas concluants et ne permettent pas de désigner une portion génomique virale plus précise. De plus, il conviendra de poursuivre ces essais en répétant l'expérimentation décrite dans le tableau 4.

III. Conclusion

De manière très intéressante, nous avons observé chez l'accession JEA une résistance spécifique des feuilles de la rosette. L'observation de ce mécanisme de résistance totalement nouveau met en avant le fait que la propagation virale semble se mettre en place différemment entre les tissus floraux et les feuilles de la rosette. Cette spécificité de propagation virale peut être expliquée soit par l'implication d'un facteur de la plante hôte indispensable à l'invasion spécifique des feuilles de la rosette, soit par une morphologie particulière de la plante limitant la diffusion phloémienne au niveau basal.

Grâce à des populations F1 et F2, nous avons déterminé que le déterminisme de cette résistance était récessif et impliquerait au moins deux gènes épistatiques. L'étude de cartographie de la population F2 ne nous a pas permis de déterminer les régions impliquées dans la résistance observée chez JEA, il sera nécessaire de saturer la carte génétique avant pouvoir valider ou non les résultats de cette analyse et l'implication d'au moins deux régions du génome.

A l'aide d'un marqueur diffusant librement dans le phloème, nous avons observé que le réseau phloémien de JEA était moins permissif que celui des accessions sensibles au PPV, au niveau de la rosette. Par conséquent, nous posons l'hypothèse que l'absence de propagation virale au niveau des feuilles basales observée chez JEA est due à ce manque de permissivité. Cela dit ces résultats demeurent préliminaires et demandent à être approfondis par une caractérisation plus fine de la permissivité du réseau phloémien chez JEA.

Enfin, il apparaît que l'isolat PPV-NAT possède la capacité de contourner la résistance observée chez JEA. Nous avons généré quatre clones recombinants entre les isolats PPV-R et PPV-NAT afin d'identifier le ou les facteur(s) viraux responsables de ce contournement. Même s'il semblerait que la partie C-terminale ne soit pas impliquée dans le contournement, l'ensemble des résultats actuels ne nous permettent pas de déterminer la région virale responsable du contournement de la résistance spécifique aux feuilles de la rosette chez l'accession JEA.

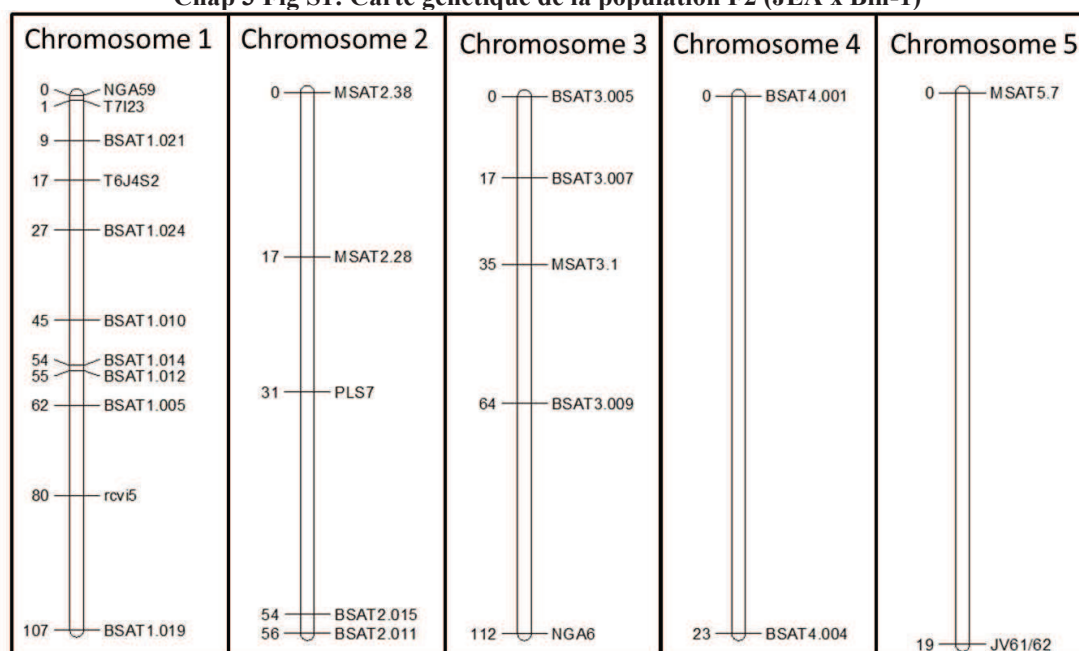
Données Complémentaires

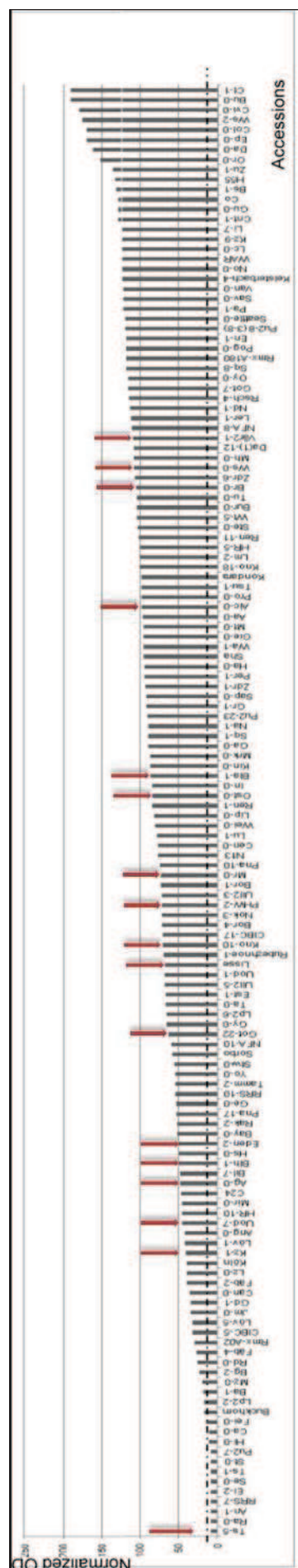
Chap 3 Tab S1. Listes des marqueurs utilisés pour réaliser la carte génétique de la population F2 (JEAxBlh-1)

Marqueurs	Chr	5' Amorce Sens 3'	5' Amorce Anti-Sens 3'	Origine
NGA59	1	GCATCTGTGTTCACTCGCC	TTAATACATTAGCCCAGACCCG	CNB-INIA
T7123	1	CATGCACGTACGATTTGTTAAC	GTGTCCTTTTTTCTCAACGATG	CNB-INIA
BSAT 1.021	1	ATGCTTCAAGAGATCCGAAC	TATCATACATACGATGGCAA	Cosson
T6J4S2	1	GGGCCGACTTATGCATT	GCTTTAGAGAGAGGGAT	Cosson
BSAT 1.024	1	CCATCTGTGTATCAGAATCGC	ATGATCCCTCCTCATGCC	Cosson
BSAT1.010	1	TTCACGAAAAACATCTCATTTT	TCTCCATCCCTGTCTGTACG	Cosson
BSAT1.014	1	TTGACTGAAGATAGGAATGA	ATACGATTAGTTTAGCGGTGT	Cosson
BSAT1.012	1	ATGGACTCACCTAATCGGAA	AAATGAGAATATAGTTTGCTC	Cosson
BSAT1.005	1	ATCTCATTACAGACTTGTCC	TGTTACATATCCAGGGTTT	Cosson
RCV1 5	1	ACATAACCACAAATAGGGGTGC	ACCATGCATAGCTTAAACTTCTTG	Decroocq
BSAT1.019	1	AAGCAGTTCAAGCATTGGTG	AAGCACCTGAAGCATCGTC	Cosson
MSAT2.38	2	TGTAACGCTAATTTAATTGG	CGCTCTTTCGCTCTG	Loudet / CNB-INIA
MSAT2.28	2	AATAGAAATGGAGTTCGACG	TGAACCTGTGTGAGCTTTG	Loudet
PLS7	2	GATGAATCTTCTCGTCCAAAT	GACAACTAAACAACATCCTTCTT	CNB-INIA
BSAT2.015	2	AAACTGCTTACGATGTATCTTTCA	CTAGAAAACTAGCCACAAAGC	Cosson
BSAT2.011	2	ACACCATAAATGTTTGAATCTGC	ACCAACCAAAAATCAGAAACC	Cosson
BSAT3.005	3	GAAATGGTTCACAACCTAAAA	CTACACTGGTTATGGTACGGC	Cosson
BSAT3.007	3	ACTCCGAATGCTTTATTTCTG	AATCATACCGACCGAAGATG	Cosson
MSAT3.1	3	GGACTCGCTGCTGCTACATTC	CCACGCACATGCAATTACATA	Loudet
BSAT3.009	3	CTCCTTCCTTGGTATGGGAT	ATACACTTATAGGGTCGATGG	Cosson
NGA6	3	TGGATTCTTCTCTCTTCAC	ATGGAGAAGCTTACACTGATC	CNB-INIA
BSAT4.001	4	GGTTTGATGATATTGTTTGGC	ATTTTCTATTTTATGATCGGGC	Cosson
BSAT4.004	4	CAATTTTGGAACCTAAATATGGG	CTTAAACGTCATACTCAAACACG	Cosson
MSAT5.7	5	GCTTGTACATTACCGACA	CCAAGCGTACTCGATCA	Loudet
JV61/62	5	CGCTTTCCTTGTGTCAATCC	AAATGCAAAATATTGATGTGTGAAA	CNB-INIA

Chr: Chromosome sur lequel est positionné le marqueur

Chap 3 Fig S1: Carte génétique de la population F2 (JEA x Blh-1)





Chap 3 Fig S2. Distribution des 147 accessions en fonction des valeurs moyenne d'accumulation virale.

Les moyennes d'accumulation virale sont exprimées en pourcentage des valeurs des densités optique mesurées 21 jours après inoculation (*jai*). Les individus sont ordonnés de la valeur la plus basse vers les valeurs les plus hautes. Les accessions sont considérées résistantes quand la moyenne des valeurs de densité optique est inférieure ou égale à trois fois la valeur du mutant perte de fonction *elFiso4E*. Le seuil délimitant les accessions résistantes des accessions sensibles est matérialisé par une ligne pointillée horizontale. Les flèches rouges indiquent les accessions ne présentant pas de hampes.

Selon ces critères une seule accession ne présentant pas de hampe est considérée totalement résistante: Ts-5, alors que les 16 autres accessions sans hampes (Bla-1, Blh-1, Ost-0, Acl-0, PHW-2, Lisse, Knox-10, Eden-2, Var2.1, Got-22, Uod-7, Ws-0, Br-0, Ag-0, Kas-1 et Mr-0) sont considérées sensible

Discussion et **perspectives**

Discussion et perspectives

Le PPV, un potyvirus pathogène des espèces ligneuses du genre *Prunus*, possède la capacité d'infecter la plante modèle *Arabidopsis thaliana*. Trop peu de résistances à ce virus existent chez son hôte naturel et nous nous sommes donc tournés vers *Arabidopsis* afin d'identifier de nouveaux mécanismes de résistance transférables vers les espèces cultivées. Comme les résistances récessives aux virus impliquent des facteurs de la plante hôte très conservés entre les genres et les espèces (Truniger and Aranda, 2009; Le Gall et al., 2011), il est supposé que l'identification d'un de ces facteurs chez *Arabidopsis* peut conduire à identifier chez les arbres fruitiers de nouveaux candidats pour la résistance au PPV.

Dans le but de mettre en évidence de nouveaux facteurs de l'hôte indispensables au cycle infectieux des potyvirus, nous avons choisi d'utiliser au cours de cette étude le pathosystème PPV-*Arabidopsis*. Cette plante modèle, largement distribuée géographiquement, possède une très grande variabilité génétique naturelle. De manière intéressante, cette espèce présente également une variabilité de réponse à l'infection virale supérieure à sa plante hôte naturelle. A partir d'accessions issues d'origines variées, nous avons pu identifier trois nouveaux mécanismes de résistance récessive totalement distincts: la première résistance est contrôlée par le gène *rpv1*. Le facteur de sensibilité associé à cette résistance est impliqué dans les étapes précoces du cycle viral, il pourrait correspondre à une phosphoglycérate kinase chloroplastique (cPGK2). Le second mécanisme de résistance décrit chez *Arabidopsis* apparaît spécifique aux feuilles de la rosette chez l'accession JEA tandis que le troisième mécanisme semble lié à un facteur de sensibilité, SHA3, impliqué dans le mouvement à longue distance du virus.

L'ensemble de ces résultats démontre que la variabilité génétique d'*Arabidopsis* est un fort atout pour la découverte de nouvelles résistances au virus de la sharka, et que cela, couplé

aux nombreuses données et ressources disponibles chez cette espèce, permet l'identification et la validation de facteurs de la plante hôte impliqués dans différentes étapes du cycle viral.

I. Identification d'un nouveau facteur de la plante hôte jouant un rôle dans l'établissement du cycle infectieux du PPV.

I.1. Rôle de la phosphoglycérate kinase chloroplastique dans la sensibilité au PPV

Au cours de cette étude, nous avons montré que les accessions Cvi-1 et Col-0 portent un mécanisme de résistance récessive partielle, spécifique à l'inoculation mécanique. L'ensemble des analyses a permis de cartographier le locus contrôlant cette résistance au niveau du chromosome 1. Ce locus, nommé *rpv1*, pourrait correspondre au gène codant pour une phosphoglycerate kinase chloroplastique (cPGK2) comme décrit par Ouibrahim et al., (soumis) lors de l'infection de Cvi-0 par le WMV. Cependant afin de valider ce gène candidat il sera nécessaire de mener des approches de complémentation, en exprimant l'allèle sensible de la cPGK (*Ler*, par exemple) chez les accessions résistantes (Cvi-1 et Col-0).

Chez les deux accessions Cvi-1 et Col-0, la résistance contrôlée par *rpv1* n'est pas totale. Plusieurs études précédentes ont montré que les résistances partielles aux virus ont un déterminisme polygénique (Caranta et al., 1997; Qi et al., 1998; Lu et al., 2012). Or dans le cas de la population Cvi-1 x *Ler*, Sicard et al., (2008) ont posé l'hypothèse que la résistance observée est contrôlée par deux gènes, l'un porté par Cvi-1 (*rpv1*) et l'autre par *Ler* (*rpv3*). Cependant, dans l'ensemble des populations testées au cours de cette étude (chapitre 2 de ce manuscrit), seul le locus *rpv1* a pu être détecté. De plus, malgré l'emploi au laboratoire de nouvelles lignées quasi-isogéniques, recombinantes dans la région de *rpv3* et présentant un fond génétique de type Cvi-1, l'implication de ce second locus n'a jamais pu être confirmée de manière claire (P. Paulstephenraj et V. Decroocq, données non publiées).

Dans notre cas, la résistance partielle est corrélée avec une tendance des plantes à échapper à l'infection. Ce phénomène implique que le virus possède toujours la capacité de se

développer chez Cvi-1 et Col-0 mais que cet événement échoue dans la majorité des cas. Nous pouvons poser deux hypothèses, soit la cPGK de Cvi-1 et de Col-0 est toujours fonctionnelle mais elle serait moins disponible pour le virus, soit l'interaction entre la cPGK2 et le virus est réduite.

Tandis que la cPGK2 de Cvi-1 présente une substitution non-synonyme au niveau du nucléotide 232, affectant l'acide aminé 78 (S78G), dans le cas de Col-0 la séquence nucléotidique de la cPGK est identique à celle de l'accèsion sensible, *Ler-1*. Au niveau de la région 5' UTR (Untranslated Region), trois substitutions nucléotidiques ont été détectées aux positions -76 ($A_{Col-0} \text{ et } Cvi-1 \Rightarrow G_{Ler-1}$), -277 ($A_{Col-0} \Rightarrow T_{Ler-1} \text{ et } Cvi-0$) et -985 ($C_{Col-0} \text{ et } Cvi-0 \Rightarrow T_{Ler-1}$). Ces trois substitutions différencient clairement l'accèsion résistante Col-0 de l'accèsion sensible *Ler-1*. Par conséquent, la résistance pourrait être associée à une dérégulation transcriptionnelle de la *cPGK2* chez Col-0. L'hypothèse serait donc qu'une réduction de l'expression de la *cPGK2* chez Col-0 résulterait dans une plus faible quantité de cPGK2 disponible pour interagir avec le virus. Cependant, les connaissances actuelles sur l'expression du gène *cPGK2* chez *Arabidopsis* ne montrent pas de dérégulation en conditions infectées (CATdb: http://urgv.evry.inra.fr/cgi-bin/projects/CATdb/catdb_index.pl). Bien au contraire, l'infection par le PPV semblerait même induire une légère surexpression de ce gène (Babu et al., 2008). Cependant, il est intéressant de remarquer que le gène codant pour la cPGK2 possède deux cadres de lecture, conduisant à la production de deux transcrits alternatifs: At1G56190.1 et At1G56190.2, le second plus court en sa partie 5' de 219 bp. Or, l'ensemble des données transcriptomiques décrites dans la CAT db ont été réalisées à l'aide de puces à ARN qui ciblent la partie 3' terminale des ARNm. Ceci ne permet donc pas de différencier l'accumulation de l'un ou l'autre des transcrits alternatifs. Si nous supposons que le virus n'utilise qu'un seul des deux transcrits de la cPGK2, alors il se pourrait que chez l'accèsion Col-0, l'expression de cette copie est dérégulée.

Dans un proche avenir, il sera donc essentiel de mesurer l'expression des deux transcrits alternatifs de la cPGK2 dans un contexte résistant (Col-0 et Cvi-1) et sensible (*Ler*), en conditions saines et infectés. Dans ce but, nous réaliserons une analyse des transcrits par PCR quantitative en utilisant un couple d'amorces ciblant les régions 5' alternatives des ARN messagers de la cPGK2, permettant ainsi de quantifier l'accumulation des deux transcrits At1G56190.1 et At1G56190.2. A partir de ces résultats, il sera possible de déterminer les ratios d'expression de ces deux copies alternatives.

Dans le cas de Cvi-1, il est probable que, comme chez Col-0, la résistance récessive liée à *rpv1* soit également due à une dérégulation des transcrits. En effet, deux substitutions dans la région 5' UTR distinguent à la fois Col-0 et Cvi-1 de l'accession sensible Ler-1: position -76bp et -985bp. Cependant, le gène codant pour la cPGK2 chez Cvi-1 se distingue de l'allèle sensible de *Ler* par une mutation non synonyme en position 78 qui affecte les deux transcrits alternatifs de la cPGK2. Nous ne pouvons donc pas exclure que cette mutation provoque chez l'accession résistante une réduction de l'interaction entre la cPGK2 et le virus. Dans ce cas-là, la perte de spécificité pourrait avoir lieu à deux niveaux distincts, soit directement entre la cPGK2 et l'ARN viral soit entre la cPGK2 et une ou plusieurs protéines virales.

Dans le cas du *Bamboo mosaic virus* (BaMV, Potexvirus), il a été montré que la cPGK du tabac avait la capacité d'interagir avec la région 3' UTR de l'ARN viral (Lin et al., 2007). Par conséquent il est tout à fait possible que l'interaction se fasse directement au niveau l'ARN viral et non de protéine à protéine. Il serait donc intéressant de comparer les interactions entre l'ARN du PPV et les protéines alternatives cPGK2 codées par les allèles de Cvi-1, Col-0 et Ler-1, par la technique de retard sur gel appelée EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), ou bien par des expériences de chromatographie d'affinité.

Cela dit, comme nous l'avons décrit dans l'introduction, les résistances récessives sont majoritairement le résultat de pertes d'interaction entre un facteur de la plante hôte et une

protéine virale. Par conséquent nous ne pouvons exclure cette possibilité. Il nous semble donc essentiel de vérifier si la cPGK2 peut interagir directement avec une ou plusieurs protéines virales. Cela pourrait être vérifié soit *in vivo* à l'aide d'un système double hybride chez la levure, mais aussi *in planta* par la technique de BiFC (Bimolecular Fluorescent Complementation).

1.2. Quels liens entre la résistance contrôlée par *rpv1* et la méthode d'inoculation ?

Au cours de notre étude, deux méthodes d'inoculation ont été réalisées. Etonnamment, la résistance contrôlée par *rpv1* n'a pu être détectée que lors des expérimentations d'inoculation mécanique. Les différents tests mis en place ont permis de déterminer que la résistance récessive contrôlée par *rpv1* était contournée lors d'inoculation par *Agrobacterium* ou biolistique. Les différences majeures entre l'inoculation mécanique et les deux autres méthodes reposent sur la charge virale de l'inoculum et la forme sous laquelle le virus est transféré. Lors de l'agro-inoculation ou de la biolistique le virus est introduit en grande quantité, sous forme de plasmide infectieux, alors que lors de l'inoculation mécanique le virus est introduit en faible quantité, sous forme d'une particule virale encapsidée.

La première étape de l'infection virale est la décapsidation du virus afin de libérer le génome viral, cette étape est cruciale pour le succès de l'infection. Même si elle est mal connue chez les *potyvirus*, on suppose qu'à l'image du *Tobacco mosaic virus* (TMV, *Tobamovirus*) les *potyvirus* utilisent une stratégie de "décapsidation co-translationnelle" dans laquelle l'étape de décapsidation est couplée à celle de la traduction de l'ARN viral (Saunal et al., 1993). Il est donc possible que la cPGK aurait un rôle essentiel lors de la transition entre la décapsidation et la traduction virale, rôle clé qui devient inutile lorsque le virus est inoculé sous forme de plasmide non encapsidé comme c'est le cas pour l'agro-inoculation ou la biolistique. Cependant cette hypothèse n'explique pas le contournement de la résistance récessive au WMV chez Cvi-0 et portée par le locus *rwm1* lors de l'inoculation par pucerons

(L. Ouibrahim, thèse de doctorat Université Aix Marseille Faculté des Sciences de Luminy 2012).

Certains cas de contournement dus à une surcharge virale ont également été observés lors de l'inoculation de l'accession Bla-14 par le Cauliflower Mosaic Virus (CaMV, *Caulimovirus*) (Callaway, 1996) et de l'accession Bay-0 par le *Plantago Asiatica Mosaic Potexvirus* (P1AMV, *potexvirus*) (Yamaji et al., 2012). Même si dans ces deux cas, la résistance contournée était dominante, nous ne pouvons exclure que l'excès de charge virale puisse permettre de casser la résistance récessive contrôlée par *rpv1*.

En l'état actuel des connaissances, nous ne pouvons éliminer l'une ou l'autre de ces hypothèses. Nous nous proposons donc de tester différentes concentrations de charge virale par inoculation mécanique mais également de générer par transcription inverse des ADNc infectieux à partir de molécules d'ARN viral, afin de tester l'effet d'une faible charge virale de particules non encapsidées sur l'infection de Cvi-1 et Col-0.

Le compartiment cellulaire où se déroule l'étape de décapsidation des particules virales est encore inconnu. Cependant, chez le TuMV, Il apparaît que la traduction virale s'initie au niveau du réticulum endoplasmique, pour transiter vers les chloroplastes où la protéine virale 6K2 provoque la formation d'invaginations de la membrane externe des chloroplastes dans lesquelles la réplication s'initie (Wei et al., 2010). Nous savons également que la réplication et la traduction des virus à ARN sont étroitement liées dans le temps et dans l'espace (Grangeon et al., 2010). Etant donné que les protéines PGK chloroplastiques se distinguent des protéines PGK cytoplasmiques par la présence d'une séquence d'adressage chloroplastique localisée dans la région N-terminale de la protéine, nous pouvons poser l'hypothèse que la cPGK pourrait intervenir au niveau des invaginations de la membrane externe des chloroplastes dans les étapes de traduction et/ou de réplication de l'ARN viral. Cependant, ceci n'explique pas la résistance à l'infection lors d'inoculation mécanique et son contournement possible par

Agrobacterium ou par biolistique puisque, quelle que soit la méthode d'inoculation, la protéine produite devra servir aux étapes ultérieures de traduction et/ou réplication du génome viral. De nombreuses questions subsistent quant au rôle de la cPGK2 dans l'infection par le PPV (ainsi que par le WMV) et il conviendra à l'avenir d'y répondre avant de transférer ce nouveau mécanisme de résistance vers les espèces fruitières.

II. Une nouvelle résistance spécifique aux feuilles de la rosette

Parmi les trois mécanismes de résistance observés au cours de cette étude, nous avons mis en évidence une résistance atypique chez l'accession JEA. En effet, chez cette accession, la propagation virale semble bloquée au niveau des feuilles basales alors que le virus a la capacité de se propager et de se multiplier au niveau des tissus floraux.

Au regard du comportement particulier de la résistance chez JEA, nous posons l'hypothèse que ce mécanisme implique un facteur de l'hôte spécifique aux étapes de propagation virale dans la rosette. L'ensemble de la littérature concernant le mouvement longue distance des virus fait état d'une diffusion virale via les tissus vasculaires au travers de deux étapes cruciales qui sont le chargement ou le déchargement du phloème (Carrington et al., 1996; Gilbertson and Lucas, 1996; Santa Cruz, 1999; Oparka and Cruz, 2000).

Il n'a, à notre connaissance, jamais été montré chez les virus de résistance spécifique à un seul type d'organe de plante. Cette résistance à l'infection virale, spécifique aux feuilles de la rosette, semble montrer que le mouvement du virus pourrait être contrôlé de manière différente lors de l'invasion des feuilles basales ou des tissus floraux.

Au cours de cette étude, nous avons montré que cette résistance récessive impliquerait deux gènes épistatiques. Cependant l'analyse de cartographie d'une population F2 n'a pas permis de mettre en évidence de région impliquée dans la résistance observée chez JEA. Ceci est dû à une densité faible des marqueurs, notamment sur les chromosomes 4 et 5. Il sera donc nécessaire de saturer cette carte avant de pouvoir valider ou non les résultats de cette analyse.

En parallèle, nous avons observé que le réseau phloémien de JEA était moins permissif que celui d'accessions sensibles au virus. Le phloème étant un élément essentiel à la propagation virale (Lough and Lucas, 2006; Dinant, 2008; Dinant and Lemoine, 2010), il est envisageable que cette réduction de permissivité pourrait jouer un rôle important dans le phénotype de résistance observée chez JEA. Cependant ces résultats restent préliminaires et demandent à être approfondis avec une caractérisation plus fine de la permissivité du réseau phloémien chez JEA. De plus, la présence de particules virales au niveau des feuilles de la rosette a été validée uniquement par des mesures globales d'accumulation virale. Il pourrait être intéressant de mettre en place une étude du suivi de la propagation du PPV marqué à la GFP chez JEA, pour comparer plus finement cette propagation avec la diffusion passive du marqueur phloémien.

III. Identification d'un nouveau facteur de la plante hôte essentiel au mouvement à longue distance du PPV.

Chez les accessions St-0, RRS-7, Ts-1, Ts-5 Hi-0 et Sf-2 un mécanisme de résistance récessive bloquant le mouvement à longue distance du PPV a pu être identifié. L'ensemble des analyses de cartographie a permis de caractériser un QTL majeur au niveau du bas du chromosome 3. Les tests d'allélismes démontrent que la résistance observée chez ces différentes accessions est contrôlée par un seul et même gène. Le locus identifié, nommé *sha3*, co-localise avec le gène *RTM3* qui contrôle lui une résistance dominante à l'infection par le PPV, LMV et TEV (Chisholm et al., 2001; Decroocq et al., 2006; Decroocq et al., 2009). Cependant il a été montré précédemment que l'isolat PPV-R utilisé au cours de cette étude contourne cette résistance de type RTM (Decroocq et al 2006; 2009) ce qui permet d'exclure toute implication de la résistance dominante contrôlée par *RTM3* dans les phénotypes que nous observons. L'intervalle défini au cours de l'étude se trouve au niveau d'un des plus grands clusters de gènes codant, pour la plupart, pour des protéines analogues à

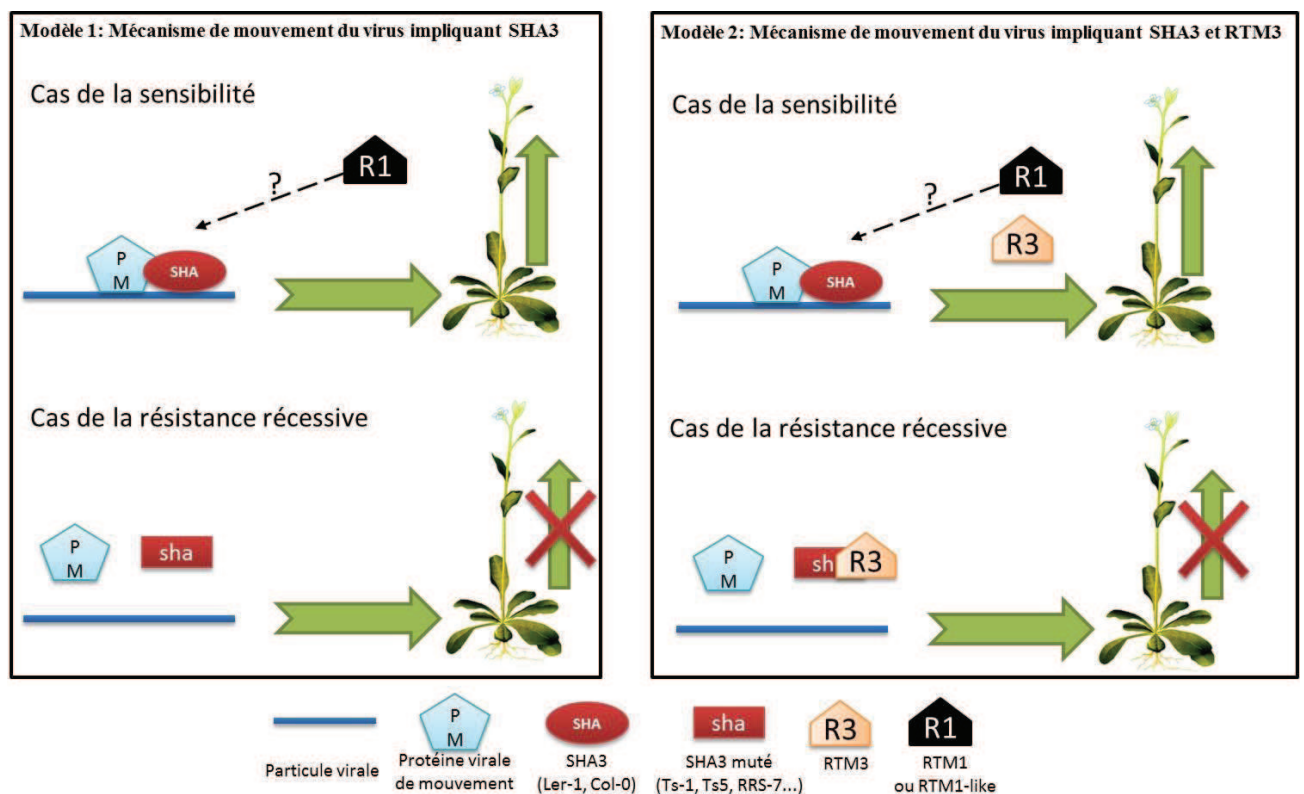
RTM3 (Cosson et al., 2010). Ces protéines sont caractérisées par la présence d'un domaine de type MATH (meprin et TRAF) et, pour certaines, d'un domaine de type "coiled-coil" ou phospholipase (Park et al., 1999; Pagny et al., 2012). Nous ne pouvons donc pas exclure la possibilité que SHA3 puisse coder pour une protéine analogue à RTM3.

Au vu du caractère récessif de la résistance, nous posons l'hypothèse que la protéine SHA3 aurait la capacité d'interagir avec le virus de manière directe ou indirecte lors du mouvement longue distance. Cette interaction serait ainsi interrompue dans le cas des accessions St-0, RRS-7, Ts-1, Ts-5 Hi-0 et Sf-2 qui portent un allèle *sha3* muté, empêchant ainsi le mouvement du virus (voir Discussion Fig 1 ci-dessous, modèle 1).

L'étude de structure de la protéine TRAF2 a permis de montrer que les domaines MATH ont la capacité de s'auto-assembler pour former des trimères (Park et al., 1999). Dans le cas de la protéine RTM3 impliquée dans la résistance dominante aux potyvirus, Cosson et al., (2010) ont effectivement mis en évidence la capacité de cette protéine à interagir avec elle-même. De plus il a été observé que les domaines MATH pouvaient aussi être impliqués dans les interactions avec d'autres protéines. Par exemple, chez *Arabidopsis*, la famille MATH-BTB (MATH-Broad complex, Tramtrack, Bric-a-Brac) interagit avec la Cullin3 (CUL3) pour former une ligase E3 fonctionnelle (Weber et al., 2005). De même, la protéine RTM3 possède la capacité de former un complexe avec la protéine RTM1 présentant des homologies de séquence avec des lectines (Cosson et al., 2010).

Les domaines MATH sembleraient donc être des domaines de liaison impliqués dans l'interaction protéine-protéine. Par conséquent si *SHA3* code pour une protéine analogue à RTM3, étant donné qu'aucune interaction directe entre le virus et la protéine RTM3 n'a été décrite à ce jour, il serait possible d'imaginer que la protéine RTM3 interagisse de manière fortuite ou non avec SHA3, bloquant ainsi son rôle dans le mouvement longue distance selon un mécanisme de résistance dominante (voir Figure 1, modèle 2). Cette interaction pourrait

soit empêcher la formation du complexe SHA3-Virus, soit bloquer son activité. Un tel cas de figure suggérerait que le mouvement à longue distance impliquant SHA3 pourrait être bloqué suite à l'interaction avec l'une ou l'autre des protéines du complexe RTM. En effet, la résistance dominante RTM implique au moins trois gènes (Mahajan et al., 1998; Whitham et al., 1999). De manière intéressante, dans la population issue du croisement Ca-0 (résistant, Pagny et al., 2012) par *Ler* (sensible) un QTL co-localisant avec le gène *RTM1* a également été identifié (V. Decroocq et C. Couture, données non publiées). Ce locus présente une interaction épistatique avec *sha3* et se positionne sur le bras court du chromosome 1. Il a récemment été restreint à un intervalle de 1.3 Mb contenant le gène *RTM1* ainsi que son paralogue, *RTM1-like*. Cela semble indiquer que RTM1 pourrait aussi intervenir dans le contrôle du mouvement longue distance médié par SHA3. Aucun locus co-localisant avec RTM2 n'a été identifié (V. Decroocq et C. Couture, données préliminaires).



Discussion Fig 1. Mécanisme de mouvement du virus impliquant SHA3 ou RTM3

A gauche, modèle 1 basé sur le principe d'une indépendance entre SHA3 et RTM3. A droite, modèle 2 basé sur un mécanisme impliquant que SHA3 et RTM3 interagissent, directement ou indirectement. Le point d'interrogation (?) indique l'implication potentielle des protéines RTM1 ou RTM1-like dans ces deux modèles

A l'heure actuelle, nous ne pouvons valider aucune de ces hypothèses. La première étape consiste à identifier parmi les gènes candidats celui qui serait responsable de la résistance récessive contrôlée par *sha3*. Une thèse de doctorat est en cours sur ce sujet. Dans un second temps, des études d'interactions entre les différentes protéines RTM et SHA3 seront réalisées, ce qui devrait permettre d'amener des éléments de réponse concernant le lien entre le mouvement du virus, SHA3 et le complexe RTM.

Même s'il est évident que plusieurs facteurs de plante participent au mouvement longue distance des virus (Schaad et al., 1996; Scholthof, 2005; Requena et al., 2006), les connaissances sur ces facteurs sont très limitées (Harries and Ding, 2011). Dans le cas des potyvirus, la seule protéine identifiée à ce jour est la PVIP (VPg-interacting protein) (Dunoyer et al., 2004). Celle-ci interagit avec la VPg du TuMV et la diminution de l'expression de *PVIP* entraîne une restriction du mouvement longue distance sans le bloquer totalement (Dunoyer et al., 2004). Par conséquent l'identification du facteur de l'hôte SHA3 est une étape importante dans la compréhension du mouvement à longue distance des potyvirus.

IV. Conclusion

Au terme de cette thèse, nous avons identifié chez *Arabidopsis* trois nouveaux mécanismes de résistance récessive. Ceci a conduit plus particulièrement à la caractérisation de deux nouveaux facteurs de la plante hôte jouant un rôle non-négligeable dans le cycle infectieux du virus. Ces deux nouveaux facteurs sont impliqués dans deux étapes distinctes, l'un intervenant vraisemblablement lors des étapes les plus précoces du cycle viral (RPV1), alors que le second est indispensable au mouvement longue distance (SHA3). Dans le cas de RPV1, le facteur de la plante hôte semble correspondre à une phosphoglycérate kinase chloroplastique. Par contre dans le cas de SHA3, l'approche gène candidat est encore en cours au laboratoire pour déterminer le facteur de la plante hôte impliqué.

Une fois ces deux facteurs identifiés et validés, ce travail ouvrira la voie au développement de nouvelles stratégies pour la lutte génétique contre les potyvirus. La recherche d'orthologues à ces deux facteurs de l'hôte pourra conduire à l'identification chez d'autres espèces, cultivées, de nouvelles sources de résistance intervenant à différentes étapes du cycle viral. Dans le cas du PPV, cela permettrait d'accroître la diversité des sources de résistance à la sharka chez les arbres fruitiers avec pour but ultime de cumuler au sein d'un même cultivar plusieurs mécanismes de résistances.

Comme nous l'avons montré, la variabilité génétique d'*Arabidopsis* a été clairement un atout dans cette étude et dans la découverte de nouveaux facteurs de l'hôte essentiels au cycle viral. Le séquençage à grande échelle de nombreuses accessions d'*Arabidopsis* a déjà permis la mise en place d'approches de génétique d'association sur des populations de plus en plus larges. Il est attendu que l'emploi de telles approches sur des populations conséquentes d'*Arabidopsis* couvrant la variabilité génétique de l'espèce nous donnera accès à une panoplie plus large de facteurs de l'hôte essentiels au(x) virus. Tous représentent des candidats intéressants pour un transfert ultérieur vers les hôtes naturels de ces virus phytopathogènes.

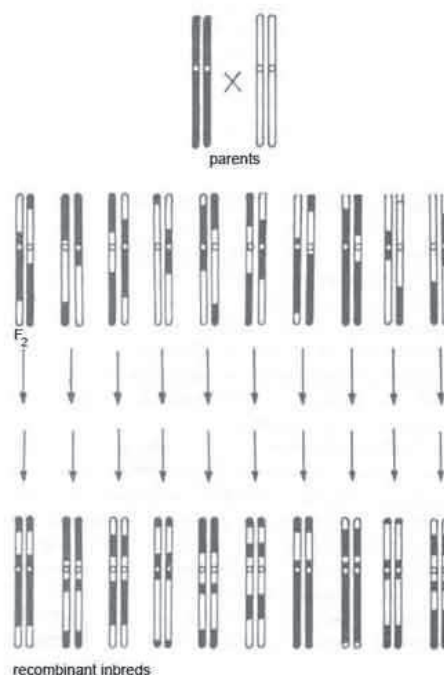
Matériel et méthodes

Matériel et méthodes

I. Matériel végétal

Les 24 accessions d'*Arabidopsis* de la collection cœur ont été obtenues auprès de l'INRA de Versailles (<http://dbsgap.versailles.inra.fr/vnat/>).

Les lignées recombinantes (RIL: recombinant inbred lines) sont issues de l'autofécondation successive d'individus F2 jusqu'en F8. Elles sont générées en "single seed descent" c'est-à-dire qu'une seule lignée de descendants, dérivée d'un seul individu à chaque génération, est autofécondée d'une génération à l'autre, ce qui permet d'obtenir des lignées homozygotes (M&M Fig 1).



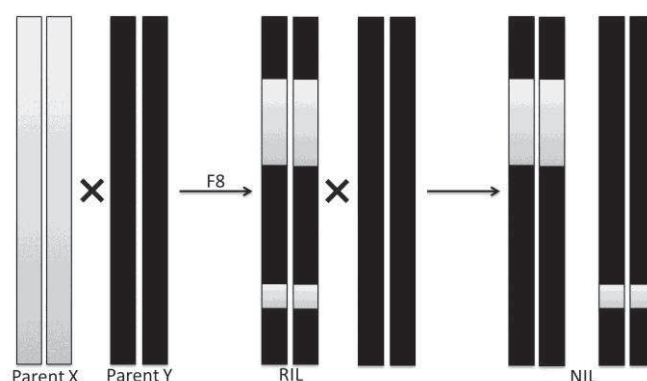
M&M Fig 1. Création d'une population de lignées recombinantes (RIL)

Les individus F2 sont menés jusqu'en F8 par autofécondation successive. Ainsi les individus en F8 sont homozygotes mais présentent une mosaïque du génome des deux parents due aux recombinaisons obtenues en F2.

Les populations de RILs issues des croisements entre Col-0 (186AV dans la collection VNAT, N1092 au NASC) et JEA (25AV), Cape Verde Islands (Cvi-1) et *Landsberg erecta* (Ler) ont été obtenues à l'INRA de Versailles (<http://dbsgap.versailles.inra.fr/vnat/>). La population de RILs issue du croisement entre Ts-5 (N22648) et MZ-0 est quant à elle

originaire du John Innes Institute (Ian Bancroft) et sont disponible auprès du NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre: www.nasc.arabidopsis.org).

Les lignées isogéniques (NIL Near Isogenic Lines) sont des lignées possédant un génotype homozygote et identique à un parent, à l'exception d'une région plus ou moins grande provenant d'un autre parent. Les NIL sont obtenues par rétrocroisements successifs d'un individu F2 ou d'une RIL avec un des deux parents originels (M&M Fig 2).



M&M Fig 2. Creation de lignées quasi isogénique (NIL)

Un individu RIL est sélectionné et rétrocroisé avec un des parents recurent (Y) pendant plusieurs générations afin d'isoler une région du génome du parent X dans un fond génétique équivalent à celui du parent (Y).

Les lignées quasi-isogéniques issues du croisement entre *Ler* et *Cvi-1*, appelé LCN, ont été développées à l'université d'Agriculture de Wageningen (Keurentjes et al., 2007). Elles sont le résultat d'introgressions de *Cvi-1* dans un fond génétique *Ler*.

Les populations F1 et F2 issues des croisements entre *Ler* (N8581) ou *Col-0* (N1092) et *RRS-7* (N22688), *Ts-1* (N22692) ou *St-0* (62AV) ainsi que celles issues des croisements *LCN1.12/Ler* et *LCN1.26/LCN1.21* ont été obtenues au laboratoire. Les plantes hétérozygotes ont été vérifiées avec le marqueur *MSAT2.5* (<http://www.inra.fr/internet/Produits/vast/msat.php>), exceptés pour les populations F1 (*LCN1.12 X Ler*) et (*LCN1.26 X LCN1.21*) qui ont été vérifiées, respectivement, avec les

marqueurs GENE A et T18A20 SLP1 (Voir liste des marqueurs Chap 1 Notes S1 et Chap 2 Tab 1). Les populations F2 ont été obtenues par autofécondation d'individus hétérozygotes.

La population F2 issue du croisement entre JEA (25AV) et Blh-1 (180AV) a quant à elle été développée par l'INRA de Versailles (<http://dbsgap.versailles.inra.fr/vnat/>)

Les 150 accessions de Nordborg utilisées pour la génétique d'association et la population recombinante MAGIC (Multiparent Advanced Generation Inter-Cross) ont été obtenues auprès du NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre: www.nasc.arabidopsis.org).

II. Matériel viral

Deux isolats du PPV ont été utilisés au cours des différentes études. L'isolat R (Rankovic) et l'isolat NAT (Non Aphid-Transmissible) font partie de la souche D (Dideron). Les constructions pICPPVnkGFP, pBINPPVnkGFP et pICPPVnkGUS contiennent la séquence nucléotidique complète du PPV-R couplé soit avec la GFP (Green Fluorescent Protein) soit avec la β -glucuronidase (GUS) (Fernandez-Fernandez et al., 2001; Jiménez et al., 2006). Les constructions pICPPVNAT1-Pst, pICPPVNATSalBam, pICPPVNATBamSac et pICPPVNATSacNde dans lesquelles chaque quart du génome du PPV-R provenant du plasmide pICPPV a été remplacé par le fragment du PPV-NAT correspondant. Le PPV étant un pathogène de quarantaine, les plantes inoculées sont confinées en serre S3, à une température moyenne de 20°C, une humidité de 60% et un éclairage quotidien d'environ 16h.

III. Technique d'inoculation

III.1. Inoculation mécanique

Les jeunes plantes d'Arabidopsis, âgées de 5 à 6 semaines post-semis, sont inoculées mécaniquement par léger frottement des feuilles à l'aide d'un inoculum constitué d'un broyat

de feuilles infectées de *Nicotiana benthamiana*. Le broyage des feuilles s'effectue dans un mortier en présence de 3 volumes d'un tampon d'inoculation (Na₃ citrate 0.5M, EDTA 0.5mM, DIECA 0.02M, pH 7.8 ajusté avec de l'acide citrique) additionné d'un abrasif, le carborundum. Cinq minutes après inoculation des feuilles, celles-ci sont rincées à l'eau pour éliminer les surplus d'inoculum. Les inoculations sont répétées à 2 jours d'intervalle.

III.2. Inoculation par biolistique

Les clones pICPPVnkGFP, pICPPVNAT1-Pst, pICPPVNATSalBam, pICPPVNATBamSac et pICPPVNATSacNde ont été introduits par biolistique dans *Nicotiana benthamiana*.

Cette technique consiste à projeter à l'aide d'un pistolet à particules, des molécules d'ADN couplées à de fines particules d'or de 1 µm de diamètre. La projection est possible grâce à la détente d'hélium sous pression (psi). Ces molécules vont pénétrer au sein des cellules végétales dans laquelle la transcription de l'ADNc infectieux viral aura lieu, donnant alors naissance à l'ARN génomique viral.

Le protocole de préparation de ce matériel est celui préconisé par Bio-Rad. Ainsi 100 µl de spermidine (50 mM) et 5 mg de billes d'or sont mélangés puis homogénéisés pendant 30 secondes à l'aide d'un vortex. Un µg de plasmide est ajouté en présence de 100 µl de CaCl₂ (1M) et le mélange est mis à incuber 10 minutes à température ambiante, puis lavé 3 fois dans 1 mL d'éthanol absolu. Le culot est resuspendu dans 600 µl de PVP-éthanol 50 µg/mL puis le mélange est placé dans un tube en Tefzel ® (Bio-Rad), et séché par flux d'azote. Ce tube est découpé en petits segments de 1 cm de long, constituant ainsi les cartouches qui seront disposées dans le barillet du pistolet à particules (Helios Gene Gun, Bio-Rad). Le tir s'effectue sous une pression de 120 psi.

III.3. Inoculation par agro-inoculation

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* C58C1 utilisée en laboratoire est dite désarmée car elle ne possède plus les gènes de pathogénicité. En revanche, elle contient un plasmide portant un gène de résistance à la tétracycline et des gènes de virulence impliqués dans le transfert du T-DNA. Cette souche a été précédemment transformée avec le clone pBINPPVnkGFP contenant la séquence du PPV-R entourée par les bordures gauches et droites d'un vecteur binaire ainsi que le gène de résistance à la Kanamycine.

Une colonie issue d'un stock glycérolé conservé à -80°C est prélevée puis mise à incuber 48h à 28°C dans 5 mL de LB (Luria-Bertani medium, MP Biomedicals, LLC: 2% bactotryptone, 0.5% extrait de levure, 10mM NaCl, 2.5 mM KCl) en présence de tétracycline 12.5 µg/mL et de Kanamycine 25 µg/mL. Les 5 mL de pré-culture sont ensuite transférées 24 h à 28°C dans 50 mL de LB supplémenté avec du MES (10mM), de l'acétosyringone (0.02 mM), de la kanamycine (0.025 µg/mL) et de la tétracycline (0.025 µg/mL). Après centrifugation du milieu de culture, le culot bactérien est rincé puis resuspendu dans une solution d'agro-infiltration (10 mM MES pH 6.3, 10 mM MgCl₂ et 150 µM d'acétosyringone). La densité optique (DO) à 600nm de la solution bactérienne est ajustée à 0.6.

Après une incubation de 3h à température ambiante, les plantes sont inoculées par scarification de la surface supérieure des feuilles avec un cure-dent préalablement trempé dans la solution bactérienne.

IV. Détection du virus

IV.1. ELISA (Enzyme-linked Immuno Sorbent Assay)

IV.1.1. Préparation de la solution d'anticorps conjugué

1.4 mg d'anticorps et 5000 unités d'enzyme (phosphatase alcaline) sont déposés dans une membrane de dialyse. Cette membrane est mise à incuber sous agitation pendant 2 heures

à 4°C, dans 1L de PBS 1X (139.9 mM NaCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 2.68 mM KCl et 8.1 mM de Na₂HPO₄), puis toute la nuit à 4°C dans un nouveau tampon PBS 1X. Le lendemain, la membrane est incubée 4h à température ambiante dans un litre de tampon PBS 1X additionné de 2.4 mL de glutaraldéhyde, La membrane est ensuite rincée pendant 2h à 4°C sous agitation dans 1L de PBS 1X puis incubée toute la nuit dans du tampon frais. Le lendemain, le dialysat est récupéré dans un tube 1.5 mL. 5 mg de BSA par mL de dialysat sont ajoutés. Le conjugué ainsi préparé est conservé à 4°C sous cette forme ou à -20°C après ajout d'un volume de glycérol 100%.

IV.1.2. Test dit "ELISA"

100 µL d'une solution d'IgG à 1 mg/mL diluée au 1/1000 dans un tampon carbonate 1X (15 mM Na₂CO₃, 30 mM NaHCO₃) sont déposés dans chacun des puits d'une plaque 96 puits qui est alors mise à incuber 3 à 5 heures à 37°C. Celle-ci est ensuite rincée 3 fois 3 minutes avec du tampon PBS-Tween (139.9 mM NaCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄ et 0.05% v/v Tween 20). Les échantillons végétaux sont broyés dans un tampon PBS-Tween-PVP 1X (2% p/v PVP_{25K}) selon un rapport p/v de 1/3, puis 100 µL de ce broyat sont déposés en duplicat dans les puits de la plaque. Après une incubation d'une nuit à 4°C, la plaque est de nouveau rincée 3 fois 3 minutes avec du tampon PBS-Tween. Ensuite 100 µL d'anticorps conjugué dilué au 1/1000 dans un tampon PBS-Tween-PVP-Ovalbumine (0.2% p/v d'ovalbumine) sont déposés et l'ensemble est mis à incuber 3h à 37°C. Après un dernier rinçage de 3 fois 3 minutes avec du tampon PBS-Tween, 100 µl de substrat Para-nitrophényl-phosphate (pNPP, Sigma 104® Phosphatase Substrate, Sigma-Aldrich®, 4mg/mL) dilué dans un tampon "substrat" (9.7% v/v diéthanolamine, pH ajusté à 9.8 avec du HCl) sont déposés. La coloration jaune due à la transformation du substrat en para-nitrophénol, par l'activité de la phosphatase alcaline, est mesurée à une longueur d'onde de

405 nm à l'aide d'un spectrophotomètre à plaque (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek®).

Les résultats sont ensuite normalisés par rapport à la valeur de DO_{405nm} associée à un broyat de *Nicotiana benthamiana* infecté déposé sur chaque plaque.

IV.2. Extraction d'ARN selon la méthode dite de Bertheau et RT-PCR

IV.2.1. Extraction des ARN totaux

Un échantillon de feuilles (0.3g) est broyé dans 1.2 mL de PBS-Tween-PVP-DIECA (139.9 mM NaCl, 1.47 mM KH_2PO_4 , 2.68 mM KCl, 8.1 mM Na_2HPO_4 , 0.05% v/v Tween 20, 2% p/v PVP_{25K} et 0.45% de DIECA 20 mM). Après centrifugation de 10 minutes à 13000 rpm, 200 μ L de surnageant sont prélevés et ajoutés de 20 μ L de SDS 10%. Après homogénéisation et incubation 15 minutes à 55°C, 100 μ L d'acétate de potassium 3M sont ajoutés et le mélange est déposé 5 minutes dans la glace. Après centrifugation 5 minutes à 13000 rpm. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube et 700 μ L de NaI 6M sont ajoutés. 5 μ L de silice sont additionnés à ce mélange conservé alors 10 minutes à température ambiante puis centrifugé 10 secondes à 5000 rpm. Le culot de silice est lavé deux fois avec 500 μ L de solution de lavage (20 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM NaCl ainsi qu'un volume égal d'éthanol absolu), séché au speed vac 10 minutes sans chauffage, puis repris dans 400 μ L d'eau stérile. L'ensemble est ensuite mis à incuber 5 minutes à 55°C et centrifugé 2 minutes à 13000 rpm. 300 μ L de surnageant sont transférés dans un nouveau tube puis conservés à -20°C (Bertheau et al.).

IV.2.2. RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction)

Le mélange RT-PCR se compose, pour un volume final de 25 μ L de 2.5 μ L d'ARN totaux, 0.3% (v/v) de triton X100, 1X de tampon DyNAzyme™ EXT (50 mM Tris-HCl (pH 9.0 at 25 °C), 1.5 mM $MgCl_2$, 15 mM $(NH_4)_2SO_4$ and 0.1 % Triton® X-100), 0.25 mM dNTP,

1 μ M d'amorce sens, 1 μ M d'amorce anti-sens, 1.5 unité d'enzyme transcriptase inverse (AMV Reverse Transcriptase, Finnzymes, ThermoScientific) et 0.1 unité de Taq polymérase (DyNAzyme™ EXT DNA Polymerase, Finnzymes, ThermoScientific)

Le programme de RT-PCR se déroule de la façon suivante:

- Transcription inverse à 45°C pendant 15 minutes
- Dénaturation initiale à 92°C pendant 30 secondes
- 40 cycles
 - Dénaturation à 92°C pendant 30 s
 - Hybridation à la température déterminée par le couple d'amorce pendant 30 s
 - Elongation à 72°C pendant 40 s
- Elongation finale à 72°C pendant 5 minutes

Les amorces qui ont servi à la caractérisation des recombinants viraux PPV R/NAT sont présentées dans le tableau 1 ci-dessous:

Nom	Amorces	Clone Viral vérifié
P3D	ACATTGCGGAGACAGCACTG	pICPPVNATBamSac
P4B	TGCCTTCAAACGTGGCACTG	
5PRc	AAAATATAAAAACTCAAC	pICPPVNAT1-Pst
HC-rev	AAGCTGCATATTGACATGTGC	
seq2CI	CACAGTCGATTTTGTGCTGC	pICPPVNATSalBam
Seq1ANIa	GATTACCTCTGAGTCACGC	
Seq6ANIlb-fw	TCTGAGACAGAAATTGAGCG	pICPPVNATSacNde
LD-rev1-P1790	TTTTTTTTTTTTTGCTCTTGCAC	

M&M Tab 1. Amorces spécifiques de chacun des recombinants viraux

IV.3. Visualisation des virus marqués

IV.3.1. Observation de la fluorescence associée à la GFP

La séquence virale du PPV-R est fusionnée au gène codant pour la GFP dans le cas des clones pICPPnkGFP et pBINnkGFP, la fluorescence émise par cette protéine a été visualisée sous loupe binoculaire (Leica Microsystems, MZ FLIII, Suisse). Cette loupe est équipée d'un filtre avec une fenêtre d'excitation à 470+/-20nm et d'une fenêtre d'émission à 525+/-25nm.

IV.3.2. Observation de la réaction histochimique liée au gène GUS

La séquence virale du PPV-R est fusionnée avec le gène GUS codant pour la β -glucuronidase. Les tissus prélevés sont trempés dans une solution contenant le substrat chromogène X-Gluc (50 mM NaH_2PO_4 (pH7), 0.01% Tween 20, 10 mM Na_2EDTA et 0.3 % (p/v) d'acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronique). Les échantillons sont placés sous vide 3 fois 5 minutes puis incubés à 37°C pendant 24H. Le substrat est alors clivé par l'activité de la β -glucuronidase (Jefferson et al., 1987) et des "plages" bleues correspondant aux zones où le virus est présent, sont visualisées. Cette visualisation est facilitée par un traitement à l'éthanol 70% qui décolore les tissus chlorophylliens.

V. Génotypage

V.1. Extraction d'ADN en plaque

Les tissus à broyer sont disposés en présence d'une bille de plomb dans chacun des puits d'une plaque 96 puits et maintenus dans l'azote liquide. A l'aide d'un agitateur mécanique, les tissus sont broyés 2 fois 30 secondes à une fréquence de 25 mouvements par seconde. 400 μL d'une solution de tampon d'extraction (200 mM Tris-HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA et 0.5% SDS) sont ajoutés au broyat et le tout est homogénéisé avec l'agitateur mécanique. Ce mélange est centrifugé 20 minutes à 5500 rpm puis 200 μL du surnageant sont transférés dans 200 μL d'isopropanol froid. La précipitation de l'ADN se fait à température ambiante pendant 10 minutes puis la solution est centrifugée 20 minutes à 5500 rpm. Le surnageant est éliminé et les culots sont lavés avec 500 μL d'éthanol 70%, séchés et repris dans 200 μL d'eau stérile.

V.2. Amplification d'ADN par PCR (Polymerase Chain Reaction)

Le mélange réactionnel des PCR est composé de 10 ng d'ADN génomique, 1X de standard *Taq* reaction buffer (10 mM Tris-HCl, 50 mM, KCl 1.5 mM, MgCl_2 , pH 8.3,

Biolabs), 0.25 mM dNTP, 1 μ M d'amorce sens, 1 μ M d'amorce anti-sens, 0.25 unité d'enzyme Taq polymerase (Biolabs) dans un volume final de 12 μ L.

Le programme de PCR se déroule de la façon suivante:

- Dénaturation initiale à 92°C pendant 2 minutes
- 35 à 40 cycles
 - o Dénaturation à 92°C pendant 40 s
 - o Hybridation à la température déterminée par le couple d'amorce, pendant 40s
 - o Elongation à 72°C pendant 40 s
- Elongation finale à 72°C pendant 5 minutes

V.3. Gels d'agarose

Les acides nucléiques sont chargés négativement. Dans un champ électrique, ils migrent donc vers l'anode. Ils sont séparés selon leur taille lors de leur migration dans un gel d'agarose (constitué d'agarose en poudre dilué dans du TBE 1X: Tris 89 mM pH 8.3, Borate 89 mM, EDTA 20 mM). La concentration du gel est comprise entre 2 et 4% (inversement proportionnelle à la taille du fragment attendu), dans lequel est ajouté du Bromure d'Ethidium (BEt 0.5 μ g/mL), molécule s'intercalant entre les bases de l'ADN et permettant la visualisation des acides nucléiques sous lumière UV.

Les échantillons (5 μ L du produit PCR) sont déposés en présence de 2 μ L de tampon de charge Orange (0.5% orange G, 30% glycérol). La migration se fait sous une tension comprise entre 90 et 120V dans une cuve d'électrophorèse en présence de tampon TBE 1X.

V.4. Géotypage par HRM

La méthode de HRM (High Resolution Melting Curve) permet de distinguer deux amplifiats PCR en fonction de leurs séquences, longueurs ou teneurs en GC. Elle peut différencier jusqu'à deux molécules d'ADN ne possédant qu'un seul acide nucléique de différence. Chaque produit d'ADN double brin synthétisé à une température de fusion (ou

T_m) spécifique, définie comme la température à laquelle la moitié de l'ADN est sous forme de double brin (l'autre moitié étant sous forme de simple brin). Cette température de fusion est fonction de la teneur en GC de l'amplifiat et de sa longueur. A l'aide d'un appareil de type LightCycler 480 (Roche) et d'une sonde fluorescente type Eva GREEN il est possible de suivre la diminution de la fluorescence lors de la dénaturation des amplifiats PCR.

Le mélange réactionnel de la HRM est composé de 2 µL d'ADN génomique, 1X de tampon 2X Master Mix (contenant: HotStarTaq Plus DNA Polymerase, EvaGreen dye, Q-Solution, dNTPs, et une concentration optimisée de MgCl₂), 0.2 µM d'amorce sens, 0.2 µM d'amorce anti-sens, 2.5 mM MgCl₂ dans un volume final de 20 µL.

Le programme de la HRM se déroule en deux étapes:

Etape d'amplification

- Dénaturation initiale 95°C pendant 10 minutes
- 50 cycles
 - o Dénaturation à 95°C pendant 30 s
 - o Hybridation à la température déterminée par le couple d'amorce pendant 30 s
 - o Elongation à 72°C pendant 30 s

Etape HRM

- 95°C pendant 1 minute
- 40°C pendant 1 minute
- 70°C à 90°C (+15°C/min) durée en fonction de la longueur et du %GC du fragment
- 40°C pendant 10 s

V.5. Séquenceur ABI 3730

Le séquenceur ABI 3730 (Applied Biosystem) utilise une technologie d'électrophorèse capillaire pour séparer les fragments d'ADN. La réaction d'amplification a été réalisée à l'aide d'amorces marquées avec les sondes fluorescentes FAM ou VIC dans le but de générer des amplifiats possédant une fluorescence spécifique. Le séquenceur dispose de laser pour détecter les émissions fluorescentes successives des fragments pendant leur migration dans les capillaires, permettant ainsi de réaliser la détection de plusieurs marqueurs simultanément.

V.6. Marqueurs utilisés

Le génotypage des populations F1 et F2 issues des croisements entre *Ler* (N8581) ou Col-0 (N1092) et RRS-7 (N22688), Ts-1 (N22692) ou St-0 (62AV) a été réalisé à partir d'un groupe de 100 marqueurs disponibles sur le site du TAIR (www.arabidopsis.org) et distribués tout au long du génome d'*Arabidopsis*. Leur polymorphisme a été mis en évidence sur les accessions *Ler*, RRS-7, Ts-1 et St-0. De plus, de nouveaux marqueurs appelés BSATX.YY (X faisant référence au chromosome et YY à la position du marqueur) ont été développés au laboratoire (Cosson *et al.* unpublished data).

La population F2 JEA x Blh-1 a été génotypée à l'aide de 14 marqueurs développés au laboratoire, complétés par 11 marqueurs issus de la base de données MSAT (<http://www.inra.fr/vast/msat.php>) (Voir Chap 3 Tab S1).

La population F2 LCN1.12 x *Ler* a été testée avec trois marqueurs marqués avec des sondes fluorescentes FAM ou VIC et discriminées en triplex sur un séquenceur ABI 3730.

En ce qui concerne les populations de lignées recombinantes, le génotypage de la population F8 Ts-5 x MZ-0 a été réalisé à l'aide de 84 marqueurs par l'équipe de Ian Bancroft comme suit: (<http://www.jic.ac.uk/staff/ian-bancroft/arabidopsis-populations.htm#TJ>). La population recombinante F8 JEA x Col-0 a été génotypée par la Station de Génétique et d'Amélioration des Plantes UR254 de l'INRA de Versailles avec 87 marqueurs dont 81 SNP (Single Nucleotide Polymorphism) (Simon *et al.*, 2008). De plus 9 marqueurs additionnels polymorphes dans cette population et co-localisant avec *rpv1* ont été ajoutés à la carte génétique (Voir Chap 2 Tab 1 et Fig 2).

Dans le cas de lignées isogéniques LCN, elles ont été génotypées à l'aide de 20 marqueurs (voir Tableau 1 chapitre 2). Les marqueurs SSR (single sequence repeat) ont été développés à partir des séquences des BAC d'*Arabidopsis* à l'aide du logiciel Sputnik (<http://www.cbib.u-bordeaux2.fr/outils/Pise/sputnik.html>). Les marqueurs SSLP (Simple

sequence length polymorphism) et SNP sont issus des bases de données monsanto sur le polymorphisme d'*Arabidopsis* ainsi qu'à partir des collections de séquences de *Ler* (<http://www.arabidopsis.org/browse/Cereon/index.jsp>). Les marqueurs ISBP (Insertion Site-Based Polymorphism) ont été identifiés à partir de la séquence génomique de Col-0 soumise au logiciel ISBP finder (Paux et al., 2010). L'ensemble des amorces entourant les régions répétées ou les sites polymorphes ont été générés à l'aide du programme Primer version 0.5 (National Biosciences, Plymouth, Minnesota) avec un T_m (température de fusion) de 57.5°C.

L'ensemble des marqueurs de type SSR ou SSLP a été amplifié par PCR (voir M&M partie V.2) et séparé sur gel d'agarose (voir M&M partie V.3). Les marqueurs de type SNP et ISBP ont quant à eux été discriminés par HRM (voir M&M partie V.4).

VI. Analyse statistique, recherche et cartographie de QTL

VI.1. Analyse statistique et étude des phénotypes

Les analyses descriptives ont été réalisées à l'aide du logiciel R (<http://www.R-project.org>). Nous avons utilisé le test de Levene's pour déterminer l'homogénéité des variances entre les différents blocs de chaque expérimentation. Dans le cas de variance homogène une ANOVA a été utilisé pour vérifier l'homogénéité des moyennes (entre les blocs), dans le cas contraire le test non paramétrique de Kruskal Wallis a été utilisé.

L'héritabilité a été estimée par un modèle à effet aléatoire: $y_{ij} = \mu + \lambda_i + b_j + e_{ij}$, où y_{ij} est le phénotype mesuré sur les répliques (j) de l'ensemble des lignées (i), μ est la moyenne globale, b_j représente l'effet bloc, λ_i représente l'effet génotypique de la lignée ou de l'accession et e_{ij} est la variation issue d'autres causes. Une ANOVA nous a permis de déterminer l'effet spécifique des génotypes et l'héritabilité au sens large. Il s'agit du ratio entre la variance génétique et phénotypique totale estimé selon la formule suivante: $h^2 = \sigma_g^2 / [\sigma_g^2 + (\sigma_e^2/n)]$ où σ_g^2 est la variance génétique, σ_e^2 est la variance environnementale et n le nombre de répliques. Dans ce cas-là, nous avons utilisé les carrés moyens comme estimateur des variances.

L'ensemble des analyses ne présentaient pas de distribution normale, l'emploi de méthode de transformation des données du type racine, logarithme (Log) et logarithme népérien (ln) ont été testées mais n'ont pas permis d'améliorer la normalité des données. Par conséquent, nous avons mené l'ensemble des analyses à l'aide de test paramétriques et non-paramétriques.

VI.2. Lignées biparentales

VI.2.1. Cartes génétiques

Les cartes génétiques ont été réalisées à l'aide du logiciel JoinMap (Van Ooijen and Voorrips, 2001). La fonction Kosambi a été utilisée pour convertir les fréquences de recombinaison en distance génétique (Kosambi, 1943). Le ratio de ségrégation des génotypes a d'abord été évalué par un test d'ajustement du khi-deux (χ^2) en utilisant la commande "*locus genotype frequency*". Les groupes de liaison ont ensuite été créés en utilisant la commande "*LOD grouping*" avec comme seuil un logarithme de vraisemblance (LOD) minimum de 5 ou de 3. Une fois les groupes établis, la carte génétique de chacun d'entre eux a été construite, en utilisant une fraction de recombinaison maximale de 0.3 et un LOD score minimal de 1.0 avec un seuil de retrait des *loci* en rapport au bon ajustement de 5 ou de 3. Dans certains cas, l'ordre des *loci* a pu être fixé par la commande "*fix order*"

VI.2.2. Détection et cartographie de QTL

La détection des QTL a été réalisée à l'aide des logiciels MapQTL version 3 (Ooijen et al., 1996) ou version 6 (www.kyazma.nl). En raison d'écarts à la normalité des distributions étudiées, la détection de QTL a été réalisée en associant des analyses non paramétriques de type Kruskal Wallis avec des analyses paramétriques telles que la cartographie d'intervalle simple (Interval Mapping IM) et composite (Composite Interval Mapping CIM). Des tests de

permutation ont été réalisés pour calculer les seuils limites de détection au niveau des chromosomes et du génome entier.

VI.2.3. Meta-analyse QTL

Le logiciel BioMercator V3 (en cours de développement, Sosnowski et Joest, non publié) (Arcade et al., 2004) a été utilisé pour la méta-analyse QTL. L'analyse a été réalisée en trois étapes, la première consistant à générer une carte génétique consensus à partir de projections itératives des cartes génétiques prise deux à deux. Puis chaque QTL détecté dans les différentes populations a été projeté sur cette carte consensus. Et enfin l'algorithme de méta-analyse implémenté par (Goffinet and Gerber, 2000) évalue la consistance des QTL détectés avec un modèle incluant le nombre de méta-QTL, leurs positions respectives et les intervalles de confiance.

VI.3. Lignées multi-parentales

La procédure de scan génomique permettant de mettre en évidence les locus impliqués dans le déterminisme génétique du trait a été réalisée comme décrit par Kover *et al* 2009. La première étape de l'analyse est basée sur une reconstruction probabilistique de la mosaïque des haplotypes de chaque lignée multi-parentale.

Ensuite, en supposant l'existence d'un QTL ségrégant au locus L dont l'effet phénotypique est dû à un individu fondateur " s " est " β_s ", le phénotype " y " de la lignée " i " s'exprime de la manière suivante: $y_i = \sum (P_{is}^{(L)} \beta_s + e_i)$ où $P_{is}^{(L)}$ est la probabilité qu'un locus L , la lignée " i " soit issu du fondateur " s ". Cela permet de calculer la probabilité, pour un individu donné, d'être l'individu fondateur (parent) à un locus donné, pour une lignée multi-parentale donnée et par conséquent de déterminer la contribution de chaque parent pour chaque QTL détecté. Le génome est ensuite parcouru pour déterminer la présence de QTL à chaque position de SNP en utilisant le modèle à effet fixe décrit plus haut. La significativité

statistique du scan du génome à chaque locus L est résumé par $\log P(-\log_{10}(\text{ANOVA P-value}))$.

Du fait que certains fondateurs ne peuvent être distingués à certains locus, l'effet phénotypique des différents fondateurs est estimé de la manière suivante: 100 matrices $X^{(1)}$, $X^{(2)}$, ..., $X^{(M)}$ sont tirées parmi la distribution des matrices $P(L)$ et un modèle linéaire $y = X^{(k)}b + e$ est ajusté pour chaque matrice. L'effet phénotypique imputé est alors calculé en moyennant les effets estimés, notés $b^{(k)}$. Nous avons utilisé les fonctions R mises au point par les auteurs pour réaliser le scan génomique (<http://mus.well.ox.ac.uk/magic/>).

Kover et al. (2009), ont aussi mis en place une méthode prenant en compte la structure à l'aide d'un modèle bayésien mais les auteurs démontrent un effet négligeable de la structure sur la valeur des p-value observées, par conséquent nous avons retenu le modèle à effet fixe décrit précédemment.

VI.4. Génétique d'association

Les résultats obtenus ont été traités soit comme des données qualitatives considérant une réponse de manière binaire (0 ou 1), soit comme des données quantitatives tenant compte des effets polygéniques.

A partir des données qualitatives (binaires) le test exact de Fisher, a été utilisé pour estimer la significativité de l'association possible entre chaque allèle et chaque phénotype à chaque locus. Puis, sur les données quantitative trois types d'analyse ont été réalisées, dans un premier temps un test non-paramétrique de Wilcoxon nous a permis de comparer les distributions de phénotype entre chaque allèle à chacun des locus. Dans un deuxième temps, une analyse de régression a été mise en place en utilisant le logiciel PLINK (Purcell et al., 2007) (<http://pngu.mgh.harvard.edu/purcell/plink/>) $y = \beta_0 + X_1\beta_1 + \varepsilon$ où β_0 représente le phénotype de l'accèsion, X_1 est le coefficient estimé par le modèle, β_1 l'effet fixe du SNP et ε la variation due aux effets non génétiques.

Mais, comme l'ensemble de ces méthodes ne permettent pas d'éviter les faux positifs résultant de la structure de la population, nous avons utilisé dans un troisième temps la méthode EMMA (Kang et al., 2008) basée sur un modèle mixte tenant compte de la structure de la population. Le modèle utilisé dans cette méthode s'écrit de la manière suivante:

$y = X\beta + Zu + e$ où y représente le vecteur des phénotypes, X contient les effets fixes de la moyenne et de chaque SNP, avec β le vecteur des coefficients des effets fixes, Z est une matrice attribuant chaque phénotype à l'accession et enfin " u " est l'effet aléatoire du modèle mixte tel que $\text{Var}(u) = \sigma^2 gK$, K étant la matrice d'apparentement décrivant la relation génétique entre chaque individu. La matrice des similarités génotypiques a été calculée à partir d'un sous-groupe de 1000 SNP répartis de manière régulière au sein des 214 000 SNP.

L'extraction des génotypes à partir des données initiales publiées sur le web, le test de Fisher, le test de Wilcoxon et le tirage de SNPs ont été réalisés à l'aide de programmes R mis en place au laboratoire.

VII. Virus induced gene silencing (VIGS)

VII.1. Culture des souches

La souche d'*Agrobacterium tumefaciens* a été précédemment transformée avec les clones TRV-RNA1, TRV-RNA2-Cherry contenant un fragment de génome de cerisier servant de contrôle négatif, TRV-RNA2-NbPDS servant de contrôle positif contenant un fragment de la phytoène desaturase dont le silencing provoque un blanchiment des feuilles. Et enfin les clones TRV-RNA2-PGK3 et TRV-RNA2-PGK5 Contenant respectivement les parties 3' et 5' de la cPGK de *Nicotiana benthamiana*.

L'ensemble des antibiotiques utilisés pour la sélection de ces différents clones sont récapitulés dans le tableau 2 ci-dessous:

Constructions	Antibiotiques
TRV-RNA1	Carbenicilline (50µg/mL), Streptomycine (50µg/mL), Rifampicine (25µg/mL) Kanamycine (50µg/mL)
TRV-RNA2-Cherry	Rifampicine (25µg/mL), Ampicilline (50µg/mL), Kanamycine (50µg/mL)
TRV-RNA2-NbPDS	Carbenicilline (50µg/mL), Streptomycine (50µg/mL), Rifampicine (25µg/mL) Kanamycine (50µg/mL)
TRV-RNA2-PGK3	Rifampicine (25µg/mL), Ampicilline (50µg/mL), Kanamycine (50µg/mL)
TRV-RNA2-PGK5	Rifampicine (25µg/mL), Ampicilline (50µg/mL), Kanamycine (50µg/mL)

M&M Tableau 2. Liste des marqueurs de sélections pour les différents clones utilisés lors du VIGS

L'ensemble de ces clones bactériens sont mis en pré-culture 24 heures à 28°C sous agitation, dans un milieu liquide LB supplémenté avec les antibiotiques correspondants. 1/10 du volume des pré-cultures est mis en culture 24 heures à 28°C sous agitation, dans un milieu liquide LB sélectif supplémenté en (MES 10mM pH 5.6 et Acétosyringone 20µM). Chaque culture est centrifugée 10 minutes à 5000 rpm puis les culots sont resuspendus dans un milieu d'agro-infiltration (10 mM MgCl₂, 10 mM MES pH5.6, 150 µM Acétosyringone). La DO à 600 nm est ajusté à 1. Les clones TRV-RNA1 et TRV-RNA2 sont mélangés à volume égal, et laissés à incuber à température ambiante au minimum 2 heures. Les suspensions bactériennes ainsi obtenues sont infiltrées à l'aide d'une seringue sur la face inférieure d'une feuille de *Nicotiana benthamiana*. Les plantes ainsi traitées sont mises à l'abri de la lumière pendant 24 h. Douze jours après induction du silencing, les jeunes feuilles sont inoculées mécaniquement avec le PPV, six jours plus tard les feuilles inoculées sont prélevées pour réaliser l'extraction des ARN totaux.

VII.2. Extraction des ARN totaux et synthèse des ADNc

Les ARN totaux des feuilles de *Nicotiana benthamiana* ont été extraits à l'aide du kit SV Total RNA Isolation System® de Promega Biosciences, LLC (selon les indications du

fournisseur). Puis à partir de ces ARN, les ADN complémentaires (ADNc) ont été synthétisés à l'aide du kit Superscript II® reverse transcriptase (Invitrogen™).

VII.3. PCR temps réel

L'accumulation des transcrits issus du gène de la cPGK codant pour la phosphoglycerate kinase chloroplastique ainsi que l'accumulation virale ont été estimées par une technique de PCR en temps réel. Le Sybr Green I est une molécule intercalante de l'ADN double brin. L'émission de la fluorescence est mesurée à la fin de chaque étape d'élongation, par un système de lecture intégré à l'appareil de PCR en temps réel. Au cours des cycles, la fluorescence émise augmente proportionnellement au nombre de copies d'ADN amplifiées. Elle est donc directement liée à la quantité initiale et au nombre de cycles de PCR.

Le mélange PCR temps réel se compose, de 10ng d'ADNc, 1X de SYBR® Green MasterMix (2X), contenant la FastStart Taq DNA polymérase, les dNTP, le tampon réactionnel, du SYBR Green 1 et 5mM MgCl₂ (Roche Applied Science), 0.5µM d'amorce sens et 0.5µM d'amorce anti-sens. La réaction de PCR temps réel est réalisée à l'aide d'un LightCycler® 480

Le programme de PCR temps réel se déroule de la façon suivante:

- Activation: 95°C pendant 5 minutes
- PCR 40 cycles
 - Dénaturation: 95°C pendant 30 secondes
 - Hybridation: 60°C pendant 40 secondes
 - Elongation: 72°C pendant 45 secondes (Etape d'acquisition de la fluorescence)
- Elongation finale: 72°C pendant 10 minutes
- Courbe de Fusion
 - 95°C pendant 10 secondes
 - 55°C pendant 10 secondes
 - 55°C à 95°C (Acquisition continue de la fluorescence)

L'accumulation virale a été quantifiée à l'aide des amorces P1/P2, celle des transcrits de la cPGK a été mesurée à l'aide des amorces PGK-F/PGK-R et pour comparer les résultats obtenus, les réactions de PCR temps réel ont été normalisées à l'aide d'un gène de ménage, le

facteur d'élongation 1 de *Nicotiana. benthamiana* (NbEF1) (séquence des amorces disponible dans le M&M Tab 3).

L'efficacité de la PCR (chimie SYBR GREEN) a été calculée et validée initialement en utilisant une gamme d'ADNc pour les trois cibles en dilution sériée (1, 10, 10², 10³, 10⁴ copies).

Amorces	Séquence
P1	ACCGAGACCACTACACTCCC
P2	CAGACTACAGCCTCGCCAGA
PGKq-F	GCCTTCTGTTGCAGGTTTCC
PGKq-R	ATTCCTCCACCCAAAAGCAA
EF1-F	GATTGGTGGTATTGGAAGTCTC
EF1-R	AGCTTCGTGGTGCATCTC

M&M Tab 3. Amorces utilisées pour les réactions de PCR temps réel

VIII. Construction des clones recombinants PPV-R/NAT

VIII.1. Amplification des fragments de PPV-NAT par immunocapture et RT-PCR

L'immunocapture permet de piéger directement à l'aide d'un anticorps spécifique le virus présent dans une plante infectée, avant d'amplifier des segments de son génome par RT-PCR. Elle est réalisée de la manière suivante:

Adsorption des IgG anti-PPV (50 µL d'IgG à 2 µg/mL dans un tampon NaHCO₃ 34 mM, Na₂CO₃ 15mM, pH 9.6) dans des microtubes stockés à 4°C pendant une nuit. Le lendemain cette solution est transférée dans un nouveau microtube qui sera stocké à 4°C pour une utilisation ultérieure, le microtube initial est lavé trois fois avec 150 µL de tampon PBS-Tween (139.9 mM NaCl, 1.47 mM KH₂PO₄, 2.68 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄ et 0.05% v/v Tween 20). Le microtube contenant 50 µL d'extrait de plante infectée, obtenu par broyage de feuilles infectées dans un tampon PBS-Tween-PVP 1X (2% p/v PVP25K) selon un rapport (v/p) de 1/3, est incubé 3 heures à 37°C ou toute la nuit à 4°C. Après trois lavages avec 150 µL de tampon PBS-Tween, la réaction de RT-PCR peut être réalisée

Les différents fragments PPV-NAT ont été obtenus à l'aide des amorces suivantes:

Nom	Fragment	Amorces Sens	Amorces Anti-Sens
RT-PCRa	1-2926	AAAATATAAAACTCAACAC	TCCTGCAGATAACTTTTTTCTACC
RT-PCRb	3633-6936	CTCAATAAACTCAAAGGC	CCAAGTGTGCTTTCATG
RT-PCRc	6936-8981	GGATGAAGTTTGCTGG	CTATGCACCAAACC
RT-PCRd	8982-9654	GAACCTTTTACAGTGCCAC	TTTTTTTTTTGTCTCTTGC

M&M Tab 4. Amorces utilisées pour générer les différents fragments PPV-NAT

VIII.2. RT-PCR (Titan One - Roche)

Deux mélanges réactionnels sont ajoutés, a volume égal, successivement dans chaque tubes, le premier composé de 10mM dNTP, 100ng/μL amorce sens, 100ng/μL amorce anti-sens, 100mM DTT, H₂O qsp 10μL et le deuxième composé de 1X de RT-PCR Reaction Buffer (5X, contenant 7.5 mM de MgCl₂), 1μL Titan Enzyme Mix (Expand High Fidelity Enzyme Blend et AMV Reverse Transcriptase, Roche Applied Science), H₂O qsp 10μL.

Le programme de RT-PCR se déroule de la façon suivante:

- Transcription inverse à 45°C pendant 45 minutes
- Dénaturation initial à 94°C pendant 2 minutes
- 4 cycles
 - o Dénaturation à 92°C pendant 30s
 - o Hybridation à 44°C pendant 40s
 - o Elongation à 68°C pendant 2'30"
- 20 cycles
 - o Dénaturation à 92°C pendant 30s
 - o Hybridation à 44°C pendant 30s
 - o Elongation à 68°C pendant 2'20" plus 5s par cycles
- Elongation finale à 68°C pendant 8 minutes

VIII.3. Purification des produits obtenus

Afin de faciliter le clonage, les dimères d'amorces ont été éliminés grâce à l'utilisation du kit MinElute ® (Quiagen) selon les indications du fournisseur.

VIII.4. Purification sur gel (Freeze and Squeeze)

Pour contrôler la qualité de la PCR, les produits d'amplification sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose. Après migration, le gel est placé sous la lampe à UV. Si la bande des produits d'amplification apparaît bien au poids moléculaire (PM) attendu, la bande d'intérêt est excisée du gel à l'aide d'une lame de rasoir. Les bandes obtenues sont mises en présence d'un mL du tampon F/Z (AcNa 0.3M pH 7, EDTA 0.5M). Le tout est incubé 30 minutes à température ambiante, puis les bandes de gel sont découpées en morceaux et placées dans un microtube 0.5mL percé à son extrémité inférieure et contenant de la gaze. Après un passage de 30 secondes dans l'azote liquide, les microtubes sont transférés dans des tubes 2 mL, pour être centrifugés 15 minutes à 12000 rpm. Les fragments d'ADN ainsi obtenus, sont mélangés avec une solution d'acétate de sodium (AcNa) 3M (1/10 du volume) et d'éthanol 100% (2.5 fois le volume) puis incubés une nuit à -20°C. Après centrifugation et élimination du surnageant, le culot est repris dans l'eau.

VIII.5. ADN ligase du bactériophage T4

Cette enzyme catalyse la liaison covalente entre deux molécules d'ADN. Elle est capable de lier entre elles des extrémités franches ou cohésives. Elle utilise l'ATP comme cofacteur. La réaction est réalisée dans un volume de 20 µL pendant une nuit à 14°C, en présence d'une unité d'enzyme pour 50 à 200 ng de vecteur, dans un tampon recommandé par le fournisseur (Invitrogen)

VIII.6. Souche bactérienne

La bactérie Gram(-) *Escherichia coli* a été utilisée comme organisme de clonage lors de ce travail. La souche employée, DH5α: F⁻ Φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17 (rK⁻, mK⁺) phoA supE44 λ⁻ thi-1 gyrA96 relA1 (Invitrogen)

VIII.7. Transformation d'E coli par choc thermique

Un aliquot de la souche bactérienne est décongelé sur glace, avant d'y ajouter, 10 à 50 ng d'ADN ou environ ¼ de la solution de ligation (5 µL). Ce mélange est incubé dans de la glace pendant 30 min. Après un passage à 42°C pendant exactement 45 secondes, le tube est mis 2 min dans la glace. Le mélange est resuspendue, stérilement, avec 500 µL de milieu SOC puis incubé 1 heure à 37°C. Le tout est étalé sur une boîte de Pétri contenant l'antibiotique de sélection adéquat. Placer dans l'incubateur toute la nuit à 37°C.

VIII.8. Milieux de culture

Les bactéries *E. coli* sont cultivées à 37°C sur un milieu complet LB (Luria-Bertani medium MP Biomedicals, LLC : 2 % bactotryptone, 0.5 % extrait de levure, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl) liquide sous agitation ou solide (addition de 1.5% d'agar bactériologique, Euromedex). Après autoclavage à 120°C pendant 20 minutes, le milieu est supplémenté en ampicilline (50µg/mL).

VIII.9. Purification d'ADN plasmidique d'E. coli

Les plasmides sont extraits par la méthode de la lyse alcaline (Sambrook et al., 1989) à partir d'une culture bactérienne en phase stationnaire. En routine, le plasmide ainsi purifié est analysé par électrophorèse, après digestion par des enzymes de restriction.

Pour le séquençage, les plasmides sont extraits grâce à l'utilisation du kit WIZARD ® plus SV DNA purification system (Promega). Cette méthode, plus rapide, est basée sur la chromatographie sur colonne de silice et permet un meilleur rendement.

VIII.10. Enzyme de restriction

Les enzymes de restriction reconnaissent spécifiquement une courte séquence d'ADN bicaténaire (le plus souvent un palindrome de 4 à 6 nucléotides) et coupent la molécule à ce niveau. Elles sont utilisées lors des clonages pour préparer le(s) plasmide(s) et/ou le(s)

fragment(s) d'ADN à insérer. De plus elles servent à valider les plasmides réalisés par des digestions spécifiques. Le temps d'incubation et la quantité d'enzyme à utiliser dépendent de la quantité d'ADN à digérer. En général, 1µg d'ADN plasmidique est coupé par 5 unités d'enzyme après 1 heure d'incubation à la température préconisée.

VIII.11. Génération des Clones infectieux

VIII.11.1. Clones intermédiaires

Le fragment PPV-NAT (1-2926) a été digéré avec l'enzyme de restriction PstI et cloné dans le vecteur p35SeNosB préalablement digéré par StuI/PstI, pour obtenir le clone intermédiaire p35SeNosBNAT1-Pst. Le deuxième fragment PPV-NAT (3633-6936) et le vecteur pUC18 ont été digérés avec BamHI/SalI puis ligués ensemble pour former le clone intermédiaire pUCPPVNATSalBam. Le troisième fragment PPV-NAT (6936-8981) et le vecteur pUC18 ont été digérés avec BamHI/SacI puis ligués ensemble pour former le clone intermédiaire pUCPPVNATBamSac. Et enfin le dernier fragment PPV-NAT (8982-9654) digéré avec SacI a été cloné dans le pUC19 digéré par SmaI/SacI pour obtenir le clone intermédiaire pUCPPVNATSacend.

VIII.11.2. Clones infectieux

Le premier clone infectieux, pICPPVNAT1-Pst, est issu d'une triple ligation à partir du fragment de 3322bp du pICPPV digéré par AlwNI/SacI, du fragment de 6286bp du pICPPV digéré par SacI/PvuII/PstI, du fragment de 4832bp et enfin du p35SeNosBNAT1-Pst digéré avec AlwNI/PstI. Le deuxième clone infectieux, pICPPVNATSalBam, a été obtenu par digestion avec BamHI/SalI, des vecteurs pUCPPVNATSalBam et pICPPV. Le troisième clone infectieux pICPPVNATBamSac, a été obtenu par digestion avec BamHI/SacI, des vecteurs pUCPPVNATBamSac et pICPPV. Et enfin le dernier clone infectieux est issu d'une triple ligation à partir du fragment de 11715bp du pICPPV digéré par BglI/SacI, du fragment

de 2052bp du pICPPV digéré par BglI/NdeI et du fragment de 673bp du pUCPPVNATSacend digéré avec SacI/NdeI.

IX. Induction florale de l'accession JEA par vernalisation

Les graines ont été maintenues une semaine dans de l'agarose 0.1% à 4°C avant d'être semées en terre, puis soumises à une vernalisation de une à quatre semaines à une température de 4°C en l'absence de lumière. Ces semis sont ensuite placés en chambre de culture en condition "jour long" avec 16 heures de jour à 22°C et 8 heures de nuit à 18°C (M&M Fig 3).

	Une semaine	Semaine 1	Semaine 2	Semaine 3	Semaine 4	Semaine 5	...
Serre	4°C Agarose 0.1%	Condition de Serre					
Chambre de Culture	4°C Agarose 0.1%	LD: jour 16h 22°C / Nuit 8h 18°C					
	4°C Agarose 0.1%	LD 4°C	LD: Jour 16h 22°C / Nuit 8h 18°C				
	4°C Agarose 0.1%	Obscurité 4°C	LD: Jour 16h 22°C / Nuit 8h 18°C				
	4°C Agarose 0.1%	LD 4°C		LD: Jour 16h 22°C / Nuit 8h 18°C			
	4°C Agarose 0.1%	Obscurité 4°C		LD: Jour 16h 22°C / Nuit 8h 18°C			
	4°C Agarose 0.1%	LD 4°C			LD: Jour 16h 22°C / Nuit 8h 18°C		
	4°C Agarose 0.1%	Obscurité 4°C			LD: Jour 16h 22°C / Nuit 8h 18°C		
	4°C Agarose 0.1%	LD 4°C				LD	
	4°C Agarose 0.1%	Obscurité 4°C				LD	

M&M Fig 3. Ensembles des conditions utilisées pour induire l'induction florale de l'accession JEA
LD: condition jour long (Long Day)

X. Visualisation du phloème

X.1. Carboxyfluorescéine

Le phloème a été visualisé à l'aide d'un marqueur fluorescent, la Carboxyfluorescéine (CF). La 5(6)-Carboxyfluorescéine diacetate disponible chez Sigma a été reprise dans de l'acétone pour générer une solution stock à 6 mg/mL. La CF diacetate a été appliquée sur les feuilles à une concentration de 60 µg/mL diluée dans l'eau. Un agent abrasif (carborundum) et 10 µL de CF diacetate (60µg/mL) sont introduits par frottement, puis la feuille est recouverte de cellophane pour prévenir toute évaporation du marqueur. Trente minutes plus tard, les feuilles non marquées sont prélevées et observées sous UV.

X.2. Observation de la fluorescence

La CF diacetate a une longueur d'onde d'excitation de 492 nm et une longueur d'onde d'émission de 517 nm. La fluorescence émise est visualisée sous loupe binoculaire équipée d'une lampe à ultra-violet identique à celle utilisée pour la fluorescence issue de la GFP (Leica Microsystems, MZ FLIII, Suisse).

Références **bibliographiques**

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. *Mol Plant Pathol* **10**: 109–113
- Acosta-Leal R, Xiong Z** (2008) Complementary functions of two recessive R-genes determine resistance durability of tobacco “Virgin A Mutant” (VAM) to Potato virus Y. *Virology* **379**: 275–283
- Agol VI, Paul AV, Wimmer E** (1999) Paradoxes of the replication of picornaviral genomes. *Virus Research* **62**: 129–147
- Albar L, Bangratz-Reyser M, Hébrard E, Ndjioudjop M-N, Jones M, Ghesquière A** (2006) Mutations in the eIF(iso)4G translation initiation factor confer high resistance of rice to Rice yellow mottle virus. *The Plant Journal* **47**: 417–426
- Allison RF, Sorenson JC, Kelly ME, Armstrong FB, Dougherty WG** (1985) Sequence determination of the capsid protein gene and flanking regions of tobacco etch virus: Evidence for synthesis and processing of a polyprotein in potyvirus genome expression. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 3969–3972
- Alonso-Blanco C, Koornneef M** (2000) Naturally occurring variation in Arabidopsis: an underexploited resource for plant genetics. *Trends in Plant Science* **5**: 22–29
- Amari K, Boutant E, Hofmann C, Schmitt-Keichinger C, Fernandez-Calvino L, Didier P, Lerich A, Mutterer J, Thomas CL, Heinlein M, et al** (2010) A Family of Plasmodesmal Proteins with Receptor-Like Properties for Plant Viral Movement Proteins. *PLoS Pathog* **6**: e1001119
- Anandalakshmi R, Marathe R, Ge X, Herr JM, Mau C, Mallory A, Pruss G, Bowman L, Vance VB** (2000) A Calmodulin-Related Protein That Suppresses Posttranscriptional Gene Silencing in Plants. *Science* **290**: 142–144
- Anbinder I, Reuveni M, Azari R, Paran I, Nahon S, Shlomo H, Chen L, Lapidot M, Levin I** (2009) Molecular dissection of Tomato leaf curl virus resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics* **119**: 519–530
- Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, Morales FJ, Epstein PR, Daszak P** (2004) Emerging infectious diseases of plants: pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. *Trends in Ecology & Evolution* **19**: 535–544
- Andino R, Boddeker N, Gamarnik AV** (1999) Intracellular determinants of picornavirus replication. *Trends Microbiol* **7**: 76–82
- Andrade M, Abe Y, Nakahara KS, Uyeda I** (2009) The cyv-2 resistance to Clover yellow vein virus in pea is controlled by the eukaryotic initiation factor 4E. *Journal of General Plant Pathology* **75**: 241–249
- Aranzana MJ, Kim S, Zhao K, Bakker E, Horton M, Jakob K, Lister C, Molitor J, Shindo C, Tang C, et al** (2005) Genome-wide association mapping in Arabidopsis identifies previously known flowering time and pathogen resistance genes. *PLoS Genet* **1**: e60

- Arcade A, Labourdette A, Falque M, Mangin B, Chardon F, Charcosset A, Joets J** (2004) BioMercator: integrating genetic maps and QTL towards discovery of candidate genes. *Bioinformatics* **20**: 2324–2326
- Atanassov D** (1932) Plum pox. A new virus disease. *Annals of the University of Sofia Faculty of Agriculture and Silviculture*, **11**: 49–69 **11**: 49–69
- Atwell S, Huang YS, Vilhjálmsson BJ, Willems G, Horton M, Li Y, Meng D, Platt A, Tarone AM, Hu TT, et al** (2010) Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines. *Nature* **465**: 627–631
- Azzam O, Yambao MLM, Muhsin M, McNally KL, Umadhay KML** (2000) Genetic diversity of rice tungro spherical virus in tungro-endemic provinces of the Philippines and Indonesia. *Archives of Virology* **145**: 1183–1197
- B. Ding RT** (1992) Substructure of freeze-substituted plasmodesmata. **169**: 28–41
- Babu M, Griffiths J, Huang T-S, Wang A** (2008) Altered gene expression changes in *Arabidopsis* leaf tissues and protoplasts in response to Plum pox virus infection. *BMC Genomics* **9**: 325
- Baggett J, Hampton R** (1991) Inheritance of Viral Bean Leaf Roll Tolerance in Peas. *J Am Soc Hortic Sci* **116**: 728–731
- Beauchemin C, Laliberté J-F** (2007) The Poly(A) Binding Protein Is Internalized in Virus-Induced Vesicles or Redistributed to the Nucleolus during Turnip Mosaic Virus Infection. *J Virol* **81**: 10905–10913
- Bel AJE van** (2003) Transport Phloem: Low Profile, High Impact. *Plant Physiol* **131**: 1509–1510
- Benitez-Alfonso Y, Faulkner C, Ritzenthaler C, Maule AJ** (2010) Plasmodesmata: Gateways to Local and Systemic Virus Infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**: 1403–1412
- Bertheau Y, Frechon D, Toth I, Hyman LJ** DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR). Methods for the detection and quantification of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* on potatoes
- Bian X-Y, Thomas MR, Rasheed MS, Saeed M, Hanson P, De Barro PJ, Rezaian MA** (2007) A Recessive Allele (*tgr-1*) Conditioning Tomato Resistance to Geminivirus Infection Is Associated with Impaired Viral Movement. *Phytopathology* **97**: 930–937
- Blair M, Rodriguez L, Pedraza F, Morales F, Beebe S** (2007) Genetic mapping of the bean golden yellow mosaic geminivirus resistance gene <i>bgm-1</i> and linkage with potyvirus resistance in common bean (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.). *TAG Theoretical and Applied Genetics* **114**: 261–271
- Boissot N, Urbino C, Dintinger J, Pavis C** (2008) Vector and graft inoculations of Potato yellow mosaic virus reveal recessive resistance in *Solanum pimpinellifolium*. *Ann Appl Biol* **152**: 263–269
- Brown R, Bolanos-Herrera A, Myers J, Miller Jahn M** (2003) Inheritance of resistance to four cucurbit viruses in <i>Cucurbita moschata</i>. *Euphytica* **129**: 253–258
- Browning KS** (2004) Plant translation initiation factors: it is not easy to be green. *Biochem Soc Trans* **32**: 589–591

- Browning KS, Webster C, Roberts JK, Ravel JM** (1992) Identification of an isozyme form of protein synthesis initiation factor 4F in plants. *J Biol Chem* **267**: 10096–10100
- Callaway A** (1996) Characterization of Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) Resistance in Virus-Resistant Ecotypes of Arabidopsis. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **9**: 810
- Cambra M, Capote N, Myrta A, Llacer G** (2006) Plum pox virus and the estimated costs associated with sharka disease. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* **36**:
- Caranta C, Palloix A, Lefebvre V, Daubèze AM** (1997) QTLs for a component of partial resistance to cucumber mosaic virus in pepper: restriction of virus installation in host-cells. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **94**: 431–438
- Carbonell A, Dujovny G, García JA, Valli A** (2012) The Cucumber vein yellowing virus Silencing Suppressor P1b Can Functionally Replace HCPro in Plum pox virus Infection in a Host-Specific Manner. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**: 151–164
- Carrington J, Kasschau K, Mahajan S, Schaad M** (1996) Cell-to-Cell and Long-Distance Transport of Viruses in Plants. *Plant Cell* **8**: 1669–1681
- Carrington JC, Freed DD, Sanders TC** (1989) Autocatalytic processing of the potyvirus helper component proteinase in *Escherichia coli* and in vitro. *J Virol* **63**: 4459–4463
- Carrington JC, Jensen PE, Schaad MC** (1998) Genetic evidence for an essential role for potyvirus CI protein in cell-to-cell movement. *Plant J* **14**: 393–400
- Charron C, Nicolaï 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
- Chen M-H, Citovsky V** (2003) Systemic movement of a tobamovirus requires host cell pectin methylesterase. *The Plant Journal* **35**: 386–392
- Chen M-H, Sheng J, Hind G, Handa AK, Citovsky V** (2000) Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *The EMBO Journal* **19**: 913–920
- Chisholm, Mahajan SK, Whitham SA, Yamamoto ML, Carrington JC** (2000) Cloning of the Arabidopsis RTM1 gene, which controls restriction of long-distance movement of tobacco etch virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**:
- Chisholm ST, Parra MA, Anderberg RJ, Carrington JC** (2001) Arabidopsis RTM1 and RTM2 Genes Function in Phloem to Restrict Long-Distance Movement of Tobacco Etch Virus. *Plant Physiol* **127**: 1667–1675
- Choi SH, Nakahara KS, Andrade M, Uyeda I** (2012) Characterization of the recessive resistance gene *cyv1* of *Pisum sativum* against Clover yellow vein virus. *Journal of General Plant Pathology* **78**: 269–276
- Chung BY-W, Miller WA, Atkins JF, Firth AE** (2008) An overlapping essential gene in the Potyviridae. *PNAS* **105**: 5897–5902

- Clark RM, Schweikert G, Toomajian C, Ossowski S, Zeller G, Shinn P, Warthmann N, Hu TT, Fu G, Hinds DA, et al** (2007) Common Sequence Polymorphisms Shaping Genetic Diversity in *Arabidopsis thaliana*. *Science* **317**: 338–342
- Cosson P, Sofer L, Le QH, Léger V, Schurdi-Levraud V, Whitham SA, Yamamoto ML, Gopalan S, Le Gall O, Candresse T, et al** (2010) RTM3, which controls long-distance movement of potyviruses, is a member of a new plant gene family encoding a meprin and TRAF homology domain-containing protein. *Plant Physiol* **154**: 222–232
- Coudriet D, Kishaba A, Bohn G** (1981) Inheritance of Resistance to Muskmelon Necrotic Spot Virus in a Melon Aphid-Resistant Breeding Line of Muskmelon. *J Am Soc Hortic Sci* **106**: 789–791
- Cronin S, Verchot J, Haldeman-Cahill R, Schaad MC, Carrington JC** (1995) Long-distance movement factor: a transport function of the potyvirus helper component proteinase. *Plant Cell* **7**: 549–559
- D’Antonio V, Falk B, Quiros CF** (2001) Inheritance of Resistance to Celery mosaic virus in Celery. *Plant Disease* **85**: 1276–1277
- Dardick CD, Golem S, Culver JN** (2000) Susceptibility and symptom development in *Arabidopsis thaliana* to Tobacco mosaic virus is influenced by virus cell-to-cell movement. *Mol Plant Microbe Interact* **13**: 1139–1144
- Daròs JA, Schaad MC, Carrington JC** (1999) Functional analysis of the interaction between VPg-proteinase (NIa) and RNA polymerase (NIb) of tobacco etch potyvirus, using conditional and suppressor mutants. *J Virol* **73**: 8732–8740
- Decroocq V, Salvador B, Sicard O, Glasa M, Cosson P, Svanella-Dumas L, Revers F, García JA, Candresse T** (2009) The determinant of potyvirus ability to overcome the RTM resistance of *Arabidopsis thaliana* maps to the N-terminal region of the coat protein. *Mol Plant Microbe Interact* **22**: 1302–1311
- Decroocq V, Sicard O, Alamillo JM, Lansac M, Eyquard JP, García JA, Candresse T, Le Gall O, Revers F** (2006) Multiple resistance traits control Plum pox virus infection in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 541–549
- Dever TE** (1999) Translation initiation: adept at adapting. *Trends in Biochemical Sciences* **24**: 398–403
- Díaz-Pendón JA, Fernández-Muñoz R, Gómez-Guillamón ML, Moriones E** (2005) Inheritance of Resistance to Watermelon mosaic virus in *Cucumis melo* that Impairs Virus Accumulation, Symptom Expression, and Aphid Transmission. *Phytopathology* **95**: 840–846
- Diez J, Ishikawa M, Kaido M, Ahlquist P** (2000) Identification and characterization of a host protein required for efficient template selection in viral RNA replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **97**: 3913–3918
- Díez J, Ishikawa M, Kaido M, Ahlquist P** (2000) Identification and characterization of a host protein required for efficient template selection in viral RNA replication. *PNAS* **97**: 3913–3918
- Dinant S** (2008) [Phloem, transport between organs and long-distance signalling]. *C R Biol* **331**: 334–346

- Dinant S, Lemoine R** (2010) The phloem pathway: New issues and old debates. *Comptes Rendus Biologies* **333**: 307–319
- Dogimont C, Bussemakers A, Martin J, Slama S, Lecoq H, Pitrat M** (1997) Two complementary recessive genes conferring resistance to Cucurbit Aphid Borne Yellows Luteovirus in an Indian melon line (*cucumis melo* L.). *Euphytica* **96**: 391–395
- Dogimont C, Leconte L, Perin C, Thabuis A, Lecoq H, Pitrat M** (2000) Identification of QTLs contributing to resistance to different strains of cucumber mosaic cucumovirus in melon. *In* N Katzir, KS Paris, eds, *Proceedings of Cucurbitaceae 2000*. International Society Horticultural Science, Leuven 1, pp 391–398
- Dogimont C, Palloix A, Daubze AM, Marchoux G, Selassie KG, Pochard E** (1996) Genetic analysis of broad spectrum resistance to potyviruses using doubled haploid lines of pepper (*Capsicum annum* L.). *Euphytica* **88**: 231–239
- Dolja VV, Haldeman R, Robertson NL, Dougherty WG, Carrington JC** (1994) Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO J* **13**: 1482–1491
- Dolja VV, Haldeman-Cahill R, Montgomery AE, Vandenbosch KA, Carrington JC** (1995) Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology* **206**: 1007–1016
- Dreher TW, Miller WA** (2006) Translational control in positive strand RNA plant viruses. *Virology* **344**: 185–197
- Dunoyer P, Thomas C, Harrison S, Revers F, Maule A** (2004) A Cysteine-Rich Plant Protein Potentiates Potyvirus Movement through an Interaction with the Virus Genome-Linked Protein VPg. *J Virol* **78**: 2301–2309
- Duprat A, Caranta C, Revers F, Menand B, Browning KS, 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
- Eagles RM, Balmori-Melián E, Beck DL, Gardner RC, Forster RLS** (1994) Characterization of NTPase, RNA-binding and RNA-helicase Activities of the Cytoplasmic Inclusion Protein of Tamarillo Mosaic Potyvirus. *European Journal of Biochemistry* **224**: 677–684
- Escalettes V, Dosba F, Lansac M, Eyquard JP** (1998) Genetic resistance to Plum pox potyvirus in peaches. *Acta Hort* 689–698
- Essafi A, Díaz-Pendón JA, Moriones E, Monforte AJ, Garcia-Mas J, Martín-Hernández AM** (2008) Dissection of the oligogenic resistance to Cucumber mosaic virus in the melon accession PI 161375. *Theoretical and Applied Genetics* **118**: 275–284
- Fanigliulo A, Comes S, Maiss E, Piazzolla P, Crescenzi A** (2003) The complete nucleotide sequence of <i>Plum pox virus</i> isolates from sweet (PPV-SwC) and sour (PPV-SoC) cherry and their taxonomic relationships within the species. *Archives of Virology* **148**: 2137–2153
- Fellers J, Wan J, Hong Y, Collins GB, Hunt AG** (1998) In vitro interactions between a potyvirus-encoded, genome-linked protein and RNA-dependent RNA polymerase. *J Gen Virol* **79 (Pt 8)**: 2043–2049

- Fernandez-Calvino L, Faulkner C, Walshaw J, Saalbach G, Bayer E, Benitez-Alfonso Y, Maule A** (2011) Arabidopsis Plasmodesmal Proteome. *PLoS ONE* **6**: e18880
- Fernandez-Fernandez MR, Mourino M, Rivera J, Rodriguez F, Plana-Duran J, Garcia JA** (2001) Protection of rabbits against rabbit hemorrhagic disease virus by immunization with the VP60 protein expressed in plants with a potyvirus-based vector. *Virology* **280**: 283–291
- Fitzgibbon J, Bell K, King E, Oparka K** (2010) Super-resolution imaging of plasmodesmata using three-dimensional structured illumination microscopy. *Plant Physiol* **153**: 1453–1463
- Flasinski S, Cassidy BG** (1998) Potyvirus aphid transmission requires helper component and homologous coat protein for maximal efficiency. *Arch Virol* **143**: 2159–2172
- Le Gall O, Aranda MA, Caranta C** (2011) Plant resistance to viruses mediated by translation initiation factors. In *Recent advances in plant virology*. Caister Academic Press, pp 177–194
- Gallie DR** (2001) Cap-Independent Translation Conferred by the 5' Leader of Tobacco Etch Virus Is Eukaryotic Initiation Factor 4G Dependent. *J Virol* **75**: 12141–12152
- Gallois J-L, Charron C, Sánchez F, Pagny G, Houvenaghel M-C, Moretti A, Ponz F, Revers F, Caranta C, German-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 Gen Virol* **91**: 288–293
- Gao Z, Evers S, Thomas C, Ellis N, Maule A** (2004a) Identification of markers tightly linked to sbm recessive genes for resistance to Pea seed-borne mosaic virus. *Theor Appl Genet* **109**: 488–494
- Gao Z, Johansen E, Evers S, Thomas CL, Noel Ellis TH, Maule AJ** (2004b) The potyvirus recessive resistance gene, sbm1, identifies a novel role for translation initiation factor eIF4E in cell-to-cell trafficking. *Plant J* **40**: 376–385
- German-Retana S, Walter J, Doublet B, Roudet-Tavert G, Nicaise V, Lecampion C, Houvenaghel M-C, Robaglia C, Michon T, Le Gall O** (2008) Mutational analysis of plant cap-binding protein eIF4E reveals key amino acids involved in biochemical functions and potyvirus infection. *J Virol* **82**: 7601–7612
- Gilbertalbertini F, Pitrat M, Lecoq H** (1995) Inheritance of Resistance to Zucchini Yellow Fleck Virus in *Cucumis-Sativus* L. *Hortscience* **30**: 336–337
- Gilbertson RL, Lucas WJ** (1996) How do viruses traffic on the “vascular highway”? *Trends in Plant Science* **1**: 250–251
- Giordano LB, Silva-Lobo VL, Santana FM, Fonseca MEN, Boiteux LS** (2005) Inheritance of resistance to the bipartite <i>Tomato chlorotic mottle begomovirus</i>; derived from <i>Lycopersicon</i>; <i>esculentum</i>; cv. “Tyking.” *Euphytica* **143**: 27–33
- Glasa M, Palkovics L, Komínek P, Labonne G, Pittnerová S, Kúdela O, Candresse T, Šubr Z** (2004) Geographically and temporally distant natural recombinant isolates of Plum pox virus (PPV) are genetically very similar and form a unique PPV subgroup. *J Gen Virol* **85**: 2671–2681
- Goffinet B, Gerber S** (2000) Quantitative Trait Loci: A Meta-analysis. *Genetics* **155**: 463–473

- Goodrick BJ** (1991) Restricted Systemic Movement of Cowpea Chlorotic Mottle Virus in Soybean with Nonnecrotic Resistance. *Phytopathology* **81**: 1426
- Grangeon R, Cotton S, Laliberté J-F** (2010) A model for the biogenesis of turnip mosaic virus replication factories. *Commun Integr Biol* **3**: 363–365
- Grube RC, Zhang Y, Murphy JF, Loaiza-Figueroa F, Lackney VK, Provvidenti R, Jahn MK** (2000) New Source of Resistance to Cucumber mosaic virus in *Capsicum frutescens*. *Plant Disease* **84**: 885–891
- Grumet R, Kabelka E, McQueen S, Wai T, Humphrey R** (2000) Characterization of sources of resistance to the watermelon strain of Papaya ringspot virus in cucumber: allelism and co-segregation with other potyvirus resistances. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **101**: 463–472
- Grzela R, Strokovska L, Andrieu J-P, Dublet B, Zagorski W, Chroboczek J** (2006) Potyvirus terminal protein VPg, effector of host eukaryotic initiation factor eIF4E. *Biochimie* **88**: 887–896
- Guo D, Spetz C, Saarma M, Valkonen JPT** (2003) Two Potato Proteins, Including a Novel RING Finger Protein (HIP1), Interact with the Potyviral Multifunctional Protein HCpro. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 405–410
- Guseman JM, Lee JS, Bogenschutz NL, Peterson KM, Virata RE, Xie B, Kanaoka MM, Hong Z, Torii KU** (2010) Dysregulation of cell-to-cell connectivity and stomatal patterning by loss-of-function mutation in *Arabidopsis* CHORUS (GLUCAN SYNTHASE-LIKE 8). *Development* **137**: 1731–1741
- Hagiwara Y, Komoda K, Yamanaka T, Tamai A, Meshi T, Funada R, Tsuchiya T, Naito S, Ishikawa M** (2003) Subcellular localization of host and viral proteins associated with tobamovirus RNA replication. *EMBO J* **22**: 344–353
- Haldeman-Cahill R, Daròs J-A, Carrington JC** (1998) Secondary Structures in the Capsid Protein Coding Sequence and 3' Nontranslated Region Involved in Amplification of the Tobacco Etch Virus Genome. *J Virol* **72**: 4072–4079
- Harries P, Ding B** (2011) Cellular factors in plant virus movement: At the leading edge of macromolecular trafficking in plants. *Virology* **411**: 237–243
- Hébrard E, Poulicard N, Gérard C, Traoré O, Wu H-C, Albar L, Fargette D, Bessin Y, Vignols F** (2010) Direct Interaction Between the Rice yellow mottle virus (RYMV) VPg and the Central Domain of the Rice eIF(iso)4G1 Factor Correlates with Rice Susceptibility and RYMV Virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **23**: 1506–1513
- Hong Y, Hunt AG** (1996) RNA polymerase activity catalyzed by a potyvirus-encoded RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* **226**: 146–151
- Hong Y, Levay K, Murphy JF, Klein PG, Shaw JG, Hunt AG** (1995) A Potyvirus Polymerase Interacts with the Viral Coat Protein and VPg in Yeast Cells. *Virology* **214**: 159–166
- Huang T-S, Wei T, Laliberté J-F, Wang A** (2010) A Host RNA Helicase-Like Protein, AtRH8, Interacts with the Potyviral Genome-Linked Protein, VPg, Associates with the Virus Accumulation Complex, and Is Essential for Infection. *Plant Physiol* **152**: 255–266

- Huet H, Gal-On A, Meir E, Lecoq H, Raccach B** (1994) Mutations in the helper component protease gene of zucchini yellow mosaic virus affect its ability to mediate aphid transmissibility. *J Gen Virol* **75** (Pt 6): 1407–1414
- Hughes SL, Green SK, Lydiate DJ, Walsh JA** (2002) Resistance to Turnip mosaic virus in *Brassica rapa* and *B. napus* and the analysis of genetic inheritance in selected lines. *Plant Pathology* **51**: 567–573
- Hwang J, Li J, Liu W-Y, An S-J, Cho H, Her NH, Yeam I, Kim D, Kang B-C** (2009) Double mutations in eIF4E and eIFiso4E confer recessive resistance to Chilli veinal mottle virus in pepper. *Mol Cells* **27**: 329–336
- Ibiza V, Cañizares J, Nuez F** (2010) EcoTILLING in *Capsicum* species: searching for new virus resistances. *BMC Genomics* **11**: 631
- Ishikawa M, Díez J, Restrepo-Hartwig M, Ahlquist P** (1997) Yeast mutations in multiple complementation groups inhibit brome mosaic virus RNA replication and transcription and perturb regulated expression of the viral polymerase-like gene. *PNAS* **94**: 13810–13815
- Ishikawa M, Naito S, Ohno T** (1993) Effects of the tom1 mutation of *Arabidopsis thaliana* on the multiplication of tobacco mosaic virus RNA in protoplasts. *J Virol* **67**: 5328–5338
- Ishikawa M, Obata F, Kumagai T, Ohno T** (1991) Isolation of Mutants of *Arabidopsis-Thaliana* in Which Accumulation of Tobacco Mosaic-Virus Coat Protein Is Reduced to Low-Levels. *Mol Gen Genet* **230**: 33–38
- James D, Varga A** (2005) Nucleotide sequence analysis of Plum pox virus isolate W3174: Evidence of a new strain. *Virus Research* **110**: 143–150
- Jefferson R, Kavanagh T, Bevan M** (1987) Gus Fusions - Beta-Glucuronidase as a Sensitive and Versatile Gene Fusion Marker in Higher-Plants. *Embo J* **6**: 3901–3907
- Jenner CE, Wang X, Tomimura K, Ohshima K, Ponz F, Walsh JA** (2003) The dual role of the potyvirus P3 protein of Turnip mosaic virus as a symptom and avirulence determinant in brassicas. *Mol Plant Microbe Interact* **16**: 777–784
- Jiménez I, López L, Alamillo JM, Valli A, García JA** (2006) Identification of a Plum pox virus CI-Interacting Protein from Chloroplast That Has a Negative Effect in Virus Infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **19**: 350–358
- Jin Y, Ma D, Dong J, Li D, Deng C, Jin J, Wang T** (2007) The HC-Pro Protein of Potato Virus Y Interacts with NtMinD of Tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **20**: 1505–1511
- Johansen IE, Lund OS, Hjulsager CK, Laursen J** (2001) Recessive Resistance in *Pisum sativum* and Potyvirus Pathotype Resolved in a Gene-for-Cistron Correspondence between Host and Virus. *J Virol* **75**: 6609–6614
- Kabelka E, Grumet R** (1997) Inheritance of resistance to the Moroccan watermelon mosaic virus in the cucumber line TMG-1 and cosegregation with zucchini yellow mosaic virus resistance. *Euphytica* **95**: 237–242

- Kachroo P, Yoshioka K, Shah J, Dooner HK, Klessig DF** (2000) Resistance to Turnip Crinkle Virus in *Arabidopsis* Is Regulated by Two Host Genes and Is Salicylic Acid Dependent but NPR1, Ethylene, and Jasmonate Independent. *The Plant Cell* **12**: 677
- Kai H, Takata K, Tsukazaki M, Furusho M, Baba T** (2011) Molecular mapping of Rym17, a dominant and rym18 a recessive barley yellow mosaic virus (BaYMV) resistance genes derived from *Hordeum vulgare* L. *Theoretical and Applied Genetics* **124**: 577–583
- Kang BC, Yeam I, Frantz JD, Murphy JF, Jahn MM** (2005a) The pvr1 locus in *Capsicum* encodes a translation initiation factor eIF4E that interacts with Tobacco etch virus VPg. *Plant Journal* **42**: 392–405
- Kang B-C, Yeam I, Jahn MM** (2005b) Genetics of plant virus resistance. *Annu Rev Phytopathol* **43**: 581–621
- Kang HM, Zaitlen NA, Wade CM, Kirby A, Heckerman D, Daly MJ, Eskin E** (2008) Efficient Control of Population Structure in Model Organism Association Mapping. *Genetics* **178**: 1709–1723
- Kanyuka K, Ward E, Adams MJ** (2003) Polymyxa graminis and the cereal viruses it transmits: a research challenge. *Molecular Plant Pathology* **4**: 393–406
- Kasschau KD, Carrington JC** (1995) Requirement for HC-Pro Processing during Genome Amplification of Tobacco Etch Potyvirus. *Virology* **209**: 268–273
- Kekarainen T, Savilahti H, Valkonen JPT** (2002) Functional genomics on potato virus A: virus genome-wide map of sites essential for virus propagation. *Genome Res* **12**: 584–594
- Kempers R, van Bel AJE** (1997) Symplasmic connections between sieve element and companion cell in the stem phloem of *Vicia faba* L. have a molecular exclusion limit of at least 10 kDa. *Planta* **201**: 195–201
- Keurentjes JJB, Bentsink L, Alonso-Blanco C, Hanhart CJ, Vries HB-D, Effgen S, Vreugdenhil D, Koornneef M** (2007) Development of a Near-Isogenic Line Population of *Arabidopsis thaliana* and Comparison of Mapping Power With a Recombinant Inbred Line Population. *Genetics* **175**: 891–905
- Khan MA, Miyoshi H, Ray S, Natsuaki T, Suehiro N, Goss DJ** (2006) Interaction of Genome-linked Protein (VPg) of Turnip Mosaic Virus with Wheat Germ Translation Initiation Factors eIFiso4E and eIFiso4F. *J Biol Chem* **281**: 28002–28010
- Kim DS, Hwang BK** (2012) The pepper MLO gene, CaMLO2, is involved in susceptibility cell death response and bacterial and oomycete proliferation. *The Plant Journal* no–no
- Kim SH, MacFarlane S, Kalinina NO, Rakitina DV, Ryabov EV, Gillespie T, Haupt S, Brown JWS, Taliansky M** (2007) Interaction of a plant virus-encoded protein with the major nucleolar protein fibrillarin is required for systemic virus infection. *PNAS* **104**: 11115–11120
- Klein PG, Klein RR, Rodriguez-Cerezo E, Hunt AG, Shaw JG** (1994) Mutational Analysis of the Tobacco Vein Mottling Virus Genome. *Virology* **204**: 759–769
- Knight VH, Barbara DJ** (1981) Susceptibility of red raspberry varieties to raspberry bushy dwarf virus and its genetic control. *Euphytica* **30**: 803–811

- Kosambi DD** (1943) THE ESTIMATION OF MAP DISTANCES FROM RECOMBINATION VALUES. *Annals of Eugenics* **12**: 172–175
- Kover PX, Valdar W, Trakalo J, Scarcelli N, Ehrenreich IM, Purugganan MD, Durrant C, Mott R** (2009) A Multiparent Advanced Generation Inter-Cross to fine-map quantitative traits in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* **5**: e1000551
- Kühne T, Shi N, Proeseler G, Adams MJ, Kanyuka K** (2003) The ability of a bymovirus to overcome the rym4-mediated resistance in barley correlates with a codon change in the VPg coding region on RNA1. *J Gen Virol* **84**: 2853–2859
- Kyle MM, Palloix A** (1997) Proposed revision of nomenclature for potyvirus resistance genes in *Capsicum*. *Euphytica* **97**: 183–188
- Lain S, Riechmann JL, Garcíá JA** (1990) RNA helicase: a novel activity associated with a protein encoded by a positive strand RNA virus. *Nucl Acids Res* **18**: 7003–7006
- Lakatos L, Csorba T, Pantaleo V, Chapman EJ, Carrington JC, Liu Y-P, Dolja VV, Calvino LF, López-Moya JJ, Burgyán J** (2006) Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J* **25**: 2768–2780
- Lalonde S, Ehrhardt DW, Loqué D, Chen J, Rhee SY, Frommer WB** (2008) Molecular and cellular approaches for the detection of protein–protein interactions: latest techniques and current limitations. *The Plant Journal* **53**: 610–635
- Lartey RT, Ghoshroy S, Citovsky V** (1998) Identification of an *Arabidopsis thaliana* Mutation (vsm1) That Restricts Systemic Movement of Tobamoviruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **11**: 706–709
- Lee J-Y, Lu H** (2011) Plasmodesmata: the battleground against intruders. *Trends in Plant Science* **16**: 201–210
- Lee W-M, Ishikawa M, Ahlquist P** (2001) Mutation of Host $\Delta 9$ Fatty Acid Desaturase Inhibits Brome Mosaic Virus RNA Replication between Template Recognition and RNA Synthesis. *J Virol* **75**: 2097–2106
- Legg JP, Thresh JM** (2000) Cassava mosaic virus disease in East Africa: a dynamic disease in a changing environment. *Virus Research* **71**: 135–149
- Lellis AD, Kasschau KD, Whitham SA, Carrington JC** (2002) Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during potyvirus infection. *Curr Biol* **12**: 1046–1051
- Léonard S, Plante D, Wittmann S, Daigneault N, Fortin MG, Laliberté J-F** (2000) Complex Formation between Potyvirus VPg and Translation Eukaryotic Initiation Factor 4E Correlates with Virus Infectivity. *J Virol* **74**: 7730–7737
- Léonard S, Viel C, Beauchemin C, Daigneault N, Fortin MG, Laliberté J-F** (2004) Interaction of VPg-Pro of Turnip mosaic virus with the translation initiation factor 4E and the poly(A)-binding protein in planta. *J Gen Virol* **85**: 1055–1063
- Lewis JD, Lazarowitz SG** (2010) *Arabidopsis* synaptotagmin SYTA regulates endocytosis and virus movement protein cell-to-cell transport. *PNAS* **107**: 2491–2496

- Li XH, Carrington JC** (1995) Complementation of tobacco etch potyvirus mutants by active RNA polymerase expressed in transgenic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 457–461
- Li XH, Valdez P, Olvera RE, Carrington JC** (1997) Functions of the tobacco etch virus RNA polymerase (Nlb): subcellular transport and protein-protein interaction with VPg/proteinase (Nla). *J Virol* **71**: 1598–1607
- Lin J-W, Ding M-P, Hsu Y-H, Tsai C-H** (2007) Chloroplast phosphoglycerate kinase, a gluconeogenic enzyme, is required for efficient accumulation of Bamboo mosaic virus. *Nucleic Acids Res* **35**: 424–432
- Ling K-S, Harris K, Meyer J, Levi A, Guner N, Wehner T, Bendahmane A, Havey M** (2009) Non-synonymous single nucleotide polymorphisms in the watermelon eIF4E gene are closely associated with resistance to <i>Zucchini yellow mosaic virus</i>. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **120**: 191–200
- Lough TJ, Lucas WJ** (2006) Integrative plant biology: Role of phloem long-distance macromolecular trafficking. *Annual Review of Plant Biology*. Annual Reviews, Palo Alto, pp 203–232
- Lu Q, Bjørnstad Å, Ren Y, Asad M, Xia X, Chen X, Ji F, Shi J, Lillemo M** (2012) Partial resistance to powdery mildew in German spring wheat “Naxos” is based on multiple genes with stable effects in diverse environments. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **125**: 297–309
- Mahajan S, Dolja VV, Carrington JC** (1996) Roles of the sequence encoding tobacco etch virus capsid protein in genome amplification: requirements for the translation process and a cis-active element. *J Virol* **70**: 4370–4379
- Mahajan SK, Chisholm ST, Whitham SA, Carrington JC** (1998) Identification and characterization of a locus (RTM1) that restricts long-distance movement of tobacco etch virus in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **14**: 177–186
- Malik I, Sarwar G, Ali Y** (1986) Genetic-Studies in Mung Bean (*vigna-Radiata* (L) Wilczek) .1. Inheritance. *Pak J Bot* **18**: 189–198
- Maliogka VI, Salvador B, Carbonell A, Sáenz P, León DS, Oliveros JC, Delgadillo MO, García JA, Simón-Mateo C** (2012) Virus variants with differences in the P1 protein coexist in a Plum pox virus population and display particular host-dependent pathogenicity features. *Molecular Plant Pathology* **13**: 877–886
- Maluf W, Tomabraghini M, Corte R** (1991) Progress in Breeding Tomatoes for Resistance to Tomato Spotted Wilt. *Rev Bras Genet* **14**: 509–525
- Marandel G, Salava J, Abbott A, Candresse T, Decroocq V** (2009) Quantitative trait loci meta-analysis of Plum pox virus resistance in apricot (*Prunus armeniaca* L.): new insights on the organization and the identification of genomic resistance factors. *Molecular Plant Pathology* **10**: 347–360
- Martin MT, Cervera MT, Garcia JA** (1995) Properties of the active plum pox potyvirus RNA polymerase complex in defined glycerol gradient fractions [Virus Research 37 (1995) 127–137]. *Virus Research* **38**: 317
- Martinez-Gomez P, Dicenta F, Audergon JM** (2000) Behaviour of apricot (*Prunus armeniaca* L.) cultivars in the presence of sharka (plum pox potyvirus): a review. *Agronomie* **20**: 407–422

- Masuta C, Nishimura M, Morishita H, Hataya T** (1999) A Single Amino Acid Change in Viral Genome-Associated Protein of Potato Virus Y Correlates with Resistance Breaking in “Virgin A Mutant” Tobacco. *Phytopathology* **89**: 118–123
- Mayberry LK, Allen ML, Dennis MD, Browning KS** (2009) Evidence for Variation in the Optimal Translation Initiation Complex: Plant eIF4B, eIF4F, and eIF(iso)4F Differentially Promote Translation of mRNAs. *Plant Physiol* **150**: 1844–1854
- McCreight JD, Liu H-Y, Turini TA** (2008) Genetic resistance to Cucurbit leaf crumple virus in melon. *Hortscience* **43**: 122–126
- McKhann HI, Camilleri C, Bérard A, Bataillon T, David JL, Reboud X, Le Corre V, Caloustian C, Gut IG, Brunel D** (2004) Nested core collections maximizing genetic diversity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **38**: 193–202
- Merits A, Guo D, Järvekülg L, Saarma M** (1999) Biochemical and genetic evidence for interactions between potato A potyvirus-encoded proteins P1 and P3 and proteins of the putative replication complex. *Virology* **263**: 15–22
- Michon T, Estevez Y, Walter J, German-Retana S, Le Gall O** (2006) The potyviral virus genome-linked protein VPg forms a ternary complex with the eukaryotic initiation factors eIF4E and eIF4G and reduces eIF4E affinity for a mRNA cap analogue. *FEBS Journal* **273**: 1312–1322
- Mignouna HD, Njukeng P, Abang MM, Asiedu R** (2001) Inheritance of resistance to Yam mosaic virus, genus Potyvirus, in white yam (*Dioscorea rotundata*). *TAG Theoretical and Applied Genetics* **103**: 1196–2000
- Miklas P, Larsen R, Riley R, Kelly J** (2000) Potential marker-assisted selection for bc-12 resistance to bean common mosaic potyvirus in common bean. *Euphytica* **116**: 211–219
- Miyoshi H, Suehiro N, Tomoo K, Muto S, Takahashi T, Tsukamoto T, Ohmori T, Natsuaki T** (2006) Binding analyses for the interaction between plant virus genome-linked protein (VPg) and plant translational initiation factors. *Biochimie* **88**: 329–340
- Munshi AD, Panda B, Mandal B, Bisht IS, Rao ES, Kumar R** (2008) Genetics of resistance to Cucumber mosaic virus in *Cucumis sativus* var. *hardwickii* R. Alef. *Euphytica* **164**: 501–507
- Murphy JF** (1995) Alleviation of Restricted Systemic Spread of Pepper Mottle Potyvirus in *Capsicum annum* cv. Avelar by Coinfection with a Cucumovirus. *Phytopathology* **85**: 561
- Murphy JF, Klein PG, Hunt AG, Shaw JG** (1996) Replacement of the tyrosine residue that links a potyviral VPg to the viral RNA is lethal. *Virology* **220**: 535–538
- Murray KE, Barton DJ** (2003) Poliovirus CRE-Dependent VPg Uridylylation Is Required for Positive-Strand RNA Synthesis but Not for Negative-Strand RNA Synthesis. *J Virol* **77**: 4739–4750
- Naderpour M, Lund OS, Larsen R, Johansen E** (2010) Potyviral resistance derived from cultivars of *Phaseolus vulgaris* carrying bc-3 is associated with the homozygotic presence of a mutated eIF4E allele. *Mol Plant Pathol* **11**: 255–263
- Nakahara KS, Shimada R, Choi S-H, Yamamoto H, Shao J, Uyeda I** (2010) Involvement of the P1 cistron in overcoming eIF4E-mediated recessive resistance against Clover yellow vein virus in pea. *Mol Plant Microbe Interact* **23**: 1460–1469

- Nicaise V, Gallois J-L, Chafiai F, Allen LM, Schurdi-Levraud V, Browning KS, 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 Lett* **581**: 1041–1046
- Nicaise V, German-Retana S, Sanjuán R, Dubrana M-P, Mazier M, Maisonneuve B, Candresse T, Caranta C, LeGall O** (2003) The Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E Controls Lettuce Susceptibility to the Potyvirus Lettuce mosaic virus. *Plant Physiol* **132**: 1272–1282
- Nicolas O, Dunnington SW, Gotow LF, Pirone TP, Hellmann GM** (1997) Variations in the VPg protein allow a potyvirus to overcome *va* gene resistance in tobacco. *Virology* **237**: 452–459
- Nieto C, Morales M, Orjeda G, Clepet C, Monfort A, Sturbois B, Puigdomènech P, Pitrat M, Caboche M, Dogimont C, et al** (2006) An eIF4E allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon. *The Plant Journal* **48**: 452–462
- Noueiry AO, Chen JB, Ahlquist P** (2000) A mutant allele of essential, general translation initiation factor DED1 selectively inhibits translation of a viral mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 12985–12990
- Ohshima K, Taniyama T, Yamanaka T, Ishikawa M, Naito S** (1998) Isolation of a Mutant of *Arabidopsis thaliana* Carrying Two Simultaneous Mutations Affecting Tobacco Mosaic Virus Multiplication within a Single Cell. *Virology* **243**: 472–481
- Okade H, Fujita Y, Miyamoto S, Tomoo K, Muto S, Miyoshi H, Natsuaki T, Rhoads RE, Ishida T** (2009) Turnip mosaic virus genome-linked protein VPg binds C-terminal region of cap-bound initiation factor 4E orthologue without exhibiting host cellular specificity. *J Biochem* **145**: 299–307
- Olorunju PE** (1992) Inheritance of Resistance in Peanut to Mixed Infections of Groundnut Rosette Virus (GRV) and Groundnut Rosette Assistor Virus and a Single Infection of GRV. *Plant Disease* **76**: 95
- Ooijen JW, Boer MP, Jansen RC, Maliepaard C** (1996) MapQTL 4.0: software for the calculation of QTL positions on genetic maps (user manual).
- Van Ooijen JW, Voorrips RE** (2001) JoinMap® 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, The Netherlands 1–51
- Oparka K j., Duckett C m., Prior D a. m., Fisher D b.** (1994) Real-time imaging of phloem unloading in the root tip of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **6**: 759–766
- Oparka KJ, Cruz SS** (2000) THE GREAT ESCAPE: Phloem Transport and Unloading of Macromolecules1. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 323–347
- Oparka KJ, Turgeon R** (1999) Sieve Elements and Companion Cells—Traffic Control Centers of the Phloem. *Plant Cell* **11**: 739–750
- Ouibrahim L, Mazier M, Estevan J, Lecoq H, Desbiez C, Pagny G, Decroocq V, Moretti A, Caranta C** (unpublished) The Chloroplast phosphoglycerate kinase is a candidate gene for *rwm1*-mediated resistance to Watermelon mosaic potyvirus in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*

- Pagny G, Paulstephenraj PS, Poque S, Sicard O, Cosson P, Eyquard J-P, Caballero M, Chague A, Gourdon G, Negrel L, et al** (2012) Family-based linkage and association mapping reveals novel genes affecting Plum pox virus infection in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* n/a–n/a
- Pal S, Dhaliwal H, Bains S** (1991) Inheritance of Resistance to Yellow Mosaic-Virus in Some *Vigna* Species. *Plant Breed* **106**: 168–171
- Panavas T, Nagy PD** (2003) Yeast as a model host to study replication and recombination of defective interfering RNA of Tomato bushy stunt virus. *Virology* **314**: 315–325
- Park S-H, Hur J, Park J, Lee S, Lee T-K, Chang M, Davi KR, Kim J, Lee S** (2002) Identification of a tolerant locus on *Arabidopsis thaliana* to hypervirulent beet curly top virus CFH strain. *Mol Cells* **13**: 252–258
- Park YC, Burkitt V, Villa AR, Tong L, Wu H** (1999) Structural basis for self-association and receptor recognition of human TRAF2. *Nature* **398**: 533–538
- Paul AV, van Boom JH, Filippov D, Wimmer E** (1998) Protein-primed RNA synthesis by purified poliovirus RNA polymerase. *Nature* **393**: 280–284
- Paux E, Faure S, Choulet F, Roger D, Gauthier V, Martinant J-P, Sourdille P, Balfourier F, Le Paslier M-C, Chauveau A, et al** (2010) Insertion site-based polymorphism markers open new perspectives for genome saturation and marker-assisted selection in wheat. *Plant Biotechnology Journal* **8**: 196–210
- Piffanelli P, Ramsay L, Waugh R, Benabdelmouna A, D'Hont A, Hollricher K, Jørgensen JH, Schulze-Lefert P, Panstruga R** (2004) A barley cultivation-associated polymorphism conveys resistance to powdery mildew. *Nature* **430**: 887–891
- Pink D a. C, Walkey DGA, McCLEMENT SJ** (1991) Genetics of resistance to beet western yellows virus in lettuce. *Plant Pathology* **40**: 542–545
- Poque S, Pagny G, Ouibrahim L, Chague A, Eyquard J-P, Candresse T, Caranta C, Mariette S, Decroocq V** (à soumettre) Allelic variation at the *rpv1* locus is controlling partial restriction of Plum pox virus early infection in *Arabidopsis thaliana*.
- Provvidenti R** (1991) Inheritance of Resistance to the NI-8 Strain of Bean Common Mosaic-Virus. *J Hered* **82**: 353–355
- Provvidenti R** (1990) Inheritance of Resistance to Pea Mosaic Virus in *Pisum sativum*. *J Hered* **81**: 143–145
- Provvidenti R, Hampton R** (1992) Sources of Resistance to Viruses in the Potyviridae. *Arch Virol* **189**: 211
- Provvidenti R, Niblett C** (1994) Inheritance of Resistance to a Strain of Passionfruit Woodiness Virus in *Pea* (*Pisum-Sativum* L). *Hortscience* **29**: 901–902
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MAR, Bender D, Maller J, Sklar P, Bakker PIW de, Daly MJ, et al** (2007) PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *The American Journal of Human Genetics* **81**: 559–575

- Puustinen P, Mäkinen K** (2004) Uridylylation of the Potyvirus VPg by Viral Replicase NIb Correlates with the Nucleotide Binding Capacity of VPg. *J Biol Chem* **279**: 38103–38110
- Qi X, Niks RE, Stam P, Lindhout P** (1998) Identification of QTLs for partial resistance to leaf rust (*Puccinia hordei*) in barley. *TAG Theoretical and Applied Genetics* **96**: 1205–1215
- Raffaele S, Bayer E, Lafarge D, Cluzet S, Retana SG, Boubekur T, Leborgne-Castel N, Carde J-P, Lherminier J, Noirot E, et al** (2009) Remorin, a Solanaceae Protein Resident in Membrane Rafts and Plasmodesmata, Impairs Potato virus X Movement. *Plant Cell* **21**: 1541–1555
- Rajamäki ML, Valkonen JP** (1999) The 6K2 protein and the VPg of potato virus A are determinants of systemic infection in *Nicotandra physaloides*. *Mol Plant Microbe Interact* **12**: 1074–1081
- Rajamäki M-L, Valkonen JPT** (2002) Viral genome-linked protein (VPg) controls accumulation and phloem-loading of a potyvirus in inoculated potato leaves. *Mol Plant Microbe Interact* **15**: 138–149
- Rajamäki M-L, Valkonen JPT** (2003) Localization of a Potyvirus and the Viral Genome-Linked Protein in Wild Potato Leaves at an Early Stage of Systemic Infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 25–34
- Rajamony L, More T, Seshadri V** (1990) Inheritance of Resistance to Cucumber Green Mottle Mosaic-Virus in Muskmelon (*cucumis-Melo L*). *Euphytica* **47**: 93–97
- Redondo E, Krause-Sakate R, Yang SJ, Lot H, Le Gall O, Candresse T** (2001) Lettuce mosaic virus pathogenicity determinants in susceptible and tolerant lettuce cultivars map to different regions of the viral genome. *Mol Plant Microbe Interact* **14**: 804–810
- Requena A, Simón-Buela L, Salcedo G, García-Arenal F** (2006) Potential involvement of a cucumber homolog of phloem protein 1 in the long-distance movement of Cucumber mosaic virus particles. *Mol Plant Microbe Interact* **19**: 734–746
- Restrepo-Hartwig MA, Carrington JC** (1994) The tobacco etch potyvirus 6-kilodalton protein is membrane associated and involved in viral replication. *J Virol* **68**: 2388–2397
- Riechmann JL, Laín S, García JA** (1992) Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J Gen Virol* **73**: 1–16
- Robaglia C, Caranta C** (2006) Translation initiation factors: a weak link in plant RNA virus infection. *Trends in Plant Science* **11**: 40–45
- Roberts AG** (2007) Plasmodesmal Structure and Development. *In* KJO FRSE, ed, *Plasmodesmata*. Blackwell Publishing Ltd, pp 1–32
- Roberts AG, Cruz SS, Roberts IM, Prior D, Turgeon R, Oparka KJ** (1997) Phloem Unloading in Sink Leaves of *Nicotiana benthamiana*: Comparison of a Fluorescent Solute with a Fluorescent Virus. *Plant Cell* **9**: 1381–1396
- Roberts IM, Wang D, Findlay K, Maule AJ** (1998) Ultrastructural and Temporal Observations of the Potyvirus Cylindrical Inclusions (CIs) Show That the CI Protein Acts Transiently in Aiding Virus Movement. *Virology* **245**: 173–181

- Rodriguez CM, Freire MA, Camilleri C, Robaglia C** (1998) The *Arabidopsis thaliana* cDNAs coding for eIF4E and eIF(iso)4E are not functionally equivalent for yeast complementation and are differentially expressed during plant development. *The Plant Journal* **13**: 465–473
- Rodriguez-Cerezo E, Findlay K, Shaw JG, Lomonossoff GP, Qiu SG, Linstead P, Shanks M, Risco C** (1997) The Coat and Cylindrical Inclusion Proteins of a Potyvirus Are Associated with Connections between Plant Cells. *Virology* **236**: 296–306
- Rojas MR, Zerbini FM, Allison RF, Gilbertson RL, Lucas WJ** (1997) Capsid Protein and Helper Component-Proteinase Function as Potyvirus Cell-to-Cell Movement Proteins. *Virology* **237**: 283–295
- 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**: 1067–1075
- Ruffel S, Gallois JL, Lesage ML, Caranta C** (2005) The recessive potyvirus resistance gene *pot-1* is the tomato orthologue of the pepper *pvr2-eIF4E* gene. *Molecular Genetics and Genomics* **274**: 346–353
- Ruffel S, Gallois J-L, Moury B, Robaglia C, Palloix A, Caranta C** (2006) Simultaneous mutations in translation initiation factors eIF4E and eIF(iso)4E are required to prevent pepper vein mottle virus infection of pepper. *J Gen Virol* **87**: 2089–2098
- Rusholme RL, Higgins EE, Walsh JA, Lydiate DJ** (2007) Genetic control of broad-spectrum resistance to turnip mosaic virus in *Brassica rapa* (Chinese cabbage). *J Gen Virol* **88**: 3177–3186
- Sáenz P, Salvador B, Simón-Mateo C, Kasschau KD, Carrington JC, García JA** (2002) Host-Specific Involvement of the HC Protein in the Long-Distance Movement of Potyviruses. *J Virol* **76**: 1922–1931
- Sambrook J, Fritsch E, Asami T** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory
- Santa Cruz S** (1999) Perspective: phloem transport of viruses and macromolecules - what goes in must come out. *Trends Microbiol* **7**: 237–241
- Sato M, Masuta C, Uyeda I** (2003) Natural Resistance to Clover yellow vein virus in Beans Controlled by a Single Recessive Locus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **16**: 994–1002
- Sato M, Nakahara K, Yoshii M, Ishikawa M, Uyeda I** (2005) Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by potyviruses. *FEBS Lett* **579**: 1167–1171
- Saunal H, Witz J, Regenmortel MHVV** (1993) Inhibition of in vitro Cotranslational Disassembly of Tobacco Mosaic Virus by Monoclonal Antibodies to the Viral Coat Protein. *J Gen Virol* **74**: 897–900
- Schaad MC, Carrington JC** (1996) Suppression of long-distance movement of tobacco etch virus in a nonsusceptible host. *J Virol* **70**: 2556–2561

- Schaad MC, Haldeman-Cahill R, Cronin S, Carrington JC** (1996) Analysis of the VPg-proteinase (NIa) encoded by tobacco etch potyvirus: effects of mutations on subcellular transport, proteolytic processing, and genome amplification. *J Virol* **70**: 7039–7048
- Schaad MC, Lellis AD, Carrington JC** (1997a) VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *J Virol* **71**: 8624–8631
- Schaad MC, Lellis AD, Carrington JC** (1997b) VPg of tobacco etch potyvirus is a host genotype-specific determinant for long-distance movement. *J Virol* **71**: 8624–8631
- Scholthof HB** (2005) Plant virus transport: motions of functional equivalence. *Trends Plant Sci* **10**: 376–382
- Schroeder WT** (1971) A Common Gene for Resistance to Bean Yellow Mosaic Virus and Watermelon Mosaic Virus 2 in *Pisum sativum*. *Phytopathology* **61**: 846
- Sekine K-T, Nandi A, Ishihara T, Hase S, Ikegami M, Shah J, Takahashi H** (2004) Enhanced Resistance to Cucumber mosaic virus in the *Arabidopsis thaliana* ssi2 Mutant Is Mediated via an SA-Independent Mechanism. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **17**: 623–632
- Serçe ÇU, Candresse T, Svanella-Dumas L, Krizbai L, Gazel M, Çağlayan K** (2009) Further characterization of a new recombinant group of Plum pox virus isolates, PPV-T, found in orchards in the Ankara province of Turkey. *Virus Research* **142**: 121–126
- Serviene E, Jiang Y, Cheng C-P, Baker J, Nagy PD** (2006) Screening of the Yeast yTHC Collection Identifies Essential Host Factors Affecting Tombusvirus RNA Recombination. *J Virol* **80**: 1231–1241
- Serviene E, Shapka N, Cheng C-P, Panavas T, Phuangrat B, Baker J, Nagy PD** (2005) Genome-wide screen identifies host genes affecting viral RNA recombination. *PNAS* **102**: 10545–10550
- Shen W, Yan P, Gao L, Pan X, Wu J, Zhou P** (2010) Helper component-proteinase (HC-Pro) protein of Papaya ringspot virus interacts with papaya calreticulin. *Molecular Plant Pathology* **11**: 335–346
- Sheveleva A, Ivanov P, Prihodko Y, James D, Chirkov S** (2012) Occurrence and Genetic Diversity of Winona-Like Plum pox virus Isolates in Russia. *Plant Disease* **96**: 1135–1142
- Shi Y, Chen J, Hong X, Chen J, Adams MJ** (2007) A potyvirus P1 protein interacts with the Rieske Fe/S protein of its host. *Molecular Plant Pathology* **8**: 785–790
- ShiJian X, BingGuang X, YuLong G, YongPing L** (2011) Genetic analysis and mapping of resistance to TMV for tobacco variety Ti245. *Journal of Hunan Agricultural University*. doi: 10.3724/SP.J.1238.2011.00123
- Sicard O, Loudet O, Keurentjes JJB, Candresse T, Le Gall O, Revers F, Decroocq V** (2008) Identification of quantitative trait loci controlling symptom development during viral infection in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Microbe Interact* **21**: 198–207
- Simon M, Loudet O, Durand S, Bérard A, Brunel D, Sennesal F-X, Durand-Tardif M, Pelletier G, Camilleri C** (2008) Quantitative trait loci mapping in five new large recombinant inbred line populations of *Arabidopsis thaliana* genotyped with consensus single-nucleotide polymorphism markers. *Genetics* **178**: 2253–2264

- Spetz C, Valkonen JPT** (2004) Potyviral 6K2 protein long-distance movement and symptom-induction functions are independent and host-specific. *Mol Plant Microbe Interact* **17**: 502–510
- Stein N, Perovic D, Kumlehn J, Pellio B, Stracke S, Streng S, Ordon F, Graner A** (2005) The eukaryotic translation initiation factor 4E confers multiallelic recessive Bymovirus resistance in *Hordeum vulgare* (L.). *The Plant Journal* **42**: 912–922
- Stynen B, Tournu H, Tavernier J, Dijck PV** (2012) Diversity in Genetic In Vivo Methods for Protein-Protein Interaction Studies: from the Yeast Two-Hybrid System to the Mammalian Split-Luciferase System. *Microbiol Mol Biol Rev* **76**: 331–382
- Tavert-Roudet G, Abdul-Razzak A, Doublet B, Walter J, Delaunay T, German-Retana S, Michon T, Gall OL, Candresse T** (2012) The C terminus of lettuce mosaic potyvirus cylindrical inclusion helicase interacts with the viral VPg and with lettuce translation eukaryotic initiation factor 4E. *J Gen Virol* **93**: 184–193
- Thiémélé D, Boissard A, Ndjondjop M-N, Chéron S, Séré Y, Aké S, Ghesquière A, Albar L** (2010) Identification of a second major resistance gene to Rice yellow mottle virus, RYMV2, in the African cultivated rice species, *O. glaberrima*. *Theoretical and Applied Genetics* **121**: 169–179
- Thivierge K, Cotton S, Dufresne PJ, Mathieu I, Beauchemin C, Ide C, Fortin MG, Laliberté J-F** (2008) Eukaryotic elongation factor 1A interacts with Turnip mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase and VPg-Pro in virus-induced vesicles. *Virology* **377**: 216–225
- Thivierge K, Nicaise V, Dufresne PJ, Cotton S, Laliberte JF, Le Gall O, Fortin MG** (2005) Plant virus RNAs. Coordinated recruitment of conserved host functions by (+) ssRNA viruses during early infection events. *Plant Physiol* **138**: 1822–1827
- Tomita Y, Mizuno T, Díez J, Naito S, Ahlquist P, Ishikawa M** (2003) Mutation of Host dnaJ Homolog Inhibits Brome Mosaic Virus Negative-Strand RNA Synthesis. *J Virol* **77**: 2990–2997
- Torrance L, Andreev IA, Gabrenaite-Verhovskaya R, Cowan G, Mäkinen K, Taliansky ME** (2006) An Unusual Structure at One End of Potato Potyvirus Particles. *Journal of Molecular Biology* **357**: 1–8
- Truniger V, Aranda MA** (2009) Recessive resistance to plant viruses. *Adv Virus Res* **75**: 119–159
- Tsujimoto Y, Numaga T, Ohshima K, Yano M-A, Ohsawa R, Goto DB, Naito S, Ishikawa M** (2003) Arabidopsis TOBAMOVIRUS MULTIPLICATION (TOM) 2 locus encodes a transmembrane protein that interacts with TOM1. *EMBO J* **22**: 335–343
- Ullah Z, Grumet R** (2002) Localization of Zucchini yellow mosaic virus to the veinal regions and role of viral coat protein in veinal chlorosis conditioned by the zym potyvirus resistance locus in cucumber. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **60**: 79–89
- Umaharan P, Ariyanayagam RP, Haque SQ** (1997) Resistance to cowpea severe mosaic virus, determined by three dosage dependent genes in *Vigna unguiculata* L Walp. *Euphytica* **95**: 49–55
- Urcuqui-Inchima S, Haenni A-L, Bernardi F** (2001) Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research* **74**: 157–175

- Valli A, Martín-Hernández AM, López-Moya JJ, García JA** (2006) RNA silencing suppression by a second copy of the P1 serine protease of Cucumber vein yellowing ipomovirus, a member of the family Potyviridae that lacks the cysteine protease HCPro. *J Virol* **80**: 10055–10063
- Verchot J, Carrington JC** (1995) Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in trans as an accessory factor for genome amplification. *J Virol* **69**: 3668–3674
- Verchot J, Koonin EV, Carrington JC** (1991) The 35-kDa protein from the N-terminus of the potyviral polyprotein functions as a third virus-encoded proteinase. *Virology* **185**: 527–535
- Vidavsky F, Czosnek H** (1998) Tomato Breeding Lines Resistant and Tolerant to Tomato Yellow Leaf Curl Virus Issued from *Lycopersicon hirsutum*. *Phytopathology* **88**: 910–914
- Vijayapalani P, Maeshima M, Nagasaki-Takekuchi N, Miller WA** (2012) Interaction of the Trans-Frame Potyvirus Protein P3N-PIPO with Host Protein PCaP1 Facilitates Potyvirus Movement. *PLoS Pathog*. doi: 10.1371/journal.ppat.1002639
- Wai T, Grumet R** (1995) Inheritance of Resistance to Watermelon Mosaic-Virus in the Cucumber Line Tmg-1 - Tissue-Specific Expression and Relationship to Zucchini Yellow Mosaic-Virus Resistance. *Theor Appl Genet* **91**: 699–706
- Wang D, Maule A** (1995) Inhibition of Host Gene-Expression Associated with Plant-Virus Replication. *Science* **267**: 229–231
- Wang X, Ullah Z, Grumet R** (2000) Interaction between Zucchini Yellow Mosaic Potyvirus RNA-Dependent RNA Polymerase and Host Poly-(A) Binding Protein. *Virology* **275**: 433–443
- Weber H, Bernhardt A, Dieterle M, Hano P, Mutlu A, Estelle M, Genschik P, Hellmann H** (2005) Arabidopsis AtCUL3a and AtCUL3b Form Complexes with Members of the BTB/POZ-MATH Protein Family. *Plant Physiol* **137**: 83–93
- Wei T, Huang T-S, McNeil J, Laliberté J-F, Hong J, Nelson RS, Wang A** (2010a) Sequential recruitment of the endoplasmic reticulum and chloroplasts for plant potyvirus replication. *J Virol* **84**: 799–809
- Wei T, Wang A** (2008) Biogenesis of Cytoplasmic Membranous Vesicles for Plant Potyvirus Replication Occurs at Endoplasmic Reticulum Exit Sites in a COPI- and COPII-Dependent Manner. *J Virol* **82**: 12252–12264
- Wei T, Zhang C, Hong J, Xiong R, Kasschau KD, Zhou X, Carrington JC, Wang A** (2010b) Formation of Complexes at Plasmodesmata for Potyvirus Intercellular Movement Is Mediated by the Viral Protein P3N-PIPO. *PLoS Pathog* **6**: e1000962
- Wen R-H, Hajimorad MR** (2010) Mutational analysis of the putative pipo of soybean mosaic virus suggests disruption of PIPO protein impedes movement. *Virology* **400**: 1–7
- Whitham SA, Anderberg RJ, Chisholm ST, Carrington JC** (2000) Arabidopsis RTM2 gene is necessary for specific restriction of tobacco etch virus and encodes an unusual small heat shock-like protein. *Plant Cell* **12**: 569–582
- Whitham SA, Yamamoto ML, Carrington JC** (1999) Selectable viruses and altered susceptibility mutants in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* **96**: 772–777

- Wittmann S, Chatel H, Fortin MG, Laliberté J-F** (1997) Interaction of the Viral Protein Genome Linked of Turnip Mosaic Potyvirus with the Translational Eukaryotic Initiation Factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* Using the Yeast Two-Hybrid System. *Virology* **234**: 84–92
- Wright KM, Chapman S, Roberts AG** (2007) Plasmodesmal Targeting and Accumulation of TMV Movement Protein. *Plant signaling & behavior*. doi: 10.4161/psb.2.3.3729
- Xu Y, Kang D, Shi Z, Shen H, Wehner T** (2004) Inheritance of resistance to zucchini yellow mosaic virus and watermelon mosaic virus in watermelon. *J Hered* **95**: 498–502
- Yamaji Y, Maejima K, Komatsu K, Shiraishi T, Okano Y, Himeno M, Sugawara K, Neriya Y, Minato N, Miura C, et al** (2012) Lectin-Mediated Resistance Impairs Plant Virus Infection at the Cellular Level. *Plant Cell* **24**: 778–793
- Yamanaka T, Imai T, Satoh R, Kawashima A, Takahashi M, Tomita K, Kubota K, Meshi T, Naito S, Ishikawa M** (2002) Complete inhibition of tobamovirus multiplication by simultaneous mutations in two homologous host genes. *J Virol* **76**: 2491–2497
- Yamanaka T, Ohta T, Takahashi M, Meshi T, Schmidt R, Dean C, Naito S, Ishikawa M** (2000) TOM1, an *Arabidopsis* gene required for efficient multiplication of a tobamovirus, encodes a putative transmembrane protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 10107–10112
- Yeam I, Cavatorta JR, Ripoll DR, Kang B-C, Jahn MM** (2007) Functional dissection of naturally occurring amino acid substitutions in eIF4E that confers recessive potyvirus resistance in plants. *Plant Cell* **19**: 2913–2928
- Yoon JY, Green SK, Opeña RT** (1993) Inheritance of resistance to turnip mosaic virus in Chinese cabbage. *Euphytica* **69**: 103–108
- Yoshii M, Nishikiori M, Tomita K, Yoshioka N, Kozuka R, Naito S, Ishikawa M** (2004) The *Arabidopsis* cucumovirus multiplication 1 and 2 loci encode translation initiation factors 4E and 4G. *J Virol* **78**: 6102–6111
- Yoshii M, Yoshioka N, Ishikawa M, Naito S** (1998) Isolation of an *Arabidopsis thaliana* mutant in which accumulation of cucumber mosaic virus coat protein is delayed. *Plant J* **13**: 211–219
- Zhu J, Gopinath K, Murali A, Yi G, Hayward SD, Zhu H, Kao C** (2007) RNA-binding proteins that inhibit RNA virus infection. *PNAS* **104**: 3129–3134

Annexes

Annexe: Tableaux complémentaires

Table 5: 500 top markers when testing genome wide association with restricted PPV systemic infection in Arabidopsis accessions.

(A) Results of the mean binary data, after Fisher analysis.

SNP Rank	LG	Pos	-log10	SNP Rank	LG	Pos	-log10	SNP Rank	LG	Pos	-log10
1	5	12241030	4,72	41	4	8267588	2,97	81	1	9836126	2,73
2	4	8040627	3,89	42	4	9336018	2,97	82	1	24399999	2,73
3	2	19266695	3,78	43	4	14484024	2,97	83	1	30021466	2,73
4	1	22961917	3,72	44	2	4521955	2,96	84	2	16794879	2,73
5	3	3133265	3,66	45	3	2561423	2,96	85	4	7182622	2,73
6	4	8262085	3,57	46	3	2738675	2,96	86	5	25913553	2,73
7	2	678546	3,49	47	3	2738977	2,96	87	2	7875693	2,68
8	2	14041823	3,49	48	3	16329691	2,96	88	3	2742250	2,68
9	4	10153320	3,44	49	5	20852332	2,91	89	2	7200363	2,68
10	1	19562908	3,42	50	3	9156928	2,90	90	3	14943632	2,68
11	3	6262358	3,42	51	1	28367628	2,89	91	2	12613719	2,66
12	4	7639543	3,42	52	2	8596357	2,89	92	2	14496260	2,66
13	1	24037196	3,35	53	3	8415644	2,89	93	3	8359155	2,66
14	4	10367563	3,35	54	4	8257769	2,89	94	3	19721184	2,66
15	3	21300489	3,34	55	4	8265063	2,89	95	4	6965943	2,66
16	3	21300599	3,34	56	4	8265546	2,89	96	4	8262399	2,66
17	4	7664611	3,34	57	5	25916071	2,89	97	5	15530055	2,66
18	4	10152907	3,34	58	1	16555187	2,85	98	5	25914680	2,66
19	4	17541537	3,34	59	2	5891779	2,85	99	3	12365096	2,63
20	2	6457358	3,33	60	2	12877165	2,85	100	1	9765204	2,62
21	4	7836308	3,24	61	1	16760790	2,82	101*	1	21089285	2,62
22	4	7836528	3,24	62	2	5597802	2,82	102	3	18876138	2,62
23	4	10151359	3,24	63	5	10831002	2,82	103	4	14955975	2,62
24	2	10764001	3,21	64	1	30021754	2,81	104	5	13591233	2,62
25	3	2541354	3,21	65	2	7885652	2,81	105	5	13591789	2,62
26	3	2739312	3,21	66	2	11088459	2,81	106	5	13604440	2,62
27	4	8266329	3,21	67	4	8259578	2,81	107	5	13610247	2,62
28	3	21897803	3,18	68	5	22301231	2,81	108	5	13610954	2,62
29	5	12115340	3,18	69	3	2806324	2,79	109	5	14876084	2,62
30	4	6041207	3,14	70	3	10580616	2,79	110	5	20712068	2,62
31	4	8258784	3,05	71	3	14876554	2,79	111	1	1893916	2,59
32	4	8258822	3,05	72	4	4744927	2,79	112	3	12854769	2,59
33	4	8265360	3,05	73	4	7068718	2,79	113	3	15207659	2,59
34	4	10154390	3,05	74	4	7835939	2,79	114	4	6222142	2,59
35	1	16757711	3,05	75	5	5149881	2,79	115	4	8262758	2,59
36	4	7095901	3,04	76	5	23495203	2,79	116	4	8262831	2,59
37	3	2738911	3,02	77	2	6663193	2,79	117	5	10789050	2,59
38	1	29206624	2,97	78	3	2741696	2,79	118	1	8541481	2,57
39	4	8259618	2,97	79	5	14898881	2,73	119	1	17292564	2,57
40	4	8267368	2,97	80	1	9836042	2,73	120	1	27343435	2,57

SNP Rank	LG	Pos	-log10
121	3	20287240	2,57
122	4	641578	2,57
123	4	11874046	2,57
124	5	7029558	2,57
125	5	9033309	2,57
126	5	9304347	2,57
127	5	12654000	2,57
128	5	13595139	2,57
129	2	5921273	2,57
130	2	7875890	2,57
131	2	7876265	2,57
132	3	16317636	2,57
133	1	12972691	2,52
134	3	12786759	2,52
135	4	15921914	2,52
136	5	16292375	2,52
137	1	5790914	2,52
138	1	30021188	2,52
139	2	19491252	2,52
140	3	6263951	2,52
141	3	8358778	2,52
142	4	8261999	2,52
143	4	9645378	2,52
144	4	9858962	2,52
145	4	14483618	2,52
146	1	26636122	2,48
147	2	2022363	2,48
148	2	2284382	2,48
149 ^e	3	21656578	2,48
150	4	14483409	2,48
151	5	7878716	2,48
152	5	19129067	2,48
153	5	19263346	2,48
154	5	23765269	2,48
155	5	24136739	2,48
156	2	7874789	2,47
157	3	7465474	2,47
158	3	16317385	2,47
159	4	7749140	2,47
160	4	18387387	2,47

SNP Rank	LG	Pos	-log10
161	3	1601128	2,45
162	3	4775851	2,45
163	4	5464231	2,45
164	4	18396130	2,45
165	5	7975679	2,45
166	5	25936904	2,45
167	1	10700082	2,45
168	1	11686148	2,45
169	1	27336654	2,45
170	2	7235816	2,45
171	3	1106853	2,45
172	3	4467415	2,45
173	3	14098613	2,45
174	5	10817736	2,45
175	5	10859768	2,45
176	5	13572108	2,45
177	5	13590091	2,45
178	5	13611946	2,45
179	5	13617567	2,45
180	5	22830321	2,45
181	2	7875007	2,42
182	2	7875279	2,42
183	3	10515444	2,42
184	4	10151393	2,42
185	4	17044324	2,42
186	5	20175731	2,42
187	5	21032466	2,42
188	1	23538017	2,39
189	2	678444	2,39
190	3	653643	2,39
191	3	6262266	2,39
192	3	6263484	2,39
193	3	6263708	2,39
194	3	15518079	2,39
195	3	16315902	2,39
196	3	22151954	2,39
197	4	8261672	2,39
198	4	8262879	2,39
199	4	10154471	2,39
200	1	22957819	2,39

SNP Rank	LG	Pos	-log10
201	1	22961382	2,39
202	1	22961993	2,39
203	1	27160869	2,39
204	2	7244599	2,39
205	3	1631255	2,39
206	3	6746612	2,39
207	3	8360089	2,39
208	4	13045192	2,39
209	5	25467455	2,39
210	1	9714132	2,37
211	1	19752811	2,37
212*	1	21041405	2,37
213	3	16175128	2,37
214	3	16966413	2,37
215	5	24817477	2,37
216	1	8118641	2,33
217	1	8197628	2,33
218	1	10055286	2,33
219	1	18821241	2,33
220	2	678586	2,33
221	2	7786183	2,33
222	3	3399885	2,33
223	3	9514112	2,33
224	5	5652126	2,33
225	5	24013347	2,33
226	1	4315563	2,33
227	2	6662173	2,33
228	2	7876981	2,33
229	3	9231106	2,33
230	3	12432968	2,33
231	3	16476118	2,33
232	4	8373961	2,33
233	4	10612585	2,33
234	5	17021747	2,33
235	1	2755691	2,30
236	1	9768880	2,30
237	1	11424122	2,30
238	1	11424527	2,30
239	1	13275524	2,30
240	1	27337052	2,30

SNP Rank	LG	Pos	-log10
241	2	6307879	2,30
242	2	7245434	2,30
243	2	7839611	2,30
244	3	680480	2,30
245	3	6339335	2,30
246	4	15802318	2,30
247	5	10823341	2,30
248	5	13581881	2,30
249	5	13592403	2,30
250	5	13595030	2,30
251	5	13616430	2,30
252	5	13617164	2,30
253	5	13626983	2,30
254	5	13627568	2,30
255	5	21501994	2,30
256	1	22956650	2,30
257	2	7877933	2,30
258	2	13231491	2,30
259	2	17692705	2,30
260	3	1861634	2,30
261	3	6263321	2,30
262	3	7575376	2,30
263	3	8215815	2,30
264	3	10298929	2,30
265	4	7053633	2,30
266	4	10155520	2,30
267	4	10316678	2,30
268	4	11895305	2,30
269	5	8038215	2,30
270	5	13581441	2,30
271	5	13582428	2,30
272	5	13583334	2,30
273	5	19247855	2,30
274	5	20924785	2,30
275	5	24610923	2,30
276	1	20000232	2,28
277	2	6662099	2,28
278	2	7873920	2,28
279	3	5502444	2,28
280	3	10579074	2,28

SNP Rank	LG	Pos	-log10
281	3	21280905	2,28
282	3	23379946	2,28
283	4	8764497	2,28
284	5	3732448	2,28
285	5	19671004	2,28
286	5	26060387	2,28
287	1	18837502	2,27
288	1	24257507	2,27
289	2	7774024	2,27
290	2	9902944	2,27
291	3	4282313	2,27
292	3	8358371	2,27
293	3	14265609	2,27
294	3	21313371	2,27
295	4	5985595	2,27
296	4	9857179	2,27
297	4	11916425	2,27
298	4	12659673	2,27
299	5	11583188	2,27
300	1	11311619	2,23
301	1	17675218	2,23
302	2	7873482	2,23
303	3	648658	2,23
304	3	8949179	2,23
305	3	9312971	2,23
306	3	9313017	2,23
307	3	16844600	2,23
308	4	7640728	2,23
309	4	8374077	2,23
310	5	3732580	2,23
311	5	6519202	2,23
312	5	17549810	2,23
313	5	20107420	2,23
314	1	11852701	2,22
315	1	13407006	2,22
316	1	21362706	2,22
317	1	22960369	2,22
318	1	25335685	2,22
319	2	8670452	2,22
320	2	15696368	2,22

SNP Rank	LG	Pos	-log10
321	3	2672381	2,22
322	3	3910963	2,22
323	3	5945917	2,22
324	3	5946051	2,22
325	3	6264217	2,22
326	3	6960033	2,22
327	3	7469106	2,22
328	3	17233128	2,22
329	3	22136989	2,22
330	4	6473028	2,22
331	4	6553088	2,22
332	4	10150785	2,22
333	4	10422068	2,22
334	4	12425969	2,22
335	4	12854265	2,22
336	4	16615701	2,22
337	4	17567640	2,22
338	5	18920468	2,22
339	5	24146357	2,22
340	1	26371952	2,21
341	2	11440811	2,21
342	2	14567891	2,21
343	3	4878891	2,21
344	3	9513648	2,21
345	4	8261903	2,21
346	4	8265302	2,21
347	4	8266219	2,21
348	4	8267874	2,21
349	4	9859330	2,21
350	4	17246884	2,21
351	5	17167587	2,21
352	3	15947007	2,19
353	3	17096076	2,19
354	4	9176420	2,19
355	5	16797713	2,19
356	5	24817660	2,19
357	1	11421998	2,17
358	1	11423390	2,17
359	1	13503249	2,17
360	1	17823275	2,17

SNP Rank	LG	Pos	-log10
361	1	24563406	2,17
362	1	27337022	2,17
363	1	27343312	2,17
364	2	1559597	2,17
365	2	2273091	2,17
366	2	6398430	2,17
367	2	7199613	2,17
368	2	7233035	2,17
369	2	7656225	2,17
370	3	3896717	2,17
371	3	11480645	2,17
372	3	11750284	2,17
373	3	12450643	2,17
374	3	20911987	2,17
375	3	23132839	2,17
376	4	4553581	2,17
377	4	11252630	2,17
378	4	11253372	2,17
379	4	12863882	2,17
380	5	12997073	2,17
381	5	13621474	2,17
382	5	16202901	2,17
383	1	22442780	2,15
384	1	23612265	2,15
385	1	24217140	2,15
386	2	7562351	2,15
387	2	11440779	2,15
388	3	2633105	2,15
389	3	4879208	2,15
390	3	8355783	2,15
391	3	10488185	2,15
392	4	4235769	2,15
393	4	6145872	2,15
394	4	7638358	2,15
395	5	8587214	2,15
396	5	12335180	2,15
397	1	9675348	2,15
398	3	2649701	2,15
399	3	3967157	2,15
400	3	8950564	2,15

SNP Rank	LG	Pos	-log10
401	4	6980545	2,15
402	4	10766528	2,15
403	5	7689728	2,15
404	5	21367041	2,15
405	5	24812453	2,15
406	1	1574240	2,14
407	1	6436332	2,14
408	1	8697532	2,14
409	1	22953730	2,14
410	2	13101164	2,14
411	2	13279392	2,14
412	2	15970425	2,14
413	3	752804	2,14
414	3	755369	2,14
415	3	6262060	2,14
416	3	6874323	2,14
417	3	14899471	2,14
418	3	15422548	2,14
419	3	16322297	2,14
420	3	16325218	2,14
421	3	16325922	2,14
422	3	19597356	2,14
423	3	22459067	2,14
424	4	6140251	2,14
425	4	14483445	2,14
426	5	7739515	2,14
427	5	7752286	2,14
428	5	13586576	2,14
429	5	14684769	2,14
430	5	25466763	2,14
431	1	8321668	2,10
432	1	17670357	2,10
433	1	17868570	2,10
434	1	27762741	2,10
435	1	28882022	2,10
436	2	6664293	2,10
437	2	10760184	2,10
438	2	15865769	2,10
439	3	5646263	2,10
440	3	9160316	2,10

SNP Rank	LG	Pos	-log10
441	3	10605073	2,10
442	4	8060628	2,10
443	4	8263448	2,10
444	4	13513949	2,10
445	5	716824	2,10
446	5	13715652	2,10
447	5	17327843	2,10
448	5	26060131	2,10
449	5	26060361	2,10
450	5	26061395	2,10
451	1	14251296	2,10
452	1	17405315	2,10
453	1	27290534	2,10
454	1	27458396	2,10
455	2	7068178	2,10
456	2	7789593	2,10
457	2	7894231	2,10
458	3	3452841	2,10
459	3	8691822	2,10
460	3	11917236	2,10
461	3	19021879	2,10
462	3	21336658	2,10
463	4	9856469	2,10
464	4	9857848	2,10
465	4	13076668	2,10
466	4	16934624	2,10
467	5	24139836	2,10
468	1	123313	2,07
469	1	11302143	2,07
470	1	11434031	2,07
471	1	18625569	2,07
472	1	22961584	2,07
473	1	26482645	2,07
474	1	28677535	2,07
475	2	6890603	2,07
476	2	13279078	2,07
477	2	13279507	2,07
478	3	349859	2,07
479	3	2727593	2,07
480	3	3448890	2,07

SNP Rank	LG	Pos	-log10
481	3	3467685	2,07
482	3	6263029	2,07
483	3	23430787	2,07
484	4	7305619	2,07
485	4	8259066	2,07
486	4	8763444	2,07
487	4	15378431	2,07
488	5	2896473	2,07
489	5	4123965	2,07
490	5	7887782	2,07
491	5	8028328	2,07
492	5	8029947	2,07
493	5	8112036	2,07
494	5	15084095	2,07
495	5	17449427	2,07
496	5	22655020	2,07
497	1	9676025	2,06
498	1	13754728	2,06
499	3	9159209	2,06
500	4	6971486	2,06

In bold, SNPs belonging to the interval depicted in table 2 in the RIL recombinant population.

*: SNPs belonging to the *rpv1* interval

⚭: SNPs belonging to the *sha3* interval

(B) Results of the quantitative data after Wilcoxon rank sum test.

SNP Rank	LG	Pos	-log10
1	5	20800524	4,88
2	1	15819293	4,82
3	5	5228101	4,73
4	1	4846774	4,55
5	4	16700233	4,44
6	4	10656266	4,35
7	1	11728267	4,28
8	2	18724710	4,25
9	5	20800205	4,25
10	3	11690210	4,23
11	1	4779840	4,18
12	1	9581403	4,17
13*	1	21067549	4,16
14	1	21365254	4,13
15	5	23955563	4,13
16	1	25008199	4,07
17	1	4618027	4,04
18	1	11715768	4,02
19	1	3931207	4,00
20	1	3931064	3,99
21	5	22589326	3,99
22	2	15605291	3,99
23	1	23420306	3,96
24	5	17203148	3,96
25	5	19891964	3,96
26	2	15600833	3,95
27	1	23315245	3,93
28	4	16700372	3,93
29	3	10226106	3,92
30	1	15821700	3,91
31	1	22332589	3,90
32	4	16699813	3,86
33	1	15689796	3,86
34	1	4862106	3,83
35	4	18378447	3,83
36	2	13587850	3,82
37	2	513819	3,82
38	4	16700715	3,81
39	4	16700996	3,81
40	1	4831897	3,80

SNP Rank	LG	Pos	-log10
41	4	10656443	3,80
42	1	23712125	3,77
43	1	3931363	3,73
44	4	18377279	3,73
45	1	25008312	3,73
46	1	4831145	3,72
47	5	19951385	3,72
48	3	5549480	3,72
49	2	18724817	3,71
50	1	22358059	3,71
51	1	24849946	3,71
52	2	18724456	3,70
53	1	19550352	3,70
54	4	16701486	3,68
55	4	13168318	3,68
56	2	15174682	3,68
57	5	17208241	3,68
58	2	15207029	3,68
59	5	74614	3,67
60	1	13168475	3,67
61	2	346068	3,66
62	5	8973390	3,65
63	5	8984128	3,64
64	5	8984212	3,64
65	3	8241597	3,64
66	5	18470541	3,64
67	1	23270844	3,64
68	2	15601176	3,63
69	2	15604801	3,63
70	1	16838214	3,63
71	1	12847006	3,62
72	1	25401800	3,60
73	5	23852811	3,59
74	3	20076683	3,56
75	2	15174329	3,56
76	2	15174573	3,56
77	4	5633006	3,55
78	4	16701718	3,54
79	4	16701907	3,54
80	1	6854060	3,54

SNP Rank	LG	Pos	-log10
81	5	12425266	3,53
82	5	15341759	3,53
83	1	4833316	3,52
84	1	4832694	3,52
85	1	4832716	3,52
86	3	15789564	3,51
87	2	15601335	3,51
88	1	11175801	3,51
89	4	10642922	3,50
90	4	13290544	3,49
91	1	15746571	3,49
92	1	4831483	3,49
93	3	21178248	3,49
94	2	514251	3,48
95	2	15173937	3,48
96	1	15818899	3,48
97	4	18375557	3,46
98 ^o	3	21603348	3,45
99	5	19981133	3,44
100	5	8980699	3,43
101	5	8981170	3,43
102	1	19581065	3,43
103	1	10728866	3,43
104	4	16700485	3,42
105	4	8277877	3,41
106	2	15606733	3,40
107	4	16702183	3,40
108	5	17203928	3,39
109	3	19907277	3,39
110	1	25892575	3,39
111	1	25893312	3,39
112	1	10728584	3,38
113	1	4944030	3,38
114	4	16699891	3,37
115	5	17208502	3,37
116	4	16869870	3,36
117	2	15606718	3,36
118	2	11205070	3,36
119	3	9620805	3,36
120	1	11185299	3,36

SNP Rank	LG	Pos	-log10
121	1	26424091	3,35
122	1	15796346	3,34
123	4	10765149	3,34
124	1	29251969	3,33
125	3	17243443	3,33
126	2	15605637	3,33
127	2	4375049	3,33
128	2	11971527	3,33
129	2	5419022	3,33
130	4	16869831	3,32
131	4	7835611	3,32
132	5	837150	3,32
133	1	25915669	3,32
134	4	13482064	3,32
135	1	11693561	3,32
136	2	12169771	3,32
137	4	18370061	3,31
138	4	10924322	3,30
139	2	14463450	3,29
140	2	13552044	3,28
141	1	4831431	3,28
142	5	17203273	3,28
143	5	1109664	3,28
144	1	25892806	3,28
145	1	14543663	3,28
146	1	15882809	3,28
147	1	11703641	3,27
148	5	23966568	3,27
149	5	19889853	3,27
150	5	19890913	3,27
151	4	16700254	3,27
152	5	19899183	3,26
153	3	15801983	3,25
154	2	19166623	3,25
155	3	19920637	3,25
156	5	5218864	3,24
157	1	22190292	3,24
158	1	15821026	3,24
159	1	16658101	3,24
160	1	25273253	3,24

SNP Rank	LG	Pos	-log10
161	2	17295521	3,24
162	4	12382199	3,24
163	1	4831103	3,23
164	2	11979961	3,22
165	1	26472040	3,22
166	2	18727429	3,22
167	3	1174877	3,22
168	5	20813838	3,22
169	1	4831654	3,22
170	3	5498280	3,22
171	1	21271426	3,21
172	3	17258104	3,21
173*	1	21217366	3,19
174	5	17205123	3,19
175	5	22626424	3,19
176	2	12009906	3,19
177	2	19168513	3,18
178	3	3466897	3,18
179	3	11735098	3,18
180	1	22815589	3,18
181	1	15435748	3,18
182	1	16659352	3,17
183	1	23349817	3,17
184	1	4831504	3,17
185	1	20081964	3,17
186	1	23582185	3,15
187*	1	21187854	3,15
188	4	18372634	3,15
189	1	4816433	3,15
190	2	15208651	3,14
191	1	21270725	3,14
192	3	21287337	3,14
193	2	6044321	3,14
194	3	11736633	3,14
195	5	7027849	3,14
196	4	18525183	3,13
197	3	17244583	3,13
198	5	17992511	3,12
199	1	15816518	3,12
200	3	21277646	3,12

SNP Rank	LG	Pos	-log10
201	3	6228489	3,12
202	1	7280243	3,12
203	1	22887337	3,12
204	1	22232488	3,12
205	3	11736049	3,12
206 ^a	3	21613164	3,12
207	1	25984413	3,11
208	4	13019803	3,11
209	1	22190760	3,11
210	2	8125031	3,11
211	5	17203676	3,11
212	3	18589490	3,11
213	5	1102020	3,10
214	1	29255430	3,10
215	2	13532768	3,10
216	2	17292967	3,10
217	4	205287	3,10
218	4	208650	3,10
219	4	209531	3,10
220	4	212222	3,10
221	1	7289743	3,09
222	3	7618475	3,09
223	1	21515265	3,09
224	5	5894392	3,09
225	2	2524079	3,09
226	4	18371535	3,09
227	3	20085557	3,08
228	4	3555657	3,08
229	1	25951144	3,08
230	5	15347229	3,08
231	5	8981744	3,08
232	1	3386255	3,07
233	1	3387374	3,07
234	3	19684107	3,07
235	4	13498738	3,07
236	1	14216376	3,07
237	1	4739205	3,07
238	1	26467944	3,07
239	1	25275476	3,06
240	1	22684097	3,06

SNP Rank	LG	Pos	-log10
241	5	15662882	3,06
242	5	6687401	3,06
243	3	11735192	3,06
244	2	15592142	3,05
245	5	17213109	3,05
246	3	19906307	3,05
247	3	18590572	3,04
248	5	8922657	3,04
249	3	18599067	3,04
250	5	19933671	3,04
251	5	19934007	3,04
252	5	19934235	3,04
253	5	19934412	3,04
254	5	20803097	3,03
255	1	4847697	3,03
256	1	15731240	3,03
257	2	10867490	3,03
258	2	10868216	3,03
259	5	15419949	3,03
260	1	16670471	3,03
261	3	13112895	3,02
262	5	20808595	3,02
263	5	20808643	3,02
264	5	1095574	3,02
265	4	10706451	3,02
266	4	10708036	3,02
267	4	5266321	3,02
268	4	13019314	3,02
269	3	18590304	3,02
270	3	11735726	3,02
271	2	1559125	3,01
272	4	12486807	3,01
273	1	17443780	3,01
274	3	20077024	3,01
275	5	19271143	3,00
276	4	7900848	3,00
277	1	11463428	3,00
278	1	8292255	3,00
279	1	14284436	3,00
280	4	13504766	3,00

SNP Rank	LG	Pos	-log10
281	1	14204470	3,00
282	1	22282317	3,00
283	1	24882709	3,00
284	1	14058677	2,99
285	1	13141534	2,99
286	1	15733455	2,99
287	1	15819397	2,99
288	1	15820203	2,99
289	1	15883008	2,99
290	5	20807671	2,98
291	1	25060990	2,97
292	1	11698778	2,97
293	2	12150390	2,97
294	1	22333862	2,97
295	3	19908225	2,97
296	5	10242444	2,97
297	1	22367088	2,96
298	5	6691685	2,96
299	3	15733959	2,96
300	1	6857390	2,96
301	1	15867145	2,96
302	1	9951986	2,96
303	5	2499745	2,96
304	3	17940573	2,96
305	1	23592236	2,96
306	2	19424980	2,96
307	2	5531949	2,96
308	1	25348206	2,95
309	1	25407457	2,95
310	1	24865360	2,95
311	1	25414126	2,95
312	1	4109754	2,95
313	3	21198120	2,95
314	4	6228768	2,95
315	5	12328010	2,95
316	1	12132377	2,95
317	2	303149	2,95
318	2	12170887	2,95
319	1	22407867	2,94
320	3	8090677	2,94

SNP Rank	LG	Pos	-log10
321	4	16853732	2,94
322	5	20729938	2,94
323	4	12462284	2,94
324	4	12790213	2,94
325	3	21289173	2,94
326	1	15533394	2,93
327	2	12150432	2,93
328	4	18494850	2,92
329	5	1103223	2,92
330	4	13166072	2,92
331	1	25897148	2,92
332	3	8201684	2,92
333	3	12741334	2,92
334	2	2433941	2,92
335	5	8978878	2,92
336	1	4838371	2,92
337	5	6601789	2,91
338	4	13462722	2,91
339 ^a	3	21614908	2,91
340	4	2985444	2,91
341	1	23806708	2,91
342	1	23584854	2,91
343	5	7904606	2,91
344	1	4854468	2,91
345	1	10734127	2,90
346	3	21175786	2,90
347	1	25392576	2,90
348	1	25393585	2,90
349	2	499143	2,90
350	2	499863	2,90
351	1	25889514	2,89
352	3	7616549	2,89
353	3	7618091	2,89
354	3	7618211	2,89
355	3	17258709	2,89
356	5	15232894	2,89
357	5	4344025	2,89
358	5	22258342	2,89
359	3	5032864	2,88
360	1	22887582	2,88

SNP Rank	LG	Pos	-log10
361	2	15174154	2,88
362	1	16837702	2,88
363	1	25911733	2,88
364	1	23948994	2,88
365	3	22054161	2,88
366	5	3841499	2,87
367	1	9867806	2,87
368	3	21408359	2,87
369	5	9431706	2,87
370	4	2029723	2,87
371	5	7968463	2,87
372	4	18370684	2,87
373	5	9999009	2,86
374	4	7582479	2,86
375	4	10586167	2,86
376	4	10645590	2,86
377	1	4737964	2,86
378	5	6708014	2,86
379	1	7604416	2,86
380	4	7768813	2,86
381	2	13690896	2,85
382	1	22690254	2,85
383	1	22784896	2,85
384	4	18531464	2,85
385	1	4738610	2,85
386	2	751448	2,85
387	2	17228333	2,85
388	1	22284957	2,85
389	3	22410020	2,85
390	5	11563984	2,85
391	1	22886072	2,85
392	2	12100822	2,84
393	1	15818418	2,84
394	1	25383658	2,84
395	5	5218713	2,84
396	3	23187248	2,84
397	1	21669791	2,84
398	2	2431023	2,84
399	1	25346518	2,84
400	1	25406162	2,84

SNP Rank	LG	Pos	-log10
401	5	837792	2,84
402	1	16744507	2,84
403	5	19270230	2,83
404	5	19270578	2,83
405	4	13461947	2,83
406	1	25435198	2,83
407	1	25446525	2,83
408	1	25447194	2,83
409	3	9899934	2,83
410	3	19907106	2,83
411	3	19907418	2,83
412	2	10868733	2,82
413	4	12543317	2,82
414	5	21169987	2,82
415	1	20081480	2,82
416	4	18380424	2,82
417	3	20092426	2,82
418	2	4335414	2,82
419	5	15288388	2,82
420	4	13463679	2,82
421	1	4831529	2,81
422	1	9966389	2,81
423	1	22869618	2,81
424	5	21169693	2,81
425	5	261187	2,81
426	1	23224556	2,81
427	3	2513587	2,81
428	4	4720327	2,81
429	3	4281271	2,80
430	3	10467884	2,80
431	2	13572830	2,80
432	3	6245367	2,80
433	4	10715699	2,80
434	1	9274121	2,80
435	2	653472	2,80
436	5	855186	2,80
437	2	4336054	2,80
438	3	9245579	2,79
439	4	11720861	2,79
440	3	20076957	2,79

SNP Rank	LG	Pos	-log10
441	3	19917339	2,79
442*	1	21212550	2,79
443	1	28705904	2,79
444	2	17373409	2,79
445	3	21151893	2,79
446	1	19587888	2,79
447	4	10654632	2,78
448	1	12100067	2,78
449	3	19906268	2,78
450	1	4816011	2,78
451	1	26213556	2,78
452	1	23014444	2,78
453	2	4184758	2,77
454	1	26401408	2,77
455	1	4868166	2,77
456	3	19377261	2,77
457	1	23206403	2,77
458	1	25011390	2,77
459	4	171611	2,77
460	2	314948	2,77
461	5	21142349	2,77
462	1	23206520	2,77
463	2	12171758	2,77
464	1	15796490	2,77
465	4	16419377	2,77
466	5	5853316	2,77
467	4	13462095	2,76
468	4	14734108	2,76
469	1	17149445	2,76
470	2	10495964	2,76
471	2	346114	2,76
472	1	23265950	2,76
473	4	16799246	2,76
474	3	21310498	2,75
475	5	19892774	2,75
476	1	16180832	2,75
477	2	13705282	2,75
478	5	6126712	2,75
479	1	16648692	2,75
480	1	16648834	2,75

SNP Rank	LG	Pos	-log10
481	5	16403054	2,75
482	1	3930572	2,75
483	1	6723516	2,74
484	5	15233179	2,74
485	1	22690950	2,74
486	2	7568164	2,74
487	1	12849492	2,74
488	2	17323406	2,74
489	4	5296441	2,74
490	1	10730388	2,74
491	4	12609155	2,74
492	5	21086496	2,74
493	5	17210424	2,74
494	1	25911936	2,74
495	1	25914036	2,74
496	1	22332460	2,73
497	3	19896689	2,73
498	4	13497226	2,73
499	1	23269125	2,73
500	5	3987414	2,73

In bold, SNPs belonging to the interval depicted in table 2 in the RIL recombinant population.

*: SNPs belonging to the *rpv1* interval

⦿: SNPs belonging to the *sha3* interval

(C) Results of the quantitative data after PLINK method.

SNP Rank	LG	Pos	-log10
1*	1	21067549	6,60
2	1	11728267	6,02
3	1	11715768	5,41
4	2	13690896	5,31
5	1	16658101	5,03
6	1	11693561	4,98
7	1	15435748	4,92
8	2	13687586	4,77
9	5	23966568	4,75
10	2	5190584	4,74
11	3	15801983	4,72
12	2	2524079	4,69
13	2	5109582	4,63
14	4	5430492	4,56
15	2	5081481	4,54
16	4	8277877	4,52
17	5	26594585	4,48
18	1	11703641	4,47
19	1	11698778	4,43
20	1	23315245	4,41
21	5	19891964	4,40
22	5	13607312	4,38
23	2	5091428	4,35
24	4	10642922	4,35
25	1	25305375	4,33
26	1	26482113	4,31
27	1	4618027	4,25
28	3	10226106	4,25
29	2	2476399	4,24
30	3	18491759	4,18
31	1	15821700	4,17
32	1	16744507	4,12
33	5	5228101	4,12
34	2	13587850	4,09
35	1	15819293	4,05
36	3	15789564	4,05
37	1	23712125	4,05
38	1	21365254	4,01
39	5	13574184	4,01
40	3	3466897	4,00

SNP Rank	LG	Pos	-log10
41	2	1327044	3,98
42	3	16509347	3,97
43	1	15689796	3,96
44	5	19865003	3,94
45	2	18724710	3,93
46*	1	21210902	3,90
47*	1	21216992	3,90
48	2	504403	3,87
49	1	26204881	3,85
50	5	20800524	3,83
51	4	18540821	3,83
52	2	499143	3,81
53	2	499863	3,81
54*	1	21187854	3,81
55	1	7051889	3,80
56	5	7027849	3,78
57	5	22346907	3,77
58	1	17058261	3,76
59	4	18560658	3,75
60	3	11690210	3,74
61	1	16648692	3,73
62	1	16648834	3,73
63	3	5817857	3,72
64	1	13168475	3,71
65	2	2464834	3,70
66	5	19889853	3,70
67	5	19890913	3,70
68	1	7047558	3,69
69	5	7023934	3,68
70	4	8002077	3,68
71	2	13731498	3,65
72	1	21856804	3,65
73	5	19981133	3,65
74	5	23955563	3,63
75	2	18724817	3,62
76	5	10672905	3,62
77	1	25951144	3,62
78	5	19899183	3,60
79	4	18566786	3,59
80	2	5088825	3,58

SNP Rank	LG	Pos	-log10
81	3	14360885	3,58
82	4	16700254	3,56
83	1	26424091	3,55
84	4	7768813	3,54
85	4	16700233	3,54
86	3	21278599	3,54
87	3	9620805	3,54
88	1	16675380	3,54
89	2	2582801	3,53
90	4	18375557	3,53
91	2	655376	3,52
92	2	303149	3,50
93	3	13424519	3,49
94	4	18443578	3,49
95	3	15700999	3,46
96	3	5498280	3,46
97	2	2433941	3,45
98	1	26933861	3,45
99	1	22282317	3,44
100	1	3948738	3,44
101	4	10656266	3,44
102	3	22412570	3,44
103	3	1916588	3,43
104	5	7044722	3,41
105	2	504633	3,41
106	3	19377261	3,41
107	4	18525183	3,41
108	2	5531949	3,40
109	5	6126712	3,40
110	1	4426514	3,40
111	5	12328010	3,40
112	4	13525049	3,39
113	4	18525090	3,38
114	4	18526048	3,38
115	4	18527805	3,38
116	4	18528081	3,38
117	4	18528720	3,38
118	4	18530425	3,38
119	2	2095503	3,37
120	5	12425266	3,37

SNP Rank	LG	Pos	-log10
121	2	2429019	3,36
122	2	2429141	3,36
123	5	19892774	3,36
124	4	12382199	3,34
125	4	12171904	3,34
126	4	8381176	3,34
127	2	654512	3,33
128	5	26660902	3,32
129	2	12009906	3,32
130	5	18470541	3,31
131	5	19618671	3,31
132	5	22589326	3,30
133	4	18534990	3,30
134	4	16700715	3,30
135	4	16700996	3,30
136	5	15341759	3,30
137	1	26430501	3,30
138	2	15592142	3,29
139	1	27554543	3,28
140	5	7044948	3,28
141	5	15347229	3,27
142	1	21270725	3,27
143	4	15948456	3,26
144*	1	21217366	3,26
145	1	22232488	3,26
146	2	10515892	3,26
147	2	869010	3,25
148	3	8241597	3,25
149	2	17295521	3,25
150	3	9826743	3,25
151	4	16869870	3,24
152	2	13730349	3,24
153	1	23420306	3,24
154	1	25275476	3,24
155	4	18531464	3,23
156	1	14176644	3,23
157	1	24144623	3,23
158	4	8579722	3,22
159	1	21240024	3,22
160	3	3218703	3,21

SNP Rank	LG	Pos	-log10
161	5	3987414	3,21
162	5	18120416	3,21
163	2	2431023	3,21
164	1	21693546	3,20
165	4	16701486	3,20
166	5	15405397	3,20
167	2	2471375	3,19
168	2	15605291	3,19
169	1	4779840	3,19
170	2	1532196	3,19
171	2	5540491	3,18
172	2	2581123	3,18
173	2	2469037	3,18
174	4	18524915	3,17
175	4	18531502	3,17
176	2	2461431	3,17
177	2	18724456	3,17
178	3	5549480	3,17
179	5	20432076	3,17
180	5	812897	3,16
181	5	17240505	3,16
182	4	18378447	3,16
183	1	28753759	3,16
184	2	17103609	3,16
185	2	2471122	3,16
186	2	2485492	3,16
187	2	2515233	3,16
188	2	2588509	3,16
189	3	360627	3,16
190	5	7045095	3,16
191	5	9677850	3,15
192	5	17208241	3,15
193	4	16699813	3,15
194	1	11742910	3,15
195	1	23270844	3,15
196	4	9812534	3,15
197	1	4862106	3,14
198	1	10728866	3,14
199	1	26472040	3,14
200	5	22626424	3,14

SNP Rank	LG	Pos	-log10
201	1	15821026	3,14
202	4	18494850	3,14
203	1	22275176	3,14
204	1	15746571	3,13
205	2	19310613	3,13
206	4	18540220	3,13
207	1	22358059	3,13
208	1	11282480	3,13
209	4	12609155	3,12
210	3	5499975	3,12
211*	1	21212550	3,12
212	1	11686891	3,12
213	4	16700372	3,12
214	2	7332999	3,11
215	2	2948204	3,11
216	5	9346657	3,10
217	2	2471585	3,10
218	3	11736633	3,10
219	1	23670579	3,09
220	4	12609089	3,09
221	1	13143486	3,09
222	1	24164624	3,09
223	1	22281064	3,08
224	3	21277646	3,07
225	4	16701718	3,07
226	4	16701907	3,07
227	2	18727429	3,07
228	2	7201750	3,06
229	1	24144082	3,06
230	5	22226852	3,05
231	4	18523822	3,05
232	3	19339607	3,05
233	5	17203148	3,05
234	4	8584806	3,05
235	1	10728584	3,04
236	4	8122351	3,04
237	4	2022497	3,04
238	4	2025142	3,04
239	1	23206403	3,04
240	4	18377279	3,04

SNP Rank	LG	Pos	-log10
241	4	10656443	3,03
242	3	6488918	3,03
243	5	1139738	3,03
244	2	8125031	3,03
245	5	24458830	3,03
246	1	27379440	3,03
247	5	5287758	3,02
248	5	3178060	3,02
249	2	1559125	3,02
250	2	5084897	3,02
251	5	18411217	3,01
252	4	8617241	3,01
253	4	16700485	3,01
254	1	27703453	3,01
255	4	13525407	3,00
256	1	15818899	3,00
257	3	3224906	3,00
258	2	14381533	3,00
259	5	15662882	3,00
260	5	10689784	3,00
261	5	19797464	2,99
262	1	15796346	2,98
263	1	16986564	2,98
264	2	12100822	2,98
265	2	15174682	2,98
266	4	18380424	2,98
267	5	17213109	2,97
268	1	25892575	2,97
269	1	25893312	2,97
270	5	9820093	2,97
271	1	26932283	2,97
272	1	26933535	2,97
273	1	21237481	2,97
274	4	18531790	2,96
275	4	18535258	2,96
276	1	15533394	2,96
277	2	13692786	2,96
278	2	13694260	2,96
279	2	13706722	2,96
280	4	13509031	2,96

SNP Rank	LG	Pos	-log10
281	3	9617139	2,96
282	2	2426363	2,95
283	2	15601335	2,95
284	1	27567381	2,95
285	2	15601176	2,95
286	2	15604801	2,95
287	5	7015014	2,95
288	1	21381938	2,94
289	5	17313656	2,93
290	1	25915669	2,93
291	5	4051910	2,93
292	3	3887421	2,93
293	3	19281739	2,93
294	3	7235698	2,93
295	1	25816847	2,93
296	5	19866379	2,93
297	4	16702183	2,92
298	3	21287337	2,92
299	2	513819	2,92
300	2	2429964	2,92
301	2	15173937	2,92
302	5	1102020	2,92
303	3	16920679	2,92
304	2	2441571	2,92
305	5	17311567	2,91
306	1	22190292	2,91
307	3	4279953	2,91
308	1	21271547	2,91
309	5	17208502	2,91
310	5	17752436	2,91
311	1	25401800	2,91
312	2	15207029	2,91
313	1	23443965	2,90
314	1	23753853	2,90
315	2	4794567	2,90
316	3	3229588	2,90
317	4	13523210	2,90
318	5	19911060	2,90
319	5	20800205	2,89
320	5	23852811	2,89

SNP Rank	LG	Pos	-log10
321	1	17391504	2,89
322	1	16648406	2,89
323	4	18325224	2,89
324	2	13798180	2,88
325	5	7040848	2,88
326*	1	21212104	2,88
327	3	18590572	2,88
328	1	9924865	2,88
329	5	23977259	2,88
330	3	4281271	2,88
331	1	11285801	2,88
332	5	5759960	2,88
333	5	1078192	2,87
334	2	15174329	2,87
335	2	15174573	2,87
336	1	25238540	2,87
337	1	20142834	2,87
338	1	23624860	2,86
339	1	23625286	2,86
340	1	23627676	2,86
341	2	1592856	2,86
342	4	8170277	2,86
343	4	18495170	2,86
344	4	18495870	2,86
345	2	2440607	2,86
346	5	17203928	2,86
347	1	26932183	2,86
348	1	26933265	2,86
349	5	74614	2,86
350	5	22069696	2,86
351	2	14819427	2,86
352	3	4288029	2,85
353	4	8408509	2,85
354	5	5218864	2,85
355	3	23187248	2,85
356	3	13083597	2,85
357	3	1174877	2,84
358	1	25897148	2,84
359	4	8381770	2,84
360	1	21271426	2,84

SNP Rank	LG	Pos	-log10
361	3	9302275	2,84
362	3	19396816	2,84
363	4	12063800	2,84
364	5	1103223	2,84
365	3	10612842	2,84
366	4	12790213	2,84
367	1	24151402	2,83
368	1	17443780	2,83
369*	1	21179770	2,83
370	1	24148389	2,83
371	1	25892806	2,83
372	3	19338837	2,83
373	4	5147809	2,83
374	3	21288391	2,83
375	4	16869831	2,83
376	1	9656646	2,82
377	1	24143391	2,82
378	1	24144285	2,82
379	1	24144753	2,82
380	1	24146158	2,82
381	1	24147454	2,82
382	1	24147805	2,82
383	1	24148169	2,82
384	3	3184428	2,82
385	1	4868166	2,82
386	1	24865360	2,81
387	2	12169771	2,81
388	5	20555734	2,81
389	1	4586783	2,81
390	5	786323	2,81
391	1	14216376	2,80
392	5	10242444	2,80
393	1	23265950	2,80
394	5	262460	2,80
395	4	13480465	2,79
396	1	23747946	2,79
397	1	4847697	2,79
398	4	13478844	2,79
399 ^ψ	3	21614908	2,79
400	3	18590304	2,79

SNP Rank	LG	Pos	-log10
401	3	11672462	2,79
402	2	14834184	2,79
403	2	14791626	2,79
404	4	10641052	2,79
405	5	12225673	2,79
406	1	22190760	2,79
407	3	21289173	2,79
408	4	2985444	2,78
409	1	22745513	2,78
410	1	14058677	2,78
411	5	20791682	2,78
412	2	490567	2,78
413	1	8740782	2,78
414	3	19063939	2,77
415	2	14831654	2,77
416	2	13805237	2,77
417	5	15491802	2,77
418	1	3277589	2,77
419	1	25348206	2,77
420	2	79128	2,77
421	3	17243443	2,77
422	1	21856527	2,76
423	5	5853316	2,76
424	2	2528248	2,76
425	2	6835863	2,76
426	2	7202337	2,76
427	1	28095130	2,76
428	3	22968931	2,76
429	5	11563984	2,75
430	4	8276269	2,75
431	2	2484766	2,75
432	4	15986572	2,75
433	4	15986670	2,75
434	5	7870746	2,75
435	3	21849105	2,75
436	5	16150803	2,75
437	1	27377810	2,75
438	5	1095574	2,75
439	2	5535930	2,75
440	2	15600833	2,74

SNP Rank	LG	Pos	-log10
441	3	10716217	2,74
442	5	14575681	2,74
443	3	10692405	2,74
444	1	8677724	2,74
445	5	15430896	2,74
446	4	13290544	2,74
447	2	2486756	2,74
448	1	4652410	2,74
449	4	5633006	2,74
450	2	514251	2,73
451	4	2614318	2,73
452	1	16935185	2,73
453	2	19166623	2,73
454	4	12609291	2,73
455	1	11185299	2,73
456	5	15275043	2,73
457	1	15731240	2,73
458	5	9104978	2,73
459	1	7053609	2,73
460	5	23734957	2,73
461	5	8574593	2,73
462	4	5147888	2,72
463	3	4281881	2,72
464	3	9244811	2,72
465	5	7044060	2,72
466	3	18613238	2,72
467	1	343125	2,72
468	1	3931207	2,72
469	3	6230728	2,72
470	4	9485519	2,72
471	3	9034268	2,72
472	1	28012197	2,72
473	2	13671301	2,72
474	1	8292255	2,72
475	1	25346518	2,72
476	2	8617527	2,71
477	5	17203676	2,71
478	2	2517462	2,71
479	5	14011898	2,71
480	2	498701	2,71

SNP Rank	LG	Pos	-log10
481	5	3989876	2,71
482	2	2593954	2,70
483	5	21671897	2,70
484	2	7195336	2,70
485	2	7202929	2,70
486	4	16722318	2,70
487	4	13463679	2,70
488	5	17523406	2,70
489	1	15882809	2,70
490	4	10804637	2,70
491	3	19396264	2,70
492	4	17251258	2,70
493	2	15605637	2,70
494	3	16070603	2,70
495	3	3860572	2,70
496	5	3518855	2,69
497	4	9290199	2,69
498	5	6708014	2,69
499	3	21885522	2,69
500	1	7570958	2,69

In bold, SNPs belonging to the interval depicted in table 2 in the RIL recombinant population.

*: SNPs belonging to the *rpv1* interval

⦿: SNPs belonging to the *sha3* interval

(D) Results of the quantitative data after EMMA method.

SNP Rank	LG	Pos	-log10
1*	1	21067549	6,60
2	1	11728267	6,20
3	1	11715768	5,56
4	2	13690896	5,31
5	1	16658101	5,17
6	1	11693561	5,05
7	1	15435748	4,92
8	2	13687586	4,77
9	5	23966568	4,75
10	2	5190584	4,74
11	2	2524079	4,72
12	3	15801983	4,72
13	2	5109582	4,63
14	4	5430492	4,56
15	2	5081481	4,54
16	4	8277877	4,52
17	5	26594585	4,48
18	1	11703641	4,47
19	1	11698778	4,43
20	1	23315245	4,41
21	5	19891964	4,40
22	5	13607312	4,38
23	2	5091428	4,35
24	4	10642922	4,35
25	3	18491759	4,34
26	1	25305375	4,33
27	1	26482113	4,31
28	1	4618027	4,26
29	3	10226106	4,25
30	2	2476399	4,24
31	1	15821700	4,17
32	1	16744507	4,12
33	5	5228101	4,12
34	2	13587850	4,09
35	1	15819293	4,05
36	3	15789564	4,05
37	1	23712125	4,05
38	1	21365254	4,01
39	5	13574184	4,01
40	3	3466897	4,00

SNP Rank	LG	Pos	-log10
41	2	1327044	3,98
42	3	16509347	3,97
43	1	15689796	3,96
44	5	19865003	3,94
45	2	18724710	3,93
46*	1	21210902	3,90
47*	1	21216992	3,90
48	2	504403	3,87
49	1	26204881	3,85
50	1	7051889	3,85
51	1	16648692	3,84
52	1	16648834	3,84
53	5	20800524	3,83
54	4	18540821	3,83
55	2	499143	3,81
56	2	499863	3,81
57*	1	21187854	3,81
58	5	7027849	3,78
59	5	7023934	3,77
60	5	22346907	3,77
61	1	17058261	3,76
62	4	18560658	3,75
63	1	16675380	3,75
64	3	11690210	3,74
65	3	5817857	3,72
66	1	13168475	3,71
67	2	2464834	3,70
68	5	19889853	3,70
69	5	19890913	3,70
70	1	7047558	3,69
71	4	8002077	3,68
72	2	13731498	3,65
73	1	21856804	3,65
74	5	19981133	3,65
75	5	23955563	3,63
76	2	18724817	3,62
77	5	10672905	3,62
78	1	25951144	3,62
79	5	19899183	3,60
80	4	18566786	3,59

SNP Rank	LG	Pos	-log10
81	2	5088825	3,58
82	3	14360885	3,58
83	4	16700254	3,56
84	1	26424091	3,55
85	4	7768813	3,54
86	4	16700233	3,54
87	3	21278599	3,54
88	3	9620805	3,54
89	2	2582801	3,53
90	4	18375557	3,53
91	2	655376	3,52
92	2	303149	3,50
93	3	13424519	3,49
94	3	5498280	3,49
95	5	15341759	3,49
96	4	18443578	3,49
97	2	2095503	3,48
98	3	15700999	3,46
99	2	2433941	3,45
100	1	26933861	3,45
101	1	22282317	3,44
102	1	3948738	3,44
103	4	10656266	3,44
104	3	22412570	3,44
105	5	7044722	3,43
106	3	1916588	3,43
107	2	504633	3,41
108	3	19377261	3,41
109	4	18525183	3,41
110	2	5531949	3,40
111	5	6126712	3,40
112	1	4426514	3,40
113	5	12328010	3,40
114	4	13525049	3,39
115	5	15347229	3,39
116	4	18525090	3,38
117	4	18528081	3,38
118	4	18528720	3,38
119	4	18530425	3,38
120	4	18526048	3,38

SNP Rank	LG	Pos	-log10
121	4	18527805	3,38
122	5	12425266	3,37
123	2	2429019	3,36
124	2	2429141	3,36
125	5	19892774	3,36
126	4	12382199	3,34
127	4	12171904	3,34
128	4	8381176	3,34
129	2	654512	3,33
130	5	26660902	3,32
131	2	12009906	3,32
132	5	18470541	3,31
133	5	19618671	3,31
134	5	22589326	3,30
135	4	18534990	3,30
136	4	16700715	3,30
137	4	16700996	3,30
138	5	7044948	3,30
139	5	17208241	3,30
140	1	26430501	3,30
141	2	15592142	3,29
142	1	27554543	3,28
143	1	21270725	3,27
144	4	15948456	3,26
145*	1	21217366	3,26
146	1	22232488	3,26
147	2	10515892	3,26
148	2	869010	3,25
149	3	8241597	3,25
150	2	17295521	3,25
151	3	3218703	3,25
152	3	9826743	3,25
153	4	16869870	3,24
154	2	13730349	3,24
155	1	23420306	3,24
156	1	25275476	3,24
157	4	18531464	3,23
158	1	11742910	3,23
159	1	14176644	3,23
160	1	24144623	3,23

SNP Rank	LG	Pos	-log10
161	4	8579722	3,22
162	1	21240024	3,22
163	5	3987414	3,22
164	5	18120416	3,21
165	2	2431023	3,21
166	5	20432076	3,21
167	1	21693546	3,20
168	4	16701486	3,20
169	5	15405397	3,20
170	2	2471375	3,19
171	2	15605291	3,19
172	1	4779840	3,19
173	2	1532196	3,19
174	3	5499975	3,18
175	2	5540491	3,18
176	2	2581123	3,18
177	2	2469037	3,18
178	4	18524915	3,17
179	4	18531502	3,17
180	2	2461431	3,17
181	2	18724456	3,17
182	3	5549480	3,17
183	1	4862106	3,17
184	5	812897	3,16
185	5	17240505	3,16
186	4	18378447	3,16
187	1	28753759	3,16
188	2	17103609	3,16
189	3	360627	3,16
190	2	2485492	3,16
191	2	2588509	3,16
192	2	2471122	3,16
193	2	2515233	3,16
194	5	7045095	3,16
195	5	9677850	3,15
196	3	3229588	3,15
197	4	16699813	3,15
198	5	17203148	3,15
199	4	18494850	3,15
200	1	23270844	3,15

SNP Rank	LG	Pos	-log10
201	4	9812534	3,15
202	1	10728866	3,14
203	1	26472040	3,14
204	5	22626424	3,14
205	1	15821026	3,14
206	1	22275176	3,14
207	1	15746571	3,13
208	2	19310613	3,13
209	4	18540220	3,13
210	1	22358059	3,13
211	1	11282480	3,13
212	4	12609155	3,12
213*	1	21212550	3,12
214	1	11686891	3,12
215	4	16700372	3,12
216	2	7332999	3,11
217	2	2948204	3,11
218	5	9346657	3,10
219	2	2471585	3,10
220	3	11736633	3,10
221	5	806858	3,09
222	1	23670579	3,09
223	4	12609089	3,09
224	1	13143486	3,09
225	1	24164624	3,09
226	1	22281064	3,08
227	3	21277646	3,07
228	4	16701718	3,07
229	4	16701907	3,07
230	2	18727429	3,07
231	5	4051910	3,06
232	2	7201750	3,06
233	1	24144082	3,06
234	5	22226852	3,05
235	4	18523822	3,05
236	3	19339607	3,05
237	4	8584806	3,05
238	2	12169771	3,05
239	1	10728584	3,04
240	4	8122351	3,04

SNP Rank	LG	Pos	-log10
241	4	2022497	3,04
242	4	2025142	3,04
243	1	23206403	3,04
244	4	18377279	3,04
245	2	13694260	3,03
246	2	13692786	3,03
247	2	13706722	3,03
248	4	10656443	3,03
249	1	18071380	3,03
250	3	6488918	3,03
251	5	1139738	3,03
252	2	8125031	3,03
253	5	24458830	3,03
254	1	27379440	3,03
255	5	5287758	3,02
256	5	3178060	3,02
257	2	1559125	3,02
258	2	5084897	3,02
259	3	3224906	3,01
260	5	18411217	3,01
261	4	8617241	3,01
262	4	16700485	3,01
263	1	27703453	3,01
264	4	13525407	3,00
265	1	15818899	3,00
266	2	14381533	3,00
267	5	15662882	3,00
268	5	9820093	3,00
269	5	10689784	3,00
270	5	20791682	2,99
271	5	19797464	2,99
272	1	16986564	2,98
273	1	15796346	2,98
274	4	18380424	2,98
275	2	15174682	2,98
276	2	12100822	2,98
277	5	17213109	2,97
278	1	25893312	2,97
279	1	25892575	2,97
280	1	26932283	2,97

SNP Rank	LG	Pos	-log10
281	1	26933535	2,97
282	1	21237481	2,97
283	4	18531790	2,96
284	4	18535258	2,96
285	1	15533394	2,96
286	4	13509031	2,96
287	1	25816847	2,96
288	3	9617139	2,96
289	2	2426363	2,95
290	2	15601335	2,95
291	1	27567381	2,95
292	2	15601176	2,95
293	2	15604801	2,95
294	5	7015014	2,95
295	1	16648406	2,94
296	1	21381938	2,94
297	5	17313656	2,93
298	1	25915669	2,93
299	2	14819427	2,93
300	3	3887421	2,93
301	3	19281739	2,93
302	3	7235698	2,93
303	5	19866379	2,93
304	4	16702183	2,92
305	3	21287337	2,92
306	2	513819	2,92
307	5	812383	2,92
308	5	812733	2,92
309	5	812845	2,92
310	2	2429964	2,92
311	5	786323	2,92
312	2	15173937	2,92
313	5	1102020	2,92
314	3	16920679	2,92
315	2	2441571	2,92
316	5	17311567	2,91
317	1	22190292	2,91
318	3	4279953	2,91
319	1	21271547	2,91
320	5	17208502	2,91

SNP Rank	LG	Pos	-log10
321	5	17752436	2,91
322	1	25401800	2,91
323	4	8170277	2,91
324	2	15207029	2,91
325	1	17443780	2,91
326	1	23753853	2,90
327	1	23443965	2,90
328	2	4794567	2,90
329	4	13523210	2,90
330	5	19911060	2,90
331	5	20800205	2,89
332	5	23852811	2,89
333	1	17391504	2,89
334	4	18325224	2,89
335	1	24151402	2,89
336	5	7040848	2,88
337	2	13798180	2,88
338*	1	21212104	2,88
339	3	18590572	2,88
340	1	9924865	2,88
341	5	23977259	2,88
342	3	4281271	2,88
343	1	11285801	2,88
344	5	5759960	2,88
345	2	14834184	2,88
346	3	21288391	2,88
347	5	1078192	2,87
348	2	15174329	2,87
349	2	15174573	2,87
350	1	25238540	2,87
351	1	20142834	2,87
352	1	23624860	2,86
353	1	23625286	2,86
354	1	23627676	2,86
355	2	1592856	2,86
356	4	18495170	2,86
357	4	18495870	2,86
358	2	2440607	2,86
359	5	17203928	2,86
360	1	26932183	2,86

SNP Rank	LG	Pos	-log10
361	1	26933265	2,86
362	5	74614	2,86
363	5	22069696	2,86
364	1	24148389	2,86
365	3	4288029	2,85
366	4	8408509	2,85
367	5	5218864	2,85
368	3	23187248	2,85
369	3	13083597	2,85
370	3	1174877	2,84
371	1	25897148	2,84
372	4	8381770	2,84
373	1	21271426	2,84
374	3	19396816	2,84
375	3	9302275	2,84
376	4	12063800	2,84
377	5	1103223	2,84
378	3	10612842	2,84
379	4	12790213	2,83
380*	1	21179770	2,83
381	1	25892806	2,83
382	3	19338837	2,83
383	4	5147809	2,83
384	4	16869831	2,83
385	3	3860572	2,82
386	1	24143391	2,82
387	1	24146158	2,82
388	1	24144285	2,82
389	1	24144753	2,82
390	1	24147454	2,82
391	1	24147805	2,82
392	1	24148169	2,82
393	1	9656646	2,82
394	3	3184428	2,82
395	1	4868166	2,82
396	1	24865360	2,81
397	5	20555734	2,81
398	1	4586783	2,81
399	1	14216376	2,80
400	5	10242444	2,80

SNP Rank	LG	Pos	-log10
401	1	23265950	2,80
402	1	8292255	2,80
403	5	262460	2,80
404	4	13480465	2,79
405	1	23747946	2,79
406	1	4847697	2,79
407	4	13478844	2,79
408 ^ψ	3	21614908	2,79
409	3	18590304	2,79
410	3	11672462	2,79
411	2	14791626	2,79
412	3	21289173	2,79
413	5	12225673	2,79
414	4	10641052	2,79
415	1	22190760	2,79
416	2	6835863	2,78
417	4	2985444	2,78
418	1	22745513	2,78
419	5	7870746	2,78
420	1	14058677	2,78
421	2	490567	2,78
422	1	8740782	2,78
423	3	19063939	2,77
424	2	14831654	2,77
425	2	13805237	2,77
426	5	15491802	2,77
427	1	3277589	2,77
428	5	23734957	2,77
429	1	25348206	2,77
430	2	79128	2,77
431	3	17243443	2,77
432	2	7202337	2,77
433	5	17203273	2,76
434	1	21856527	2,76
435	5	5853316	2,76
436	2	2528248	2,76
437	1	28095130	2,76
438	3	22968931	2,76
439	5	11563984	2,75
440	1	8677724	2,75

SNP Rank	LG	Pos	-log10
441	4	8276269	2,75
442	1	4652410	2,75
443	2	2484766	2,75
444	4	15986572	2,75
445	4	15986670	2,75
446	3	21849105	2,75
447	5	16150803	2,75
448	1	27377810	2,75
449	5	1095574	2,75
450	2	5535930	2,75
451	2	15600833	2,74
452	3	10716217	2,74
453	5	14575681	2,74
454	4	787126	2,74
455	3	10692405	2,74
456	5	15430896	2,74
457	5	15413676	2,74
458	4	13290544	2,74
459	5	17203676	2,74
460	3	19396264	2,74
461	2	2486756	2,74
462	4	5633006	2,74
463	2	514251	2,73
464	4	2614318	2,73
465	5	3518855	2,73
466	1	16935185	2,73
467	2	19166623	2,73
468	4	12609291	2,73
469	5	15275043	2,73
470	1	11185299	2,73
471	1	15731240	2,73
472	5	9104978	2,73
473	1	7053609	2,73
474	5	8574593	2,73
475	4	5147888	2,72
476	3	4281881	2,72
477	5	7044060	2,72
478	3	9244811	2,72
479	3	18613238	2,72
480	1	343125	2,72

SNP Rank	LG	Pos	-log10
481	1	8588425	2,72
482	1	3931207	2,72
483	3	6230728	2,72
484	5	19884339	2,72
485	4	9485519	2,72
486	3	9034268	2,72
487	2	13671301	2,72
488	1	28012197	2,72
489	1	25346518	2,72
490	2	8617527	2,71
491	2	2517462	2,71
492	5	14011898	2,71
493	2	498701	2,71
494	5	3989876	2,71
495	2	2593954	2,70
496	5	21671897	2,70
497	2	7202929	2,70
498	2	7195336	2,70
499	4	16722318	2,70
500	5	17523406	2,70

In bold, SNPs belonging to the interval depicted in table 2 in the RIL recombinant population.

*: SNPs belonging to the *rpv1* interval

⊙: SNPs belonging to the *sha3* interval

Résumé

La maladie de la Sharka est due à un virus de quarantaine, le *Plum Pox Virus* (PPV). Celui-ci infecte les arbres fruitiers à noyaux du genre *Prunus* pour lesquels il est nécessaire de trouver des moyens de lutte telle que la sélection et la plantation de variétés résistantes au virus. Or, chez ces espèces, les sources de résistance sont à l'heure actuelle en nombre limité, voire inexistantes. Il a été montré, au laboratoire, que ce virus est capable d'infecter *Arabidopsis thaliana* et qu'il existe chez cette espèce une grande diversité de réponse à l'infection. En effet, nous avons observé que certaines accessions présentaient un comportement de type résistant à partiellement sensible.

Deux méthodes d'inoculation ont été comparées: l'inoculation mécanique à partir de feuilles de *Nicotiana benthamiana* inoculées avec le clone infectieux pICPPVnkGFP et une inoculation par agro-infection à partir d'une souche *Agrobacterium tumefaciens* contenant le clone pBINPPVnkGFP. L'emploi de ces deux méthodes d'inoculation nous a permis de mettre en évidence une variabilité de réponse au PPV en fonction de la méthode utilisée.

En conséquence, cette étude visait donc à identifier le ou les facteur(s) de la plante hôte impliqué(s) dans l'infection virale.

L'agro-infection de populations recombinantes (F2 et RIL), de lignées multi-parentales ainsi que l'emploi de la génétique d'association a mis en évidence un locus majeur, *sha3*, qui contrôle le mouvement longue distance du PPV. La cartographie fine de ce locus a restreint l'intervalle de *sha3* à une vingtaine de gènes dont la plupart code pour des analogues de protéines à domaine MATH (meprin et TRAF). Puisque cette résistance est récessive, l'identification du gène *sha3* devrait conduire à la mise en évidence d'un facteur de l'hôte essentiel au mouvement du virus dans la plante hôte.

Après inoculation mécanique, l'analyse d'une population recombinante a révélé l'importance d'un locus majeur, distinct de *sha3* et positionné au milieu du bras long du groupe de liaison 1. Ce locus co-localise avec *rpv1*, déterminant décrit précédemment dans la descendance Cvi-1 x Ler (Sicard, Loudet et al. 2008). Ce même locus a été confirmé à la fois dans une population multi-parentale et par une approche de génétique d'association. Un gène candidat est actuellement en cours de validation au laboratoire.

Une étude visant à décomposer le mécanisme de résistance porté par l'accession JEA a été mise en place. Dans ce cas, il apparaît que la propagation du virus est inhibée dans les feuilles de la rosette mais pas dans les tissus floraux. Ainsi, la résistance/sensibilité au PPV chez JEA est fortement conditionnée par les stades physiologiques de la plante hôte. Des travaux complémentaires seront indispensables afin de décrire plus finement ce mécanisme de résistance très particulier.

Au terme de cette thèse, nous nous attendons à ce que l'identification de ces nouveaux gènes de résistance chez *Arabidopsis* permettent, après transfert, d'accroître la diversité des sources de résistance à la sharka chez les arbres fruitiers.