

EFFICACITÉ DE LA TRANSGENÈSE POUR LUTTER CONTRE LE VIRUS DE LA SHARKA

Michel RAVELONANDRO
INRA
UMR-GDPP 1090
Université de BordeauxII
BP 81
33883 VILLENAVE D'ORNON

1- INTRODUCTION

La sharka est une maladie virale qui a été décrite, pour une première, par un chercheur bulgare au début du 20^{ème} siècle (ATANASSOV, 1932). Les balkans ont donc représenté le site européen qui est à l'origine de cette maladie qui affecte principalement les arbres fruitiers à noyaux (abricotiers, cerisiers, pêchers et pruniers). Pathologistes et sélectionneurs européens ont porté un intérêt croissant afin d'identifier l'agent pathogène et, *de facto*, de contribuer activement à la lutte. Le virus de la sharka est naturellement transmissible par pucerons selon le mode non-persistant, c'est à dire que le virus est capté passivement par l'insecte-vecteur pour l'inoculer à une plante-hôte. L'homme occupe également une importance particulière comme vecteur non intentionnel de la maladie. Les échanges de matériels végétaux contaminés reflètent cette participation inconsciente à la dissémination du virus. Le virus de la sharka est considéré comme un pathogène de quarantaine (CEE, 1993). La présence de la maladie dans un pays interdit la pratique qui consisterait à autoriser explicitement la vente de matériel issu d'une propagation végétative qui n'est pas certifié comme étant indemne de virus. D'autre part, les manipulations expérimentales concernant le virus sont configurées selon des normes et des règles strictes conformément aux lois de l'Union européenne. Quoiqu'il faille reconnaître qu'au cours de ces dernières années, des progrès marquants ont été enregistrés dans l'étude de la structure, la compréhension du génôme viral et l'élaboration des stratégies de lutte. Cela n'a couvert jusqu'à présent que l'approche préventive qui est axée sur la reconnaissance des symptômes de la maladie, la détection précoce du virus que pour la recherche des gènes de résistance. Dans ce sens, la situation actuelle est encore loin de satisfaire les aspirations des arboriculteurs européens mais les recherches continuent de représenter une sérieuse approche pour neutraliser la diffusion du virus dans les vergers (KEGLER *et al.*, 1998).

Depuis 1986, le concept de résistance dérivée du pathogène est apparu comme une approche pleine d'espoir car elle permet de protéger une plante contre une infection virale (ABEL, P.P. *et al.*, 1986). De fil en aiguille, ces résultats ont été considérés comme un approche alternative pour le sélectionneur afin d'améliorer ses variétés culturales. Si la mise en œuvre de la transgenèse constitue certes un progrès non négligeable pour répondre à un problème économique causé par un bioagresseur, elle connaît par contre des difficultés techniques majeures. Actuellement il existe encore des espèces cultivées qu'on ne parvient

pas à transformer (cerisier, pêcher). Ce qui rend cette pratique comme étant opportune. Notre association avec un laboratoire américain qui maîtrise la transformation du prunier a permis d'aborder la biotechnologie comme une stratégie alternative pour lutter contre le virus de la sharka. Par suite de l'obtention des pruniers transgéniques exprimant le gène codant pour la capsid du virus de la sharka (SCORZA *et al.* 1994), nous avons établi un plan de recherche visant à évaluer au premier abord le comportement des plantes en serre de confinement (RAVELONANDRO *et al.*, 1997) afin d'envisager à la lumière des résultats atteints à confirmer les phénotypes observés en conditions naturelles.

Evaluer le comportement des OGM dans l'environnement consiste non seulement à vérifier l'efficacité de cette nouvelle propriété bénéfique pour la protection des plantes mais il apporte de surcroît de nouvelles connaissances sur le pathogène cible c-a-d le PPV. Le fait que le PPV est un virus de quarantaine soulève un critère fondamentalement difficile car les techniques et méthodologies à mettre en œuvre proviennent des travaux en serre de confinement alors que dans le cadre de ces défis, aucune faveur n'est prévisible à la réussite de ces travaux. Le clone C-5 pourra-t-il reproduire d'une manière homogène son comportement résistant quelles que soient les conditions environnementales (localisation géographique, climat, variabilité du parasite) où la plante est soumise. Le défi lancé dans le cadre de ces analyses a été diversifié afin de comprendre les limites possibles de la protection d'une plante pérenne contre un bioagresseur présent de manière endémique dans les sites testés.. Les résultats rapportés dans les lignes qui suivent comportent aussi bien les résultats des observations que l'interprétation scientifique des phénomènes rencontrés: telle que l'extinction post-transcriptionnelle du transgène (PTGS) et la co-suppression du génôme viral cible.

2- MATERIELS ET METHODES

2.1 Pruniers transgéniques

Le prunier domestique (*Prunus domestica*) est parmi les arbres fruitiers les plus cultivés dans les pays tempérés. Depuis la découverte de la maladie dans les balkans, c'est l'arbre fruitier qui est le plus menacé en Europe. C'est pourquoi l'intérêt de protéger cette espèce contre les effets néfastes de la sharka constitue l'un de nos objectifs. La résistance dérivée du pathogène représente l'approche qui a été choisie (SANFORD & JHONSTON, 1985). C'est une technologie qui consiste à introduire un segment de gène d'origine virale dans le chromosome de la plante de manière à ce que celle-ci qui est dite transformée puisse l'exprimer selon les processus naturels qui obéissent au dogme de la biologie moléculaire. Pour pouvoir reconnaître cette dernière des gènes marqueurs de transformations ont été également introduits. Plus d'une douzaine de clones transgéniques ont été régénérées sur milieux synthétiques contenant de la kanamycine et ont été par la suite acclimatés en serre afin d'être analysés pour les objectifs scientifiques fixés. Comme attendu le segment de gène introduit est facilement détecté par amplification génique à partir de l'ADN des pruniers sélectionnés. Dès lors ces clones ont été végétativement propagés par greffe et les scions obtenus évalués pour leur comportement vis-à-vis de l'infection virale.

2.2 Protocoles expérimentaux

Si la majorité des essais de résistance au virus n'ont concerné jusqu'à présent qu'à des cultures annuelles (courges, pommes de terre, papayer), (FUCHS & GONSALVES, 1995; GONSALVES, 1998) ces études sur les ligneux ont été considérées comme une première car les cultures fruitières en question sont destinées à croître au verger pour plus de dix ans. Les

essais de résistance à ce pathogène de quarantaine qu'on réalise en conditions naturelles ne peuvent être entrepris que dans un pays où la maladie est endémique. C'est le cas notamment des balkans (Albanie, Bosnie-Herzégovine, Bulgarie, Croatie, Serbie), des pays d'Europe centrale (Tchéquie, Slovaquie, Hongrie, Pologne, Slovénie, Roumanie), et de certains pays d'Europe méditerranéenne (Grèce, Espagne). Dans le cadre des travaux d'expérimentation au champ, une autorisation est requise notamment pour la nature transgénique du matériel à tester (90/220/EEC), qui a été répertoriée récemment sous la référence 2001/18/EC . Lorsque nous avons contacté les collègues étrangers qui ont l'expertise de mener des essais de résistance au PPV au champ, nous avons considéré posément ces problèmes auxquels les plantes transgéniques sont soumises. Conformément aux règles de la CEE entreprendre des essais concernant des clones transgéniques au champ signifie donc la soumission des essais à un collège d'experts. En focalisant les essais sur l'étude du comportement des pruniers transgéniques à l'infection naturelle par le PPV, les commissions de génie génétique locales se sont prononcées sur l'autorisation des essais uniquement à des fins de recherche. Conformément aux règles qui régissent les essais transgéniques en conditions naturelles, nos collaborateurs étrangers ont donc mis en place des protocoles conformes qui ont fait preuve de rigueur vis à vis du confinement environnemental. Les plants testés ont été ceinturés d'arbres-tampons, espèces qui sont incompatibles génétiquement aux pruniers (amandiers en Espagne et cerisiers en Pologne). Ces mesures reposent notamment sur le principe de confinement du transgène viral qu'on ne souhaite pas diffuser dans l'environnement. L'intérêt, dans cette perspective, est d'évaluer l'effet de protection conférée par le transgène face à la dynamique du PPV qui est considérée dans son contexte naturel. C'est pourquoi nos collaborateurs n'ont pas appliqué trop strictement les conditions de traitements anti-parasites qui risquaient de compromettre la diffusion naturelle du PPV par les pucerons (MALINOWSKI *et al.*, 2006). Des observations régulières (apparition de symptômes, colonies de pucerons...) ont été menées puis consignées dans un cahier de charges. Ces données ont été ensuite confirmées par des tests de laboratoire (analyses sérologiques et traçage moléculaire de l'ARN viral, RT/PCR) afin d'interpréter et de pouvoir comprendre le comportement des clones.

3- RESULTATS

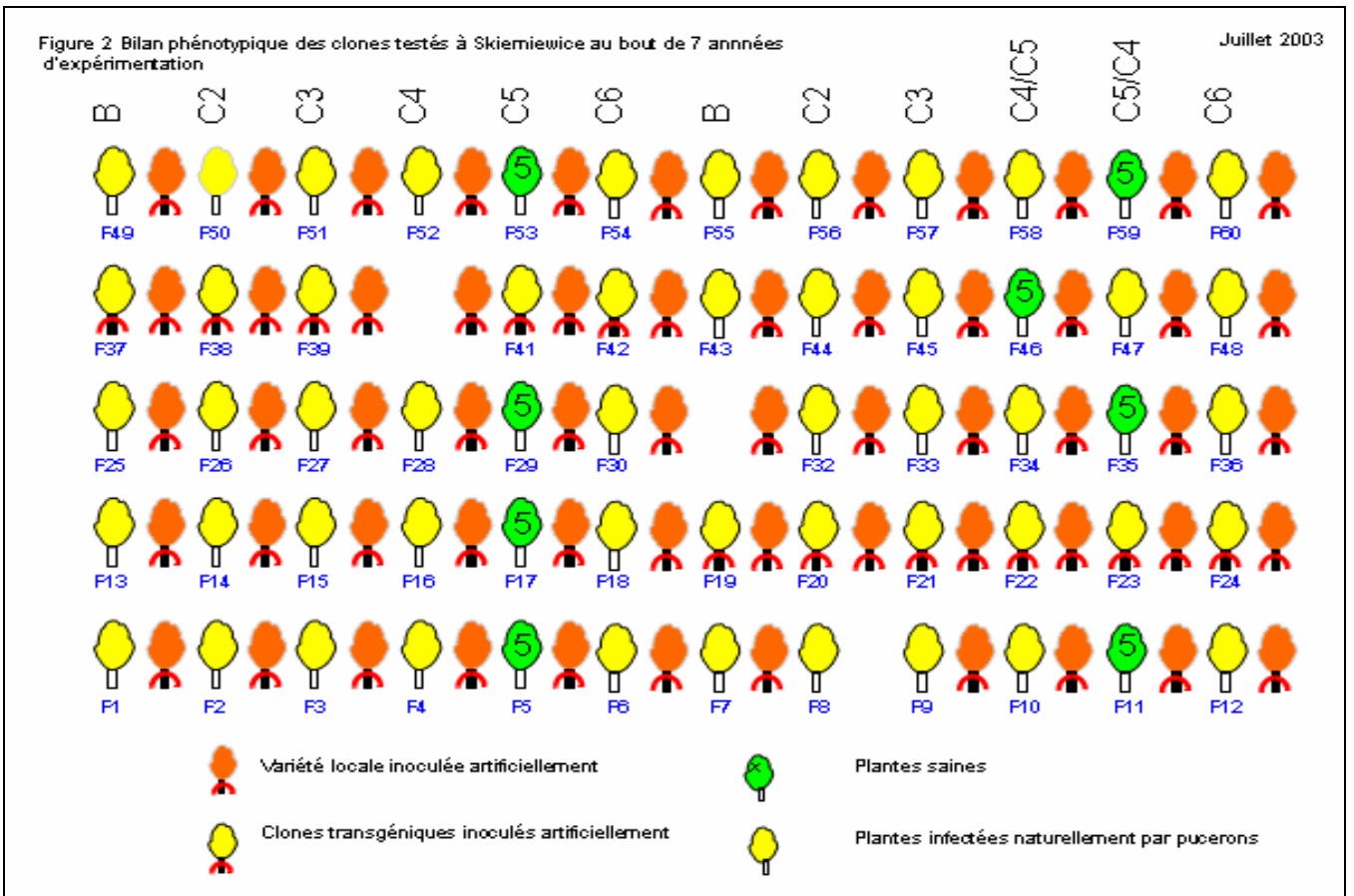
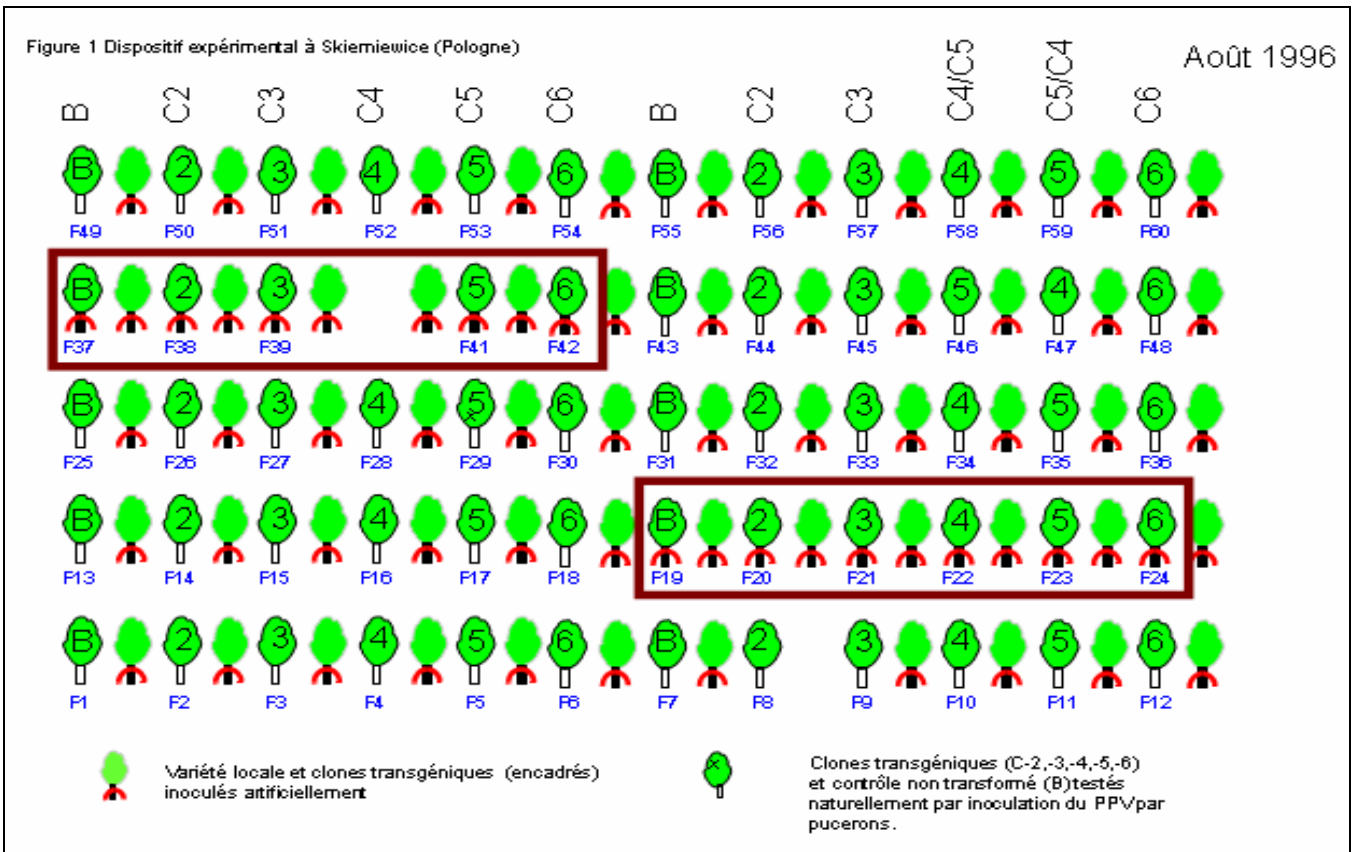
3.1 Essais de résistance en serre de confinement

La caractérisation moléculaire des plantes nous a montré que nous avons produit des clones génétiquement distincts. A ce stade, nous étions arrivés à une première conclusion saisissante : des plantes expriment le gène codant pour la capsid et d'autres ne l'expriment pas. C'est dire que la diversité génétique des clones observés chez le *Prunus* n'est pas uniquement restreinte aux plantes hôtes herbacées expérimentales. Cette similarité nous a conforté dans notre démarche car nous avons déjà observé cela dans les expériences préalables de modélisation chez l'espèce apparentée au tabac (*N.benthamiana*) . La différence majeure repose sur les plants testés. Travailler sur les ligneux requiert l'intégration de leurs conditions culturales. De façon à standardiser les essais, chaque clone a été écussonné sur un porte-greffe sensible au virus afin de les tester à l'infection par le PPV. Deux méthodes d'inoculation du virus ont été appliquées, l'inoculation par entage (accolement de bouts d'écorces infectés) et l'apport de pucerons virulifères aux scions ainsi produits. Le compromis entre les deux techniques est matérialisé par l'apparition des symptômes de la maladie à des périodes différentes. Si la sensibilité d'un clone est perçue au niveau des jeunes feuilles du scion à partir de la quatrième semaine d'inoculation par pucerons, en revanche celle-ci n'est clairement appréciable qu'à la suite d'une période de dormance (RAVELONANDRO *et al.*, 1997). Il est donc clair que les essais conduits en serre de confinement sont calqués à ceux

menés dans l'environnement, à une particularité majeure que dans ces conditions expérimentales, les plantes sont contraintes à deux dormances annuelles. En effet, le prunier C-5 est l'unique clone qui s'est distingué tout au long de ce parcours expérimental. Après maintes inoculations de cette plante par pucerons nous sommes parvenus à conclure que nulle trace d'infection ne pouvait être perçue. La mise en place d'analyses moléculaires focalisées à l'étude de la corrélation entre transgènes et phénotypes a montré que ce clone co-supprime aussi bien le transgène viral que le virus-cible (SCORZA *et al*, 2001). Processus assez mal connu chez les ligneux, car les travaux menés sur ces pruniers furent la première étude du genre dans la lutte contre un virus parasitant une plante ligneuse. La recherche incluant d'autres paramètres (variabilité virale, effets synergiques avec d'autres virus contaminant les arbres fruitiers) est actuellement poursuivie dans cet axe. Mais l'essentiel pour l'immédiat, a été l'obtention de ces résultats d'analyses bien documentées pour pouvoir comprendre les incidences possibles qui pourraient se produire dans l'environnement. L'interprétation de ces résultats a été rendue brève car l'observation de cette disparité phénotypique nous conforta dans notre approche pour entreprendre la démarche suivante. Transposer ces essais en conditions naturelles fut donc un impératif pour nous.

3.2 Essais de résistance au champ

Dans ce volet, notre objectif a été de vérifier la résistance du clone C-5 qu'on a préalablement identifié en conditions naturelles. Afin de répondre de façon pertinente à cette reproductibilité des résultats observés en conditions artificielles d'expérimentation, nous avons tenu à standardiser ces essais, d'un en propageant végétativement par greffe les plants à tester et de deux, à simplifier la tâche des expérimentateurs, par la plantation directe des scions qu'on a multipliés. La fiabilité des résultats obéit à ces mesures strictes qui devraient déboucher clairement à la distinction entre clones sensibles et plantes résistantes. Bien que ces essais ont été validés à des périodes différentes, les résultats des deux essais rapportés dans ces lignes indiquent deux tendances intéressantes. Premièrement, l'essai expérimental mené à Skierniewice (Pologne) (Figure 1) est localisé dans une région tempérée qui est dotée d'un climat continental. Alors que l'essai conduit à Valencia en Espagne est localisé dans un site méditerranéen, chaud et sec. Si les deux essais s'accordent en une vérification du comportement des pruniers transgéniques en conditions naturelles, les *Prunus* locaux, (pruniers domestiques en Pologne, pruniers japonais en Espagne) sources de PPV ne sont pas infectés par les mêmes isolats viraux. Deuxièmement, les pucerons vecteurs du PPV sont de nature différente. Tous ces paramètres contribuent à la compréhension des essais qui sont matérialisés non seulement par des pratiques agricoles différentes, mais notamment par la diversité des espèces végétales contaminées qui représentent les sources naturelles d'inoculum.

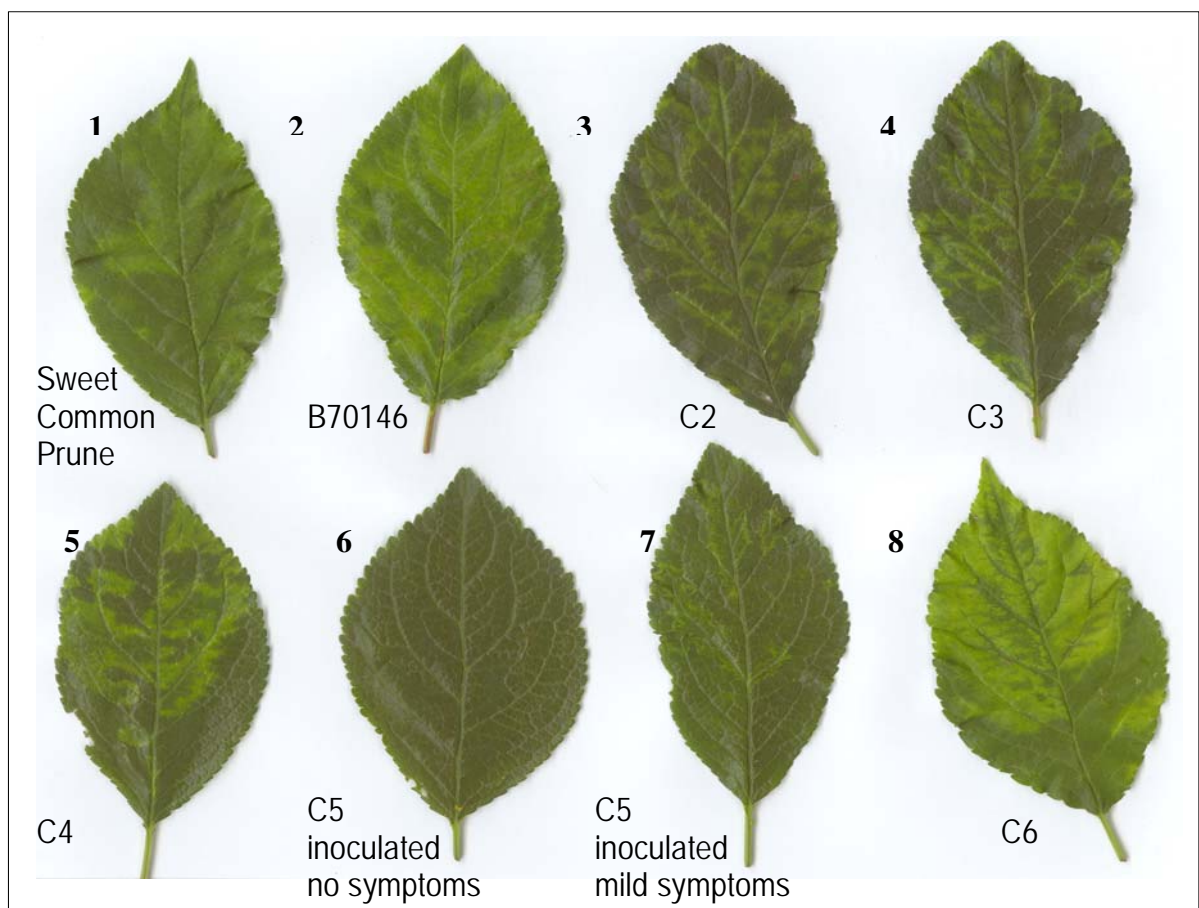


De surcroît, la prise en compte du protocole a contraint nos collègues expérimentateurs à disposer d'une gamme d'options concernant les variétés végétales-tampons (cerisiers pour la Pologne et amandiers pour l'Espagne) qui sont génétiquement incompatibles avec ces clones testés. Ces options ont eu pour objectif de confiner le flux du transgène. Ces arbres-tampons qui ne sont pas hôtes typiques des isolats viraux testés englobent également la possibilité de confiner les populations virales testées. Bien que les arbres testés aient été isolés de la sorte, cela n'a pas exclu la violation de cette barrière par des insectes vecteurs virulifères qui ont apporté d'autres isolats de PPV qui venaient d'ailleurs (MALINOWSKI *et al.* 2006). Les plants testés ont montré d'une manière homogène leurs phénotypes respectifs qui, à chaque reprise du cycle végétatif d'un ligneux, ont reflété d'une manière répétitive la sensibilité de certains clones par opposition à d'autres qui ont exhibé d'une manière stable leur caractère résistant. L'aspect le plus rationnel de ces études a été d'observer une similitude quasi-certaine des plantes C-5. La découverte irrationnelle d'une plante C-5 infectée au bout de 5 années d'évaluation a soulevé notre inquiétude en Pologne (Figure 2). Pouvait-on penser qu'un clone transgénique puisse subir dans l'environnement une diversité génétique quelconque? Vu la standardisation des essais, et notamment la propagation végétative des clones, l'arbre qui dérive d'un même clone ne puisse faire apparaître de divergence. En effet nous avons cherché des éléments rationnels pour expliquer ces observations en procédant notamment par le contrôle moléculaire (empreinte génétique). Ceci a permis de vérifier que l'erreur humaine peut faire partie des incidents expérimentaux qui a été vite dissipée par le contrôle génétique. Ce qui s'avéra d'ailleurs comme étant une plante C-4. Une erreur d'étiquetage qui a mis en relief le comportement particulier du clone C-5 et indiquant aussi que ce clone C-4 a montré un comportement phénotypique un peu plus différencié des autres car sa sensibilité au PPV est traduite par un délai d'apparition des symptômes, aussi bien observé en Espagne qu'en Pologne (MALINOWSKI *et al.* 2006). Figure 2 nous montre que si près de 96% des arbres testés ont été infectés au bout de 7 ans ceci ne concerne chez C-5 que les deux plants qui ont été artificiellement inoculés et qui révèlent par moment quelques taches diffuses, très discrètes au niveau de certaines feuilles de 2 arbres traités (Figures 1 et 2). À l'inverse, les autres arbres C-5 qui ont été soumis à l'infection naturelle par les pucerons sont clairement sains. Si la progression de l'infection a été plus lente en Espagne, l'interprétation de celle-ci est assez difficile à cadrer car les paramètres environnementaux sont apparemment critiques vu la prédominance d'un puceron-vecteur qui véhicule mal le PPV (*Aphis gossypii*) ou la forte chaleur méditerranéenne qui réduit la concentration virale relative dans les feuilles des plantes infectées. De façon similaire avec l'essai polonais, la particularité concerne le clone C-5 qui est considérée par rapport à tout autre comme étant le seul clone n'ayant pas été infecté au verger. Ce comportement a été corroboré par des observations expérimentales où l'inoculation par pucerons du porte-greffe (sensible) a permis d'inoculer le scion transgénique C-5 qui essaie de confiner le PPV aux environs des points de greffe. Ce scénario assez similaire à l'inoculation par entage ou par greffage a permis au porte-greffe de servir de réserves de virus qui est constamment combattu par le transgène C-5 afin d'obstruer à la diffusion du virus dans l'arbre. Il est clair que ces essais menés à petite échelle au champ sont fortement instructifs car ils nous ont permis de mettre à nouveau en relief l'homogénéité du clone C-5, aucun arbre n'a été naturellement infecté par pucerons. Confronté à des isolats variés du PPV, la résistance déployée par l'arbre est unanimement stable. Ces essais en conditions naturelles démontrent l'homogénéité du clone C-5 quel que soient les sites analysés. Ce comportement uniforme exclut apparemment toute forme de diversité phénotypique du clone C-5 et permet de corroborer la durabilité de la résistance observée en conditions naturelles (Figure 2). Telle a été l'étape décisive de ces travaux.

3.3 Implication ciblée du transgène viral

Une attention particulière a été portée à l'interprétation scientifique de ces observations. Selon les données rapportées dans ces essais, le prunier C-5 a visiblement montré une caractéristique jugée comme étant homogène car aucune plante C-5 n'a été contaminée naturellement par le PPV. En effet, les résultats des essais en conditions naturelles illustrent d'une manière stable les caractéristiques de la résistance au PPV. Celles-ci restent inchangées quels que soient les protocoles expérimentaux mis en place, les isolats viraux locaux et notamment la diversité apparente des pucerons vecteurs de la maladie. En effet, nous nous sommes méfiés de ces apparences et c'est pourquoi nous avons tenu à comprendre les effets observables, tels les corrélations entre la présence du transgène viral, le taux de transcription, la dégradation de ces transcrits, la réplication virale et la réaction de défense de la plante (Figures 2 et 3). Ces processus ne sont pas le fait du hasard, car le tout s'organise autour du transgène, lui-même sujet de modifications fort complexes pour aboutir à ces dégradations ciblées de transcrits (transgéniques et viraux).

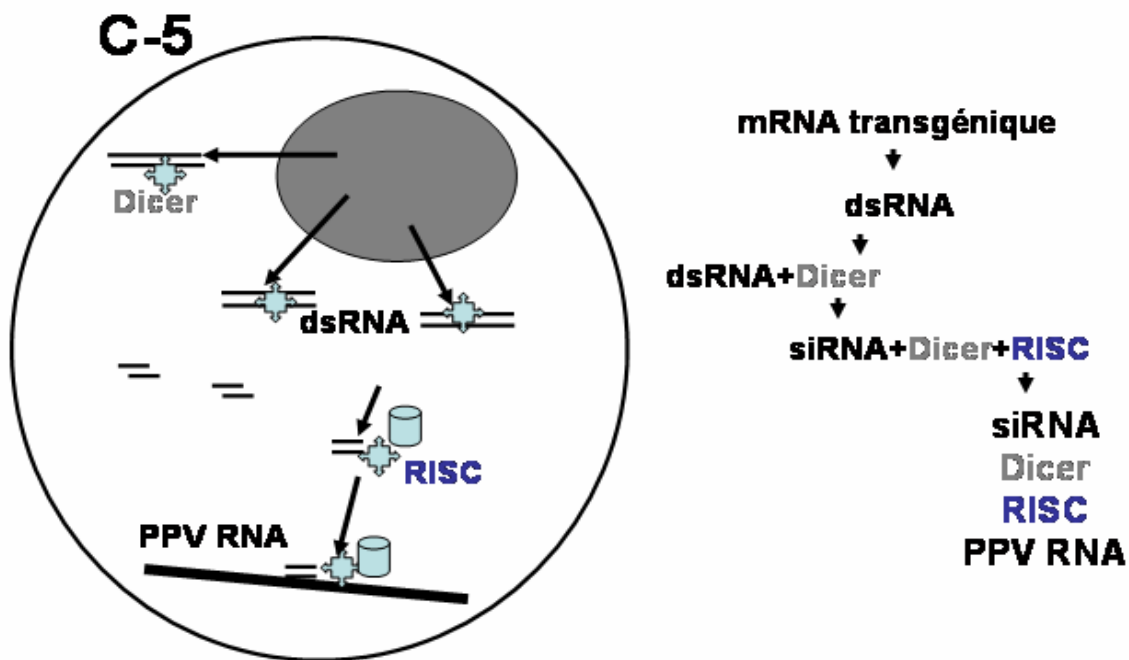
Figure 3 Phénotypes montrés par les différents clones testés (1- variété locale polonaise, 2-contrôle non transformé, 3-4-5-8 clones transgéniques indépendants, 6-clone C-5 résistant et 7- symptômes diffus montrés par les deux plantes C-5 inoculées artificiellement).



En effet si le décodage de ces processus a été bien interprété chez les plantes transgéniques herbacées (HAMILTON *et al.*, 2002; VOINNET, 2001), nous avons lancé un défi pour comprendre le déroulement séquentiel chez le prunier. Pour aborder ces études, nous

avons intégré la particularité de notre modèle qui est plutôt une plante pérenne. Afin de valider cela, les phénomènes étudiés doivent afficher une reproductibilité qui constitue sans aucun doute le garant de la stabilité du caractère résistant. Les travaux menés par HILY *et al.*, 2004, ont notamment mis en relief l'implication du transgène viral inséré dans le chromosome du clone C-5. En effet la prise en compte du phénomène de dormance comme étant l'un des processus physiologiques qui remettent en question le déroulement de la machinerie cellulaire chez les ligneux a permis de mettre en évidence que le transgène viral est bien assujéti à une modification épigénétique. La variation indiquée concerne, en effet, la méthylation du transgène viral. SCORZA *et al.*, 2001 et HILY *et al.* 2004 ont démontré que le transgène viral porté par le clone C-5 utilise cette variation moléculaire pour induire l'extinction post-transcriptionnelle du transgène (PTGS). Sans doute ce mécanisme implique-t-il une certaine ambiguïté dans la stabilité des caractères phénotypiques induits, mais force est de relater qu'elle est déterminante pour la réaction défensive de la plante contre l'intrus indésirable, le PPV. Les lignes qui suivent essaient de définir exactement pourquoi le clone C-5 multiplié de manière végétative se comporte d'une manière stable vis-à-vis du PPV et de façon durable lorsqu'il est analysé dans les conditions expérimentales naturelles. Le processus de défense qui est mis en place par le clone C-5 a lieu à l'intérieur de la cellule (Figure 4).

Figure 4 Schéma explicatif de l'extinction post-transcriptionnelle du transgène viral chez le prunier C-5



Il comprend des étapes qui siègent aussi bien dans le noyau que dans le cytoplasme. Comme indiqué plus haut, le mécanisme requis obéit au dogme de la biologie moléculaire. Nous venons de voir que l'étape essentielle, là où le clone C-5 se démarque des autres pruniers transgéniques produits est la méthylation. Ce phénomène se déroule au niveau nucléaire, là où les ARN du transgène sont transcrits afin de migrer dans le cytoplasme. Selon des processus qui sont encore peu connus chez les plantes, la dégradation des ARN du transgène s'opère dès ces étapes initiales et fait naître des ARN intermédiaires qui ont une structure double brin (dsRNA) et de petite taille (21-27 nucléotides) appelés „small interfering RNA“ (siRNA) (HAMILTON *et al.*, 2002). Pour une première, HILY *et al.* 2005 ont démontré qu'un ligneux

transgénique régule les populations de gènes produites au sein de ses cellules avec les mêmes règles qu'opère une plante herbacée. Ceci marque la différence fondamentale entre ce clone qui ne produit pas de protéine de capsid virale et les autres qui en synthétisent selon le programme génétique qu'on leur a introduit (SCORZA *et al.*, 1994). Ces observations sont fondamentalement corroborées par les analyses menées sur les *Prunus*, hôtes naturels du PPV, qui favorisent sans ambiguïté la réplication du virus et ne contiennent pas ces doublets de petits ARN ciblés. Etant donné que l'infection virale constitue le paramètre déterminant de ces travaux, les études menées sur les différents clones ont permis de distinguer l'effet particulier des doublets d'ARNi (21-27nt) qui, comme indiqué précédemment, n'est produit que par le clone C-5. Cependant la détection du petit dsARN 21nt chez les autres clones infectés (transgéniques ou pas) symbolise d'une part leur infection par le PPV et puis d'autre part, la contribution naturelle de la plante afin de défendre contre l'invasion cellulaire du pathogène introduit. Ceci reflète une marque de protection où l'on observe au fil du temps que la plante pérenne ayant exhibée les symptômes de la maladie puisse récupérer selon un calendrier saisonnier où la dormance stoppe le cycle de multiplication virale. Celle-ci reprend à nouveau au printemps, une période qui marque la différenciation apparente des processus génétiques mis en oeuvre par chaque clone pour se défendre contre le PPV. Cette défense qui est matérialisée par l'absence de symptômes au niveau des feuilles est continuellement fonctionnelle. Bien entendu si la résistance déployée par le clone C-5 n'est pas stable, celle-ci sera notamment perçue au printemps. Une période où le cycle de réplication virale dans un ligneux est étroitement lié à la physiologie active de l'arbre (montée de sève- élaboration des feuilles) et aussi aux insectes symbiotes répertoriés tels que les pucerons, les acariens et les abeilles... Les pucerons constituent de façon évidente l'un des paramètres influents dans l'aboutissement de ces essais. Vu que l'arbre transgénique est soumis temporairement à des attaques virales. Celles-ci émanent de façon naturelle par les pucerons vecteurs, par suite de leurs visites passives sur les plantes infectées ou non-intentionnellement par les blessures causées par les outils humains (sécateurs-canif...) qui peuvent être malencontreusement utilisés sur des plants infectés. Ces scénarios conjugués avec les facteurs environnementaux n'induisent que la réplication du génôme viral indésirable.

Ces essais ont mis en évidence que l'épidémiologie expérimentale n'a pu atteindre le seuil significatif qu'au bout de sept ou huit ans (MALINOWSKI *et al.* 2006). Il est indéniable que ces essais représentent une avancée non négligeable en faveur de la science car les mécanismes de défense utilisés par la plante sont étroitement corrélés avec le transgène viral et ses produits dérivés (siRNAs). HILY *et al.*, 2005 ont clarifié que le phénotype déployé par le clone C-5 repose *de facto* sur la dégradation des ARN du transgène et son homologue intrusif c'est à dire le génôme viral. Ces travaux ont montré que le transgène inséré dans le patrimoine génétique de la plante obéit à un processus moléculaire dicté par les régulations cellulaires normales: production programmée, intervention cellulaire spécifique par induction des enzymes de défense cellulaire (Dicer) qui détruisent à leur tour les molécules virales indésirables y compris les débris de petits ARN transgéniques (VOINNET, 2001). A notre connaissance actuelle le processus défini comme étant moins complexe fait quand même appel à des mécanismes régulateurs encore mal connus. Nous ambitionnons prospectivement d'étudier cela afin de mieux comprendre cette boîte noire qui matérialise des passages cellulaires encore mal connus. Figure 4 montre que ces régulations obéissent à des règles strictes et séquentielles, les complexes enzymatiques de défense cellulaire (Dicer-RISC) guidées spécifiquement par ces petits ARN se déplacent dans toute la plante tout en stimulant un mécanisme de défense matérialisé par la dégradation de l'ARN viral cible (HUTVAGNER, 2005). Il y a lieu de penser que le transgène viral dégradé à l'état de siRNA adopte une structure non encore identifiée qui est utilisée comme guide aux enzymes de régulation cellulaires pour inhiber spécifiquement la réplication virale cible. Tant que ce

dernier est intact, il est répliqué afin de causer la maladie. Conformément à de telles interprétations on est quand même enclin à se poser des questions sur le cas des arbres C-5 inoculés artificiellement par greffe (Pologne) ou par transfert du virus *via* un porte-greffe infecté (Espagne), où l'on observe des symptômes diffus sur quelques feuilles du clone C-5 (Figure 3) (MALINOWSKI *et al.* 2006).

Comprendre ces phénotypes de récupération est fort souhaité par tous car il permet d'encourager non seulement les recherches sur le PTGS mais à l'exemple de ces pruniers résistants à la sharka, cela montre le potentiel concernant toute utilisation possible de nouvelles variétés commerciales qui répondent aux besoins de l'arboriculture fruitière. Le PPV comporte un gène considéré comme un stratège viral „anti-résistance“ communément nommé „suppresseur“ (helper component-protein, HC-Pro). En effet, l'énigme actuelle repose sur les rapports interactionnels entre le PTGS et HC-Pro. Des études prospectives sont en cours.

L'aboutissement de ces travaux offrirait certes un champ d'application ouverte qui inclut non seulement la possibilité de neutraliser les effets néfastes d'un virus mais pourrait relancer aussi l'élaboration possible d'un programme d'amélioration génétique. Une entreprise qui est tout à fait pertinente dans les localités productrices affectées de façon endémique par le PPV.

REMERCIEMENTS

J'adresse mes remerciements aux équipes de recherches américaines (Dr R. Scorza, USDA, Kearneysville, USA), polonaise (Dr Malinowski, ISK, Skierniewice, Pologne) et espagnole (Dr Cambra, IVIA, Valencia, Espagne) qui ont participé à la réalisation de ces travaux.

BIBLIOGRAPHIE

- ABEL, P.P., NELSON, R.S., DE, B., HOFFMANN, N., ROGER, S.G., FRALEY, R.T. AND BEACHY, R.N. –1986- Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232, 738 – 743.
- ATANASSOV, D.-1932- Plum pox. A new virus disease. *Ann. Univ. Sofia Fac. Agric. Silvic.* 11, 49-69.
- FUCHS, M. AND GONSALVES, D. –1995-. Resistance of transgenic hybrid squash ZW-20 expressing the coat protein genes of zucchini yellow mosaic virus and watermelon mosaic virus 2 to mixed infection by both potyviruses. *Bio/Technology* 13, 1466 – 1473.
- GONSALVES, D.-1998-. Control of papaya ringspot virus in papaya: a case study. *Ann. Review of Phytopathol.*, 36, 415-437
- HAMILTON A, VOINNET O, CHAPPELL L AND BAULCOMBE DC –2002- Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *EMBO J*, 21: 4671-4679.
- HILY JM, SCORZA R, MALINOWSKI T, ZAWADSKA B AND RAVELONANDRO M –2004- Stability of gene silencing-based resistance to *Plum pox virus* in transgenic plum (*Prunus domestica* L) under field conditions. *Transgenic Res* 13: 427-436.
- HILY JM, SCORZA R, WEBB K, AND RAVELONANDRO M –2005- Accumulation of the long class of siRNA is associated with resistance to plum pox virus in a transgenic woody perennial plum tree. *Mol Plant-Microbe Interact* 18: 794-799 .
- HUTVAGNER, G. –2005-. Small RNA asymmetry in RNAi: function in RISC assembly and gene regulation. *FEBS Lett.*
- KEGLER, H., FUCHS, E., GRUNTZIG, M. AND SCHWARZ, S. –1998-. Some results of 50 years of research on the resistance to plum pox virus. *Acta Virologica* 42: 200 -215.
- MALINOWSKI, T., CAMBRA, M., CAPOTE, N., ZAWADZKA, B., GORRIS, M.T., SCORZA, R. AND RAVELONANDRO, M. –2006-. Field trials of plum clones transformed with the *Plum pox virus* coat protein (PPV-CP) gene. *Plant Disease* , 90, 1012-1018.

- RAVELONANDRO M, SCORZA R, BACHELIER JC, LABONNE G, LEVY L, DAMSTEEGT V AND DUNEZ J –1997- Resistance of *Prunus domestica* L to plum pox virus infection. *Plant Dis* **81**: 1231-1235.
- SANFORD, J.C. AND JOHNSTON, S.A. –1985-. The concept of pathogen derived resistance: deriving resistance genes from the parasite's own genome. *Journal of Theoretical Biology*, **113**: 395-405.
- SCORZA R, RAVELONANDRO M, CALLAHAN AM, CORDTS JM, FUCHS M, DUNEZ J AND GONSALVES D –1994- Transgenic plums (*Prunus domestica* L.) express the plum pox virus coat protein gene. *Plant Cell Repts* **14**: 18-22.
- SCORZA R, CALLAHAN A, LEVY L, DAMSTEEGT V, WEBB K AND RANELONANDRO M – 2001- Post-transcriptional gene silencing in plum pox virus resistant transgenic European plum containing the plum potyvirus coat protein gene. *Transgenic Res* **10**: 201-209.
- VOINNET, O. –2001-. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet.* **17**: 449-459.