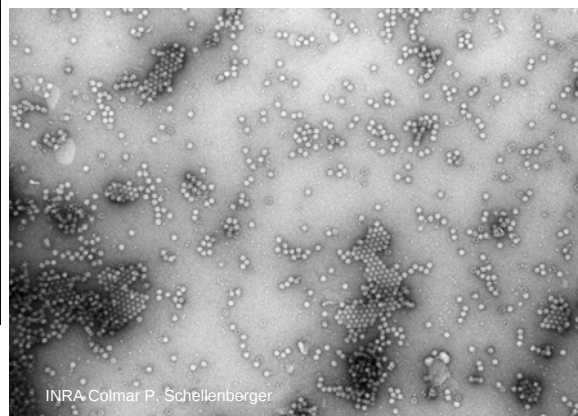
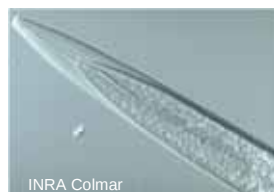




La transgénèse chez la vigne : intérêt, potentialités et acceptabilité sociale dans le cas particulier de la résistance au *Grapevine fanleaf virus*, agent principal de la maladie du court-noué



Assemblée Générale du 13 mars 2009 ; Lien de la Vigne



La maladie du court-noué : virose la plus dommageable pour la viticulture mondiale



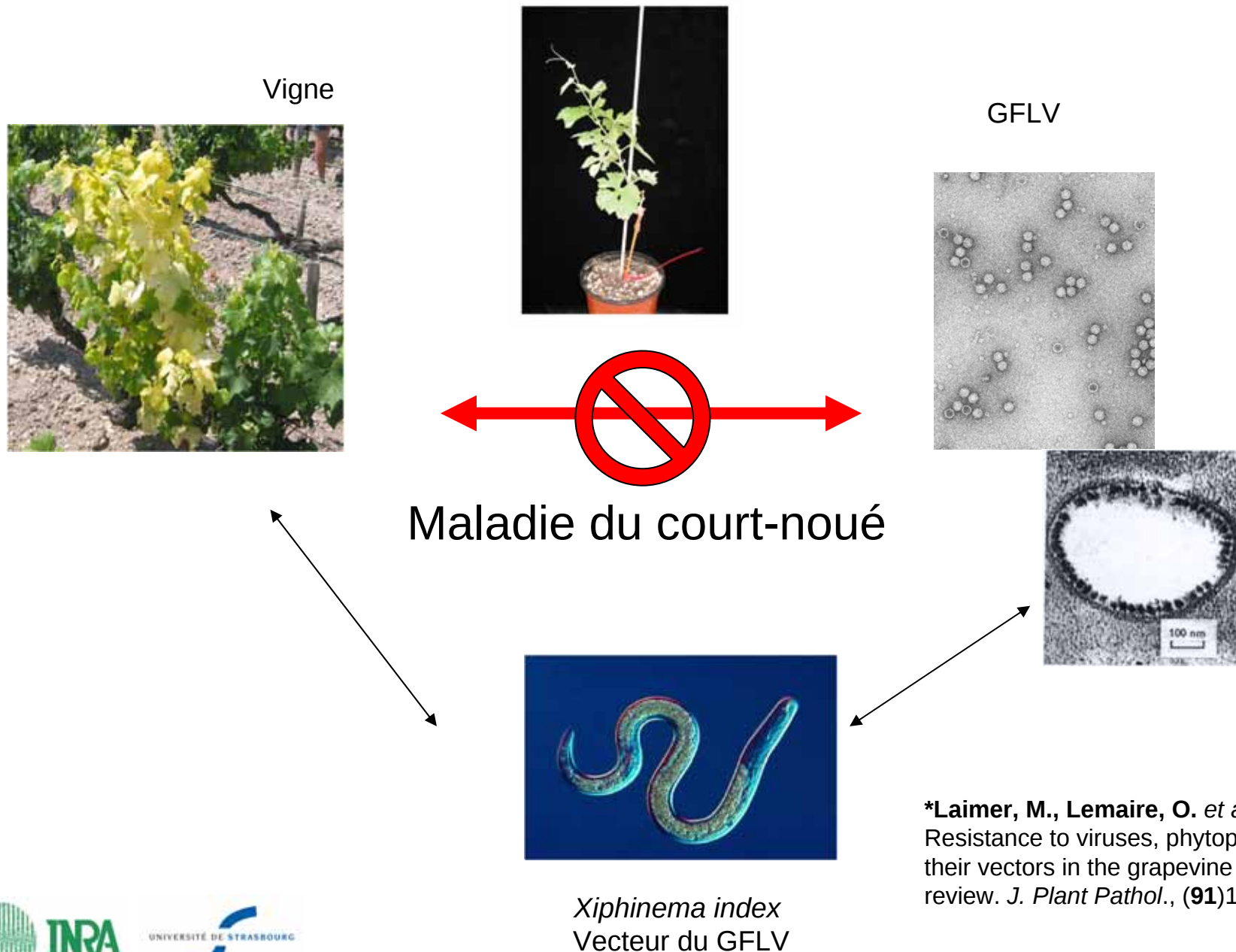
Sain

Infecté

- Pertes de rendement conséquentes : dépassent 70 % en cas d'attaque sévère
- 30 % du vignoble touché (env 240 000 sur 800 000 ha)
2/3 surface totale

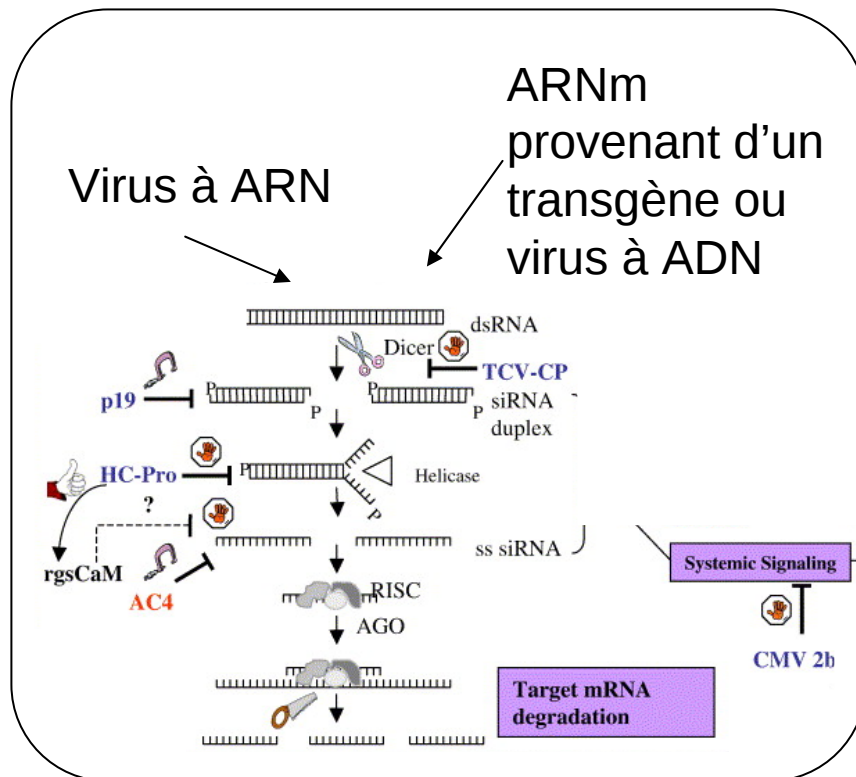
**Nécessité de rechercher des alternatives à la lutte chimique ;
impasse technique et réglementaire**

Résistance dérivée du pathogène*- RDP



***Laimer, M., Lemaire, O. et al., 2009.**
Resistance to viruses, phytoplasmas and
their vectors in the grapevine in Europe: a
review. *J. Plant Pathol.*, (91)1, 7-23.

RNA silencing (ou PTGS) est un mécanisme de défense de la plante vis-à-vis d'un virus et qui va être constitutivement activé par le transgène viral



La plupart des virus ont élaboré des contre-stratégies (protéines dites « suppresseurs de RNA silencing »), rentrant en compétition avec le PTGS à différents niveaux

Viral family	Virus	Suppressors	Other functions	References
Positive-strand RNA viruses in plants				
Carmovirus	Turnip Crinkle virus	P38	Coat protein	122
Cucumovirus	Cucumber mosaic virus; tomato aspermy virus	2b	Host-specific movement	67
Closterovirus	Beet yellows virus	P21	Replication enhancer	123
	Citrus tristeza virus	P20 P23 CP	Replication enhancer Nucleic-acid binding Coat protein	124
Comovirus	Cowpea mosaic virus	S protein	Small coat protein	125
Hordeivirus	Barley yellow mosaic virus	γb	Replication enhancer; movement; seed transmission; pathogenicity determinant	126
Pecluvirus	Peanut clump virus	P15	Movement	127
Polerovirus	Beet western yellows virus; cucurbit aphid-borne yellows virus	P0	Pathogenicity determinant	103
Potexvirus	Potato virus X	P25	Movement	60
Potyvirus	Potato virus Y; tobacco etch virus; turnip yellow virus	HcPro	Movement; polyprotein processing; aphid transmission; pathogenicity determinant	65–67
Sobemovirus	Rice yellow mottle virus	P1	Movement; pathogenicity determinant	68
Tombusvirus	Tomato bushy stunt virus; cymbidium ringspot virus; carnation Italian ringspot virus	P19	Movement; pathogenicity determinant	68
Tobamovirus	Tobacco mosaic virus; tomato mosaic virus	P30	Replication	128
Tymovirus	Turnip yellow mosaic virus	P69	Movement; pathogenicity determinant	70
Negative-strand RNA viruses in plants				
Tospovirus	Tomato spotted wilt virus	NSs	Pathogenicity determinant	129
Tenuivirus	Rice hoja blanca virus	NS3	Unknown	
DNA viruses in plants				
Geminivirus	African cassava mosaic virus Tomato yellow leaf curl virus Mungbean yellow mosaic virus	AC2 C2 C2	Transcriptional activator protein (TrAP)	68,81
Positive-strand RNA viruses in animals				
Nodavirus	Flock house virus; nodamura virus	B2	Plaque formation	35
Negative-strand RNA viruses in animals				
Orthomyxovirus	Influenza virus A*	NS1	Poly(A) binding; inhibitor of mRNA export; PKR inhibitor	36,107,108
DNA viruses in animals				
Adenovirus	Adenovirus	VA1 RNA	PKR inhibitor	87
Poxvirus	Vaccinia virus*	E3L	PKR inhibitor	36

*These have only been demonstrated in heterologous systems (insects and plants). HcPro, helper component proteinase; PKR, an RNA-dependent protein kinase.

Développement de porte-greffes transgéniques de vigne pour la résistance au *Grapevine fanleaf virus*

Principales étapes dans la co-construction de cette expérimentation :

1996-1999 : Evaluation de la résistance de porte-greffes transgéniques vis à vis de l'infection naturelle au vignoble en Champagne - 3 lignées prometteuses

2001-2002 : Groupe de réflexion composé de scientifiques, de représentants de la filière viticole et de la société civile : intérêt de la reprise d'un essai en milieu non confiné de porte-greffes transgéniques résistants au GFLV

<http://www.inra.fr/internet/Directions/SED/science-gouvernance/ITA-Vignes/index.html>

2003 : Méthodologie d'expérimentation définie en concertation avec le Comité Local de Suivi de l'essai de porte-greffes transgéniques : **co-construction du dispositif**

Juin 2004 : Avis favorable CGB (B/FR/04.05.01) pour un essai non confiné pour évaluer 5 lignées du porte-greffe 41B exprimant toutes la CP du GFLV-F13 entière, traductible

Développement de porte-greffes transgéniques de vigne pour la résistance au *Grapevine fanleaf virus*

Principales étapes dans la co-construction de cette expérimentation :

8 juillet 2005 : autorisation ministérielle (05/012)

Sept 2005-2006 : mise en place de l'essai en plein champ de vignes transgéniques (41B transgénique + greffon Pinot Meunier clone 317 non-transgénique)

2006-2009 : Obtention d'un financement de l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR 2005-14) pour 3 ans : évaluation de la résistance, impact environnemental et analyse des transferts du PG transgénique vers le greffon non transgénique

2007-2009 : Post-doc SPE - nouvelles constructions - mécanisme épigénétique de la résistance ; Comité Local de Suivi : études prospectives, impact environnemental-méthodes alternatives/complémentaires, soumission ANR GMGE 2009 - proposition de demande de prolongation HCB

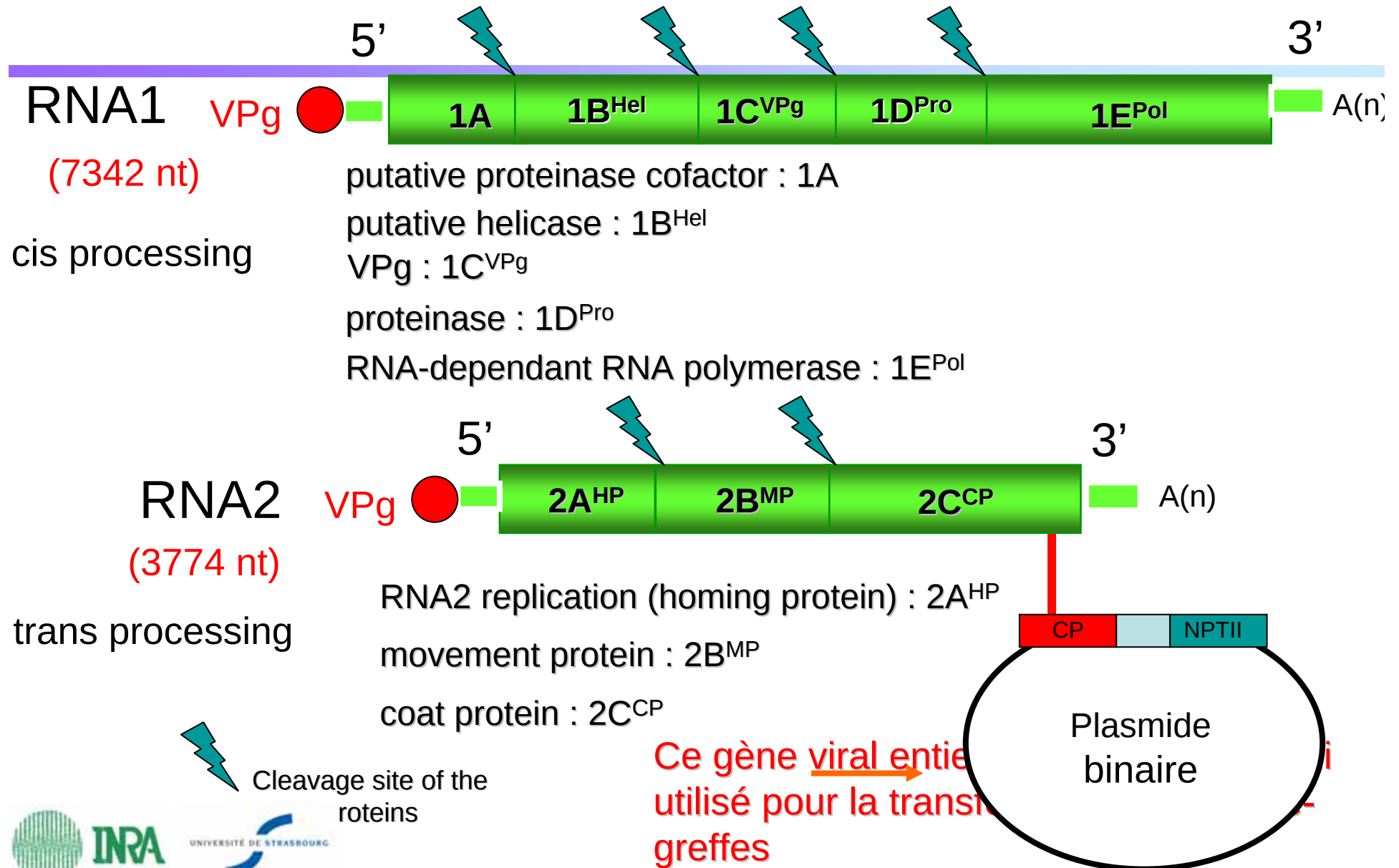
Décembre 2009 : fin de la première étape de l'expérimentation



Objectifs scientifiques de l'essai hors-confinement de PG transgéniques de vigne

- 1- Confirmer nos données préliminaires sur le niveau de protection des porte-greffes transgéniques vis-à-vis de l'infection naturelle du GFLV *via* les nématodes vecteurs en condition de plein champ (*versus* milieu confiné)
- 2- Mécanisme et durabilité de la résistance d'origine épigénétique : rechercher le(s) suppresseur(s) de « gene silencing » chez le GFLV
- 3- Analyser le transfert éventuel des produits du transgène CP et NPTII (protéines, mRNAs, *siRNAs*) du porte-greffe transgénique vers le greffon non-transgénique
- 4- Poursuivre l'évaluation de l'effet des porte-greffes transgéniques sur la dynamique et la variabilité génétique des populations de GFLV transmises par les nématodes virulifères (possibilité d'émergence de nouveaux variants viraux et de recombinants...)
- 5- Analyses exhaustives d'impact par une approche de métagénomique virale et microbienne : optimiser l'appréciation coût/bénéfice pour ce type de stratégie OGM ; données factuelles pour les décideurs - re-définition de la terminologie : thérapie génique ?

Organisation génomique du GFLV

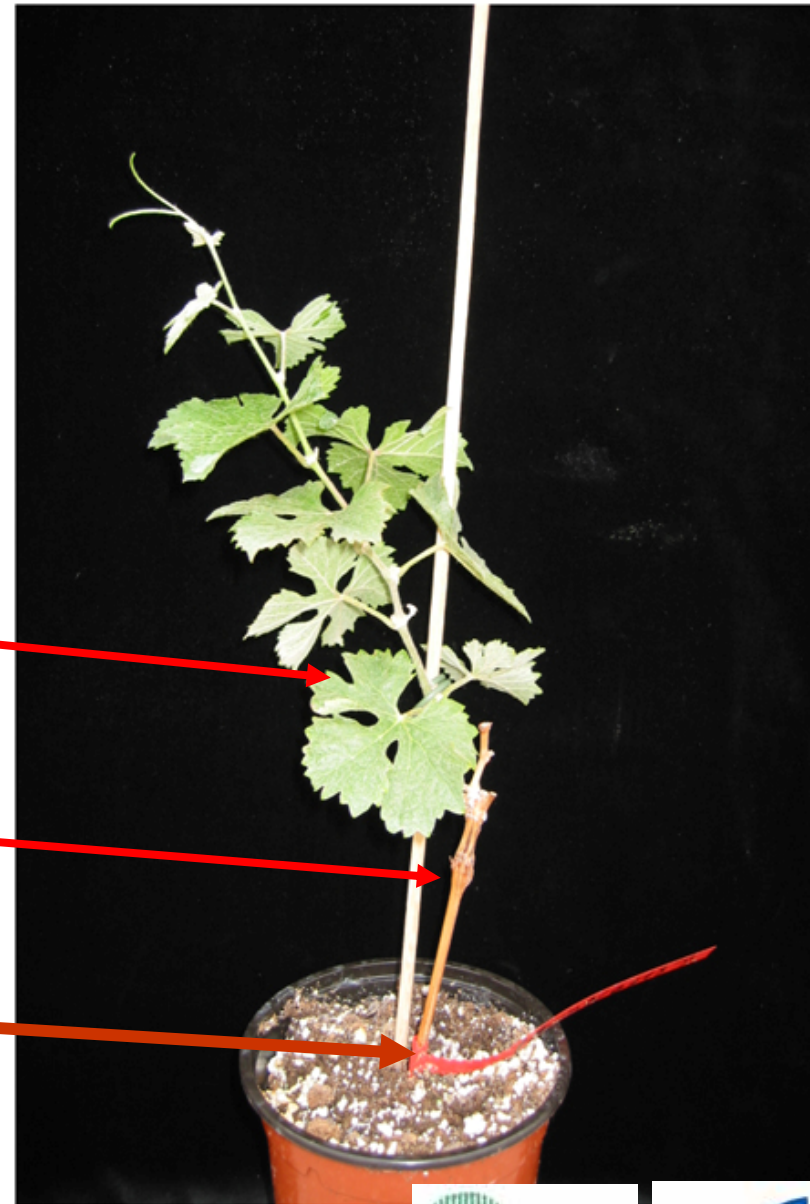
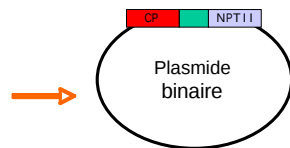


Hypothèse de résistance transgénique : médiée par le porte-greffe par expression du gène de la coque protéique du GFLV-F13

Greffon Pinot-Meunier
non-transgénique

Point de greffe

Porte-greffe transgénique



5 évènements indépendants testés

Mise en place du dispositif expérimental en plein champ

Co-construction du dispositif de 2005 ; toutes les questions sont prises en compte par le Comité Local de Suivi dont certaines traduites en projets de recherche



Expérimentation de porte-greffes transgéniques en vignoble AOC champenois (1996-1999) - Chardonnay/41B transgénique



Expérimentation de porte-greffes transgéniques à l'INRA de Colmar hors AOC ; résultante de la co-construction - Pinot-Meunier/41B transgénique

Niveau de résistance de lignées transgéniques exprimant le gène CP - essai de Champagne ; durée 3 ans (1996-1999)

Vigne et al., Transgenic Research, 2004

% Infection	Nb de lignées
0 %	3 (3 des 5 de la parcelle, qualifiées de « prometteuses »)
1 - 20 %	1
21 - 40 %	3
41 - 60 %	2
61 - 80 %	6
80 % contrôles non transgéniques	3
Total	18

Plan d'expérimentation

Zone d'évaluation des
plants PG transgénique-
greffon non transgénique
5 x 10 plants

Inoculum : terre de
vignoble
hébergeant naturellement
GFLV- *X. index* (40 m³)

Conservatoire 5 x 4
plants transgéniques

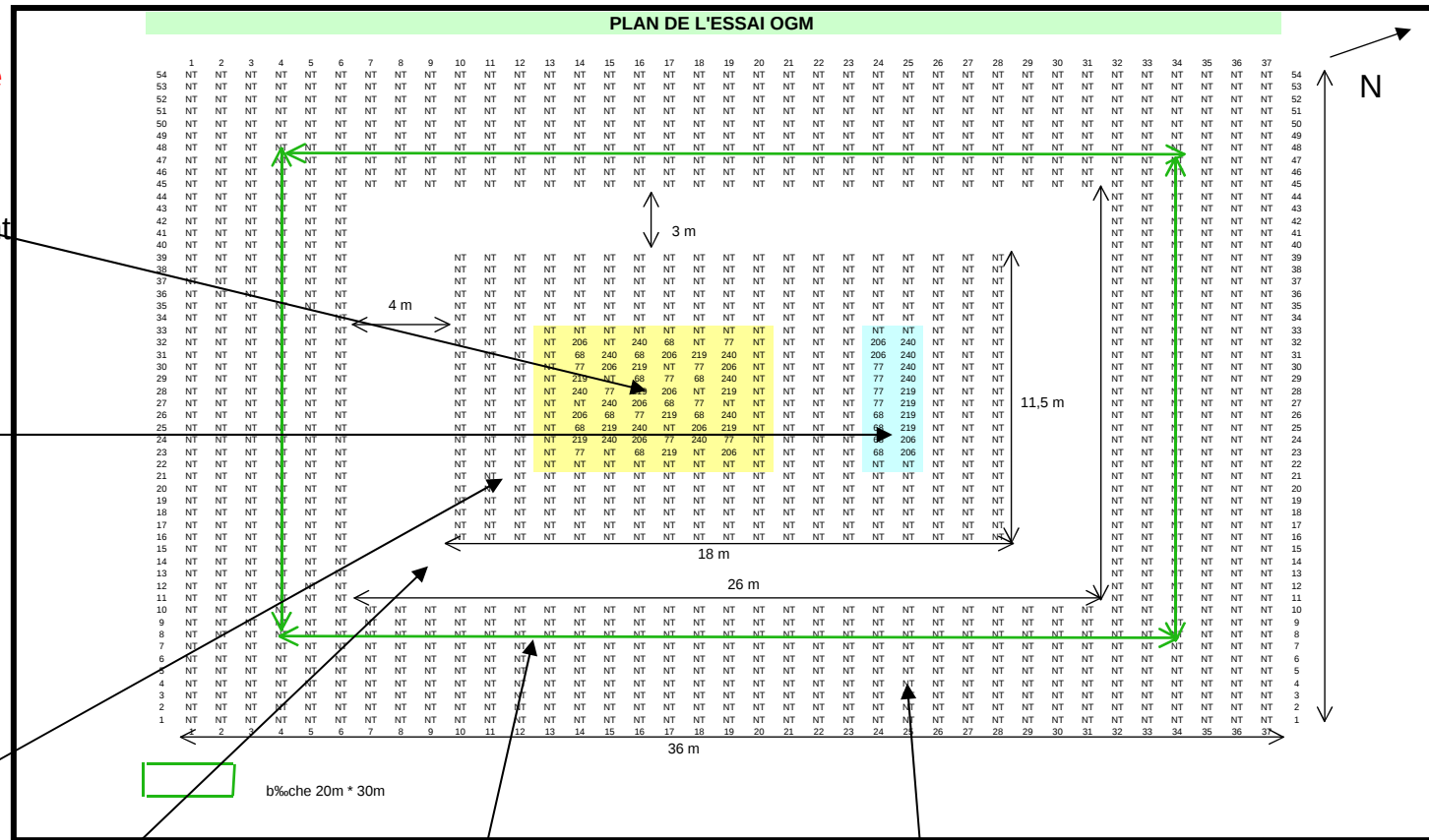
Zone de confinement :
430 plants 41B/PM317

Zone de sécurité :
aucune végétation

Toile en non-tissé géotextile :
20 x 30 x 1.5 m

Bordure :
1074 plants 41B/PM317

Grillage
Vidéo-surveillance













Plantation du matériel
expérimental entre sept
2005 et sept 2006 :
troisième année
d'expérimentation

**Mise en place d'une
réplique de l'essai,
simultanément (sept 2006)
et dans le même sol en
milieu confiné :**

- expression différentielle de la résistance
- comparaison de la translocation
potentielle des produits d'expression des
transgènes
- mises au point méthodologiques
- cinétique de contamination des témoins
sensibles
- analyses des systèmes racinaires
- analyses de métagénomique virale et
microbienne, milieu contrôlé versus
vignoble



1- Confirmer nos données préliminaires sur le niveau de protection des porte-greffes transgéniques vis-à-vis de l'infection naturelle du GFLV *via* les nématodes vecteurs en condition de plein champ (*versus* milieu confiné)

Evaluation de la résistance à l'issue des deux premières années d'expérimentation 2007 et 2008

Impact environnemental :

- Translocation des produits d'expression des transgènes du porte-greffe transgénique au greffon ?
- Transfert horizontal du transgène CP au GFLV et émergence de variants ou recombinauts viraux ?
- Transfert horizontal du transgène NPTII vers la microflore du sol ; modification des populations de bactéries du sol ?

Transfert vertical des protéines du transgène CP et NPTII du porte greffe au greffon ?

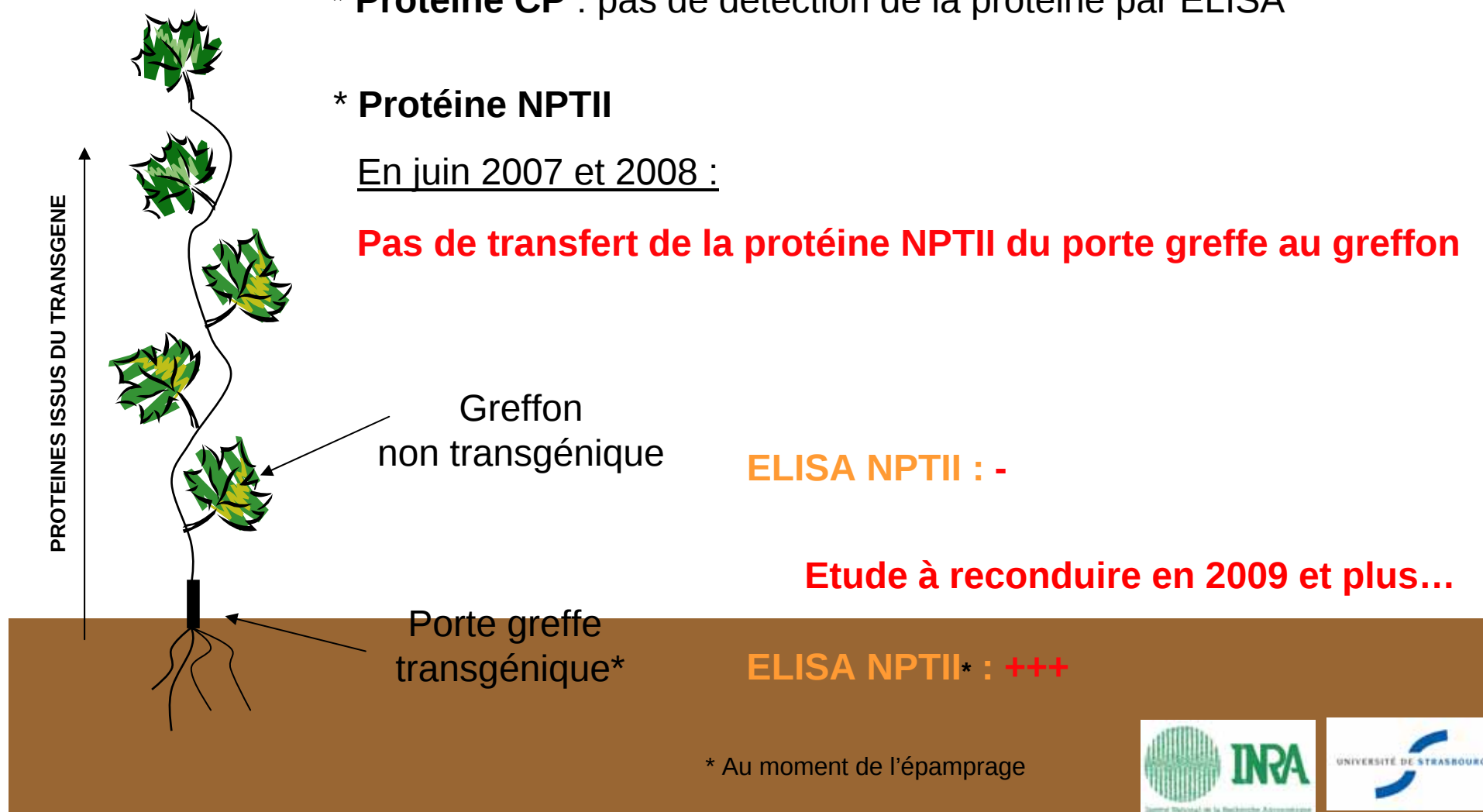
Vignes provenant de la **parcelle**

* **Protéine CP** : pas de détection de la protéine par ELISA

* **Protéine NPTII**

En juin 2007 et 2008 :

Pas de transfert de la protéine NPTII du porte greffe au greffon



Transfert vertical de l'ARNm du transgène CP et NPTII du porte greffe au greffon ?

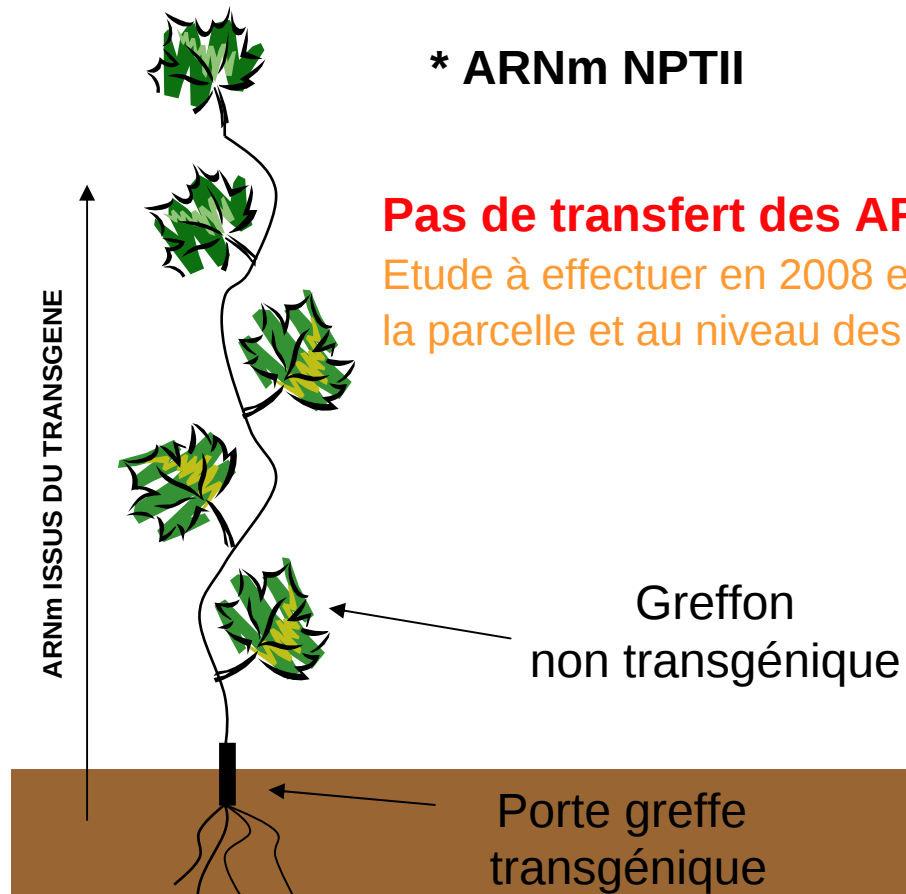
Essais préliminaires : vignes (mêmes lignées et assemblages) provenant de **serre**

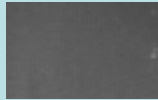
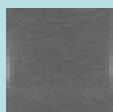
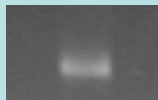
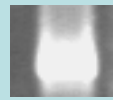
* ARNm CP

* ARNm NPTII

Pas de transfert des ARNm CP et NPTII du porte greffe au greffon

Etude à effectuer en 2008 et 2009 sur les vignes sur PG transgéniques de la parcelle et au niveau des inflorescences des greffons PM



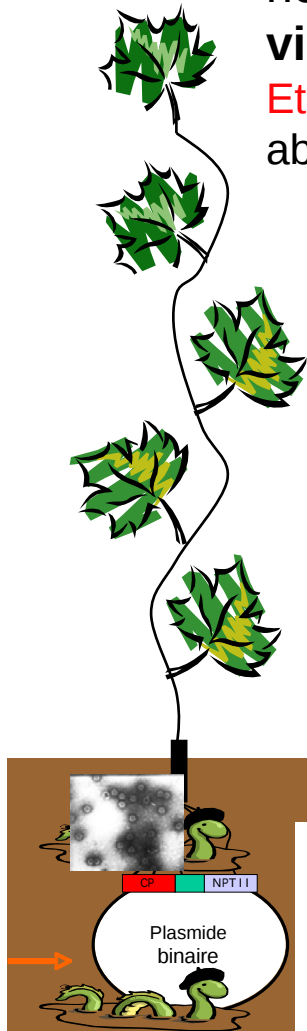
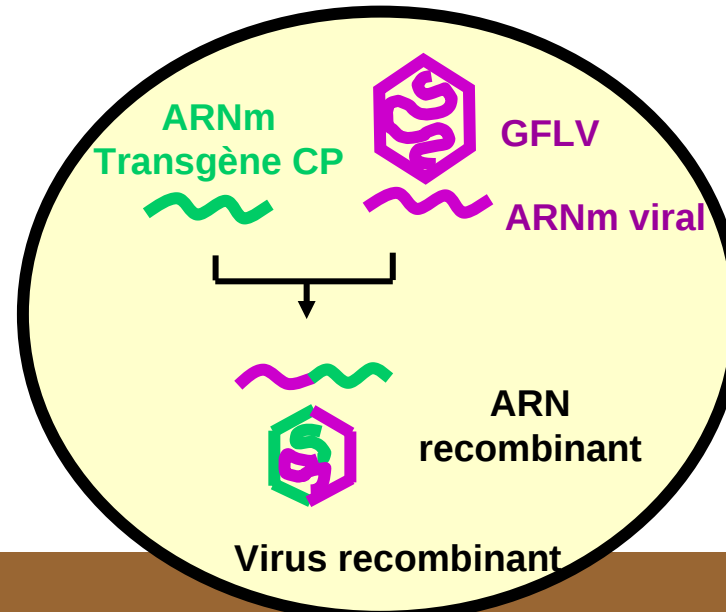
ARNm CP	ARNm NPTII
 -	 -
 +	 +

RT-PCR
(détection ARNm)

Emergence de variants ou recombinauts viraux ?

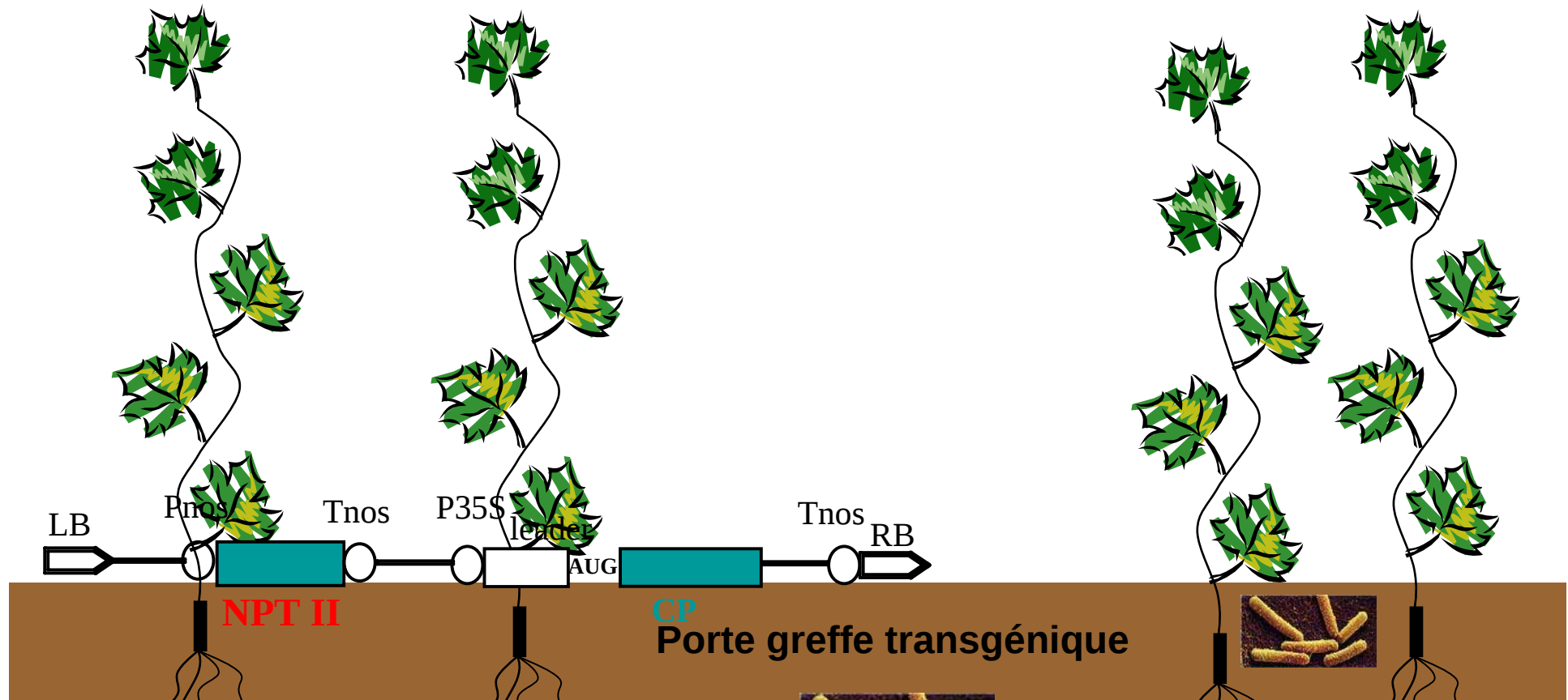
Evaluer l'effet des porte-greffes transgéniques sur la dynamique et la variabilité génétique des populations de GFLV transmises par les nématodes virulifères : **possibilité d'émergence de nouveaux variants viraux par recombinaison ?**

Etude préliminaire réalisée par l'équipe (projet européen TransVir) : absence de recombinauts viables transgène-GFLV sauvage (Vigne et al., 2004a)



Projet d'analyse métagénomique virale : étude d'impact exhaustive (plusieurs 10^6 séquences analysées de 400 bp contre qq 10^2 actuellement) sur la génomique des populations de GFLV : soumis ANR 2009

Transfert horizontal de l'ADN transgénique du porte-greffe vers la microflore du sol ?



Transfert potentiel de transgène - HGT ; recombinaison homologue basée sur des homologies de séquences *nptII*/microflore tellurique ; mis en évidence *in vitro* avec gène *bla* (Simonet *et al.*, 2008)

Perspectives

Terminer l'évaluation de la résistance de ces constructions de première génération : existe-t-il au sein d'une même lignée transgénique une variabilité de réponse à l'infection virale, conséquence des variations du milieu extérieur ...?

La stratégie « CP mediated resistance » est-elle applicable à cette stratégie de résistance transgénique conférée par le porte-greffe ? Nouvelles constructions (hpRNA) et collaboration avec Cornell University (stratégie CP)

Suppresseur de silencing ; durabilité de la résistance : approche avec les 8 gènes candidats du GFLV-F13 ; identification de la protéine(s) impliquée(s) et analyse du mécanisme (coll. IBMP)

Analyses moléculaires exhaustives des populations de GFLV sur l'essai (coll. INRA Bordeaux et CNRS Lyon : métagénomique)

Transfert horizontal de l'ADN transgénique du porte-greffe vers la microflore du sol (coll. CNRS Lyon et Gif)

Ces études d'impact apporteront des données scientifiques très précises pour les analyses de risque et la définition du rapport coût/bénéfice pour l'utilisation de la « thérapie génique » par induction du RNA silencing en viticulture

Perspectives à plus long terme : cumul de résistances en association avec itinéraire technique - co-construction de stratégies systémiques et intégrées, avec le Comité Local de Suivi

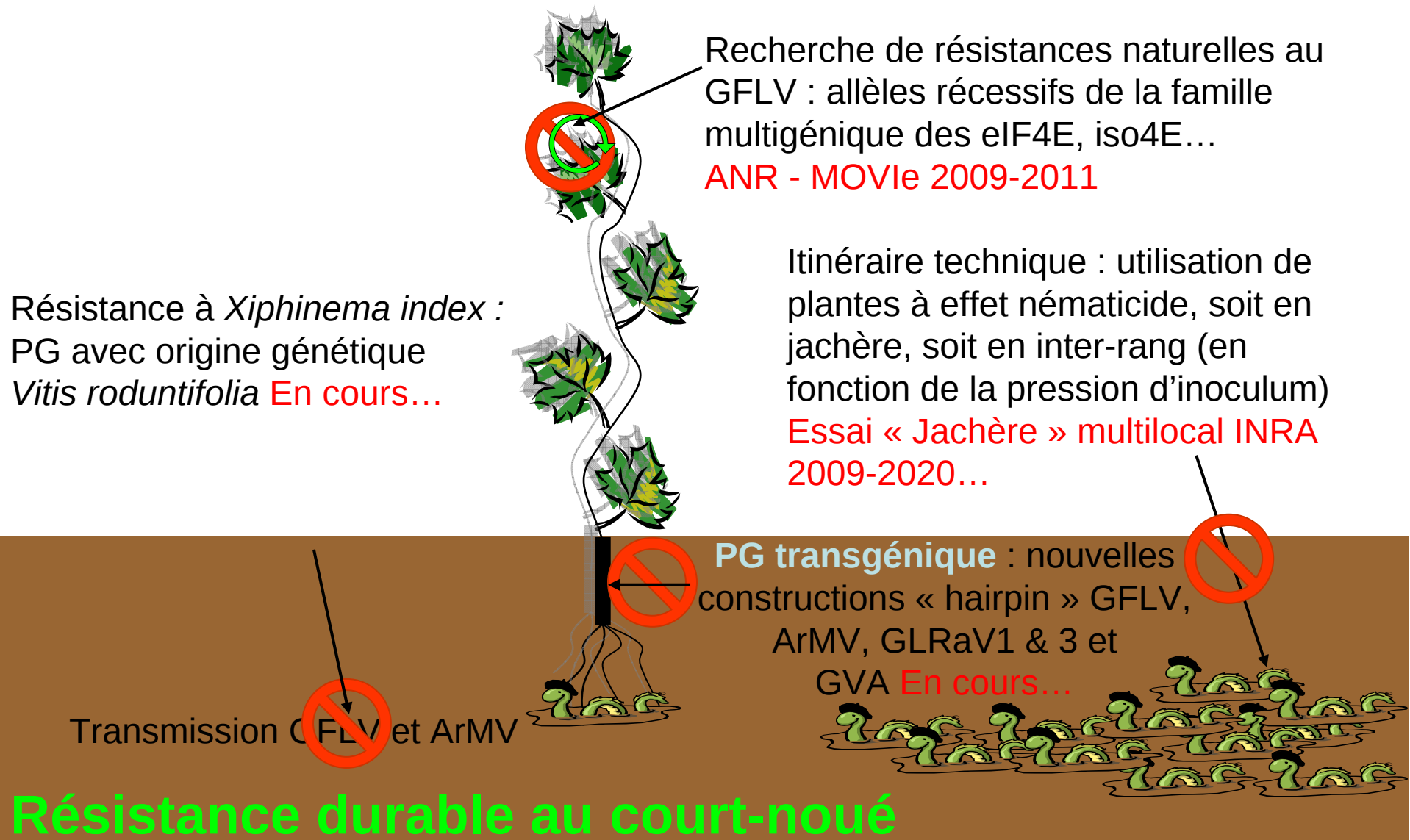


Illustration de la co-construction de notre projet de recherche sur le développement de porte-greffes transgéniques pour lutter contre le court-noué par P. B. Joly, Nature, nov. 2007

NATURE | Vol 450 | 8 November 2007

ESSAY

A timely harvest

The public should be consulted on contentious research and development early enough for their opinions to influence the course of science and policy-making.

Pierre-Benoît Joly and Arle Rip

Public engagement in emerging science and technology is thriving, particularly in the United Kingdom. Recent initiatives such as 'Nanodialogues', organized by the think tank Demos, suggest that citizen juries, dialogue exercises and interactive public understanding projects can be fruitful for scientists and members of the public. Over two years, the Nanodialogues series allowed members of the public to join scientists in discussions on regulation, research funding, development and corporate innovation of nanotechnologies. Such enterprises may foster mutual understanding, but they can struggle to make a difference to research or to policy-making.

Governments and research institutions generally fail to respond to the outcomes of public engagement exercises, perhaps because the outcomes are often too late and too vague on concrete strategies for moving forward. We've learnt that it is better to engage the public 'midstream', at a point in the research process when it is possible to incorporate their opinions into research orientation and policy-making.

The French National Institute of Agronomic Research (INRA) used such an approach to focus on research into and field trials of genetically modified (GM) vines. In 2001, INRA had to decide whether to run field trials of a GM vine that is potentially resistant to a disease-causing virus. INRA's research director for plant sciences, Guy Riba, voiced the opinion of most researchers: "Surely scientists have a responsibility to carry out these experiments with a view to the future, even in the face of current public opposition?"

INRA met strong opposition to the trials because of the cultural significance of wine in France. A group of wine producers, including some prestigious Châteaux, had signed a petition in June 2000 calling for a moratorium on the use of GM techniques in wine production, and joined forces to create the non-governmental organisation Terre et Vin du Monde (Land and Wine of the World).

In response, INRA asked a group of social scientists who specialize in science and technology studies to organize a public consultation, in which we took leading

roles. Our goal was to produce a public report to be taken into account in decision-making at INRA.

Our working group comprised 14 people, including members of the public, wine growers and researchers. They had seven days of intensive discussions over a six-month period in 2002. The set of recommendations they produced was made freely available on the web. The INRA directorate prepared a public response explaining the decisions it



intended to take and how these would accommodate the group's recommendations.

One outcome of the discussions was the creation of a local steering committee to follow up and give feedback on the field experiments taking place in Colmar, a town in the Alsace region of France. This committee has since grown into a forum for debate on various research options to fight vine viruses.

The experiment was highly productive. It yielded some unexpected recommendations that could be worked into the decision-making process. Some of the participants opposed the field trial at all costs but most supported it under strict conditions, including that INRA guaranteed that the trials would be used only for research, not for commercial purposes; that a local committee would be in charge of monitoring the experiment; and that INRA would

commit to exploring alternative ways to fight viruses. Appropriately, it was not a smooth process, either within the group during deliberation, or in implementing the agreement.

Researchers at INRA criticized the public consultation process for its power to reduce the freedom of research. Non-governmental organizations claimed that INRA was manipulating public opinion through the exercise. These tensions are an unavoidable part of the process.

Three important lessons emerged from the exercise. First, midstream engagement is not a recipe for wide social agreement and acceptance. Rather, it improves the robustness of decisions by taking into account the diversity of worldviews and interests. Second, it stimulates institutional learning. Third, the process can produce research and development options not previously considered. This is of particular value if directors of public research are truly committed to generating beneficial sociotechnical innovation.

Public consultations in science and technology should be undertaken at a point early enough in the development process when it is still feasible to change course. The nanotechnology world often refers to 'the lessons to be learned from GM' — the main one is timely, considered public engagement.

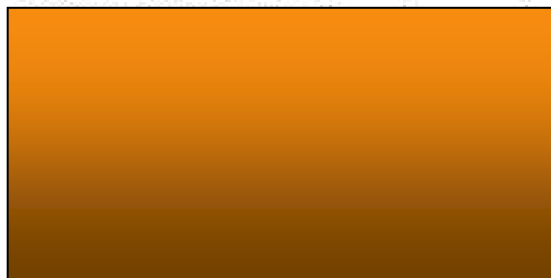
Pierre-Benoît Joly is director of research at INRA, 65 Boulevard de Brandebourg, F-94205 Ivry, France, and director of the TSV (Social and Political Transformations related to Life Sciences) research unit. Arle Rip is assistant professor of philosophy of science and technology at the University of Twente in Enschede, The Netherlands, and leads a programme on social and ethical aspects of nanotechnology.

For more essays and information see <http://nature.com/nature/essays/index.html>.

Correction
In the Essay 'Big lessons for a healthy future' (Nature 449, 791–792; 2007) the conversion of 68.5 billion should have read US\$93 billion, not million.



intended to take and how these would accommodate the group's recommendations.



The experiment was highly productive. It yielded some unexpected recommendations that could be worked into the

ESSAY



Équipe « Virologie & Vection » UMR 1131 Colmar



INRA

UNIVERSITÉ DE STRASBOURG

Transgénèse vigne ; résistance au court-noué

Responsable du projet : Olivier Lemaire



Résistance dérivée du pathogène : nouvelles stratégies, évaluation, impact, supresseurs, mécanisme, ...



INRA Colmar

Perm.

Emmanuelle Vigne (AI), Véronique Komar (TR), Gérard Demangeat (IR), Aurélie Marmonier (AI), **X (TR-2009)**



Chercheur associé

Laure Valat (MC mise à disposition sept 2007-sept 2009)

Post-doc
CDD

Post doc SPE **Valérie Goldschmidt** (2007-2008)
CDD SPE/ANR Caroline Hemmer



INRA Colmar

Coll.

INRA Colmar (**Jean Masson**)
IBMP Strasbourg (équipes Ritzenthaler, Voinnet)



Contrats,
actions
incitatives,
réseau

CLS, ANR, SPE, ResistVir, gpe porte-greffe...



INRA Colmar